



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Titulación:

Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Mención:

Explotaciones Agropecuarias

Título del trabajo:

Estudio sobre las anomalías morfológicas de los
espermatozoides en zánganos de *Apis mellifera*
iberiensis.

English title:

Study on sperm morphological anomalies in
Apis mellifera iberiensis drones.

Autor/es

Daniel Casalé Hernández

Director/es

Jesús Yániz Pérez de Albéniz

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
Año 2023

Yo, Daniel Casalé Hernández declaro que el Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición y defensa es original y todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

Firma:

Fecha:28/11/2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Daniel Casalé Hernández', written in a cursive style.

Daniel Casalé Hernández.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Jesús Yániz Pérez de Albéniz por proponerme la temática del actual Trabajo, por ofrecerme la posibilidad de participar en este proyecto, así como por su dirección, ayuda y guiado en el trabajo.

A Matías y Miryam por su apoyo y sonrisa día tras día en el laboratorio.

A mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de la realización de este Trabajo y los años de estudios. Vuestra constante motivación, comprensión y aliento fueron pilares fundamentales en este camino académico. Gracias por ser mi red de apoyo, por alentarme a seguir adelante y por creer en mí en todo momento.

A mi pareja por su constante ánimo, comprensión y paciencia, que fueron fundamentales y me brindaron la fuerza y la motivación necesarias para completar este proyecto.

De igual manera, agradecer el apoyo de amigos, compañeros y profesores en todo lo acontecido durante estos años de estudios en la Escuela Politécnica Superior de Huesca.

Índice

Índice De Figuras	7
Índice De Tablas	8
RESUMÉN	9
ABSTRACT.....	11
1.Introducción.....	1
1.1 Importancia de las abejas melíferas	1
1.2. El declive de las abejas y sus causas.	2
1.3. La calidad del semen en abejas melíferas.....	5
2. Justificación y Objetivos	12
3. Materiales y métodos.....	14
3.1. Recolección de los zánganos.....	14
3.2. Mantenimiento de los zánganos en el laboratorio	14
3.3. Captura y almacenamiento de las reinas.	15
3.4. Recolección de semen	15
3.5. Diseño experimental.....	17
3.5.1. Estudio 1. Caracterización morfológica de espermatozoides de zánganos maduros y reinas jóvenes.....	17
3.5.2. Estudio 2. Efecto del procesado	19
3.5.3. Estudio 3. Efecto del mantenimiento del semen a temperatura ambiente sobre la incidencia de morfoanomalías espermáticas	20
3.5.4. Estudio 4. Efecto de la criopreservación de semen en la incidencia de morfoanomalías espermáticas	20
3.5. Análisis estadístico	20
4.Resultados y Discusión.....	22
4.1. Estudio 1. Caracterización morfológica de espermatozoides de zánganos maduros y reinas jóvenes.....	22
4.2. Estudio 2. Efecto del procesado.	26
4.3. Estudio 3. Efecto del mantenimiento del semen a temperatura ambiente sobre la incidencia de morfoanomalías espermáticas.....	28
4.4. Estudio 4. Efecto de la criopreservación de semen en la incidencia de morfoanomalías espermáticas.....	29
6.Conclusiones.	33
BIBLIOGRAFIA	35

Índice De Figuras:

Figura 1. Tipos de castas en <i>Apis mellifera</i> . Fuente: Enciclopedia Britanica, Infoc. (2006).....	4
Figura 2. Espermateca abeja reina sobre un vial de 1,5 ml (izquierda) y en el abdomen de la reina (derecha).....	5
Figura 3. Imagen combinada de contraste de fases y fluorescencia (Hoechst) de un espermatozoide de abeja que muestra el acrosoma (a), el núcleo (b) y el flagelo (c). Barra de escala = 10 μ m. Fuente: (Yániz , <i>et al.</i> , 2020).	6
Figura 4. Jaulas (izquierda) y alimentadores (derecha).....	14
Figura 5. Cámara controlada de almacenamiento de zánganos.....	15
Figura 6. Utensilios utilizados para la recolección del semen.	16
Figura 7. Extracción de semen mediante capilar.....	16
Figura 8. Fotograma de una secuencia de vídeo para el estudio de la movilidad espermática en zánganos.	18
Figura 9. Imagen de microscopía de fluorescencia en la que se aprecian espermatozoides teñidos de rojo (muertos) y de verde (vivos).	19
Figura 10. Anomalías espermáticas: a) Espermatozoide normal b) Con cabeza doblada, c) Sin acrosoma, d) Enrollado, e) Deshilachado, f) Doblado y g) Roto.	23

Índice De Tablas:

Tabla 1. Resultados calidad espermática (media \pm DE) de las muestras de semen de los eyaculados de zánganos maduros.	24
Tabla 2. Correlación de Pearson (r) entre las muestras en fresco y su movilidad y viabilidad.	24
Tabla 3. Parámetros de calidad seminal (media \pm DE) de las muestras procedentes de las espermatecas de reinas jóvenes.	25
Tabla 4. Parámetros de calidad seminal (media \pm DE) de las muestras procedentes de los métodos de procesamiento.	27
Tabla 5. Parámetros de calidad seminal (media \pm DE) de las muestras procedentes del almacenamiento de semen a 22°C.	29
Tabla 6. Parámetros de calidad seminal (media \pm DE) de las muestras sometidas al proceso de congelación-descongelación.....	30

RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar los tipos de morfoanomalías del espermatozoide en *Apis mellifera* y establecer un protocolo estandarizado para evaluar la morfología del espermatozoide en esta especie. Además, el estudio tuvo como objetivos analizar las anomalías morfológicas de los espermatozoides presentes en el semen de zánganos maduros y en la espermateca de reinas jóvenes en abejas melíferas, así como investigar el impacto de las técnicas de procesamiento y almacenamiento del semen en la incidencia de anomalías espermáticas. Se llevaron a cabo cuatro estudios. El primer estudio se diseñó para caracterizar las morfoanomalías espermáticas en muestras de semen fresco de eyaculados y espermatecas en abejas melíferas. El segundo estudio se diseñó para analizar la influencia de las técnicas de frotis y secado al aire en la aparición de anomalías morfológicas de los espermatozoides. En el tercer y cuarto estudio se evaluó el efecto de la conservación del semen a temperatura ambiente y de la criopreservación, respectivamente. En conclusión, el método utilizado permitió una estimación fiable de las morfoanomalías espermáticas en abejas melíferas y detectar el efecto del procesado y el almacenamiento del semen sobre las mismas. Este protocolo puede ser de utilidad para mejorar los protocolos de conservación de semen en esta especie.

Palabras clave

Apis mellifera; macho; reproducción; semen; calidad espermática; criopreservación; abeja reina; espermateca.

ABSTRACT

The main objective of this study was to characterize the types of sperm morphoanomalies in *Apis mellifera* and to establish a standardized protocol to evaluate sperm morphology in this species. In addition, the study aimed to analyze the morphological anomalies of sperm present in the semen of mature drones and in the spermatheca of young queens in honey bees, as well as to investigate the impact of semen processing and storage techniques on the incidence of sperm abnormalities. Four studies were carried out. The first study was designed to characterize sperm morphoanomalies in fresh semen samples from ejaculates and spermathecae in honey bees. The second study was designed to analyze the influence of smear and air-drying techniques on the appearance of morphological sperm abnormalities. In the third and fourth studies, the effect of semen conservation at room temperature and cryopreservation was evaluated, respectively. In conclusion, the method used allowed a reliable estimation of sperm morphoanomalies in honey bees and detected the effect of semen processing and storage on them. This protocol may be useful to improve semen conservation protocols in this species.

Key words

Apis mellifera; male; reproduction; semen; sperm quality; cryopreservation; queen bee; sperm

1.Introducción

1.1 Importancia de las abejas melíferas

El papel crucial de las abejas melíferas como polinizadores eficientes es de suma importancia en la agricultura este se considera un servicio ecosistémico clave. Las abejas melíferas, principalmente *Apis melífera*, siguen siendo los polinizadores económicamente más valiosos de los monocultivos, de cultivos en todo el mundo (Klein.,2007). Entre los polinizadores controlados la abeja melífera es claramente un elemento clave debido a que la polinización de muchos cultivos en la mayor parte del mundo depende de esta especie (Dainat, *et al.*, 2012). Además, aportan importantes trabajos de polinización en cultivos comerciales y en muchos hábitats naturales en todo el mundo. La mayor parte de la polinización animal, quizás el 80%, es la realizada por las abejas melíferas (Montesinos, 2014).

Para cultivos europeos, Williams (1994) evaluó las necesidades de polinizadores para 264 especies de cultivos en el continente y determinó que la producción del 84% de estos cultivos estudiados depende, al menos en cierta medida, de la polinización (Klein.,2007).

La polinización animal es importante para la reproducción sexual de muchos cultivos, además de las plantas silvestres, que también pueden ser importantes para proporcionar calorías y micronutrientes a los humanos (Sundriyal y Sundriyal.,2004). La disminución de las especies polinizadoras puede conducir también a la disminución de las especies de las plantas (Biesmeijer, *et al.*, 2006).

Hay otros autores que estudian la situación desde un punto de vista diferente a los anteriores, considerando que la polinización no es un factor tan importante para la alimentación humana ya que, según las estimaciones, aproximadamente el 35% del consumo humano de alimentos depende directa o indirectamente de la polinización mediada por insectos, pero el 60% de la producción global proviene de cultivos que no dependen de la polinización animal y el 5% no están evaluados (Delaplane y Mayer 2000; Klein. , *et al.*,2007). Por lo tanto, los principales aportes calóricos de la dieta humana provienen de pocos alimentos básicos de gran producción mundial donde la polinización es un factor irrelevante para su producción (Richards, 2001; Ghazoul, 2005). Sin embargo, esta es una reducción muy simplista, ya que obviamente la dieta es algo mucho más complejo y variado que un simple aporte calórico, y la polinización

juega un papel fundamental en asegurar una dieta variada y equilibrada.

1.2. El declive de las abejas y sus causas.

A pesar de su importancia, las abejas melíferas han experimentado un declive en las últimas décadas debido a numerosos factores, tanto bióticos como abióticos, solos o en combinación. Entre los factores bióticos tenemos los patógenos, de los que los más frecuentes en las abejas y que más mortalidad están causando en España son; Loque, *Varroa destructor* (provoca Varroasis), pollo escayolado o cría calcárea (provoca Ascoferosis), *Nosema apis* (provoca Nosemosis), y diversos virus, entre otras. De todos los patógenos nombrados es *Varroa destructor* el que más muertes está provocando en los últimos años. Esta enfermedad se considera la causa más importante de pérdidas de las abejas. Además, se ha demostrado que tanto *Varroa destructor* como los patógenos asociados a esta enfermedad pueden afectar al sistema inmunológico de las abejas (Dainat, *et al.*, 2012). Además de estos, son numerosos los causantes de la pérdida de las abejas como animales invasores (*Vespa velutina*, *Vespa orientalis*, *Aethina tumida*), plaguicidas, cambio climático y contaminación ambiental, cultivos modificados genéticamente (Hristov, *et al.*, 2020), etc. Algunos insecticidas con efectos neurotóxicos pueden provocar efectos letales y subletales (Soderlund, *et al.*, 1989), además de efectos negativos en la reproducción de la colmena (Koeniger y Koeniger, 2000). Muchos de estos factores son causa de estrés, lo que debilita a las abejas potenciando sus efectos negativos (Alaux, *et al.*, 2010).

Un fenómeno que está sucediendo en las últimas décadas es conocido como Colony Collapse Disorder (CCD) o síndrome de despoblamiento de colmenas (SDC), en el que se observa una disminución de las abejas dentro de las colmenas sin causa aparente, cuyo origen es probablemente multifactorial. Este fenómeno se produce mayoritariamente durante los inviernos. La mortalidad media de las colonias en Europa se sitúa en torno al 20% anual, llegando a superar el 50% en algunos países en años concretos (Yániz, *et al.*, 2016). En una revisión sobre el estado de las colmenas se estimó con datos de la FAO que las pérdidas desde 1961 a 2007 fueron de 26.5% en Europa y hasta de 49.5% en EE. UU. causados por el SCD (VanEngelsdorp y Meixner, 2010).

Aunque se cree que estos fenómenos tienen un origen multifactorial, se piensa

que la falta de diversidad genética puede jugar un papel relevante. En la mayor parte de los países desarrollados la industrialización de la apicultura ha provocado esta disminución de la diversidad genética debido a que los apicultores de todo el mundo prefieren el mismo tipo de abeja: mansa, trabajadora y buena para vivir en colmenas hechas por el hombre (Yániz, *et al.*, 2016). La consiguiente disminución de la diversidad genética reduce el potencial de la abeja para evolucionar en respuesta al cambio del ambiente (Coroian, *et al.*, 2014), y provoca una mayor vulnerabilidad de las abejas frente a los pesticidas y enfermedades, siendo estos elementos determinantes en el SDC.

Otra causa importante de mortalidad de las colonias es la muerte o pérdida de funcionalidad de la reina. La abeja reina desempeña un papel fundamental en el éxito de la colonia ya que es la única hembra fértil de la colonia y la única que puede asegurar la supervivencia y la reproducción de esta. Además, la reina libera una serie de feromonas que ayudan a las abejas obreras a identificarla y preservar la jerarquía de la colonia. Por lo tanto, sus funciones principales son la producción de huevos y el mantenimiento de la cohesión de la colonia. De la calidad de la reina depende en buena medida el desempeño de la colonia puesto que una buena reina pondrá muchos huevos, de los que nacerán muchas obreras que producirán más miel.

La reina es la madre de todas las obreras de la colonia, que reciben la mitad de los genes de ésta y la otra mitad de los zánganos que la han fecundado. Los principales caracteres valorados por los apicultores son: la producción de miel, la resistencia a enfermedades, la mansedumbre y la baja tendencia a la enjambrazón, entre otros. Existe una sola reina en la colmena, aunque puede que en un periodo de remplazo de esta coincidan dos a la vez (la madre y la hija). Una buena reina pone entre 1,500 y 2,000 huevos al día, y una reina puede ovopositar satisfactoriamente durante dos o tres años. La duración de su vida depende de factores genéticos, así como de la eficiencia de su fecundación, las condiciones en las que haya sido criada y la totalidad de huevos producidos (Martínez- Puc, *et al.*, 2017).



Figura 1. Tipos de castas en *Apis mellifera*. Fuente: Enciclopedia Britanica, Inf. (2006).

La importancia de la abeja reina exige un mínimo de calidad de esta para asegurar el éxito de la colonia. La calidad de la reina no solo depende de su potencial reproductivo, sino también de la calidad de su apareamiento, que determina el número de espermatozoides almacenados en la espermateca. Si el número es bajo, la reina pondrá huevos sin fecundar, de los que nacerán zánganos, mermando la capacidad productiva de la colonia (Schluns, 2005). Si la reina es inseminada con menos del 46% de espermatozoides vivos, tiene una alta probabilidad de ser ponedora de zánganos y de almacenar menos espermatozoides en la espermateca (Collins, 2004).

Las abejas reinas son poliándricas, se aparean en vuelo con un total de 10-20 zánganos (Tarpy y Nielsen, 2002). Realizan una o varias salidas de orientación seguidas de uno o varios vuelos de apareamiento (vuelo nupcial), (Jean-Prost y Le Conte 2007). En el vuelo nupcial es cuando los zánganos pasan sus espermatozoides a la reina virgen y estos pasan a la espermateca de la reina (Figura 2), donde quedan almacenados. Allí son nutridos, pudiendo continuar viables durante varios años. Posteriormente serán utilizados en la fecundación de los huevos que darán origen a las obreras y a una reina nueva en el momento que sea necesario. Dado el comportamiento poliándrico, adquieren especial relevancia los métodos de reproducción artificial como puede ser la inseminación artificial, que es el único método que permite el control completo de los apareamientos y por lo tanto la genética de ambos parentales.

La mala calidad del semen puede influir en el éxito reproductivo de la reina, la producción y supervivencia de la colonia y la eficacia de las técnicas de inseminación artificial. Dado que la reina almacenara entre 4.5 y 5.7 millones de espermatozoides

procedentes de aproximadamente una docena de zánganos (Gontarz, *et al.*, 2016) en la espermateca durante varios años (6,7), el estudio de la calidad del semen en esta especie adquiere una especial relevancia. La mala calidad del semen genera reinas de peor calidad. Los problemas con las reinas se sitúan entre las principales causas de pérdidas de las colonias (Tarp y Olivarez, 2014).



Figura 2. Espermateca abeja reina sobre un vial de 1,5 ml (izquierda) y en el abdomen de la reina (derecha).

1.3. La calidad del semen en abejas melíferas

Los espermatozoides de los zánganos son células largas y filamentosas con extremos cónicos tienen una longitud aproximada de 250-270 μm (Lino-Neto, *et al.*, 2000). La ultraestructura de los espermatozoides ha sido objeto de estudios taxonómicos y estudios filogenéticos de varios grupos de animales incluidos los insectos (Lino-Neto, *et al.*, 2000). Están formados por una sección de la cabeza que es relativamente pequeña y angosta, con unas dimensiones de aproximadamente 10 μm de longitud y 0,4–0,5 μm de ancho. Esta sección de la cabeza está conectada al centriolo de transición y al flagelo. La cabeza del espermatozoide mide 8-10 μm (Power, *et al.*, 2019) y consta de dos partes consecutivas de tamaño similar: primero, encontramos el complejo acrosómico, seguido por un núcleo en forma lineal (Yániz, *et al.*, 2020). El complejo acrosomal está compuesto por una vesícula en forma de cono, dentro de la cual se encuentra el perforatorio, que se extiende desde una hendidura profunda en la punta nuclear anterior (Lino-Neto, *et al.*, 2000). El flagelo del espermatozoide se compone de un axonema con un patrón microtubular 9+9+2, dos grandes derivados mitocondriales y dos estructuras accesorias alargadas. Estos derivados mitocondriales, de desigual longitud y diámetro, se sitúan en paralelo al

axonema a lo largo de todo el flagelo espermático. Los dos cuerpos accesorios son estructuras alargadas que se encuentran entre el axonema y cada uno de los derivados mitocondriales (Yániz, *et al.*, 2020).



Figura 3. Imagen combinada de contraste de fases y fluorescencia (Hoechst) de un espermatozoide de abeja que muestra el acrosoma (a), el núcleo (b) y el flagelo (c). Barra de escala = 10 μ m.

Fuente: (Yániz, *et al.*, 2020).

Una mala calidad seminal puede comprometer el éxito reproductivo de la reina y en consecuencia la supervivencia y el nivel de productividad de la colmena (Yániz, *et al.*, 2020). Según Collins, (2000) la presencia de espermatozoides en la espermateca no significa que estén vivos. Hay estudios que detectan la presencia de un bajo número de espermatozoides en las espermatecas de las reinas criadas comercialmente (Rhodes, *et al.*, 2011). Esto podría deberse a la presencia de un número bajo de zánganos con la edad madura para producir semen, o a la existencia de suficientes zánganos maduros, pero con insuficiente producción de semen de calidad o una combinación de ambos sucesos (Rhodes, *et al.*, 2011). Cuando el número de espermatozoides viables en la espermateca es bajo, aumenta la puesta de huevos sin fecundar (zánganos). Como se ha descrito anteriormente, las reinas inseminadas con menos del 46% de espermatozoides vivos tienen una alta probabilidad de almacenar menos espermatozoides en la espermateca y acabar siendo ponedoras de zánganos (Collins, 2004).

El estudio de la calidad del semen de los zánganos también tiene interés en

investigación. Numerosos factores pueden condicionar la calidad del semen en esta especie. Entre ellos se ha analizado el efecto de la edad, el tamaño corporal, la genética, la temperatura, la nutrición, el manejo, variaciones estacionales, enfermedades, insecticidas, acaricidas, almacenamiento de semen en estado líquido y congelado, manipulación de semen, competencia de espermatozoides y fisiología (Yániz, *et al.*, 2020). Algunos estudios han asociado la mala calidad del semen producido por los zánganos a la edad de estos, ya que los espermatozoides de los zánganos viejos son menos viables, aunque su motilidad no cambia (Locke y Peng, 1993, Stürup, 2013). Por otro lado, la viabilidad del semen producido por zánganos mantenidos después de la emergencia a temperaturas más altas es menor (Bieńkowska, *et al.*, 2011).

Según Bratu, *et al.*, (2022) el incremento en la masa corporal de los zánganos de las abejas melíferas se asocia con una elevada concentración de espermatozoides en cada eyaculado, así como un aumento en la cantidad total de espermatozoides. Sin embargo, este aumento en el tamaño de los zánganos también está relacionado con un incremento en la proporción de espermatozoides que presentan morfología anormal (Czakońska y Tofilski., 2020; Bieńkowska, *et al.*, 2011).

A continuación, se resumirá brevemente las técnicas relacionadas con la evaluación de la calidad del semen en la abeja melífera.

1.3.1. Recolección del semen

En las últimas décadas la eyaculación inducida ha sido el principal método utilizado para recolectar muestras de semen, la eyaculación del semen de zángano normalmente se induce aplicando presión en el tórax y el abdomen (Yániz, *et al.*, 2020). El semen se recoge directamente de la punta del endofalo evertido utilizando un capilar (Cobey, *et al.*, 2013).

1.3.2. Volumen de semen

El volumen del semen producido por cada zángano es de aproximadamente de 1 μL , con un rango de entre 0.1 y 2.4 μL (Yániz, *et al.*, 2020). Entre los factores que posiblemente influyan en el volumen recolectado por cada zángano, se han descrito los efectos de la edad, el peso corporal, la estación y la línea reproductiva (Rhodes, *et al.*, 2011; Gencer, *et al.*, 2011; Czakońska, *et al.*, 2013). Sin embargo, el incremento del peso también puede aumentar el porcentaje de anomalías (Bratu, *et al.*, 2022), y según Czakońska (2013) se obtiene menor porcentaje de espermatozoides viables en

zánganos jóvenes.

1.3.3. Concentración espermática

La concentración espermática es uno de los parámetros más estudiadas en la calidad del semen de zángano, lo que ha permitido evaluar el proceso de espermatogénesis y la madurez sexual de los zánganos (Yániz, *et al.*, 2020). El método más empleado para evaluar la concentración de los espermatozoides de los zánganos es el recuento manual bajo microscopio con la ayuda de un hemocitometro. Sin embargo, este método es tedioso, requiere mucho tiempo y es difícil debido a la obtención de resultados con una gran variedad, lo que puede resultar en la acumulación de espermatozoides y su mala dispersión en las cámaras de los hemocitometros (Rhodes, *et al.*, 2011; Koeniger, *et al.*, 2005; Collins, *et al.*, 2005; Ciereszko, *et al.*, 2017). En las demás especies es frecuente usar espectrofotómetros para determinar la concentración del semen, aunque apenas se han estudiado para su uso en las abejas (Yániz, *et al.*, 2020). Aunque Collins (2005) determino que mediante un espectrofotómetro con una longitud de onda de 260 a 550 nm ya se encontraba una correlación significativa entre el recuento de espermatozoides y la absorbancia, Ciereszko (2017) demostró que usando el espectrofotómetro en esta especie usando una longitud de onda de 600nm en lugar de 550nm, proporciona una estimación más precisa de la concentración espermática. Otras tecnologías utilizadas para determinar la concentración espermática en mamíferos basadas en análisis con sistemas computarizados no se han utilizado debido a la particular morfología de los espermatozoides en esta especie, sin una cabeza prominente. Por lo tanto, el uso del análisis de imágenes automatizado resulta complicado, aunque si se combina con microscopia de fluorescencia, se podría conseguir una identificación rápida y precisa (Yániz, *et al.*, 2020).

1.3.4. Movilidad de los espermatozoides.

Aunque no es uno de los parámetros más utilizados para el estudio de la calidad del semen en mamíferos (Yániz, *et al.*, 2018), se ha estudiado en pocas ocasiones en abejas (Yániz, *et al.*, 2019). La movilidad espermática refleja tanto la eficacia energética como la calidad del aparato de motilidad (Ciereszko, *et al.*, 2017). Además, es una condición necesaria para la migración de los espermatozoides a la espermateca de la abeja reina y para su posterior fertilización del ovulo (Yániz, *et al.*, 2020). Wegener *et al.* (2012) obtuvo una evidente correlación entre la movilidad espermática y los resultados reproductivos de reinas inseminadas. En los estudios más recientes, la motilidad de los

espermatozoides se ha expresado con mayor frecuencia como porcentaje de células móviles, con algunos indicadores ocasionales del tipo de movimiento (Ciereszk, *et al.*, 2017; Wegener, *et al.*, 2012; Alcay, *et al.*, 2019; Yániz, *et al.*, 2019). Los espermatozoides se pueden clasificar como espermatozoides móviles en el caso de que presenten algún tipo de movimiento activo, libremente móviles si la cabeza del espermatozoide muestra desplazamiento y espermatozoides circulares si la cabeza y la cola se superponen (Yániz, *et al.*, 2019). El método más utilizado para el estudio de la motilidad en el caso del semen de zángano es el uso de porta y cubreobjetos, con o sin incubación de la muestra antes o después de cargarla en la cámara. (Yániz, *et al.*, 2020).

1.3.5. Integridad de la membrana plasmática.

Este es uno de los parámetros más evaluados en el análisis de la calidad del semen de *Apis mellifera* ya que la pérdida de la integridad de esta membrana se considera incompatible con la viabilidad del espermatozoide (Yániz, *et al.*, 2013). Esta es esencial para el metabolismo de los espermatozoides y juega un papel importante su fusión con los oocitos, por lo que es de vital importancia para poder llevar a cabo correctamente la fusión de los espermatozoides con los ovocitos. Los métodos utilizados para conocer el estado de esta membrana se basan en el aumento de la permeabilidad de las membranas dañadas a diferente sustancia como son tinciones o sondas fluorescentes (Yániz, *et al.*, 2020). Una estrategia alternativa es el uso de soluciones hipo-osmóticas (prueba de hinchazón hipo-osmótica HOST desarrollada por Jeyendran *et al.* (1984)). Esta técnica se basa en la semi-permeabilidad de la membrana celular, que en el caso de que permanezca intacta producirá una hinchazón en condiciones hipo-osmóticas, esta hinchazón indica que el transporte de agua a través de las membranas se produce normalmente y se mantiene la integridad de la membrana (Lomeo y Giambersio., 1991). La técnica HOST se ha utilizado eficazmente para evaluar la integridad funcional del espermatozoide de los mamíferos y las abejas melíferas (Nur, *et al.*, 2012). Existen otros métodos que también se han utilizado en la abeja melífera basados en la permeabilidad selectiva a ciertos fluorocromos o tinciones (Yániz, *et al.*, 2020).

1.3.6. Morfología del espermatozoide

Ocasionalmente en el estudio morfológico de espermatozoide de zánganos se han descrito diferentes formas aberrantes de cola, incluidas formas enrolladas, deshilachadas, de doble extremo, fragmentadas y cortas (Lodesani, *et al.*, 2004; Bratu, *et al.*, 2022; Power, *et al.*, 2019; Alcay, *et al.*, 2019). Con respecto a la morfometría del

espermatozoide, la longitud total y detallada del mismo también se ha incluido en ocasiones como rasgo propio de la calidad mostrando diferencias significativas entre el comienzo y el final de la temporada apícola (Yániz, *et al.*, 2020).

1.3.7. Integridad del acrosoma

La integridad de acrosoma en espermatozoides generalmente se evalúa utilizando lectinas marcadas con fluorescencia, proteínas vegetales que se unen específicamente a algunas glicoproteínas acrosómicas. En la abeja melífera el único estudio que llevo a cabo este proceso utilizo para la tinción con la lectina *Pisum sativum* agglutinin, considerándose que los acrosomas fluorescentes estaban dañados y los acrosomas no teñidos como intactos (Alcay, *et al.*, 2019).

1.3.8. Función mitocondrial del espermatozoide

Los espermatozoides necesitan energía a para poder llevar a cabo sus funciones, está la consigue del ATP, que a su vez lo consiguen a través de vías glucolíticas citoplasmática (glucolisis anaeróbico) y de fosforilación oxidativa (OXPHOS) mitocondrial (Moscatelli, *et al.*,2017). Cada vez hay más evidencias de que las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la regulación de la función y esperanza de vida de los espermatozoides, al menos en los mamíferos, para los cuales la evaluación de la función mitocondrial es un aspecto muy relevante dentro del espermiograma (Yániz, *et al.*, 2020).

1.3.9. Fragmentación del ADN

Debido a la importancia de una transmisión precisa de la información genética a la descendencia, se han desarrollado varios métodos para detectar el ADN dañado en el espermatozoide (Cordelli, *et al.*,2017). Estos métodos se basan en el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) que utiliza un tinte naranja de acridina y se basa en alta sensibilidad de la cromatina anormal a la desnaturalización inducida del ADN, y la técnica de marcado del extremo de la transferasa terminal dUTP (TUNEL) (Dolník, *et al.*,2017). La técnica TUNEL se ha utilizado en abejas para cuantificar la rotura del ADN causada por el proceso de criopreservación, aunque no se observó un aumento claro en comparación con las muestras en fresco (Borsuk, *et al.*,2018).

1.3.10. Respuesta al estrés inducido

Se trata de la respuesta de los espermatozoides a varios tipos de estrés como el estrés térmico, oxidativo u osmótico (Yániz, *et al.*, 2020).

1.3.11. Ensayos bioquímicos

Estos también se utilizan para determinar la calidad espermática de la abeja. Para ello se utilizan ocasionalmente ensayos como la cuantificación del contenido de trifosfato de adenosina (ATP) (Abdelkader, *et al.*,2014; Kairo, *et al.*,2016) y de la pérdida de enzimas del citosol y las mitocondrias (Wegener, *et al.*,2012).

1.3.12. Evaluación multiparamétrica de la calidad del semen

La medición de múltiples parámetros de forma simultánea puede permitir el desarrollo de pruebas de calidad más sólidas y puede ampliar las posibilidades de investigación. Hoy en día pueden desarrollarse pruebas multiparamétricas como la citometría de flujo (Peña, *et al.*,2018) o fluorescentes multicanales (Yaniz, *et al.*,2017).

1.3.12. Contaminación del semen

Por último, la contaminación del semen mediante microorganismos debe de ser considerado como un aspecto importante de la calidad del semen dada su importancia en la preservación y fertilidad del semen y la posibilidad de transmisión de enfermedades e infecciones de la reina (Yaniz, *et al.*,2020).

2. Justificación y Objetivos

A diferencia de los mamíferos, en los que el estudio de la morfología espermática es un parámetro esencial del espermiograma, ha habido relativamente pocos estudios que haya examinado este aspecto en las abejas melíferas. En la práctica de laboratorio se han utilizado en la mayoría de los casos técnicas de tinción para analizar la morfología del espermatozoide (Collins, *et al.*, 1999; Lodesani, *et al.*, 2004; Gontarz, *et al.*, 2016). La ausencia de uniformidad en las técnicas de tinción empleadas para la evaluación puede ocasionar discrepancias en los resultados de los diferentes estudios.

A través de un estudio microscópico de los espermatozoides, se han descrito algunas anomalías morfológicas en espermatozoides de zángano como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la descripción resulta a menudo imprecisa e incompleta, por lo que se necesitan estudios adicionales para una mejor caracterización. También es necesario analizar el efecto del procesado y otros factores sobre la incidencia de anomalías espermáticas. En algunos trabajos se ha observado un aumento significativo de espermatozoides con doble cola en la época de primavera (Gontarz, *et al.*, 2016) mientras que otros relacionan la morfometría espermática con la estación (Morais, *et al.*, 2022).

Los métodos convencionales empleados en el estudio de la morfología del espermatozoide generalmente involucran varios pasos de preparación de la muestra, que incluyen dilución, extensión, fijación y tinción. Algunos de estos pasos pueden tener un efecto en la morfología del espermatozoide. Sin embargo, la importancia de este aspecto requiere una evaluación adicional en abejas. Por ello en este proyecto nos planteamos determinar una técnica adecuada y eficaz para la preparación de las muestras de semen destinadas al estudio de la morfología del espermatozoide. Este estudio puede ser importante para analizar las causas del declive de las abejas, lo que enlaza con una producción responsable de acuerdo con el Objetivo 12 de los ODS: Producción y consumo responsable.

Como ya se ha mencionado anteriormente las abejas melíferas han experimentado un declive en las últimas décadas debido a numerosos factores, tanto bióticos como abióticos. Este hecho resalta la urgencia de implementar estrategias destinadas a conservar la variabilidad genética de esta especie. Estas acciones son

complementarias a los programas existentes de mejora genética y se alinean con los propósitos del Objetivo 15 de los ODS: Vida de ecosistemas terrestres.

El objetivo general de este TFG fue caracterizar los tipos de morfoanomalías del espermatozoide en *Apis mellífera* y determinar el impacto de las técnicas de procesamiento y de la conservación del semen en la incidencia de estas morfoanomalías. Los objetivos específicos que nos planteamos en este proyecto son:

1. Desarrollar un protocolo de referencia para evaluar la morfología del espermatozoide en abejas melíferas.
2. Realizar una caracterización de las anomalías morfológicamente los espermatozoides presentes en el semen de zánganos maduros y en la espermateca de reinas jóvenes en abejas melíferas.
3. Analizar el efecto del procesado sobre la incidencia de anomalías morfológicas en zánganos de abejas melíferas.
4. Estudiar el efecto del mantenimiento del semen a temperatura ambiente sobre la incidencia de morfoanomalías espermáticas.
5. Evaluar el efecto de la criopreservación de semen en la incidencia de morfoanomalías espermáticas

3. Materiales y métodos

3.1. Recolección de los zánganos

Para la toma de muestras se recogieron zánganos de *A. m. iberiensis* durante los meses de mayo y junio del año 2023, en 15 colmenas pertenecientes a un apiario experimental localizado en Aniés (Huesca). Este apiario consta de 40 colmenas todas de la misma subespecie (*A. m. iberiensis*). Los zánganos se capturaron manualmente de la piquera en su regreso de un vuelo de apareamiento fallido, después de bloquear la entrada con una rejilla excluidora de reinas. Con este método nos aseguramos de que los zánganos recolectados fueran maduros, es decir que tuvieran al menos de 14 a 21 días después de su emergencia.

3.2. Mantenimiento de los zánganos en el laboratorio

Los zánganos se almacenaron en jaulas de metacrilato con rejillas de ventilación, y se mantuvieron en un incubador a 31.2°C hasta la extracción del semen (Figura 4), que sucedió dentro de los primeros 4 días tras su captura. Los zánganos se alimentaron con una mezcla de miel natural y agua, que se depositó en placas de 96 pocillos como se muestra en la Figura 3, para facilitar la alimentación y evitar la muerte de estos quedándose pegados en el alimento (Yániz, *et al.* 2023).



Figura 4. Jaulas (izquierda) y alimentadores (derecha).

Los zánganos se distribuyeron en diferentes jaulas, en cada una de las cuales se colocaron los de una misma colonia (Figura 5).



Figura 5. Cámara controlada de almacenamiento de zánganos.

3.3. Captura y almacenamiento de las reinas.

Las 6 abejas reinas utilizadas en este TGF se recolectaron directamente de los núcleos de fecundación a las 5 semanas tras su nacimiento y se almacenaron en jaulas de reinas junto a 6-8 abejas nodrizas y alimento en forma de pasta y se mantuvieron a 28 °C hasta su análisis.

3.4. Recolección de semen

La recolección de muestras de semen extraído de los zánganos se realizó provocando la eversión del endofalo. Este proceso consta de dos pasos: la eversión parcial y la eversión total. Para llevar a cabo una eversión parcial se colocaron los zánganos en una atmósfera saturada de cloroformo hasta que se observó la protusión de la primera porción del endofalo. La segunda eversión se indujo mediante presión en la zona abdominal, extremando las condiciones higiénicas.

Después de la eversión total del aparato copulador del zángano se llevó a cabo la exudación del semen. Para ello se utilizó una jeringa de inseminación (Peter Schley, Lich, Alemania; Figura 6) para recolectar el semen en un tubo capilar con un diámetro de aproximadamente de 1mm (Figura 7), que previamente se rellenó parcialmente con diluyente (Kiev) para mantener una aspiración regular en todo momento.

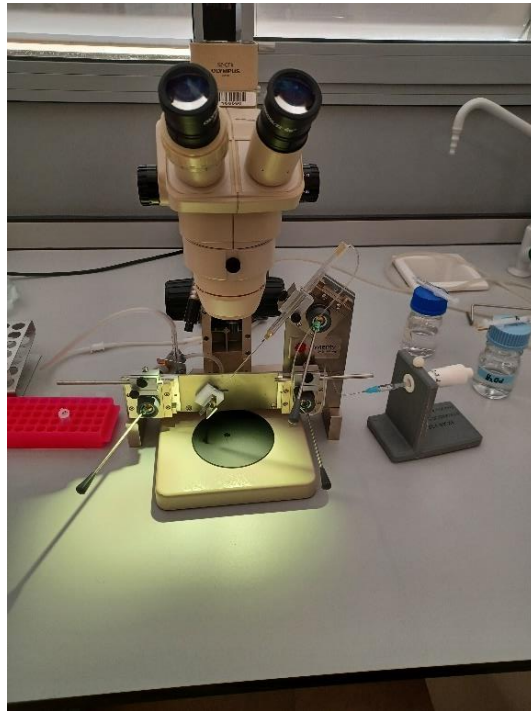


Figura 6. Utensilios utilizados para la recolección del semen.



Figura 7. Extracción de semen mediante capilar.

En las reinas, para la extracción del semen de la espermateca se sacrificó la reina y se fijó con agujas entomológicas a una placa de Petri rellena de parafina. Posteriormente se realizó una disección dorsal del abdomen, se localizó la espermateca bajo la lupa binocular y se extrajo mediante unas pinzas muy finas. Una vez extraída la espermateca se depositó en un tubo eppendorf con un 100 μ l de Kiev, se rompió cuidadosamente con las pinzas para liberar los espermatozoides del interior y se extrajo el tejido sobrante con las pinzas.

3.5. Diseño experimental

3.5.1. Estudio 1. Caracterización morfológica de espermatozoides de zánganos maduros y reinas jóvenes.

El primer estudio se diseñó para caracterizar las morfoanomalias espermáticas en el semen de las abejas melíferas, examinando si son compatibles con la movilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides y determinando su aparición en los eyaculados de zánganos de abejas melíferas sanos y maduros, y en la espermateca de reinas jóvenes.

La recogida de muestras se realizó de forma individual para cada zángano extrayendo la máxima cantidad posible de semen, se recolectó semen de 30 zánganos sanos de 15 colonias diferentes. Una vez recogidas las muestras, se depositó directamente cada eyaculado en tubos Eppendorf y se diluyeron en 100 μ l de Kiev-BSA manteniendo estos tubos en un termobloque a una temperatura constante de unos 37°C durante unos minutos previos a su análisis. El diluyente Kiev-BSA utilizado tenía la siguiente composición para 100 ml de disolución, con un pH de 8.1 y una osmolaridad de 385 mOsm: 2.43 g de citrato de SONa.2H₂O, 0.21g de NaHCO₃, 0.41g de KCL, 0.3g de C₆H₁₂O₆ y 2 g de BSA (Yániz, *et al.* 2019).

En las muestras provenientes de espermatecas de reinas jóvenes el semen se recolectó individualmente de 6 abejas reinas y se diluyo en 100 μ l de Kiev manteniendo de la misma forma los tubos Eppendorf en el termobloque. El diluyente Kiev utilizado contenía: 12,15 g de C₆H₅Na₃O₇ * 2 H₂O, 2,05 g de KCL, 1,50 g de D (+) C₆H₁₂O₆, 1,05 g de NaHCO₃ y hasta 500 ml con H₂O miliQ. Este medio tiene un pH de 8,4, y una osmolaridad de 388 mOsm.

La evaluación de la calidad espermática incluyó aspectos ya comentados anteriormente en el apartado de introducción: el análisis de la movilidad espermática, la integridad de la membrana plasmática y la morfología espermática.

En las muestras de movilidad se rediluyeron en Kiev-BSA hasta obtener una concentración de entre 5 y 15 millones de espermatozoides/ml, se colocaron 3 μ l de la disolución en una cámara de Makler y se mantuvo durante 5 minutos a una temperatura de 37°C (Yániz, *et al.*, 2019). A continuación, se grabaron secuencias de vídeo en diferentes campos microscópicos (Figura 8) mediante el uso de una cámara Basler ace USB3, cuyo control se llevó a cabo desde un ordenador equipado con el software

Pylon. El análisis de movilidad se realizó utilizando el programa CASABee (Yániz, *et al.*, 2023).

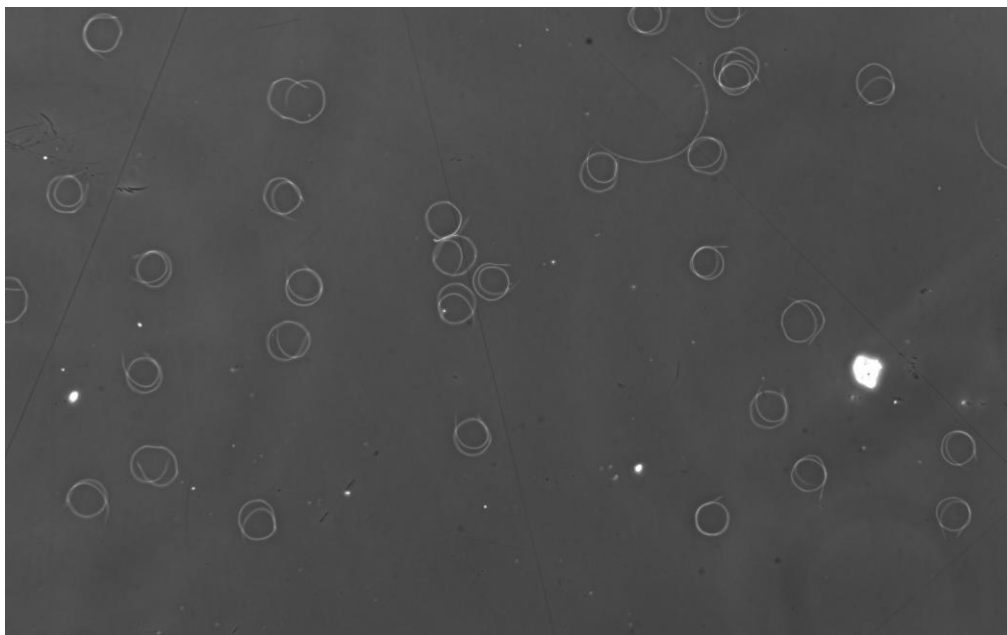


Figura 8. Fotograma de una secuencia de vídeo para el estudio de la movilidad espermática en zánganos.

Para el estudio de la morfoanomalías, se colocaron 5 μ l de la misma muestra empleada para la evaluación de la movilidad en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos por duplicado, y se observaron directamente con un microscopio de contraste de fases Olympus BX40 con un objetivo de 40X.

Para cada muestra individual se realizó una selección aleatoria de 200 espermatozoides y se realizó una evaluación visual con el fin de registrar y documentar cualquier anomalía morfológica. La clasificación de los espermatozoides en categorías morfológicas específicas se determinó a partir de un estudio previo de las muestras y estas categorías se describen en el apartado de resultados.

Para el análisis de la integridad de la membrana (viabilidad) se diluyó el semen en tampón Kiev antes de la evaluación. Se determinó la viabilidad espermática usando una combinación SYBR14-yoduro de propidio. Las muestras se incubaron en oscuridad a 35 °C durante 20 min y se procesaron y fotografiaron como se detalla en Yaniz *et al.* (2013). Se examinaron al menos 200 células por muestra utilizando el Software OpenCASA v2 (Yaniz, *et al.*, 2020b), que permitió diferenciar los espermatozoides vivos, con la cabeza verde, y los muertos, con la cabeza roja (Figura 9).

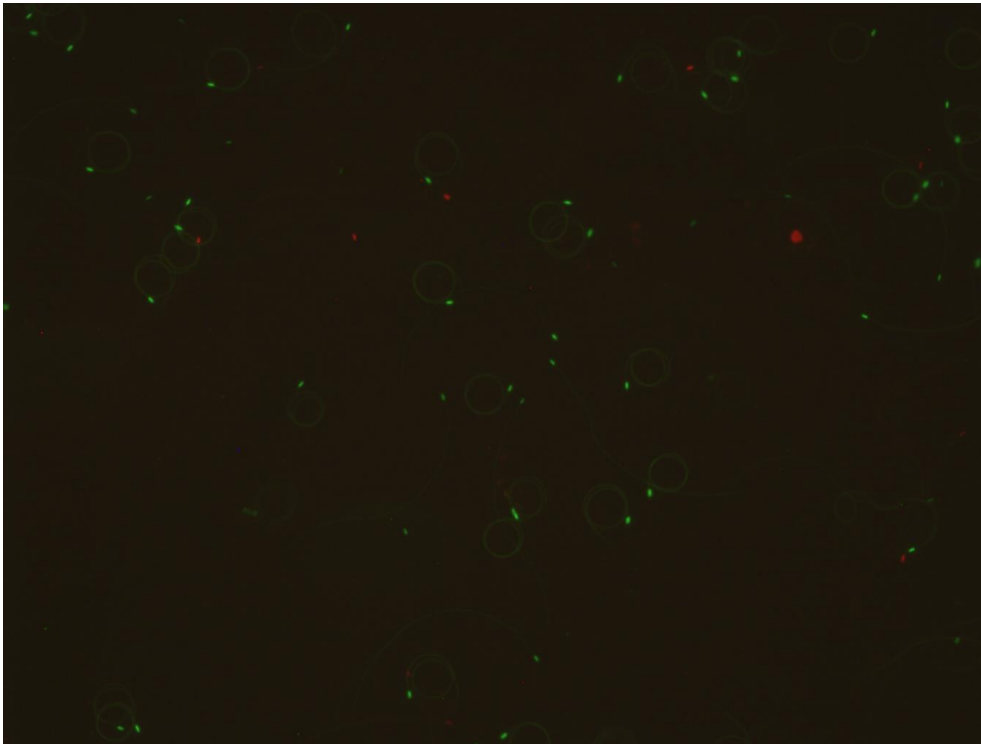


Figura 9. Imagen de microscopía de fluorescencia en la que se aprecian espermatozoides teñidos de rojo (muertos) y de verde (vivos).

3.5.2. Estudio 2. Efecto del procesado

El segundo estudio se llevó a cabo para evaluar el impacto de los tratamientos de preparación de frotis y de secado al aire en la aparición de morfoanomalias en los espermatozoides. En este caso la evaluación se llevó a cabo a partir de las mismas alícuotas utilizadas en el Estudio 1, diluidas en Kiev-BSA. Como control se utilizaron las muestras húmedas, siguiendo el procedimiento descrito en el Estudio 1. En el tratamiento de frotis se depositó una alícuota de 5 μ l de la muestra en el extremo del portaobjetos extendiendo la gota con el borde de otro portaobjetos. Posteriormente se dejaron secar al aire durante un mínimo de 2 horas y se analizaron sin ningún procesamiento adicional utilizando la misma configuración que en el Estudio 1. Para discriminar el posible efecto del secado al aire del posible daño físico durante la extensión del semen, en las muestras en fresco analizadas se retiró el cubreobjetos y se dejaron secar al aire sin modificación adicional hasta su observación directa al microscopio (grupo secado al aire).

3.5.3. Estudio 3. Efecto del mantenimiento del semen a temperatura ambiente sobre la incidencia de morfoanomalias espermáticas

El tercer estudio fue concebido para investigar el impacto del almacenamiento de semen a temperatura ambiente en la aparición de morfoanomalias en los espermatozoides. Este estudio se llevó a cabo con las mismas muestras de semen del Estudio 1. En este caso se diluyeron en 50 μ l de Kiev, y luego se mantuvieron a 22°C durante dos días. La calidad del espermatozoide que engloba la movilidad, la viabilidad y las morfoanomalias, se evaluó a las 0, 24 y 48 horas después de la extracción, utilizando las mismas metodologías empleadas que en el Estudio 1.

3.5.4. Estudio 4. Efecto de la criopreservación de semen en la incidencia de morfoanomalias espermáticas

En el último estudio se investigó el efecto de la criopreservación de semen de zánganos en la aparición de morfoanomalias espermáticas. En estas muestras se realizó un pool de eyaculados de 10 zánganos para cada muestra, obteniendo 12 muestras agrupadas. El eyaculado obtenido en cada muestra fue de alrededor de 1-3 μ l, esto se diluyó en 50 μ l de Kiev. Las doce muestras agrupadas se dividieron cada una en 3 disoluciones diferentes, la primera sirvió como control y las otras dos se diluyeron en Kiev con una concentración final de DMSO y yema de huevo del 10%. Una de estas muestras se utilizó para evaluar el efecto de la disolución utilizada sobre los espermatozoides y la otra se envasó en pajuelas de 0.25ml y se sometió a criopreservación mediante el protocolo descrito por Yániz, *et al.*, (2022). La evaluación de la calidad espermática de los tres tipos de muestras obtenidas se realizó utilizando los mismos métodos descritos en el Estudio 1.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete SPSS, versión 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se utilizaron como variables independientes los tratamientos (procesado, conservación en fresco y congelación) y como dependientes los parámetros de calidad seminal, incluyendo la presencia de morfoanomalias. Posteriormente se verificó la normalidad de las distribuciones y la homogeneidad de la varianza utilizando los métodos de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Para las variables con distribución normal, se evaluaron las diferencias en los parámetros de calidad espermática entre grupos mediante una un

análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de Tukey a posteriori. Para poblaciones no distribuidas normalmente, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de Mann-Whitney. La correlación entre variables de calidad se analizó utilizando la correlación de Spearman. El nivel estadístico de significación se estableció en $P < 0,05$. Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm desviación estándar de la media (s.d.)

4.Resultados y Discusión.

4.1. Estudio 1. Caracterización morfológica de espermatozoides de zánganos maduros y reinas jóvenes.

En el estudio 1 se caracterizó los tipos de morfoanomalias espermáticas presentes en de las abejas melíferas, determinando su aparición en los eyaculados de zánganos maduros y en el contenido de las espermatecas de abejas reinas jóvenes recientemente apareadas.

En relación a la caracterización morfológica, se observaron los siguientes tipos de espermatozoides:

1) Espermatozoide normal (Fig. 10a): Células largas y filamentosas con extremos cónicos con una longitud aproximada de 250-270 μm . Están formados por una sección de la cabeza que es relativamente pequeña y angosta con dimensiones de 8-10 μm . Se considera un espermatozoide con características normales cuando no presenta deformaciones en sus flagelos, como dobleces o bifurcaciones inusuales, ni muestra irregularidades en su cabeza, como deformaciones o ausencia del acrosoma, y no se detectan fracturas o roturas evidentes en su estructura.

2) Espermatozoides con una cabeza anormal incluyendo desviaciones de forma de la cabeza (Fig. 10b) y con el acrosoma dañado, en los que se puede distinguir el perforatorio (Fig. 10c).

3) Espermatozoides con la cola defectuosa, incluyendo cola enrollada (Fig. 10d), deshilachada (Fig. 10e), doblada (Fig. 10f) y rota (Fig. 10g).

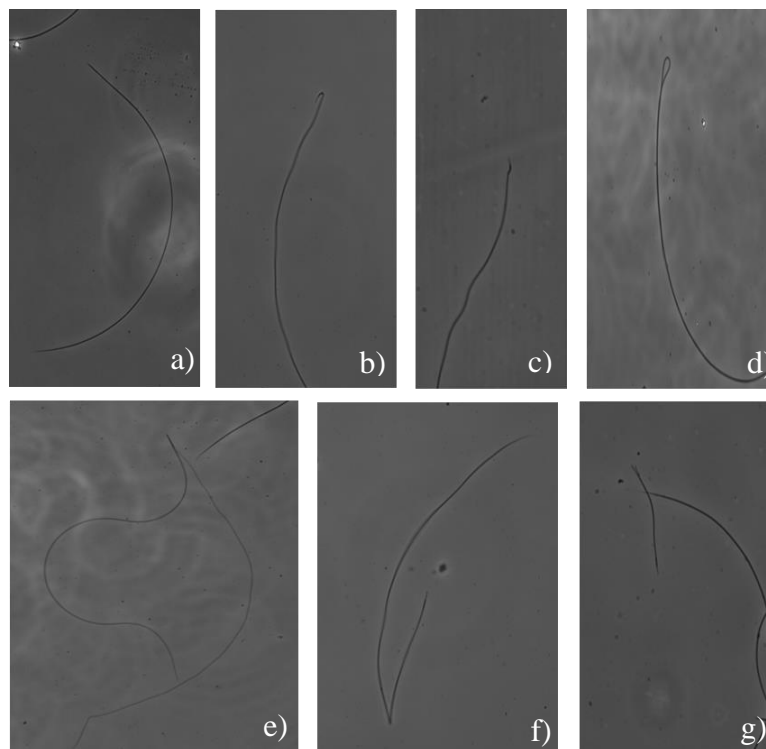


Figura 10. Anomalías espermáticas: a) Espermatozoide normal b) Con cabeza doblada, c) Sin acrosoma, d) Enrollado, e) Deshilachado, f) Doblado y g) Roto.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de calidad seminal en los eyaculados frescos. Las muestras analizadas presentaron valores de movilidad y de viabilidad elevados, lo que es indicador de una buena calidad seminal. Del total de los espermatozoides analizados (3.000) el 91,70% de ellos eran normales. Entre los espermatozoides anómalos, las colas defectuosas fueron las más frecuentes, principalmente las colas enrolladas, mientras que las bifurcadas, dobladas y rotas se observaron con menor frecuencia (Tabla 1). En cambio, las anomalías de cabeza fueron relativamente infrecuentes. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en muestras analizadas en fresco de otros estudios, respecto a las anomalías morfológicas (Bratu, *et al.*,2022;), a la movilidad (Bratu, *et al.*,2022; Yániz, *et al.*,2019; Taylor, *et al.*,2009; Ciereszko, *et al.*,2017; Wegener, *et al.*, 2014) y a la integridad de membrana (Bratu, *et al.*, 2022; Taylor, *et al.*,2009; Ciereszko, *et al.*,2017; Alcaay, *et al.*,2015; Collins.,2000). La mayoría de los estudios sobre calidad espermática en abejas se han centrado en el análisis de la viabilidad y motilidad de los espermatozoides, con pocas referencias a la evaluación morfológica y sus posibles alteraciones (Power, *et al.*,2019), aun siendo este un aspecto importante relacionado con la fertilidad (Chenoweth, *et al.*,2014; Abu Hassan Abu, *et al.*,2012). Aun así, hay

varios estudios donde se documenta la presencia de diferentes tipos de anomalías de cabeza y de cola en espermatozoides de eyaculados (Bratu, *et al.*,2022; Power, *et al.*,2019) y anomalías espermáticas en muestras precedentes de espermatecas de abeja reina (Lodesani, *et al.*,2004).

Tabla 1. Resultados calidad espermática (media \pm DE) de las muestras de semen de los eyaculados de zánganos maduros.

Características de los espermatozoides (%)	Muestras en Fresco
Movilidad (%)	82,93% \pm 6,73%
Viabilidad (%)	79,24% \pm 13,03%
Espermatozoides normales	91,70% \pm 13,56%
Anomalías de cabeza	1,76% \pm 2,70%
Cabeza deformada	0,59% \pm 1,88%
Sin acrosoma	1,17% \pm 1,93%
Anomalías de cola	6,72% \pm 13,92%
Flagelos enrollados	3,96% \pm 13,59%
Flagelos bifurcados	1,91% \pm 2,68%
Flagelos doblados	0,85% \pm 1,37%
Espermatozoides rotos	0,01% \pm 0,11%

En la Tabla 2 se muestran las correlaciones entre variables de calidad. Los espermatozoides normales mostraron una correlación directa con la movilidad, mientras que la presencia de espermatozoides con la cola deshilachada o sin acrosoma presentaron una correlación inversa con la movilidad (Tabla 2). En el caso de las anomalías de cabeza, los espermatozoides sin acrosoma mostraron una correlación negativa con la movilidad.

Tabla 2. Correlación de Pearson (r) entre las muestras en fresco y su movilidad y viabilidad.

	% Viabilidad	% Normales	% Enrollados	% Deshilachados	% Doblados	% Cabeza deformada	% Sin acrosoma	% Rotos
% Movilidad	-0,022	,577**	-0,229	-,549**	-0,124	-0,253	-,485**	0,02
% Viabilidad		-0,087	0,034	-0,084	0,271	-0,255	0,104	-0,161

**P<0.001

En la Tabla 3 se muestran los resultados del estudio dedicado al análisis de la calidad del semen proveniente de la espermateca de abejas reinas jóvenes. De los espermatozoides analizados (1200), el 96.44% eran normales, un porcentaje mayor a

los observados en semen de los eyaculados de zángano, lo que podría indicar una cierta selección espermática en el tractor reproductor de la reina. Las anomalías de colas fueron las más frecuentes, con un predominio de colas dobladas. Las colas enrolladas y bifurcadas, en cambio, se observaron con una menor frecuencia, y las anomalías de cabeza fueron poco frecuentes (Tabla 3). La movilidad y la viabilidad de los espermatozoides de espermatecas presentaron valores ligeramente superiores a los obtenidos en muestras de eyaculados.

Tabla 3. Parámetros de calidad seminal (media \pm DE) de las muestras procedentes de las espermatecas de reinas jóvenes.

Características de los espermatozoides (%)	Muestras Espermateca Abejas Reinas
Espermatozoides normales	96,44% \pm 1,62%
Movilidad	88,22% \pm 4,70%
Viabilidad	83,90% \pm 4,20%
Anomalías de cabeza	0,04% \pm 0,14%
Cabeza deformada	0,08% \pm 0,20%
Sin acrosoma	0,00% \pm 0,00%
Anomalías de cola	1,16% \pm 1,34%
Flagelos enrollados	0,74% \pm 0,92%
Flagelos bifurcados	0,17% \pm 0,26%
Flagelos doblados	2,57% \pm 1,18%
Espermatozoides rotos	0,00% \pm 0,00%

La biología reproductiva de las abejas melíferas está constituida por una selección sexual precopuladora (competencia de apareamiento) y una la poscopuladora (competencia del esperma) (Gençer, *et al.*, 2020). En la competencia de apareamiento normalmente el zángano más fuerte, más rápido y vigoroso es el que fecunda a la abeja reina (Córdova Sánchez, 2011; Abraham Castro, 2018; Lara Zumba, 2022.). El aparato reproductor de las abejas reina está formado por: los ovarios, el oviducto, la espermateca y la vagina. Cuando el espermatozoide accede al óvulo, lo realiza a través del oviducto medio. Al encontrarse cerca de la válvula vaginal, se produce la apertura del conducto de la espermateca y la recepción de un conjunto de espermatozoides (Salinas Saquicela, 2023). La conexión de la espermateca con el oviducto medio se establece a través de un conducto que controla el flujo de los espermatozoides. En primer lugar, regula su ingreso desde el oviducto

hacia la espermateca, donde se almacenan, luego permite su liberación interna para la fecundación de los óvulos (IICA, 1998). Como ocurre con otros insectos, los machos de *Apis mellífera* no transfieren sus espermatozoides directamente a la espermateca, sino que los eyaculan en la vagina de la hembra, en la bolsa copuladora del tracto sexual (Duvoisin, *et al.*, 1999; Koeniger y Koeniger., 1991). Debido a un mayor volumen del total de los eyaculados del que puede albergar la bolsa copuladora, los eyaculados se transfieren a los oviductos laterales por contracciones de la bolsa (Baer., 2005). La coexistencia de diferentes eyaculados en los oviductos laterales permite la competencia intraoviductal de los espermatozoides durante el proceso de migración hacia la espermateca (Gençer, *et al.*, 2020).

Los procesos de selección mencionados respaldarían los resultados obtenidos en las muestras de semen proveniente de espermatecas, con porcentajes de espermatozoides móviles, viables y normales superiores a los obtenidos en las muestras de eyaculados. Al igual que en este trabajo, Tarpay, *et al.*, (2014) observaron un alto porcentaje de viabilidad espermática en las espermatecas de reinas recién inseminadas (90.3%), mientras que con el paso del tiempo la viabilidad de los espermatozoides disminuía de manera constante registrando porcentajes de 81.3% de espermatozoides viables en espermatecas de abejas reinas 5 meses después de su inseminación. Para explicar este descenso, sugirieron varias posibilidades, como la utilización de espermatozoides vivos versus muertos, es decir cuando la reina pone óvulos usa espermatozoides vivos por lo que las tasas de espermatozoides muertos aumentan. También puede influir un mayor estrés fisiológico a largo plazo sugiriendo de esta forma que los espermatozoides sufren un estrés en la espermateca y que a causa del paso del tiempo y de ese estrés, resulta en su muerte. En nuestro estudio se utilizaron solamente espermatecas de reinas jóvenes recientemente apareadas, lo que probablemente ha influido en los resultados obtenidos.

4.2. Estudio 2. Efecto del procesado.

El estudio 2 se analizó el efecto de las preparaciones de frotis y secado al aire en la aparición de morfoanomalías en el semen. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos. La utilización de las técnicas de procesado dio lugar a un aumento significativo de la incidencia de anomalías espermáticas, especialmente de las anomalías de colas enrolladas y dobladas. Respecto a las anomalías de cabeza,

también se vieron significativamente incrementadas con el uso de las preparaciones. En conjunto, las anomalías de cabeza y cola fueron las mismas en los dos grupos procesados, pero el tipo de anomalías fue algo diferente, con un aumento mayor de flagelos enrollados en el grupo secado al aire, y de flagelos doblados y sin acrosoma en el grupo en el que se realizó el frotis (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros de calidad seminal (media \pm DE) de las muestras procedentes de los métodos de procesamiento.

Características de los espermatozoides (%)	Método de procesamiento		
	Preparación Fresco	Secado al aire	Frotis
Espermatozoides normales	91,70% \pm 13,56% ^a	42,13% \pm 20,16% ^b	37,83% \pm 25,76% ^b
Anomalías de cabeza	1,76% \pm 2,70% ^a	11,41% \pm 10,31% ^b	11,54% \pm 18,43% ^b
Cabeza deformada	0,59% \pm 1,88% ^a	9,68% \pm 9,90% ^b	8,43% \pm 17,96% ^b
Sin acrosoma	1,17% \pm 1,93% ^a	1,73% \pm 2,86% ^a	3,11% \pm 4,15% ^b
Anomalías de cola	6,72% \pm 13,92% ^a	51,63% \pm 64,84% ^b	50,06% \pm 29,25% ^b
Flagelos enrollados	3,96% \pm 13,59% ^a	30,05% \pm 61,98% ^c	17,43% \pm 17,64% ^{bc}
Flagelos bifurcados	1,91% \pm 2,68% ^a	4,38% \pm 12,46% ^{bc}	5,40% \pm 6,68% ^c
Flagelos doblados	0,85% \pm 1,37% ^a	17,21% \pm 14,39% ^b	27,24% \pm 22,36% ^c
Espermatozoides rotos	0,01% \pm 0,11% ^a	0,85% \pm 2,01% ^b	0,24% \pm 0,89% ^a

Diferentes superíndices (a-c) dentro de una fila significan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Las técnicas predominantes para evaluar la morfología de los espermatozoides incluyen la realización de frotis, secado al aire y posterior tinción. Son pocos los estudios que evalúan la morfología a través de preparaciones húmedas (Soler, *et al.*, 2015). Los procesos de deshidratación, hidratación y tinción comúnmente utilizados pueden distorsionar la morfología de los espermatozoides (Yeung, *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos en el presente estudio evidenciaron cambios morfológicos significativos en los espermatozoides procesados por técnicas comunes de secado al aire y frotis más secado, por lo que implica la necesidad de sustituir este tipo de preparaciones por las preparaciones húmedas, que mantienen mejor la estructura de los espermatozoides.

En el presente estudio el porcentaje medio de anomalías obtenido en muestras evaluadas en fresco (8,3%) fue similar al obtenido por otros autores (Bratu, *et al.*, 2022), aunque otros han obtenido unas mayores incidencias de defectos morfológicos (Morais, *et al.*, 2022; da Silva Morais, *et al.*, 2023). Esta divergencia en

los resultados obtenidos puede atribuirse a protocolos de procesamiento de las muestras que implican frotis, secado al aire, fijación y tinción de muestras de semen y/o disolución del semen en medios de baja osmolaridad, lo que provoca cambios morfológicos notables, reflejados en la curvatura o hinchazón de la cola (Nur, *et al.*,2012; da Silva Morais, *et al.*,2023). Cabe destacar que en este estudio se utilizaron zánganos maduros de colonias sanas y bien nutridas durante la época reproductiva, los cuales mostraron altos parámetros de calidad espermática en la mayoría de los casos. Como ya se comentó en el apartado de introducción entre los factores que posiblemente influyan en el volumen recolectado por cada zángano, se han descrito los efectos de la edad, el peso corporal, la estación y la línea reproductiva (Rhodes, *et al.*.,2011; Gencer, *et al.*.,2011; Czekońska, *et al.*.,2013), de la misma forma que posiblemente estos parámetros pueden también estar relacionados con la aparición de anomalías morfológicas en los espermatozoides, por lo que es probable que la incidencia de estas anomalías aumente cuando se encuentran en condiciones desfavorables.

4.3. Estudio 3. Efecto del mantenimiento del semen a temperatura ambiente sobre la incidencia de morfoanomalías espermáticas.

En el estudio 3 se evaluó el efecto de la conservación de muestras mantenidas a una temperatura constante de 22°C. En la Tabla 5 se observan los resultados obtenidos. La conservación del semen en estas condiciones produjo una disminución de la movilidad el día 2 y de viabilidad espermática a partir del día 1 de almacenamiento. También se observó un aumento progresivo de las anomalías conforme pasaron los días, especialmente las colas enrolladas (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de calidad seminal (media \pm DE) de las muestras procedentes del almacenamiento de semen a 22°C.

Características de los espermatozoides (%)	Tiempo de almacenamiento (días)		
	d0	d1	d2
Movilidad	82,93% \pm 6,73% ^a	76,22% \pm 10,42% ^a	35,49% \pm 17,72% ^b
Viabilidad	79,24% \pm 13,03% ^a	71,13% \pm 8,92% ^b	49,55% \pm 13,30% ^c
Espermatozoides normales	91,70% \pm 13,56% ^a	74,84% \pm 28,02% ^b	57,24% \pm 19,01% ^c
Anomalías de cabeza	1,76% \pm 2,70% ^a	2,04% \pm 3,12% ^a	2,28% \pm 2,95% ^a
Cabeza deformada	0,59% \pm 1,88% ^a	0,95% \pm 2,41% ^a	0,45% \pm 0,91% ^a
Sin acrosoma	1,17% \pm 1,93% ^a	1,09% \pm 1,99% ^a	1,83% \pm 2,81% ^a
Anomalías de cola	6,72% \pm 13,92% ^a	23,24% \pm 28,18% ^b	40,37% \pm 22,02% ^c
Flagelos enrollados	3,96% \pm 13,59% ^a	19,03% \pm 27,93% ^b	34,49% \pm 21,06% ^c
Flagelos bifurcados	1,91% \pm 2,68% ^a	2,99% \pm 3,42% ^{ab}	4,58% \pm 5,50% ^b
Flagelos doblados	0,85% \pm 1,37% ^a	1,21% \pm 1,64% ^a	1,30% \pm 3,30% ^a
Espermatozoides rotos	0,01% \pm 0,11% ^a	0,00% \pm 0,00% ^a	0,00% \pm 0,00% ^a

Diferentes superíndices (a-c) dentro de una fila significan diferencias significativas en $P < 0.05$.

La exposición de los espermatozoides de abeja a soluciones hiposmóticas induce alteraciones morfológicas, como lo demuestra el enrollamiento y la hinchazón de la cola (Nur, *et al.*, 2012). Los espermatozoides de zánganos parecen ser sensibles a cambios en la osmolaridad, aunque en este estudio se utilizó el mismo medio durante todo el almacenamiento, presentando una osmolaridad de 388 mOsm, que resulta adecuada para conservar la integridad de los zánganos de abejas melíferas (Soylu, *et al.*, 2007; Taylor, 2008; Wegener, *et al.*, 2014).

El mantenimiento del semen a temperatura ambiente también puede facilitar la proliferación bacteriana y aumentar la presencia de especies de oxígeno reactivas (ROS), que se podría disminuir en el caso de mantenerlo refrigerado y que podrían afectar a la integridad y morfología celular (Silvestre, *et al.*, 2021).

4.4. Estudio 4. Efecto de la criopreservación de semen en la incidencia de morfoanomalías espermáticas.

En este estudio se analizó el efecto sobre los parámetros de calidad del semen de zángano de la exposición al diluyente empleado en el proceso de congelación y del propio proceso de congelación-descongelación. Los resultados se muestran en la Tabla 6. La exposición al diluyente, que incluía el crioprotector DMSO, no tuvo un efecto claro sobre la integridad de membrana ni sobre las anomalías morfológicas, aunque provocó un descenso de la movilidad. El proceso de congelación tuvo un efecto

pronunciado en la calidad de los espermatozoides, provocando una disminución de la movilidad y la viabilidad y un aumento de la incidencia de anomalías morfológicas, que incluyeron anomalías de cola (especialmente los flagelos enrollados), y anomalías de cabeza (sobre todo cabezas deformadas) tras la descongelación del semen.

Tabla 6. Parámetros de calidad seminal (media \pm DE) de las muestras sometidas al proceso de congelación-descongelación.

Características de los espermatozoides (%)	Método de procesamiento		
	Fresco	Pre-Congelación	Post-congelación
Movilidad	82,40% \pm 6,24% ^a	72,73% \pm 11,28% ⁿ	53,01% \pm 6,19% ^c
Viabilidad	68,28% \pm 7,04% ^a	64,04% \pm 8,26% ^a	41,06% \pm 10,42% ^b
Espermatozoides normales	91,20% \pm 3,40% ^a	83,70% \pm 9,75% ^a	45,80% \pm 15,37% ^b
Anomalías de cabeza	2,30% \pm 1,63% ^a	1,00% \pm 0,91% ^b	10,40% \pm 9,19% ^c
Cabeza deformada	1,10% \pm 1,00% ^a	0,90% \pm 0,73% ^a	9,10% \pm 4,11% ^b
Sin acrosoma	1,20% \pm 1,13% ^a	0,10% \pm 0,19% ^b	1,30% \pm 0,91% ^a
Anomalías de cola	6,50% \pm 3,95% ^a	15,40% \pm 12,14% ^a	43,80% \pm 38,20% ^b
Flagelos enrollados	2,40% \pm 1,15% ^a	11,70% \pm 10,15% ^a	37,90% \pm 15,45% ^b
Flagelos bifurcados	2,90% \pm 1,55% ^a	3,20% \pm 2,14% ^a	4,60% \pm 1,95% ^a
Flagelos doblados	1,20% \pm 0,98% ^a	0,50% \pm 0,37% ^a	1,30% \pm 1,24% ^a
Espermatozoides rotos	0,00% \pm 0,00% ^a	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%

Diferentes superíndices (a-c) dentro de una fila significan diferencias significativas en $P < 0.05$.

Estudios previos han demostrado que los procesos de congelación y de descongelación son perjudiciales para la viabilidad y la integridad funcional de los espermatozoides (Ustuner, *et al.*, 2016), provocando efectos destructivos sobre los espermatozoides debido al shock de frío, la formación de hielo y la peroxidación lipídica (Alcay, *et al.*, 2019). El éxito de la criopreservación depende de muchos factores como son: la temperatura de congelación, la naturaleza del crioprotector, la temperatura de descongelación, la concentración del semen y las variaciones en la metodología (Alcay, *et al.*, 2015; Taylor, *et al.*, 2009).

La dilución del semen en los medios empleados para llevar a cabo el proceso de criopreservación provocaron pocos cambios en los parámetros de calidad espermática, con un ligero descenso de la movilidad como única variable afectada. Otros autores que también utilizaron disoluciones a partir de DMSO obtuvieron resultados similares, con mejores resultados al utilizar este crioprotector frente a otros como el glicerol (Taylor, *et al.*, 2009; Hopkins and Herr, 2010; Alcay, *et al.*, 2015; Hopkins and Herr, 2010; Alcay, *et al.*, 2019).

En el presente estudio, el proceso de congelación-descongelación provocó una marcada disminución de la movilidad de los espermatozoides, una disminución de la viabilidad y un aumento en las incidencias de anomalías morfológicas, especialmente las colas enrolladas y cabezas deformadas. El aumento de la incidencia de colas enrolladas podría asociarse al efecto de los cambios osmóticos que se producen en el proceso de congelación-descongelación. En cambio, el aumento de cabezas deformadas podría asociarse a la muerte celular, ya que todos los espermatozoides con esta anomalía no mostraron movilidad.

En estudios previos se ha descrito un aumento del daño acrosómico tras los procesos de congelación-descongelación en zánganos de *Apis mellífera* (Hammadeh, *et al.*,2001; Soyly, *et al.*,2007; Nur *et al.*,2010; Üstüner, *et al.*,2014; Silva, *et al.*,2012). Los resultados de este estudio, en cambio, no mostraron este efecto sobre las anomalías acrosómicas, lo que puede deberse a la diferente metodología empleada tanto en el proceso de congelación-descongelación como en el análisis de calidad espermática. Los resultados obtenidos en este estudio y los de otros autores demuestran la utilidad del estudio morfológico para mejorar los protocolos de criopreservación en esta especie.

6. Conclusiones.

En base a los resultados obtenidos en este estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El método basado en el estudio de muestras de semen húmedo con microscopia de contraste de fases permitió una estimación fiable de las morfoanomalías espermáticas en la abeja melífera, con una caracterización precisa de los tipos de defectos morfológicos.
2. Los espermatozoides almacenados en espermatecas de abejas jóvenes y recientemente apareadas presentaron mejores resultados de calidad que los de los eyaculados de los zánganos maduros, lo que podría evidenciar una selección espermática y una buena conservación del semen en espermatecas de las reinas a corto plazo.
3. Los métodos de procesamiento tradicionalmente utilizados, basadas en frotis y el secado al aire, provocan un aumento de la incidencia de las anomalías morfológicas de los espermatozoides, por lo que se recomienda el análisis de las preparaciones húmedas.
4. El almacenamiento de semen a temperatura ambiente aumentó la incidencia de anomalías morfológicas, especialmente de las colas enrolladas.
5. El proceso de congelación-descongelación tuvo un efecto pronunciado en la calidad de los espermatozoides, afectando drásticamente la incidencia anomalías morfológicas de cabeza y cola.

BIBLIOGRAFIA

Abraham Castro, A. (2018). Influencia del cambio de la abeja Reina, (*Apis mellifera* L.) en los rendimientos de la colmena (Bachelor's thesis, Universidad de Holguín, Facultad de Ciencias Naturales y Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agropecuarias).

Abu Hassan Abu, D., Franken, D. R., Hoffman, B., & Henkel, R. (2012). Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function. *Andrologia*, 44, 571-577.

Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., ... y Le Conte, Y. (2010). Las interacciones entre las microsporas de *Nosema* y un neonicotinoide debilitan a las abejas melíferas (*Apis mellifera*). *Microbiología ambiental*, 12(3), 774-782.

Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Mulkpınar, E., Gokce, E., Ustuner, B., ... & Nur, Z. (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., & Nur, Z. (2015). Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. *University Faculty of Veterinary*, 21, 31-35.

Baer, B. (2005). Sexual selection in *Apis* bees. *Apidologie*, 36(2), 187-200.

Ben Abdelkader, F., Kairo, G., Tchamitchian, S., Cousin, M., Senechal, J., Crauser, D., ... & Brunet, J. L. (2014). Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie*, 45, 215-223.

Bieńkowska, M., Panasiuk, B., Węgrzynowicz, P., & Gerula, D. (2011). The effect of different thermal conditions on drone semen quality and number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee. *J. Apic. Sci*, 55(2), 161-168.

Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P., Reemer, M., Ohlemuller, R., Edwards, M., Peeters, T., ... & Kunin, W. E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785), 351-354.

Borsuk, G., Kozłowska, M., Anusiewicz, M., & Paleolog, J. (2018). *Nosema ceranae* changes semen characteristics and damages sperm DNA in honeybee

drones. *Invertebrate Survival Journal*, 15(1), 197-202.

Bratu, I. C., Igna, V., Simiz, E., Dunea, I. B., & Pătruică, S. (2022). The Influence of Body Weight on Semen Parameters in *Apis mellifera* Drones. *Insects*, 13(12), 1141.

Chenoweth, P.J. y Lorton, S. (Eds.). (2014). *Andrología animal: teorías y aplicaciones*. Cabi.

Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G. J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S., & Karol, H. (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48, 211-222.

Cobey, S. W., Tarpy, D. R., & Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-18.

Collins, A. (2000). Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie*, 31(3), 421-429.

Collins, A. M. (2004). Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *Journal of apicultural research*, 43(4), 167-171.

Collins, A. M. (2005). Insemination of honey bee, *Apis mellifera*, queens with non-frozen stored semen: sperm concentration measured with a spectrophotometer. *Journal of apicultural research*, 44(4), 141-145.

Collins, A. M., & Donoghue, A. M. (1999). Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*, 51(8), 1513-1523.

Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spanó M 2005: Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* 72: 273-279.

Córdova Sánchez, E. (2011). Manejo de la abeja reina sobre la defensividad de la colonia y producción de miel en apiarios de Tabasco, México (Master's thesis).

Coroian, C. O., Muñoz, I., Schlüns, E. A., Paniti-Teleky, O. R., Erler, S., Furdui, E. M., ... & Moritz, R. F. (2014). Climate rather than geography separates two

- European honeybee subspecies. *Molecular ecology*, 23(9), 2353-2361.
- Czakońska, K., & Tofilski, A. (2020). Body mass of honey bee drones developing in constant and in changing temperatures. *Apidologie*, 51(4), 510-518.
- Czakońska, K., & Tofilski, A. (2020). Body mass of honey bee drones developing in constant and in changing temperatures. *Apidologie*, 51(4), 510-518.
- Czakońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., & Chorbiński, P. (2013). The effect of brood incubation temperature on the reproductive value of honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 96-105.
- Czakońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., & Samborski, J. (2015). Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie*, 46, 1-9.
- Czakońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., & 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. 1.
- da Silva Morais, L., de Araujo Neto, E. R., da Silva, A. M., Bezerra, L. G. P., da Cunha, A. F. S., de Sousa Chagas, N. O., ... & Silva, A. R. (2023). Africanized honeybee (*Apis mellifera*) semen freezing using Tris-based and Collins extenders. *Tropical Animal Health and Production*, 55(5), 329.
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., & Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS one*, 7(2), e32151.
- Ellis, J. D., Evans, J. D., & Pettis, J. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 134-136.
- Delaplane, K. S., & Mayer, D. F. (2000). *Crop pollination by bees*. CABI publishing.
- Dolník, M., Mudroňová, D., Pošivák, J., Lazar, G., & Mudroň, P. (2019). Flow cytometry in assessment of sperm integrity and functionality—a review. *Acta Veterinaria Brno*, 88(2), 169-175.
- Duvoisin, n., baer, b., & schmid-hempel, p. a. u. l. (1999). Sperm transfer and male competition in a bumblebee. *Animal Behaviour*, 58(4), 743-749.

- Gencer, H. V., & Kahya, Y. (2011). Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy?. *Journal of Apicultural Research*, 50(2), 130-137.
- Ghazoul, J. (2005). Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in ecology & evolution*, 20(7), 367-373.
- Gontarz, A., Banaszewska, D., Gryzinska, M., & Andraszek, K. (2016). Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 40(5), 598-602.
- Hammadeh, M. E., Dehn, C. H., Hippach, M., Zeginiadou, T., Stieber, M., Georg, T., ... & Schmidt, W. (2001). Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *international journal of andrology*, 24(2), 66-72.
- Hopkins, B. K., & Herr, C. (2010). Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*, 41(5), 548-556.
- Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., & Neov, B. (2020). Factors associated with honey bee colony losses: A mini-review. *Veterinary Sciences*, 7(4), 166.
- IICA. (1998). La cría de abejas reinas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (Venezuela), 3(1), 23.
- Jean-Prost P., Le, C. Y. (2007). *Beekeeping: Knowledge of the bee. Hive management* (4th ed.).
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219-228.
- Kairo, G., Provost, B., Tchamitchian, S., Ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Cousin, M., ... & Brunet, J. L. (2016). Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Scientific reports*, 6(1), 31904.
- Klein, A. -M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., y Tschamntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing

landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*, 274(1608), 303-313.

Koeniger, G., Koeniger, N., Tingek, S., & Phiancharoen, M. (2005). Variance in spermatozoa number among *Apis dorsata* drones and among *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, 36(2), 279-284.

Koeniger, N., & Koeniger, G. (1991). An evolutionary approach to mating behaviour and drone copulatory organs in *Apis*. *Apidologie*, 22(6), 581-590.

Koeniger, N., & Koeniger, G. (2000). Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. *Apidologie*, 31(2), 313-339.

Lara Zumba, D. R. (2022). Ácido fórmico en el control de varroa en abejas.

Lino-Neto, J., Bão, S. N., & 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., & 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.

Lodesani, M., Balduzzi, D., & Galli, A. (2004). Functional characterisation of semen in honeybee queen (*Am ligustica* S.) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination. *Italian Journal of Animal Science*, 3(4), 385-392.

Lomeo, A. M., & Giambersio, A. M. (1991). 'Water-test': a simple method to assess sperm-membrane integrity. *International journal of andrology*, 14(4), 278-282.

Martínez-Puc, J. F., & de Ayala, L. R. M. P (2017). *Biología de la abeja*. Lic. Gerardo Montero Pérez, 17.

Montesinos, P. (2014). Situación de la apicultura en España. Albéitar. Portal Veterinario.

Morais, L. S., Araujo Neto, E. R., Silva, A. M., Marinho, D. E., Bezerra, L. G., Velarde, J. M., ... & Message, D. (2022). Sperm characteristics of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) drones during dry and wet seasons in the Caatinga

biome. *Journal of Apicultural Research*, 1-8.

Moscatelli, N., Spagnolo, B., Pisanello, M., Lemma, E. D., De Vittorio, M., Zara, V., ... & Ferramosca, A. (2017). Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. *Scientific reports*, 7(1), 17931.

Nur, Z. E. K. A. R. İ. Y. A., Zik, B., Ustuner, B. U. R. C. U., Sagirkaya, H., & Ozguden, C. G. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73(9), 1267-1275.

Nur, Z., Seven-Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, CI, ... and Soylu, MK (2012). The use of the hipoosmótica test, the water test and the supravital tincture in the evaluation of spermatozoides of drones. *Apidology*, 43, 31-38.

Peña, F. J., JM, O. R., & Gil, M. C. (2018). Flow cytometry analysis of spermatozoa: Is it time for flow spermetry?. *Reproduction in Domestic Animals= Zuchthygiene*, 53, 37-45.

Power, K., D'Anza, E., Martano, M., Albarella, S., Ciotola, F., Peretti, V., & Maiolino, P. (2019). Morphological and morphometric analysis of the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*) spermatozoa: A preliminary study in Campania region. *nucleus*, 4, 0-61.

Rhodes, J. W., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D. L., & Wheen, G. (2011). Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, 42, 29-38.

Richards, A. J. (2001). Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield?. *Annals of botany*, 88(2), 165-172.

Salinas Saquicela, L. V. (2023). Evaluación de diferentes niveles de disolución de jalea real con agua bidestilada para la obtención de abejas reinas (*Apis mellifera*) en el cantón Morona.

SCHLUNS, H. (2005). Multiple nuptial flights and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens (*Apis mellifera* L.). *Anim Behav*, 70, 125-131.

Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Vidal, A. H., Soares, P. C., & Guerra, M. M. P. (2012). In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene

glycol or acetamide. *Animal reproduction science*, 132(3-4), 155-158.

Silvestre, M.A.; Yaniz, J.L.; Peña, F.J.; Santolaria, P.; Castello-Ruiz, M. Papel de los antioxidantes en el almacenamiento líquido enfriado de espermatozoides de mamíferos. *Antioxidantes-Basilea* 2021, 10, doi:10.3390/antiox10071096.

Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual review of entomology*, 34(1), 77-96.

Soler, C., García-Molina, A., Contell, J., Silvestre, M. A., & Sancho, M. (2015). The Trumorph® system: The new unit of the morphology of living sperm. *Animal reproduction science*, 158, 1-10.

Soylu, M. K., Nur, Z. E. K. A. R. İ. Y. A., Ustuner, B. U. R. C. U., Dogan, I. B. R. A. H. I. M., Sagirkaya, H., Gunay, U., & Ak, K. (2007). Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 51(2), 241.

Stürup, M., Baer-Imhoof, B., Nash, D. R., Boomsma, J. J., & Baer, B. (2013). When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology*, 24(5), 1192-1198.

Sundriyal, M., & Sundriyal, R. C. (2004). Wild edible plants of the Sikkim Himalaya: Nutritive values of selected species. *Economic Botany*, 58(2), 286-299.

Tarpy, D. R., & Nielsen, D. (2002). Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(4), 513-528.

Tarpy, D. R., & Olivarez Jr, R. (2014). Measuring sperm viability over time in honey bee queens to determine patterns in stored-sperm and queen longevity. *Journal of Apicultural Research*, 53(4), 493-495.

Taylor, M. A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., & Buhr, M. M. (2009). Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72(2), 149-159.

Taylor, MA (2008). Criopreservación de espermatozoides de abejas (*Apis mellifera* L.) (Tesis doctoral, Universidad de Guelph).

- Üstüner, B., Alçay, S., Nur, Z., Sağırkaya, H., & Soylu, M. K. (2014). Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in post-Thaw Ram Semen quality and in vitro fertility.
- vanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R. M., & Pettis, J. S. (2010). A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of apicultural research*, 49(1), 7-14.
- Wegener J., May T., Kamp G., Bienefeld K., (2014). A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology* 69: 236-242.
- Wegener, J., & Bienefeld, K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77(3), 600-607.
- Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G., Müller, K., & Bienefeld, K. (2012). In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology*, 65(2), 126-131.
- Williams, I. H. (1994). The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agric. Zool. Rev.*, 6, 229-257.
- Yániz, J. L., Escalera, N., Silvestre, M. A., Soler, C., & Santolaria, P. (2022, October). A simplified protocol for honey bee semen cryopreservation minimising liquid nitrogen consumption. In *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS* (Vol. 57, pp. 106-106). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.
- Yániz, J. L., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Gosalvez, J., López-Fernández, C., & Santolaria, P. (2013). Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reproduction in domestic animals*, 48(4), 598-603.
- Yániz, J. L., Silvestre, M. A., & Santolaria, P. (2020). Sperm quality assessment in honey bee drones. *Biology*, 9(7), 174.
- Yániz, J. L., Soler, C., & Santolaria, P. (2015). Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Animal reproduction science*, 156, 1-12.
- Yániz, J., Alquézar-Baeta, C., Yagüe-Martínez, J., Alastruey-Benedé, J., Palacín, I., Boryshpolets, S., ... & Pérez-Pe, R. (2020b). Expanding the limits of computer-assisted sperm analysis through the development of open software. *Biology*, 9(8),

207.

Yániz, J., Ángel, E., Ramos, PM, Sales, E., & Santolaria, P. (2016). Caracterización de la abeja melífera en la provincia de Huesca. *Lucas Mallada*, 257-271.

Yániz, J., Palacín, I., & Santolaria, P. (2019). Effect of chamber characteristics, incubation, and diluent on motility of honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm. *Apidologie*, 50, 472-481.

Yániz, JL, Soler, C., Alquézar-Baeta, C. y Santolaria, P. (2017). Hacia un análisis integrador y predictivo de la calidad del esperma en *Bos taurus*. *Ciencia de la reproducción animal*, 181 , 108-114.

Yeung, C. H., Perez-Sanchez, F., Soler, C., Poser, D., Kliesch, S., & Cooper, T. G. (1997). Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Human Reproduction Update*, 3(3), 205-213.