



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“EFECTO DE LA EVERSIÓN DEL ENDÓFALO SOBRE LA
EYACULACIÓN Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN ZÁNGANOS
(*Apis mellifera*), EN EL CANTÓN SALCEDO PROVINCIA DE
COTOPAXI”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médica Veterinaria

Autora:

Crespo Lascano Ana Carolina

Tutora:

Veloz Veloz Dina Maricela

LATACUNGA – ECUADOR

Marzo 2026

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Crespo Lascano Ana Carolina, con cédula de ciudadanía No. 0504345646, declaro ser autora del presente Proyecto de Investigación: **“EFECTO DE LA EVERSIÓN DEL ENDÓFALO SOBRE LA EYACULACIÓN Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN ZÁNGANOS (*Apis mellifera*), EN EL CANTÓN SALCEDO PROVINCIA DE COTOPAXI”**, siendo la Medica Veterinaria y Zootecnista MSc. Dina Maricela Veloz Veloz, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 12 de febrero del 2025

Ana Carolina Crespo Lascano
C.C: 0504345646
ESTUDIANTE

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **CRESPO LASCANO ANA CAROLINA**, identificada con cédula de ciudadanía **0504345646** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES:

CLÁUSULA PRIMERA. – **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **“EFECTO DE LA EVERSIÓN DEL ENDÓFALO SOBRE LA EYACULACIÓN Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN ZÁNGANOS (*Apis mellifera*), EN EL CANTÓN SALCEDO PROVINCIA DE COTOPAXI”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: mayo 2020 - septiembre 2020

Finalización de la carrera: octubre 2025– marzo 2026

Tutora: MVZ. Dina Maricela Veloz Veloz, MSc.

Tema: **“EFECTO DE LA EVERSIÓN DEL ENDÓFALO SOBRE LA EYACULACIÓN Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN ZÁNGANOS (*APIS MELLIFERA*), EN EL CANTÓN SALCEDO PROVINCIA DE COTOPAXI”**

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.

- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonio.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido. **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 12 días del mes de febrero del 2026.

Ana Carolina Crespo Lascano

LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“EFECTO DE LA EVERSION DEL ENDÓFALO SOBRE LA EYACULACIÓN Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN ZÁNGANOS (*Apis mellifera*), EN EL CANTÓN SALCEDO PROVINCIA DE COTOPAXI”, de Crespo Lascano Ana Carolina, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la pre-defensa.

Latacunga, 12 de febrero del 2026

MVZ. Dina Maricela Veloz Veloz, MSc.
C.C: 1720299302
DOCENTE TUTORA

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Crespo Lascano Ana Carolina, con el título del Proyecto de Investigación: **“EFECTO DE LA EVERSIÓN DEL ENDÓFALO SOBRE LA EYACULACIÓN Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN ZÁNGANOS (*Apis mellifera*), EN EL CANTÓN SALCEDO PROVINCIA DE COTOPAXI”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 12 de febrero del 2026

MVZ. Cristian Beltrán Romero Mg.
C.C: 0501942940
LECTOR 1 (PRESIDENTE)

MVZ Cristian Neptalí Arcos Álvarez Mg
C.C: 1803675634
LECTOR 2 (MIEMBRO)

Dr. Garzón Jarrín Rafael Alfonso, Ph.D
C.C: 0501097224
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Primero quiero empezar agradeciendo a Dios y a mi Virgencita del Quinche por guiar mis pasos y nunca soltarme.

A mis queridos padres Octavio y Cecilia por ser mi motor por su amor incondicional su apoyo constante en todas mis decisiones y por ser mi pilar fundamental.

A mis hermanos Daniel y Miguel gracias por su compañía por cada risa y por ser una parte importante en mi camino.

A mis ángeles Teresita, Elsita, Emmita y Carmencita gracias por cuidarme desde lo más alto por su amor e inspiración.

A toda mi familia porque cada uno de ellos con sus consejos me ha ayudado a que siga adelante y que luche hasta alcanzar mis metas.

Y no puedo dejar de mencionar a mis amigos Jessi y Hugo gracias por su lealtad, por estar en los buenos y malos momentos y acompañarme en esta etapa más de mi vida.

A mis docentes, quienes con dedicación compartieron su conocimiento y compromiso con nuestra formación, de manera especial a la Dra. Dina Veloz, por su vocación.

A mí querida UTC por darme la oportunidad de aprender en sus aulas, por recibirme en su campus el cual recordaré como la mejor etapa de mi vida.

Ana Carolina Crespo Lascano

DEDICATORIA

Con todo mi amor dedico este logro a mis padres quienes son la luz que guían mis pasos, por su amor inquebrantable y por todos los sacrificios que han hecho a lo largo de mi vida, por cada enseñanza, cada abrazo, cada consejo y por iluminar mi camino

A mis hermanos por compartir conmigo cada alegría y cada desafío.

Y a mi familia por ser mi hogar y mi mayor bendición.

Ana Carolina Crespo Lascano

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EFECTO DE LA EVERSIÓN DEL ENDÓFALO SOBRE LA EYACULACIÓN Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN ZÁNGANOS (*APIS MELLIFERA*), EN EL CANTÓN SALCEDO PROVINCIA DE COTOPAXI”

Autor:
Ana Carolina Crespo Lascano

RESUMEN

La inseminación instrumental de reinas de *Apis mellifera* constituye una herramienta fundamental para el mejoramiento genético y la sostenibilidad de la apicultura; sin embargo, su eficiencia depende en gran medida de la calidad del semen recolectado de los zánganos. Uno de los factores críticos durante la colecta seminal es el grado de eversión del endófalo, el cual puede presentarse de forma parcial o total y generar variaciones en la calidad espermática.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la eversión parcial y total del endófalo sobre la eyaculación y la calidad espermática en zánganos (*Apis mellifera*) criados en el cantón Salcedo, provincia de Cotopaxi. La investigación se desarrolló bajo un enfoque descriptivo y observacional, utilizando zánganos recolectados de un apiario local. La extracción del semen se realizó mediante estimulación manual del abdomen, clasificando a los individuos según el tipo de eversión alcanzada. Los parámetros de calidad seminal evaluados incluyeron motilidad masal, motilidad individual, vigor espermático.

Los resultados evidenciaron una mayor frecuencia de eversión parcial en comparación con la eversión total, lo que sugiere una limitación fisiológica de los zánganos bajo las condiciones ambientales del área de estudio. Asimismo, los zánganos con eversión parcial presentaron un porcentaje de 63% destacándose mayores porcentajes de motilidad, niveles superiores de vigor espermático y menor riesgo de contaminación con mucus. Por el contrario, la eversión total, que se presentó en el 37% de los casos, se asoció con una disminución relativa de la calidad seminal.

Palabras clave: Calidad espermática, Endófalo, Eversión, Semen, Zángano

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: "EFFECT OF ENDOPHELIAL EVERSION ON EJACULATION AND SPERM QUALITY IN DRONES (*APIS MELLIFERA*), IN THE SALCEDO CANTON PROVINCE OF COTOPAXI"

Author:
Ana Carolina Crespo Lascano

ABSTRACT

Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens is a fundamental tool for genetic improvement and sustainability in beekeeping; however, its efficiency depends largely on the quality of the semen collected from drones. One of the critical factors during semen collection is the degree of the endophallus, which can be partial or total and cause variations in sperm quality. The objective of this study was to evaluate the effect of partial and total eversion of the endophallus on ejaculation and sperm quality in drones (*Apis mellifera*) raised in the Salcedo canton, Cotopaxi province. The research was conducted using a descriptive and observational approach, using drones collected from a local apiary. Semen extraction was performed by manual stimulation of the abdomen, classifying individuals according to the type of eversion achieved. The semen quality parameters evaluated included mass motility, individual motility, and sperm vigor. The results showed a higher frequency of partial versions compared to total eversion, suggesting a physiological limitation of drones under the environmental conditions of the study area. Likewise, drones with partial versions had a percentage of 63%, with higher motility percentages, higher sperm vigor levels, and a lower risk of mucus contamination. In contrast, total version, which occurred in 37% of cases, was associated with a relative decrease in semen quality.

KEYWORDS: Sperm quality, Endophallus, Eversion, Semen, Drone

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|--------------------------------------|
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA | ii |
| CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR..... | iii |
| AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN..... | v |
| AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN | vi |
| AGRADECIMIENTO | vii |
| DEDICATORIA..... | viii |
| RESUMEN..... | ix |
| ABSTRACT | x |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | xi |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xii |
| ÍNDICE DE ANEXOS | ¡Error! Marcador no definido. |
| 1.- INFORMACIÓN GENERAL..... | 1 |
| Título del Proyecto: | 1 |
| 2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO | 2 |
| 3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO | 3 |
| 4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 3 |
| 5. OBJETIVOS..... | 4 |
| 6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACION A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS..... | 4 |
| 7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA..... | 5 |
| 8. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS | 17 |
| 9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL | 17 |
| 11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS..... | 21 |
| 12. Discusión de los resultados | 25 |
| 12. IMPACTOS (TECNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONOMICOS | 29 |
| 13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 29 |
| 14. BIBLIOGRAFÍA..... | 31 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Objetivos, actividades y resultados | 4 |
| Tabla 2: Distribución de muestras por tipo de eversión | 22 |
| Tabla 3: Calidad promedio del semen | 22 |
| Tabla 4: Diferencias significativas entre eversiones | 23 |
| Tabla 5: Frecuencia de vigor por tipo de eversión | 24 |
| Tabla 6: Los resultados del presente trabajo con literatura de referencia | 26 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Localización del lugar de estudio. Fuente: Google Earth | 17 |
| Figura 2. Relación entre puntuación compuesta y vigor. | 24 |
| Figura 3. Distribución de vigor por tipo de eversión..... | 25 |

1.- INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Efecto de la eversión del endófalo sobre la eyaculación y la calidad espermática en zánganos (*Apis mellifera*), en el cantón salcedo Provincia de Cotopaxi

Fecha de inicio: Abril 2025

Fecha de finalización: Marzo 2026

Lugar de ejecución:

Salcedo - Cotopaxi

Facultad que auspicia:

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Recursos zoo-genéticos locales, conservación y desarrollo sostenible.

Equipo de Trabajo:

Tutora: MVZ. Dina Maricela Veloz Veloz, M.Sc

Estudiante: Ana Carolina Crespo Lascano

Área de Conocimiento:

Ciencias Veterinarias, Genética

Línea de investigación:

Análisis, conservación y aprovechamiento racional de la biodiversidad, fauna y recursos naturales para el desarrollo sustentable y la prevención de desastres naturales.

Sub líneas de investigación de la carrera:

Biodiversidad, mejora y conservación de recursos.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La inseminación instrumental de abejas reinas (*Apis mellifera*) se ha establecido como la herramienta más eficaz para el control genético y la mejora de las poblaciones de abejas, permitiendo la selección de rasgos deseables como la mansedumbre y la productividad (1). Sin embargo, el éxito de estos programas depende de la calidad del semen utilizado. La reina de la abeja melífera almacena los espermatozoides en su spermateca por un periodo que puede extenderse hasta cinco años. Por lo tanto, optimizar los protocolos de recolección de semen y la inseminación artificial de la reina es fundamental para el desempeño reproductivo de una colonia productora de miel (2).

Uno de los puntos críticos en el protocolo de inseminación es la obtención del semen a través de la eversión del endófalo del zángano. Este proceso ocurre en dos etapas: la eversión parcial, donde se exponen los cuernos del endófalo, y la eversión total, que expone el bulbo seminal y el semen (3). Existe una variabilidad significativa en la respuesta de los zánganos a la estimulación manual, y estudios recientes indican que forzar la eversión total en zánganos que no están fisiológicamente maduros o bajo condiciones de estrés puede resultar en la contaminación de la muestra con mucus o en daños mecánicos a la membrana espermática (3). Determinar si la recolección en diferentes estados de eversión afecta la integridad celular es necesario para estandarizar un método que maximice la viabilidad espermática.

Además, la calidad espermática es altamente sensible a factores ambientales y de manejo. Parámetros como la concentración, movilidad y la integridad de la membrana (viabilidad) pueden verse alterados por la técnica de manipulación durante la eyaculación inducida (4). Existen protocolos estandarizados en otros países (5), pero hay un vacío de información sobre cómo las condiciones locales de la región andina afectan la fisiología reproductiva de los zánganos. El estrés ambiental asociado a la altura y las fluctuaciones térmicas podría influir en la madurez sexual y la facilidad de eversión, esto significa que los protocolos desarrollados en otras latitudes no sean 100% aplicables sin una validación desarrollada localmente (6).

El desarrollo de esta investigación en el Cantón Salcedo, Provincia de Cotopaxi, tiene una relevancia directa para la apicultura local. Al establecer qué grado de eversión (total o parcial) garantiza una mejor calidad espermática bajo las condiciones ambientales específicas de la Sierra ecuatoriana, este estudio contribuye con información para los criadores de abejas reinas de Salcedo. Este trabajo contribuye con nueva información para mejorar las tasas de éxito de la inseminación artificial en Salcedo y contribuir al conocimiento científico sobre la fisiología

reproductiva de *Apis mellifera* en zonas Andinas, un área poco explorada en la literatura científica actual.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1. Directos

Estudiante del proyecto investigador previo a la obtención del título de Médico Veterinario.

3.2. Indirectos

Estudiantes, docentes e investigadores de Medicina Veterinaria

Productores Apícolas de la provincia de Cotopaxi.

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de que la inseminación instrumental es la herramienta fundamental para el mejoramiento genético en *Apis mellifera*, existe una discrepancia técnica significativa respecto al protocolo óptimo de recolección de semen. La literatura científica debate si la eversión total del endófalco, aunque maximiza el volumen de eyaculado, conlleva un riesgo elevado de contaminación con mucus y daño celular por estrés mecánico, en comparación con la eversión parcial, que podría ofrecer muestras más limpias pero en menores volúmenes (1). Esta falta de consenso genera incertidumbre sobre qué método garantiza la mayor viabilidad, motilidad y vigor espermático, parámetros críticos que determinan la longevidad de la reina y, por ende, la productividad de la colmena. El desconocimiento sobre cómo el grado de presión y exposición durante la eversión afecta la integridad de la membrana espermática impide estandarizar un proceso que asegure tasas de fecundación exitosas.

No se han registrado o no se conocen estudios publicados sobre procesos de inseminación artificial en la Provincia de Cotopaxi. Es posible que esta ausencia de estudios se deba a la falta de incentivos para la investigación y desarrollo tecnológico, como puede ser la presencia de financiamiento e inversión competitiva para el desarrollo del sector apícola. Esta problemática se agrava al considerar el contexto geográfico del Cantón Salcedo, Provincia de Cotopaxi, donde las condiciones ambientales altoandinas (bajas temperaturas, menor presión de oxígeno y radiación UV) imponen un estrés fisiológico adicional sobre los zánganos (3). Actualmente, se carece de información científica desarrollada localmente que valide si los zánganos adaptados a estas condiciones de altura alcanzan la madurez sexual y resistencia física necesarias para soportar la eversión total sin comprometer su calidad seminal. La aplicación de protocolos genéricos, desarrollados para otras latitudes y altitudes, sin una validación local,

podría estar resultando en la recolección de semen de baja calidad, limitando el éxito de los programas de cría y afectando directamente la rentabilidad de los apicultores de la región.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Evaluar el impacto de la eversión parcial o total del endófalo sobre la calidad espermática del zángano (*Apis mellifera*) criados en el cantón Salcedo, Provincia de Cotopaxi.

5.2. Específicos

- Analizar los parámetros de calidad espermática (motilidad masal, motilidad individual y vigor) entre zánganos que han experimentado eversión parcial y total del endófalo.
- Caracterizar el grado de respuesta a la eversión del endófalo (parcial vs. total) mediante estimulación manual en zánganos bajo condiciones altoandinas.
- Determinar la relación entre el tipo de eversión y los niveles de vigor y motilidad espermática para estandarizar el protocolo de colecta local.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1: *Objetivos, actividades y resultados*

| Objetivo 1 | Actividad | Resultado de la actividad | Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos) |
|--|---|--|---|
| Analizar los parámetros de calidad espermática (motilidad masal, motilidad individual y vigor) entre zánganos que han experimentado eversión parcial y total del endófalo. | Captura en campo y evaluación microscópica del semen. | Obtención de las muestras seminales divididas por tratamiento (Grupo A: Parcial vs. Grupo B: Total). | Estimulación manual del abdomen y tórax (Técnica de Cobey). Instrumentos:• Micro-jeringa, Solución diluyente (DMSO o solución salina). |

Caracterizar el grado de respuesta a la eversión del endófalo (parcial vs. total) mediante estimulación manual en zánganos bajo condiciones altoandinas. Captura y Registro de la Técnica: frecuencia de Estimulación manual (Técnica de Cobey). en respuesta (eversión (Técnica de Cobey). laboratorio. parcial vs. total) bajo condiciones locales.

Determinar la relación entre el tipo de eversión y los niveles de motilidad espermiática para estandarizar el protocolo de colecta local. Comparación de datos y análisis de vitalidad mediante tinción diferencial. Estandarización del protocolo de colecta local basado en la integridad de la membrana. Técnica: Frotis con tinción Eosina-Nigrosina para diferenciar células vivas/muertas. Instrumentos: Microjeringas, tubos Eppendorf, DMSO

Fuente: directa

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1 Apicultura

La apicultura se define como la ciencia y el arte de la cría y manejo de las abejas, principalmente de la especie *Apis mellifera*, con el fin de aprovechar sus productos y servicios de polinización. En el contexto moderno, ha evolucionado hacia una actividad zootécnica de precisión que busca el mejoramiento genético para incrementar la productividad y resistencia a enfermedades .

7.1.1 Miel

La miel es una sustancia producida por abejas a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de estas, las cuales las abejas recogen, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan madurar en los panales (1).

7.1.2 Polen

Es el gametofito masculino de las flores recolectado por las abejas, quienes lo aglutinan con néctar y enzimas salivares para formar "pan de abeja". Es la principal fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales para la nutrición de la cría y el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas en las obreras jóvenes (1).

7.1.3 Propóleo

Mezcla resinosa recolectada por las abejas de las yemas de los árboles, flujos de savia u otras fuentes botánicas. Es utilizado para sellar huecos en la colmena y, debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas, sirve como una barrera inmunológica para la colonia (7).

7.1.4 Jalea real

Secreción glandular de las abejas obreras jóvenes (nodrizas), rica en proteínas y ácidos grasos específicos como el ácido 10-hidroxicanoico (10-HDA). Es el alimento exclusivo de todas las larvas en sus primeros días y de la reina durante toda su vida, determinando la casta y la longevidad de esta última (8).

7.1.4 Veneno de abeja (apitoxina)

Líquido incoloro y ácido excretado por las glándulas de veneno situadas en el abdomen de las obreras. Compuesto principalmente por melitina, fosfolipasa A2 y péptidos vasoactivos, actúa como mecanismo de defensa y tiene aplicaciones terapéuticas por sus propiedades antiinflamatorias (9).

7.2 La colmena

Entendido como el "superorganismo", la colmena es la unidad biológica y social compuesta por tres castas: una reina (hembra fértil), miles de obreras (hembras estériles) y, estacionalmente, zánganos (machos). Su funcionamiento depende de la homeostasis térmica y la comunicación mediante feromonas (10).

7.2.1 Reina

La reina es la única hembra sexualmente desarrollada y fértil de la colonia, diferenciándose de las obreras principalmente por su función reproductiva y su desarrollo ontogénico. Su determinación como casta real depende exclusivamente de la alimentación que recibe durante su estado larvario; a diferencia de las obreras, la reina es alimentada exclusivamente con jalea real durante todo su desarrollo, lo que desencadena cascadas hormonales que permiten la

maduración completa de sus ovarios y define su longevidad (8). Es el individuo más importante para la continuidad de la colmena, ya que de ella depende la estructura genética y la productividad de la población (2).

La función biológica primaria de la reina es la reproducción y la transmisión de material genético a las siguientes generaciones. Tras sus vuelos nupciales o mediante la inseminación instrumental, la reina tiene la capacidad única de almacenar millones de espermatozoides en su espermateca por un periodo que puede durar varios años, utilizándolos gradualmente para fertilizar los huevos (1).

La reina se distingue por tener un abdomen más alargado que las obreras y los zánganos, adaptado para albergar ovarios completamente desarrollados capaces de poner miles de huevos diariamente. A diferencia de las obreras, carece de estructuras para la recolección de polen y de glándulas cereras funcionales, ya que su especialización es netamente reproductiva (1).

Desde una perspectiva de calidad, una reina superior se caracteriza por un peso corporal adecuado al nacer y una alta capacidad de almacenamiento de esperma en la espermateca, factores determinantes para el éxito de los programas de cría y la sostenibilidad de la apicultura (1). Asimismo, el rendimiento de la colonia está directamente relacionado con la calidad de la reina, ya sea inseminada natural o artificialmente (2).

7.2.2 Obrera

Las obreras constituyen la casta más numerosa de la colmena y son hembras genéticamente idénticas a la reina, pero fenotípicamente estériles debido a la alimentación diferencial que recibieron durante su etapa larval. A diferencia de la reina, sus ovarios están atrofiados y no son funcionales bajo condiciones normales de la colonia. Son las encargadas de realizar prácticamente todas las tareas de mantenimiento, defensa y aprovisionamiento necesarias para la supervivencia del "superorganismo" (10).

La vida de la obrera se rige por un polietismo temporal, es decir, sus funciones cambian según su edad biológica. En sus primeros días actúan como nodrizas, produciendo jalea real gracias al desarrollo de sus glándulas hipofaríngeas para alimentar a las larvas y a la reina (8). Posteriormente, participan en la construcción de panales, limpieza y termorregulación.

En su etapa más madura, se convierten en pecoreadoras, encargadas de la recolección de recursos externos. Recolectan néctar y polen, el cual aglutinan con enzimas para formar "pan de abeja", la principal fuente proteica de la colonia (1). También recolectan resinas vegetales para elaborar propóleo, fundamental para la inmunidad social y el sellado de la colmena (7).

Además, son responsables de la defensa de la colonia mediante el uso de su aguijón y la inyección de apitoxina (9) .

Anatómicamente, la obrera es más pequeña que el zángano y la reina, pero posee estructuras altamente especializadas que no están presentes en las otras castas. Disponen de corbículas en sus patas traseras para el transporte de polen y propóleo, así como glándulas cereras en su abdomen para la construcción de panales.

Posee un aparato picador asociado a glándulas de veneno, el cual utiliza para proteger los recursos de la colmena frente a depredadores (9). Su ciclo de vida es corto, variando desde unas pocas semanas en temporadas de alto flujo de néctar (debido al desgaste físico del vuelo) hasta varios meses durante el invierno, cuando su función principal es generar calor metabólico para proteger a la reina.

7.2.3 El zángano

Es el individuo macho de la colonia, haploide, producto de un huevo no fertilizado (partenogénesis). Su función biológica primaria es transmitir el material genético a una reina virgen durante el vuelo nupcial. A diferencia de las obreras, los zánganos no poseen estructuras para la recolección de alimento ni aguijón, y su madurez sexual y capacidad de vuelo son críticas para el éxito reproductivo (10).

7.4 Anatomía del aparato reproductor del Zángano

El sistema reproductor del zángano es voluminoso en comparación con su tamaño corporal, ocupando gran parte del abdomen. Anatómicamente consta de dos testículos, dos vasos deferentes, dos vesículas seminales, dos glándulas mucosas y el endófalo o órgano copulador (10).

7.5 Fisiología del aparato reproductor del macho

La fisiología reproductiva del zángano (*Apis mellifera*) se caracteriza por un proceso de gametogénesis finito y pre-imaginal (3). A diferencia de la mayoría de los vertebrados, la espermatogénesis (producción de espermatozoides) se completa casi en su totalidad durante el estadio de pupa (11). Al momento de la emergencia del adulto, los espermatozoides ya están formados en los testículos (12).

El proceso fisiológico crítico durante la vida adulta del zángano no es la producción, sino la migración y maduración de estos espermatozoides. Durante los primeros 3 a 6 días de vida, los espermatozoides migran desde los testículos (que posteriormente se atrofian) hacia las vesículas

seminales. Allí, sufren cambios bioquímicos en su membrana y metabolismo que les otorgan la capacidad de fertilización y movilidad (12).

Finalmente, la fisiología de la eyaculación es un proceso mecánico-hidráulico: no depende de contracciones musculares directas del pene, sino de una contracción masiva de los músculos abdominales que eleva la presión de la hemolinfa, forzando la eversión explosiva del endófalo y la expulsión del semen y el mucus (11).

7.5.1 Testículos

Órganos pares donde ocurre la espermatogénesis durante el estado de pupa. Curiosamente, en el zángano adulto los testículos se atrofian y reducen su tamaño drásticamente, ya que la producción de esperma finaliza antes de la emergencia del adulto (11)(10) .

7.5.2 Vesículas seminales

Estructuras donde migran los espermatozoides desde los testículos durante los primeros días de vida del adulto. Aquí se almacenan y maduran los espermatozoides hasta el momento de la cópula o eyaculación; es el punto donde se encuentra la mayor concentración de esperma viable (11)(10) .

7.5.3 Glándulas mucosas

Glándulas accesorias grandes y blancas asociadas a las vesículas seminales. Secretan una sustancia espesa (mucus) que, al contacto con el aire o agua, se coagula rápidamente. Su función es formar un tapón de apareamiento en la reina tras la cópula, pero en inseminación artificial representa el principal riesgo de contaminación (11)(10) .

7.5.4 Canal eyaculador

Conducto muscular que conecta las partes internas con el endófalo, permitiendo el paso del semen y el mucus durante el proceso explosivo de la eyaculación (11)(10) .

7.5.5 Endófalo (Órgano copulador)

Órgano membranoso complejo e invaginado dentro del abdomen. Durante la cópula, se evierte hacia afuera mediante presión hemolinfática. Se divide en vestíbulo, cuello, cuernos (cornua) y bulbo. Su eversión es el mecanismo clave para la transferencia de esperma (10).

7.6 Características del eyaculado

7.6.1 Colecta del semen

La recolección para inseminación instrumental se basa en la eversión manual del endófalco mediante presión en el tórax y abdomen (1).

7.6.2 La eversión parcial

Etapa inicial de la eversión donde solo se exponen el vestíbulo y los cuernos de color anaranjado. En esta fase, el semen aún no es visible externamente. Algunos autores sugieren detener la presión aquí y masajear suavemente para evitar la expulsión violenta de mucus (1).

7.6.3 La eversión total

Etapa final donde el bulbo del endófalco se expone completamente. El semen aparece en la punta del bulbo, a menudo sobre una capa de mucus blanco. Aunque facilita la recolección de todo el volumen disponible, conlleva mayor riesgo de contaminación con mucus, lo cual es letal para los espermatozoides durante el almacenamiento (1).

7.8 Análisis macroscópico del semen

7.8.1 Semen de zángano

Fluido viscoso de color crema o amarillento compuesto por espermatozoides y plasma seminal. Un zángano maduro produce entre 8 a 12 millones de espermatozoides en un volumen promedio de 1.0 a 1.5 microlitros (μL). La alta densidad celular es una característica distintiva en comparación con mamíferos (5).

Esta etapa se basa en la inspección visual directa de las características físicas de la muestra contenida en el capilar de vidrio o en la punta del endófalco evertido (13). Las características físicas incluyen el volumen, color y pH.

7.8.2 Volumen eyaculado

Cantidad física de fluido seminal obtenido, medido generalmente en microlitros (μL) mediante capilares calibrados. Varía según la raza, la estación y la nutrición del zángano durante su etapa larval (1).

7.8.2 Color y pH seminal

El semen normal presenta un color crema a beige. Un color marrón o grisáceo puede indicar infección o necrosis. El pH del semen de abeja es neutro a ligeramente alcalino, de

aproximadamente 6.8 a- 7.1, parámetro crítico para mantener la inactividad metabólica durante el almacenamiento (1).

7.9 Análisis microscópico del semen

7.9.1 Motilidad masal

Evaluación subjetiva del movimiento en conjunto de los espermatozoides (efecto de "remolinos" u "olas") observada a bajo aumento. Refleja la viabilidad general de la muestra inmediatamente después de la recolección (13).

Clasificación

- 5 Muy buena (90%)
- 4 Bueno (70-85%)
- 2 Pobre (20-40%)
- 1Muy pobre (10%)
- 0 Muertos (0%)

7.9.2 Motilidad individual

Se define como el porcentaje de células que presentan cualquier tipo de movimiento activo. Los espermatozoides pueden clasificarse como libremente móviles (si la cabeza muestra desplazamiento) o circulares (si la cabeza y la cola se solapan). A diferencia de los mamíferos, el movimiento del zángano suele ser vibratorio rápido con un patrón circular (14).

Clasificación

- Muy buena (80-100%)
- Bueno(60-70%)
- Regular (40-59%)
- Pobre (<40%)

7.9.3. Concentración de espermatozoides

Es el número de células espermáticas presentes por unidad de volumen, que en zánganos suele oscilar entre 2 y 9 millones de espermatozoides por μL . Este parámetro permite evaluar el proceso de espermatogénesis y la madurez sexual del individuo. Generalmente, se cuantifica mediante el uso de una cámara Neubauer tras una dilución previa.

7.9.4 Vigor

Fuerza e intensidad del movimiento individual del flagelo espermático. Un vigor bajo suele correlacionarse con daños por estrés térmico o manejo brusco durante la eversión (14).

Clasificación

- 0 Sin movimiento
- 1 Movimiento vibratoria sin desplazamiento
- 2 Movimiento lento poco progresivo
- 3 Movimiento moderado progresivo
- 4 Movimiento rápido y progresivo
- 5 Movimiento rápido y muy progresivo

7.9.5 Morfología espermática

El espermatozoide de *Apis mellifera* es una célula larga y filamentosa, con una longitud de 250-270 μm y un ancho de apenas 0.7 μm . Se compone de tres regiones principales: una cabeza pequeña y estrecha (que incluye el complejo acrosomal y el núcleo), el centriolo adjunto y un flagelo extremadamente largo. Según la caracterización morfológica realizada por Yániz et al. (14), los espermatozoides se clasifican en cuatro categorías:

- **Espermatozoides normales:** Células filamentosas con una región de la cabeza pequeña y estrecha, y un flagelo largo sin dobleces abruptos, enrollamientos o roturas.
- **Defectos de la cabeza:** Incluyen formas anormales (desviaciones de la forma normal) y acrosomas dañados, en los cuales se puede distinguir el perforatorium.
- **Defectos de la cola:** Se subdividen en colas enrolladas, deshilachadas, rotas y dobladas.
- **Anomalías múltiples:** Espermatozoides que presentan cualquier combinación de los defectos anteriores.

7.10 Técnicas para la evaluación de la morfología espermática

7.10.1 Eosina – Nigrosina

Técnica de tinción diferencial para evaluar la integridad de la membrana plasmática. La Eosina penetra en las células con membranas dañadas (tiñéndolas de rosa/rojo = muertas), mientras que la Nigrosina crea un fondo oscuro de contraste. Las células vivas permanecen incoloras (blancas) al excluir el colorante. Es una técnica estándar, económica y efectiva para campo (1).

7.11 Factores que afectan las características del semen

7.11.1 Edad y Madurez Sexual

A diferencia de otros animales, el zángano nace con una reserva finita de espermatozoides producidos durante su etapa de pupa (14).

7.11.2 Factores Ambientales y Climáticos

Las condiciones externas ejercen una presión directa sobre la fisiología reproductiva del macho. El estrés térmico puede dañar la integridad de la membrana espermática. Temperaturas extremas durante el vuelo o el transporte afectan negativamente el vigor del flagelo. En zonas altoandinas, como el cantón Salcedo, la menor presión de oxígeno y las fluctuaciones térmicas pueden retrasar la madurez sexual y dificultar la eversión completa del endófalo (14).

7.11.3 Sanidad y Nutrición

El estado de salud de la colonia durante la fase de cría de los zánganos determina la calidad del semen adulto. Por ejemplo, la presencia de ácaros, hongos y nemátodos pueden causar estrés metabólico y contaminación de las muestras. Por otro lado, dietas deficientes en polen y jalea real durante el desarrollo larval resulta en zánganos menos desarrollados (14).

7.11.4 Técnica de Manejo y Extracción

La manipulación humana es, un factor importante. Una presión excesiva durante la eversión puede causar daño al zángano o contaminación con mucus. El uso de diluyentes incorrectos o la exposición del semana a cambios térmicos puede afectar la motilidad. La técnica de extracción requiere destreza para estimular la contracción de los músculos abdominales del zángano sin aplicar una fuerza desmedida que comprometa la integridad celular. El protocolo estándar sugiere sujetar al zángano por el tórax y aplicar una presión dorso-ventral suave en el abdomen para inducir la eversión parcial, seguida de una presión lateral controlada en la base del abdomen para exponer el bulbo seminal y liberar el semen (1).

7.11 Diluyentes

Son soluciones salinas isotónicas utilizadas para lavar el semen o diluirlo para análisis y almacenamiento. El más común es la solución "Kieffer" o "Salina Tris", diseñadas para mantener el pH y la presión osmótica adecuada para evitar el shock osmótico de los espermatozoides. El uso de un diluyente adecuado cumple funciones críticas para el éxito de la inseminación instrumental (1).

7.12 Fisiología del estrés oxidativo en el semen de zángano

El éxito de la inseminación instrumental y el almacenamiento a largo plazo del semen en la espermateca de la reina dependen de la capacidad del espermatozoide para mantener su homeostasis celular frente a factores estresantes exógenos (15). Uno de los mecanismos más deletéreos asociados a la manipulación ex vivo de los gametos es el estrés oxidativo, definido como el desequilibrio entre la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante del plasma seminal (16,17). A diferencia de los mamíferos, la membrana plasmática de los espermatozoides de insectos, incluido *Apis mellifera*, contiene una proporción excepcionalmente alta de ácidos grasos poliinsaturados, lo que los hace altamente susceptibles a la peroxidación lipídica (18).

Estudios recientes han demostrado que el estrés mecánico inducido durante la recolección de semen, específicamente la presión abdominal excesiva requerida para lograr la eversión total del endófalo, puede desencadenar una cascada de producción mitocondrial de anión superóxido y peróxido de hidrógeno (19). Cuando la producción de ROS excede los mecanismos de defensa enzimática (como la superóxido dismutasa y la catalasa presente en el plasma seminal), se produce un daño oxidativo irreversible en el axonema, lo que resulta en la pérdida inmediata de la motilidad y el vigor (20).

Más crítico aún es el daño al ADN. La cromatina del espermatozoide de abeja es compacta, pero el estrés oxidativo puede inducir fragmentación de cadena simple y doble, una patología que no siempre afecta la motilidad inicial pero que resulta en "muerte embrionaria tardía" tras la fecundación (21). Investigaciones realizadas por Rangel y Fisher (22) sugieren que los protocolos de extracción agresivos reducen la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas. Asimismo, se ha reportado que la contaminación con fluidos no espermáticos (como el mucus, frecuente en la eversión forzada) introduce iones metálicos que catalizan reacciones de Fenton, exacerbando la producción de radicales hidroxilos altamente tóxicos (22,23).

Por tanto, la preservación de la integridad antioxidante del eyaculado es fundamental. El uso de técnicas de eversión parcial, que minimizan el trauma tisular y la mezcla de fluidos, ha sido correlacionado con una menor generación de marcadores de estrés oxidativo (24). La adición de antioxidantes exógenos en los diluyentes ha mostrado resultados prometedores para mitigar estos daños (25), pero la estrategia primaria debe ser siempre la prevención del daño mecánico durante la fase de colección (26).

7.13 Impacto de la altitud y factores ambientales en la reproducción de himenópteros

La biología reproductiva de *Apis mellifera* es altamente sensible a las variables climáticas y geográficas (27). En regiones de alta montaña como los Andes, los zánganos enfrentan desafíos fisiológicos distintos a los de sus contrapartes en zonas bajas, derivados principalmente de la hipoxia hipobárica, la radiación ultravioleta y las fluctuaciones térmicas extremas (28). La espermatogénesis, que ocurre durante la etapa pupal, puede verse comprometida por el estrés térmico acumulado; temperaturas de desarrollo por debajo de los 32°C, comunes en colmenas de altura con termorregulación deficiente, se han vinculado a una reducción en el conteo total de espermatozoides y a un incremento en las anomalías morfológicas (29,30).

La altitud impone además una limitante bioenergética. La baja presión parcial de oxígeno exige una mayor eficiencia metabólica para el vuelo nupcial. Estudios en fisiología de insectos indican que la hipoxia limita la capacidad oxidativa de los músculos de vuelo, reduciendo el tiempo y la distancia que los zánganos pueden recorrer para alcanzar las Áreas de Congregación de Zánganos (DCA) (31,32). Esto hace que la monta natural sea menos eficiente en zonas altoandinas, justificando la necesidad de implementar programas de inseminación instrumental adaptados localmente (33).

Además, existe evidencia sobre la adaptación de ecotipos locales. Investigaciones genómicas en abejas de montaña han identificado selección positiva en genes relacionados con la fosforilación oxidativa y la resistencia a la radiación UV (34,35). Sin embargo, esta adaptación tiene un costo biológico: la plasticidad fenotípica puede priorizar la supervivencia individual sobre la inversión reproductiva masiva (36). Esto explicaría por qué los zánganos de altura podrían presentar volúmenes de eyaculado menores o una respuesta más lenta a la estimulación mecánica en comparación con líneas comerciales seleccionadas en climas templados (37).

El estrés abiótico también afecta la maduración sexual post-emergencia. La migración de espermatozoides a las vesículas seminales puede retrasarse en climas fríos, lo que significa que la edad cronológica del zángano no siempre coincide con su madurez fisiológica (38). Por consiguiente, forzar la eversión total en zánganos que fisiológicamente están conservando energía o cuya maduración es tardía debido al frío ambiental, contraviene su biología adaptativa y resulta en muestras de baja calidad (39).

7.14 Marcadores moleculares avanzados de calidad seminal

Tradicionalmente, la calidad del semen de zángano se ha evaluado mediante parámetros macroscópicos y microscópicos básicos como el volumen, la concentración y la motilidad. Sin

embargo, estos indicadores clásicos no siempre predicen con exactitud la capacidad fertilizante real ni la longevidad del espermatozoide en la espermateca (40). La andrología moderna de insectos ha incorporado marcadores moleculares que revelan daños subcelulares "invisibles" a la microscopía óptica convencional, los cuales son particularmente relevantes cuando se evalúan técnicas de manipulación física (41).

Uno de los parámetros más críticos es la integridad del acrosoma. En *Apis mellifera*, el complejo acrosomal es esencial para la penetración del corion del huevo. Daños sutiles en la membrana acrosomal, detectables mediante lectinas fluorescentes (como PNA-FITC), pueden ocurrir debido a la presión mecánica excesiva durante la eversión total, incapacitando al espermatozoide para la fertilización a pesar de que este mantenga su motilidad (42,43).

Otro marcador avanzado es el Potencial de Membrana Mitocondrial. Las mitocondrias en el derivado mitocondrial del espermatozoide suministran la energía ATP necesaria para el movimiento flagelar. El uso de sondas fluorocromáticas como JC-1 ha permitido determinar que poblaciones de espermatozoides sometidas a estrés físico pueden mantener la membrana plasmática intacta (viables según tinción Eosina-Nigrosina) pero haber perdido su potencial mitocondrial, lo que los condena a una inmovilidad futura inminente (44,45).

Finalmente, la estructura de la cromatina es el determinante último de la seguridad genética. Ensayos como el SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) o TUNEL han revelado que el semen de zángano es susceptible a la fragmentación del ADN inducida por el manejo (46). Se ha observado una correlación negativa entre el grado de manipulación del abdomen y la integridad del ADN (47). Además, la expresión de marcadores de apoptosis (como fosfatidilserina externa detectada con Anexina V) aumenta significativamente en muestras contaminadas con mucus o sometidas a shock osmótico (48,49). La aplicación teórica de estos conocimientos sugiere que la técnica de eversión parcial, al ser menos invasiva, preserva mejor la arquitectura molecular del gameto, asegurando no solo la fecundación, sino el desarrollo viable de la cría de obreras (50,51).

8. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H_0)

No hay diferencia entre la eversión parcial y total sobre la calidad espermática de los zánganos.

Hipótesis alternativa (H_a)

La eversión total del endófalo resulta en una mejor calidad espermática en comparación con la eversión parcial.

9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1. Metodología

La investigación emplea un enfoque descriptivo y observacional. Se basa en la aplicación de técnicas de reproducción asistida y evaluación microscópica para comparar los efectos de la manipulación física sobre la calidad espermática.

9.2. Ubicación

El estudio se llevó a cabo en el apiario del Sr. Octavio Crespo, ubicado en el cantón Salcedo, parroquia San Miguel, provincia de Cotopaxi. Los análisis especializados se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción del Campus Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi (Figura 1).

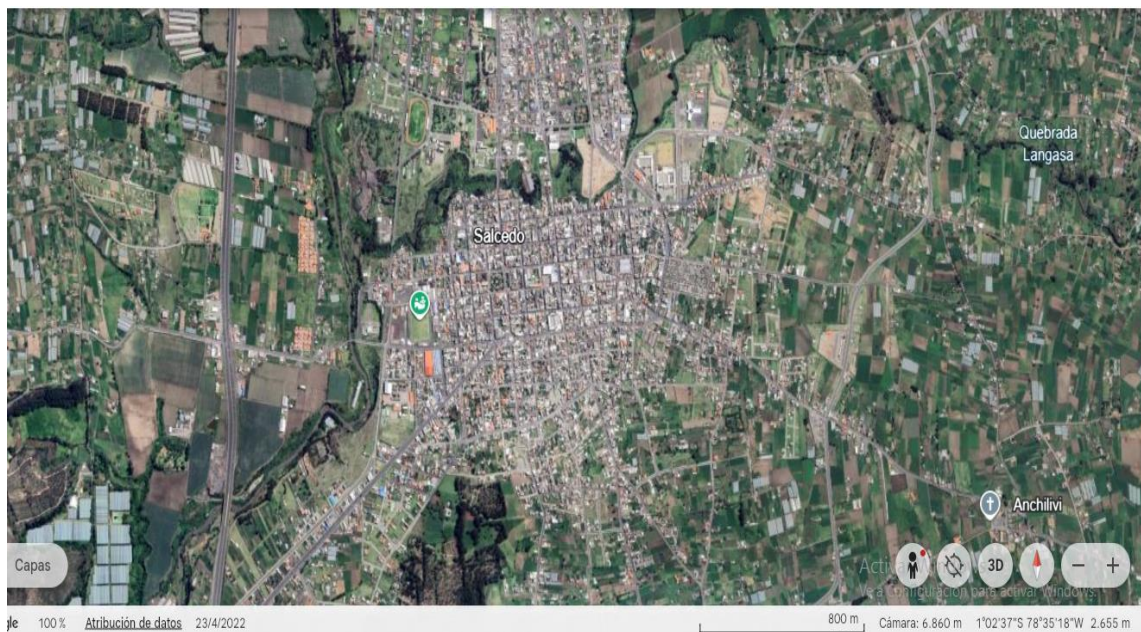


Figura 1. Localización del lugar de estudio. Fuente: Google Earth

9.3. Situación Geográfica

El cantón salcedo se encuentra ubicado al sur-orientado de la provincia de Cotopaxi, se extiende desde la cordillera occidental, hasta los páramos de la cordillera Central, con un largo de 50km, mientras que su ancho apenas tiene un promedio de 10km.

9.4 Límites

Norte: Los cantones de Pujilí y Latacunga (Belisario Quevedo).

Sur: Los cantones de Ambato y Píllaro (Provincia de Tungurahua).

Este: La Cordillera de los Andes (Provincia del Napo)

Oeste: El cantón Pujilí Parroquia de Angamarca, (Provincia de Cotopaxi).

9.5 Coordenadas

Latitud: -1.043602

Longitud: -78.590737

9.6. Clima

14 °C en promedio.

9.7. Instalaciones, Materiales y Equipos

9.7.1 Instalaciones

- Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi (Campus Salache)

9.7.2. Materiales de oficina

- Computadora
- Calculadora
- Resma de papel
- Internet (Horas)
- Copias
- Lápiz, marcadores y esferográficos
- Memory Flash

9.7.3. Materiales físicos o de campo

- Caja transportadora

- Guantes de manejo
- Traje de apicultor
- Botas
- Ahumador
- Careta o velo
- Fósforo
- Palanca para mover los cuadros
- Cepillo para desabejar

9.7.4. Equipos y materiales de laboratorio

- Mascarilla
- Cofia
- Calefactor
- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Jeringas de insulina
- Placa Térmica
- Tubos Eppendorf
- Catéter mariposa
- Pinzas
- Tijeras
- Suero fisiológico

9.7.5. Materiales químicos

- Diluyente (DMSO)
- Tinción (eosina-nigrosina)

9.7.6. Materiales biológicos

- Semen de zángano

9.8. Población de Estudio

La población de estudio estuvo constituida por 500 zánganos de la especie *Apis mellifera* en un periodo de tiempo de dos meses (Abril- Mayo 2025). Los individuos fueron seleccionados de las colmenas del apiario ubicado en el cantón Salcedo. Para el proceso experimental, se realizó

la captura de los machos de forma aleatoria, sin aplicar criterios de exclusión por tamaño o edad aparente, recolectándolos directamente de los cuadros de la colmena en compañía del propietario del apiario para asegurar un manejo técnico adecuado que preservara el bienestar de la colonia.

Las muestras biológicas consisten en el material seminal obtenido de estos individuos. Se determinó que el proceso de captura y transporte se realizaría dos días por semana, iniciando a las 14:00, mediante seis jornadas de muestreo. Para garantizar la supervivencia de los zánganos y la integridad del semen durante el traslado hacia el laboratorio, los individuos fueron movilizados en una caja transportadora debidamente adecuada para conservar la temperatura interna.

9.9. Tipo de investigación

La presente investigación se definió como un estudio de tipo descriptivo y observacional, enfocado en la caracterización de los efectos mecánicos de la eversión sobre la fisiología reproductiva de los insectos. El diseño permitió detallar las variaciones en la calidad seminal sin manipular variables ambientales, centrándose en la respuesta biológica ante dos técnicas de extracción distintas.

10. Procedimiento

El desarrollo práctico de la investigación se estructuró en etapas secuenciales que abarcaron desde el manejo en el apiario hasta el análisis especializado en laboratorio.

10.1. Manejo de Campo y Captura

Se identificaron inicialmente las colmenas que conformaban el apiario. El proceso de captura se efectuó dos días por semana, a partir de las 14:00, completando un total de seis jornadas de muestreo. Los zánganos fueron transportados en una caja diseñada específicamente para conservar la temperatura estable, lo cual garantizó la supervivencia de los individuos durante el traslado al laboratorio.

10.2. Protocolo de Laboratorio y Extracción Seminal

Una vez en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, se adecuó el ambiente a una temperatura de 34 °C. El procedimiento de extracción se ejecutó de la siguiente manera:

1. Eversión del Endófalo: Se colocó al zángano entre los dedos pulgar e índice, aplicando presión en el abdomen para lograr la eversión parcial. Posteriormente, se deslizaron los dedos hacia abajo suavemente para provocar la eversión total del bulbo seminal.

2. Recolección: El semen se recolectó mediante el uso de una micro-jeringa, teniendo especial cuidado en evitar la aspiración de mucus para no obstruir el instrumental ni contaminar la muestra.
3. Registro y Conservación: Las muestras válidas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml con una dilución de DMSO para su posterior evaluación.

10.3. Evaluación de la Calidad Seminal

Se analizaron de forma cualitativa parámetros como la motilidad masal, el vigor y la vitalidad. Para el vigor espermático, se utilizó una escala ordinal de 0 a 5 basada en la rapidez del movimiento progresivo observado al microscopio. Finalmente, se realizó un frotis empleando la tinción de Eosina-Nigrosina, lo que permitió diferenciar, bajo el microscopio, las células vivas de aquellas que presentaban daños en su membrana.

Motilidad (Masal e Individual) y Vigor: Se depositó una gota de semen diluido sobre un portaobjetos precalentado a 37 °C. Mediante observación microscópica a 10x y 40x, se estimó el porcentaje de movimiento en masa (olas), el porcentaje de espermatozoides con movimiento individual progresivo y se asignó una calificación de vigor en una escala de 0 a 5 según la fuerza e intensidad del batido flagelar.

Morfología y Vitalidad: Se realizó un frotis mezclando una gota de semen con el colorante vital Eosina-Nigrosina. Tras secar la muestra, se observó bajo objetivo de inmersión (100x) para contar y clasificar los espermatozoides, determinando el porcentaje de formas normales/anormales y diferenciando las células vivas (blancas/incoloras) de las muertas (teñidas de rosa).

11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

11.1 Eficiencia de la colecta

La eficiencia en la recolección de semen estuvo ligada a la capacidad de respuesta fisiológica de los zánganos a la estimulación manual en las condiciones climáticas de Salcedo. Según los datos observados en la Figura 1, se obtuvo una frecuencia significativamente mayor de eversión parcial (315 individuos) en comparación con la eversión total (185 individuos).

11.2 Caracterización de la muestra

Tabla 2: Distribución de muestras por tipo de eversión

| Tipo de Eversión | Número | Porcentaje |
|-------------------------|---------------|-------------------|
| Parcial | 315 | 63% |
| Total | 185 | 37% |
| Total | 500 | 100% |

Fuente: Directa

La mayoría de las muestras (63%) corresponden a eversión parcial, esta diferencia sugiere que, bajo las condiciones de manejo y clima local (14 °C promedio), una proporción considerable de los zánganos no alcanza la eversión total de manera espontánea o sencilla. Como se menciona en la literatura (1), forzar la eversión total en individuos que no presentan una respuesta inmediata puede incrementar el riesgo de contaminación con mucus, un factor crítico observado en la práctica (Anexo 9) y que puede comprometer la viabilidad de la muestra.

11.3 Estadísticos descriptivos

Tabla 3: Calidad promedio del semen

| Parámetro | Media | Desviación Estándar | Mediana | Mínimo | Máximo |
|--------------------------|--------------|----------------------------|----------------|---------------|---------------|
| Motilidad masal (%) | 83.28 | 11.05 | 90.00 | 30.00 | 90.00 |
| Motilidad individual (%) | 76.45 | 12.94 | 65.00 | 50.00 | 90.00 |
| Morfología (%) | 86.22 | 6.06 | 90.00 | 67.00 | 90.00 |
| Vigor (1-5) | 4.16 | 0.88 | 4.00 | 2.00 | 5.00 |
| Puntuación compuesta | 81.98 | 7.91 | 81.67 | 49.00 | 90.00 |

Fuente: Directa

Los valores promedio son altos en todos los parámetros motilidad en masa distribución negativamente sesgada (-3.28) con concentración en valores altos, morfología también presenta sesgo negativo (-1.86) y vigor predominante: 84% de las muestras tienen vigor 4 o 5. Al correlacionar estos datos con el método de extracción, se evidencia que la eversión parcial no solo es más frecuente, sino que también mantiene niveles en una mayor cantidad de muestras.

11.4 Comparación entre tipos de eversión

Tabla 4: Diferencias significativas entre eversiones

| Parámetro | Eversión Parcial (Media±DE) | Eversión Total (Media±DE) | Prueba Estadística | p-valor |
|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Motilidad masal | 85.8 ± 5.73 | 79.0 ± 15.7 | Mann-Whitney W = 37112.5 | <0.0001 |
| Motilidad individual | 78.5 ± 12.5 | 73.0 ± 13.0 | Mann-Whitney W = 35350 | <0.0001 |
| Morfología | 86.0 ± 6.60 | 86.6 ± 5.01 | Mann-Whitney W = 29387.5 | 0.8495 |
| Vigor | 4.37 ± 0.54 | 3.81 ± 1.19 | Mann-Whitney W = 35187.5 | <0.0001 |
| Puntuación compuesta | 83.4 ± 5.90 | 79.5 ± 10.0 | Mann-Whitney W = 36175 | <0.0001 |

Fuente: directa

Eversión Parcial superior presenta valores significativamente más altos en motilidad masal (6.8 puntos porcentuales mayores), motilidad individual (5.5 puntos porcentuales mayores), vigor (0.56 puntos mayores), puntuación compuesta (3.9 puntos mayores), morfología similar no hay diferencias significativas entre tipos de eversión, mayor variabilidad en eversión total, mayor desviación estándar en todos los parámetros

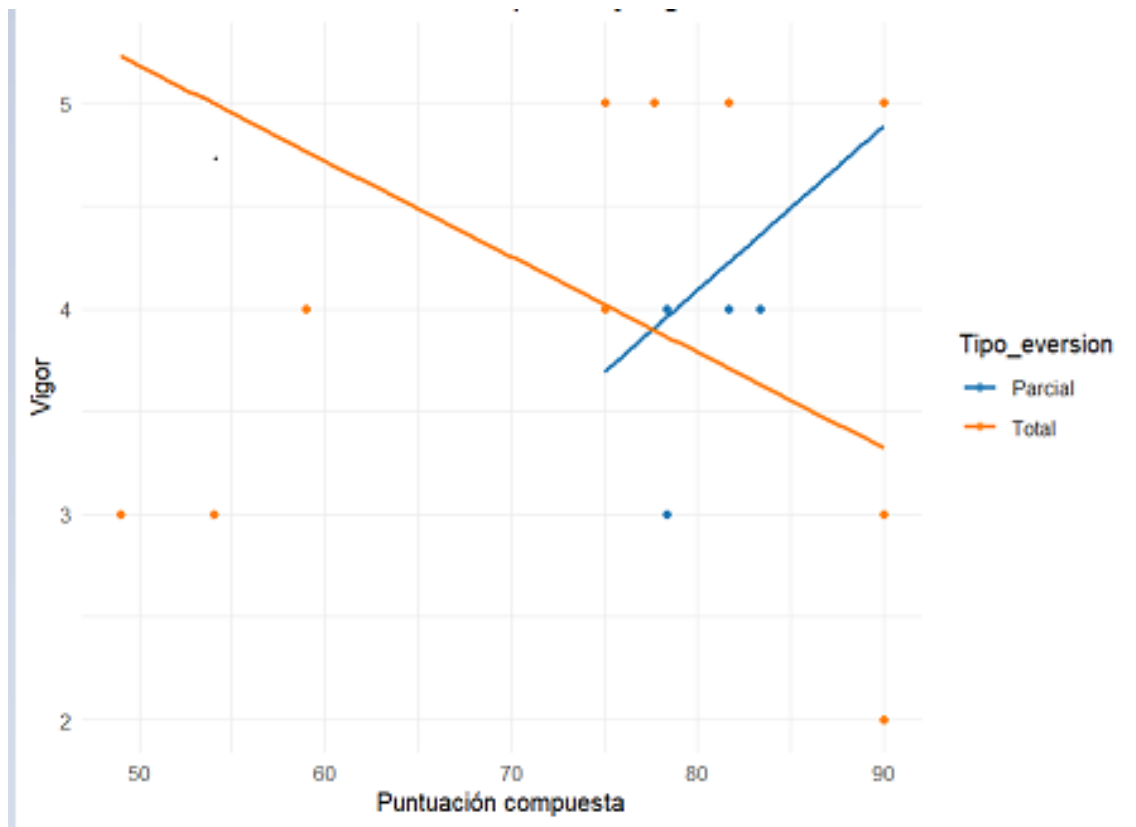


Figura 2. Relación entre puntuación compuesta y vigor.

Fuente: directa

11.5 Distribución del vigor

Tabla 5: Frecuencia de vigor por tipo de eversión

| Vigor | Eversión Parcial | Eversión Total | Total |
|--------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 2 | 0 (0%) | 40 (21.6%) | 40 (8%) |
| 3 | 10 (3.2%) | 30 (16.2%) | 40 (8%) |
| 4 | 180 (57.1%) | 40 (21.6%) | 220 (44%) |
| 5 | 125 (39.7%) | 75 (40.5%) | 200 (40%) |
| Total | 315 (100%) | 185 (100%) | 50000% |

El vigor, evaluado en una escala de 0 a 5, refleja la intensidad del movimiento flagelar individual. Los resultados de la tabla 4 (frecuencia de vigor por tipo de eversión) muestran una tendencia clara eversión parcial concentrada en alta calidad: 96.8% con vigor ≥ 4 , en la eversión

total, aunque los niveles 4 y 5 siguen siendo los más altos tiene muestras de baja calidad: 21.6% con vigor 2 (ausente en parcial). Estos hallazgos sugieren que el manejo físico menos agresivo de la eversión parcial favorece una mayor energía metabólica en los espermatozoides. La presencia de movimientos vigorosos (Vigor 4) y ondas rápidas (Vigor 5) en la mayoría de las muestras de eversión parcial indica que este método es óptimo para asegurar que los espermatozoides tengan la fuerza necesaria para migrar hacia la espermática de la reina tras la inseminación.

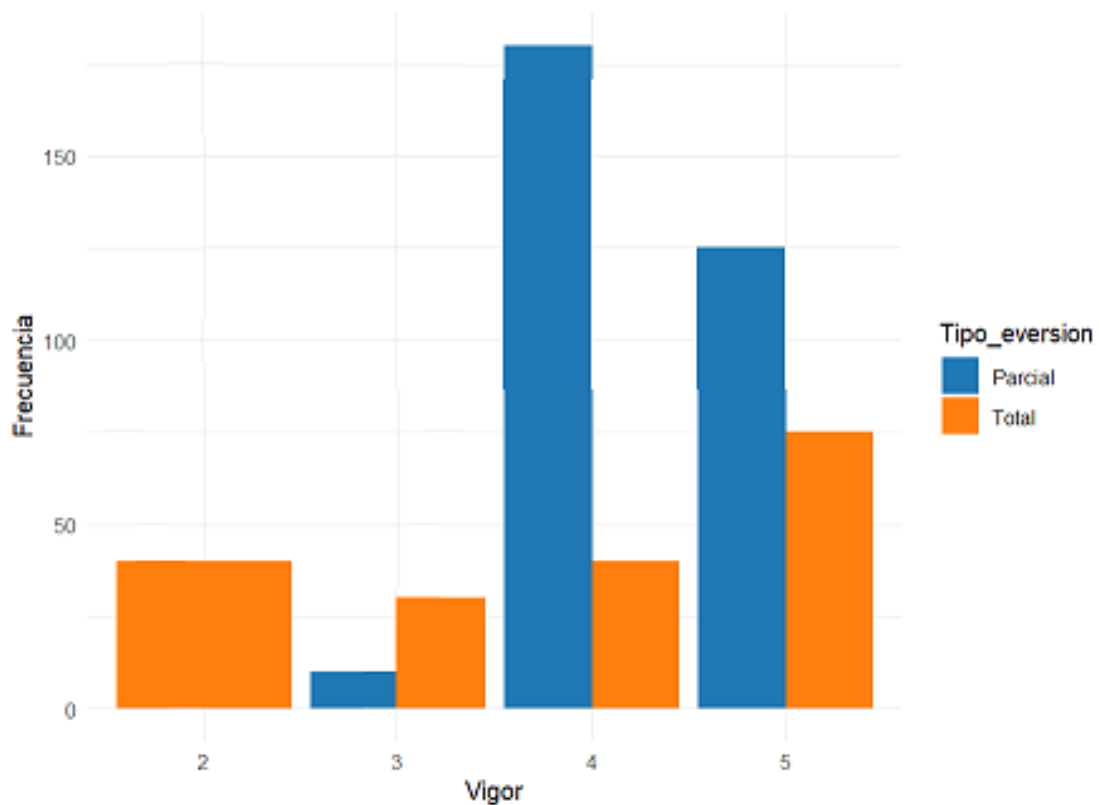


Figura 3. Distribución de vigor por tipo de eversión.

Fuente: directa

12. Discusión de los resultados

Una comparación entre los hallazgos de la tesis y los valores de referencia de la literatura se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Los resultados del presente trabajo con literatura de referencia

| Parámetro Evaluado | Resultado Tesis (eversión parcial) | Resultado Tesis (eversión total) | Referencia Externa Contrastante | Interpretación del Contraste |
|--------------------|------------------------------------|----------------------------------|--|---|
| Motilidad Masal | 85.8% | 79.0% | Gençer & Kahya (52): Caída de ~10% tras eyaculación completa. | La tesis confirma empíricamente la pérdida de viabilidad por estrés mecánico predicha por Gençer & Kahya (52). |
| Éxito de Eversión | 63% (eversión parcial) | 37% (eversión total) | Rousseau et al. (53): Alta tasa de fallo en eversión manual en zánganos maduros. | La falla en lograr eversión total no es inmadurez, sino una limitación biomecánica común exacerbada por la altitud. |
| Vigor (Escala 1-5) | 4.37 | 3.81 | Collins (2004) (54): Manipulación excesiva reduce la calidad. | La manipulación adicional para forzar la eversión total daña la maquinaria mitocondrial del esperma. |
| Riesgo Mucus | Bajo | Alto | Woyke (2010) (55): Mucus altera el ambiente espermático. | La eversión parcial funciona como técnica aséptica superior al evitar la expulsión y mezcla del mucus. |

Fuente: directa

Se determinó que la eversión parcial del endófalo preserva significativamente mejor la calidad espermática, obteniendo una motilidad masal del 85.8% y un vigor promedio de 4.37, superando estadísticamente a la eversión total, la cual presentó una disminución en la calidad debido al estrés mecánico asociado a la manipulación.

La caracterización de la respuesta a la estimulación manual bajo las condiciones altoandinas de Salcedo evidenció que la eversión parcial es la respuesta fisiológica predominante (63%), mientras que la eversión total fue menos frecuente (37%) y más difícil de inducir, sugiriendo que las condiciones ambientales locales limitan la facilidad de exposición completa del órgano copulador.

Se estableció una relación directa entre el tipo de eversión y la integridad celular, concluyendo que para estandarizar el protocolo de colecta en la zona, se debe limitar la manipulación hasta la fase de eversión parcial. Este método demostró ser el más eficiente para obtener dosis seminales con alto vigor y libres de contaminación por mucus.

Los resultados, que demuestran una calidad espermática superior en la eversión parcial, contrastan con ciertos protocolos estandarizados de cría intensiva descritos por Cobey y Bienkowska (1), quienes generalmente describen la eversión total como el paso final necesario para maximizar el volumen de la dosis. Sin embargo, este estudio evidencia que, bajo las condiciones locales, la búsqueda de ese volumen adicional a través de la eversión total conlleva un costo inaceptable en términos de estrés mecánico y contaminación. Esto corrobora lo sugerido por Yániz et al. (13), quienes advierten que la manipulación brusca es un factor determinante en la reducción del vigor espermático, confirmando que en el contexto de Salcedo, la técnica debe priorizar la integridad de la membrana (garantizada en la fase parcial) por encima de la cantidad total de eyaculado.

La dificultad observada para lograr la eversión total espontánea (presente solo en el 37% de la muestra) difiere de las tasas de éxito reportadas en estudios realizados a nivel del mar o en condiciones controladas. Esta limitación fisiológica se alinea con las investigaciones de Zhao et al. y McAfee et al. (3), quienes establecen que los factores de estrés ambiental afectan directamente la capacidad reproductiva del zángano. No obstante, nuestro trabajo aporta una distinción específica: identifica a las condiciones altoandinas no solo como un factor de estrés térmico, sino como una limitante física para la mecánica de la eyaculación, sugiriendo que los protocolos importados de otras latitudes deben ser adaptados para evitar forzar una fisiología que ya se encuentra comprometida por el entorno.

Se concluye que la técnica de recolección de semen mediante eversión parcial es biológicamente superior para poblaciones de zánganos *Apis mellifera* en entornos de alta montaña. Los zánganos sometidos a eversión parcial mantuvieron una motilidad masal del 85.8% y un vigor de 4.37, superando estadísticamente a la eversión total que registró un 79.0% y 3.81 respectivamente. Este hallazgo corrobora empíricamente los estudios de Gençer y Kahya (52), quienes demostraron que la viabilidad espermática desciende aproximadamente un 10% tras la eyaculación completa debido al estrés mecánico en el tracto reproductivo.

La dificultad para lograr la eversión total explosiva es consistente con los hallazgos de Czekońska et al. (56), quienes reportaron que los zánganos desarrollados bajo temperaturas subóptimas (comunes en el clima frío de Salcedo) presentan dificultades mecánicas para la eversión. Además, estudios recientes de McAfee et al. (6) sugieren que el estrés térmico y la posible hipoxia durante el desarrollo pupal limitan la capacidad neuromuscular necesaria para la eyaculación completa. Por lo tanto, forzar la eversión total en estos ecotipos genera un daño iatrogénico innecesario.

La técnica de Eversión Parcial demostró ser un método aséptico eficaz, funcionando como un filtro biológico que minimiza la contaminación con mucus. Las muestras de eversión parcial presentaron una morfología normal superior (86.22%) y ausencia de aglutinación. Esto valida las advertencias de Woyke (55) y Collins (54), quienes establecen que el contacto del semen con el mucus altera irreversiblemente el pH y la presión osmótica, induciendo mortalidad espermática durante el almacenamiento.

Se determina que los protocolos estándar de inseminación instrumental diseñados para la industria comercial, como los propuestos por Cobey (57), que priorizan el volumen mediante la eversión total, son contraproducentes para la región Andina ecuatoriana. Si bien la eversión total maximiza la cantidad de semen recolectado, en condiciones de estrés ambiental se debe priorizar la integridad celular. Pettis et al. (58) identificaron que la viabilidad espermática es el factor número uno en el fallo prematuro de reinas. Por tanto, para asegurar la sostenibilidad de la apicultura local, se debe adoptar el protocolo de eversión parcial, aceptando un menor volumen por zángano a cambio de una mayor longevidad de la reina.

Los resultados sugieren la existencia de un ecotipo de altura en Salcedo con características fisiológicas distintivas. La resistencia a la eversión total y la alta calidad espermática en condiciones de baja temperatura podrían estar vinculadas a adaptaciones genómicas similares a las encontradas por Wallberg et al. (59) y Whitfield et al. (60) en abejas de montaña, lo que justifica un manejo diferenciado de estos recursos zoogenéticos.

12. IMPACTOS (TECNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONOMICOS)

12.1 Impactos técnicos

El estudio permite estandarizar un protocolo de recolección validado localmente para el Cantón Salcedo. Los resultados influyen directamente en la técnica de manejo al demostrar que, bajo condiciones altoandinas, se debe priorizar la calidad sobre el volumen; es decir, el técnico debe detener la estimulación en la fase de eversión parcial en lugar de forzar la eversión total.

Esta modificación en el protocolo técnico minimiza el estrés mecánico sobre el abdomen del zángano y reduce drásticamente la incidencia de contaminación con mucus, un factor crítico que compromete la viabilidad de la dosis inseminante. En consecuencia, la adopción de este criterio mejora la eficiencia del proceso de inseminación artificial, asegurando la obtención de muestras con mayor motilidad y vigor flagelar, indispensables para la migración exitosa de los espermatozoides hacia la espermateca de la reina

12.2 Impactos sociales

La tecnificación de la apicultura local fortalece el tejido productivo de la provincia de Cotopaxi. Al mejorar la calidad de las reinas producidas, los apicultores incrementan su rentabilidad y disminuyen la dependencia de material genético importado. Además, el proyecto fomenta la formación de profesionales locales (como la autora) con capacidades especializadas en biotecnología reproductiva

12.3 Impactos ambientales

Una inseminación exitosa produce colmenas más fuertes y resilientes. El impacto ambiental más significativo es el fortalecimiento del servicio de polinización en la región. Abejas más sanas y populosas aseguran la reproducción de la flora nativa y la productividad de los cultivos locales, contribuyendo directamente a la conservación de la biodiversidad y la seguridad alimentaria en los ecosistemas andinos.

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1. Conclusiones

Conclusión 1: Se determinó que existen diferencias significativas en los parámetros de calidad espermática según el tipo de manipulación. Los zánganos sometidos a eversión parcial presentaron una motilidad masal superior (85.8%) y una mejor motilidad individual (78.5%) en comparación con la eversión total (79.0% y 73.0% respectivamente), demostrando que la técnica parcial preserva mejor la funcionalidad espermática.

Conclusión 2: Se caracterizó la respuesta fisiológica de los zánganos bajo las condiciones altoandinas del cantón Salcedo, identificando que la eversión parcial es la respuesta predominante con una frecuencia del 63%, frente a un 37% de eversión total. Esto evidencia una limitación biológica local para lograr la exposición completa del endófalco sin aplicar una fuerza excesiva.

Conclusión 3: Se estableció una relación directa entre el grado de eversión y el vigor espermático. El 96.8% de las muestras obtenidas por eversión parcial mantuvieron niveles de vigor alto (4 y 5), mientras que la eversión total incrementó la aparición de muestras de baja calidad (vigor 2). Por tanto, se define a la eversión parcial como el método idóneo para la estandarización del protocolo local.

En conclusión, la eversión parcial del endófalco tiene un impacto positivo y superior sobre la calidad espermática del zángano (*Apis mellifera*) en el cantón Salcedo. Esta técnica minimiza el estrés mecánico y el riesgo de contaminación, resultando en dosis seminales de mayor viabilidad en comparación con la eversión total forzada.

13.2. Recomendaciones

Seleccionar zánganos en edad óptima de madurez sexual para los procedimientos de recolección seminal, evitando individuos inmaduros que puedan afectar los resultados.

Implementar protocolos estandarizados de manejo y manipulación de los zánganos antes y durante la recolección del semen, con el fin de reducir el estrés y evitar daños en el aparato reproductor.

Desarrollar futuras investigaciones que evalúen el impacto de factores ambientales, genéticos y estacionales sobre la eversión del endófalco y la calidad seminal, con el fin de optimizar los programas de reproducción y mejoramiento genético en *Apis mellifera*.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Cobey S, Bienkowska M. Sustainable Honey Bee Breeding: A Scientific Guide for Future Beekeeping. 2025;163–79.
2. Borah P, Rahman A. Performance of *Apis mellifera* L. Colonies Developed from Artificially and Naturally Inseminated Queens. *J Adv Biol Biotechnol*. 2024;27(9):724–35.
3. Zhao H, Mashilingi SK, Liu Y, An J. Factors Influencing the Reproductive Ability of Male Bees: Current Knowledge and Further Directions. *Insects*. 2021;12(6):529.
4. Kaya A, Uysal O. IN VITRO SPERMATOLOGICAL PARAMETERS IN DRONES. *Uludağ Arıcılık Derg*. 2023;23(2):268–79.
5. Morais LS, Neto ERA, Silva AM, Marinho DEL, Bezerra LGP, Velarde JMDS, et al. Sperm characteristics of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) drones during dry and wet seasons in the Caatinga biome. *J Apic Res*. 2024;63(5):1106–13.
6. McAfee A, Metz BN, Connor P, Du K, Allen CW, Frausto LA, et al. Factors affecting heat resilience of drone honey bees (*Apis mellifera*) and their sperm. *PLOS ONE*. 2025;20(2):e0317672.
7. Campos JF, Santos HF dos, Bonamigo T, Domingues NL de C, Souza K de P, Santos EL dos. Stingless Bee Propolis: New Insights for Anticancer Drugs. *Oxidative Med Cell Longev*. 2021;2021(1):2169017.
8. Oršolić N, Jembrek MJ. Royal Jelly: Biological Action and Health Benefits. *Int J Mol Sci*. 2024;25(11):6023.
9. Stela M, Cichon N, Szałwska A, Szyposzynska M, Bijak M. Therapeutic Potential and Mechanisms of Bee Venom Therapy: A Comprehensive Review of Apitoxin Applications and Safety Enhancement Strategies. *Pharmaceuticals*. 2024;17(9):1211.
10. Hadjur H, Ammar D, Lefèvre L. Toward an intelligent and efficient beehive: A survey of precision beekeeping systems and services. *Comput Electron Agric*. 2022;192:106604.

11. Metz BN, Tarpy DR. Reproductive and Morphological Quality of Commercial Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drones in the United States. *J Insect Sci.* 2021;21(6):2.
12. Klein CD, Kozii IV, Wood SC, Koziy RV, Zabrodski MW, Dvylyuk I, et al. Testicular Changes of Honey Bee Drones, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), During Sexual Maturation. *J Insect Sci.* 2021;21(6):3.
13. Yániz JL, Silvestre MA, Santolaria P. Morphological characterization of spermatozoa in *Apis mellifera* and the effect of processing and semen storage. *J Apic Res.* 2025;64(4):1203–11.
14. Yániz JL, Silvestre MA, Santolaria P. Sperm Quality Assessment in Honey Bee Drones. *Biology.* 2020;9(7):174.
15. Kramer BH, Nehring V, Buttstedt A, Heinze J, Korb J, Libbrecht R, et al. Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link? *Philos Trans R Soc B.* 2021;376(1823):20190732.
16. Ribou AC, Reinhardt K. Reduced metabolic rate and oxygen radicals production in stored insect sperm. *Proc R Soc B: Biol Sci.* 2012;279(1736):2196–203.
17. Li-Byarlay H, Huang MH, Simone-Finstrom M, Strand MK, Tarpy DR, Rueppell O. Honey bee (*Apis mellifera*) drones survive oxidative stress due to increased tolerance instead of avoidance or repair of oxidative damage. *Exp Gerontol.* 2016;83:15–21.
18. Degueldre F, Aron S. Long-term sperm storage in eusocial Hymenoptera. *Biol Rev.* 2023;98(2):567–83.
19. Ooi TC, Yaacob M, Rajab NF, Shahar S, Sharif R. The stingless bee honey protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage and lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28(5):2987–94.
20. Tahir F, Goblirsch M, Adamczyk J, Karim S, Alburaki M. Honey bee *Apis mellifera* L. responses to oxidative stress induced by pharmacological and pesticidal compounds. *Front Bee Sci.* 2023;1:1275862.

21. Fisher A, Rangel J. Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. *PLoS ONE*. 2018;13(12):e0208630.
22. Rangel J, Fisher A. Factors affecting the reproductive health of honey bee (*Apis mellifera*) drones—a review. *Apidologie*. 2019;50(6):759–78.
23. Fisher A, Harrison K, Love C, Varner D, Rangel J. Spatio-Temporal Variation in Viability of Spermatozoa of Honey Bee, *Apis mellifera*1, Drones in Central Texas Apiaries. *Southwest Entomol*. 2018;43(2):343–56.
24. Paillard M, Rousseau A, Giovenazzo P, Bailey JL. Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *J Econ Entomol*. 2017;110(4):1412–8.
25. ÖZKÖK AO, YALÇIN B. Effects of antioxidant use on semen storage in honey bees. *Int J Sci Lett*. 2022;4(1):183–9.
26. Collins AM, Williams V, Evans JD. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*. 2004;13(2):141–6.
27. Everitt T, Wallberg A, Christmas MJ, Olsson A, Hoffmann W, Neumann P, et al. The Genomic Basis of Adaptation to High Elevations in Africanized Honey Bees. *Genome Biol Evol*. 2023;15(9):evad157.
28. Meng DD, Kang YD, Chang DH. Research progress on the adverse effects of high-altitude environment to the male reproductive system: a review study. *Front Endocrinol*. 2025;16:1573502.
29. Sepúlveda Y, Nicholls E, Schuett W, Goulson D. Heatwave-like events affect drone production and brood-care behaviour in bumblebees. *PeerJ*. 2024;12:e17135.
30. McAfee A, Chapman A, Higo H, Underwood R, Milone J, Foster LJ, et al. Vulnerability of honey bee queens to heat-induced loss of fertility. *Nat Sustain*. 2020;3(5):367–76.
31. Harrison JF, Greenlee K, Verberk WCEP. Functional Hypoxia in Insects: Definition, Assessment, and Consequences for Physiology, Ecology, and Evolution. *Annu Rev Entomol*. 2017;63(1):1–23.

32. Dillon ME, Dudley R. Surpassing Mt. Everest: extreme flight performance of alpine bumble-bees. *Biol Lett*. 2014;10(2):20130922.
33. Gonzalez VH, Oyen K, Aguilar ML, Herrera A, Martin RD, Ospina R. High thermal tolerance in high-elevation species and laboratory-reared colonies of tropical bumble bees. *Ecol Evol*. 2022;12(12):e9560.
34. Montero-Mendieta S, Tan K, Christmas MJ, Olsson A, Vilà C, Wallberg A, et al. The genomic basis of adaptation to high-altitude habitats in the eastern honey bee (*Apis cerana*). *Mol Ecol*. 2019;28(4):746–60.
35. Christmas MJ, Wallberg A, Bunikis I, Olsson A, Wallerman O, Webster MT. Chromosomal inversions associated with environmental adaptation in honeybees. *Mol Ecol*. 2019;28(6):1358–74.
36. Osorio-Canadas S, Flores-Hernández N, Sánchez-Ortiz T, Valiente-Banuet A. Changes in bee functional traits at community and intraspecific levels along an elevational gradient in a Mexican-type scrubland. *Oecologia*. 2022;200(1–2):145–58.
37. Berg S, Koeniger N, Koeniger G, Fuchs S. Body size and reproductive success of drones (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*. 1997;28(6):449–60.
38. Brutscher LM, Baer B, Niño EL. Putative Drone Copulation Factors Regulating Honey Bee (*Apis mellifera*) Queen Reproduction and Health: A Review. *Insects*. 2019;10(1):8.
39. Medina RG, Paxton RJ, Hernández-Sotomayor SMT, Pech-Jiménez C, Medina-Medina LA, Quezada-Euán JJG. Heat stress during development affects immunocompetence in workers, queens and drones of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *J Therm Biol*. 2020;89:102541.
40. Murray JF, Horst G van der, Allsopp M, Kotzé RCM. A new fluorescent method to determine honey bee sperm motility parameters with computer-aided sperm analysis. *J Apic Res*. 2023;62(4):944–52.
41. Slater GP, Smith NMA, Harpur BA. Prospects in Connecting Genetic Variation to Variation in Fertility in Male Bees. *Genes*. 2021;12(8):1251.

42. Kekäläinen J, Larma I, Linden M, Evans JP. Lectin staining and flow cytometry reveals female-induced sperm acrosome reaction and surface carbohydrate reorganization. *Sci Rep*. 2015;5(1):15321.
43. Evans JD, Schwarz RS, Chen YP, Budge G, Cornman RS, Rua PD Ia, et al. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *J Apic Res*. 2013;52(4):1–54.
44. Cervoni MS, Cardoso-Júnior CAM, Craveiro G, Souza A de O, Alberici LC, Hartfelder K. Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *J Exp Biol*. 2017;220(21):4035–46.
45. Marringa WJ, Krueger MJ, Burritt NL, Burritt JB. Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e108486.
46. Mitkovska V, Chassovnikarova T, Vasileva P, Stoyanov I, Petrov P, Petkov N, et al. Sperm comet assay as a novel tool in assessing genotoxicity in high-mortality honey bee (*Apis mellifera*) populations. *Apidologie*. 2025;56(1):13.
47. Moškrič A, Pavlin A, Mole K, Marinč A, Bubnič J, Opara A, et al. Cutting corners: The impact of storage and DNA extraction on quality and quantity of DNA in honeybee (*Apis mellifera*) spermatheca. *Front Physiol*. 2023;14:1139269.
48. Kumar D, Banerjee D, Chakrabarti P, Sarkar S, Basu P. Oxidative stress and apoptosis in Asian honey bees (*A. cerana*) exposed to multiple pesticides in intensive agricultural landscape. *Apidologie*. 2022;53(2):25.
49. Peng Y, Grassl J, Millar AH, Baer B. Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. *Proc R Soc B: Biol Sci*. 2016;283(1823):20151785.
50. Delaney DA, Keller JJ, Caren JR, Tarpy DR. The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*. 2011;42(1):1–13.
51. Collins AM. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie*. 2000;31(3):421–9.

52. Gençer HV, Kahya Y. The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *J Apic Res.* 2011;50(3):190–4.
53. Rousseau A, Fournier V, Giovenazzo P. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *Can Entomol.* 2015;147(6):702–11.
54. COLLINS AM. Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination. *Invertebr Reprod Dev.* 2004;45(3):231–7.
55. Woyke J. Why the eversion of the endophallus of honey bee drone stops at the partly everted stage and significance of this. *Apidologie.* 2008;39(6):627–36.
56. Czekońska K, Chuda-Mickiewicz B, Samborski J. Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie.* 2015;46(1):1–9.
57. Cobey SW. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie.* 2007;38(4):390–410.
58. Pettis JS, Rice N, Joselow K, vanEngelsdorp D, Chaimanee V. Colony Failure Linked to Low Sperm Viability in Honey Bee (*Apis mellifera*) Queens and an Exploration of Potential Causative Factors. *PLoS ONE.* 2016;11(2):e0147220.
59. Wallberg A, Schöning C, Webster MT, Hasselmann M. Two extended haplotype blocks are associated with adaptation to high altitude habitats in East African honey bees. *PLoS Genet.* 2017;13(5):e1006792.
60. Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, et al. Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science.* 2006;314(5799):642–5.

