

OFICINA DE PARTES 2 FIA.	
RECEPCIONADO	
18 OCT 2018	
Fecha	
Hora	08:51
Nº Ingreso	52212

1

INFORME TECNICO Y DE GESTIÓN FINAL

EJECUTOR:

Nombre	CENTRO INVESTIGACIÓN APICOLA ABEJAS DEL BIO BÍO LIMITADA
Giro	APICOLA
Rut	
Representante Legal	RICARDO ALBERTO ACUÑA JARA

NOMBRE DEL PROYECTO: “Conservación de semen in vitro de Apis mellífera para incrementar la producción de abejas reinas con fines exportables” **CODIGO:** PYT- 2013 - 0053

Nº INFORME: FINAL

PERIODO: 01-07-2013 hasta 28-02-2017

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO

Nombre	RICARDO ALBERTO ACUÑA JARA
Rut	
Firma	

I. RESUMEN EJECUTIVO

La primera etapa del proyecto de crioconservación de espermios de zánganos de *Apis mellífera* en Chile, se inició el *01 de Julio de 2013* y terminó el *28 de Febrero de 2017*. En su etapa inicial se partió efectuando un análisis morfológico de los espermatozoides de zánganos para conocer su estructura molecular, sus dimensiones, en definitiva, saber qué tipo de célula se tenía que congelar. Una vez teniendo claro el tipo de célula a la cual el equipo de investigadores se enfrentaba, se procedió a analizar el medio por el cual los espermios eran trasladados desde Los Angeles a Santiago. Se analizaron varias recetas de soluciones salinas o buffer, llegando a la conclusión, que la más efectiva y que aseguraba el mayor número de espermios vivos, era la utilizada desde siempre por Abejas del Bio Bío.

Una solución salina o buffer para inseminación de abejas reinas es utilizada en todo el proceso de inseminación que va desde la cosecha del semen, almacenamiento del semen en pajuelas plásticas o de vidrio, inseminación de las abejas reinas vírgenes e incluso para el lavado de los distintos equipos y accesorios que se manejan en el uso de ésta técnica. Lo interesante es que este mismo buffer podía ser utilizado para apoyar el proceso de crioconservación de los espermatozoides de zánganos *Apis mellífera*.

Una vez, sabiendo ya el tipo de célula, el líquido que los almacenaba y trasladaba; se procedió a trabajar en distintas recetas de soluciones crioprotectoras que aseguraran la no destrucción de las paredes celulares de los espermios por los micro hielos que se producían en la crioconservación y que se harían efectivos al momento de la descongelación de las células. Un ejemplo muy didáctico de este fenómeno es cuando usted saca de su congelador unos gramos de frambuesas que han estado congeladas por cierto período de tiempo. Una vez descongeladas estas frutas, muestran un líquido rojizo y ellas han perdido su consistencia dura. ¿Por qué sucedió esto? Porque el hielo, que son verdaderos cuchillos, rompieron todas las estructuras de las frutas, dejándolas prácticamente descuartizadas. Esta misma situación era la que se debía evitar al momento de descongelar los espermios de zánganos, ya que estos hielos matarían a todos los espermios que habían logrado sobrevivir de su largo sueño.

Todas las pruebas para la búsqueda de la o las soluciones crioprotectoras para espermios de zánganos se realizó en laboratorio. Se hace hincapié que estas soluciones fueron determinadas exclusivamente para los espermios de zánganos de ahí la importancia de conocer su morfología previamente. Se determinó que al menos 3 de las soluciones estudiadas, tenían potencial de ser usadas en el proceso de congelamiento. Para determinar si ellas eran efectivas, debían pasar dos etapas importantes. La primera etapa era que al momento de congelar y descongelar los espermios tenían que quedar vivos y completamente sanos en cuanto a su estructura morfológica. Y la segunda etapa, tan importante como la primera, que una vez inseminadas las abejas reinas vírgenes en terreno, éstas reinas debían generar obreras hembras. Es decir, que los espermios mantuvieran su capacidad fecundante.

Para dar respuesta a la primera etapa, se realizaron varios estudios de viabilidad espermática a través de microscopía de fluorescencia de espermatozoides de zánganos, utilizando el kit "live and dead". De color verde los vivos y color rojo los muertos. En paralelo, se realizaron estudios de la membrana mitocondrial (PMM). Los resultados de estos estudios, determinaron un gran éxito bajo el punto de vista de investigación académica, ya que los valores promedios

obtenidos fueron por sobre el 50 %, de lo proyectado por el equipo de trabajo. Esto indicaba que por sobre el 50 % de los espermios de zánganos congelados con nitrógeno líquido a menos 196 °C, despertaban al descongelarlos y tenían potencial para fecundar los huevos de la abeja reina. Esto último debía ser demostrado en terreno al realizar inseminaciones instrumentales con semen descongelado.

Pero antes de comentar qué pasó con la segunda etapa, es importante mencionar, que también se hicieron muchos ensayos para determinar “la receta” perfecta para descongelar y despertar al máximo de espermios sin que se vieran afectados en su estructura física (cabeza, colas, etc), de manera que tuvieran el potencial fecundante. De la misma manera, se había hecho anteriormente, con la “receta” para congelarlos o criopreservarlos en nitrógeno líquido. Lo que se quiere destacar con esto, es que para lograr cada paso, cada avance, cada conocimiento en el proceso de crioconservación, hubo mucho trabajo silencioso de prueba y error, para lograr todos los resultados que se están comentando en esta oportunidad en un lenguaje lo más sencillo que sea posible.

Volvamos entonces, a la segunda etapa - Las pruebas de campo. Cuando se trabaja en proyectos de investigación y desarrollo, gran parte de las universidades y centros de investigación se quedan con los méritos de alcanzar “las metas académicas” y estos resultados la mayoría de las veces, no salen de las paredes de sus laboratorios y se dan por terminado y cumplidos los proyectos que fueron financiados por fondos públicos. Nuestra empresa, teniendo una mirada empresarial y con una clara visión hacia resultados aplicables en el sector apícola, siempre tuvo atenta a propiciar resultados en terreno. Esto explica el por qué se realizaron distintos ensayos con las “recetas de crioconservación y descongelación” en abejas reinas, simulando lo que hacía permanentemente la empresa con semen fresco. Fue fuerte la presión que ejerció la empresa al equipo de investigadores para que entregaran resultados que se pudieran utilizar en procesos normales y sobretodo, comercializar pajuelas de semen congelado en el futuro. Además de constituir el primer banco de semen.

En forma paralela al estudio de crioconservación de espermatozoides de zánganos y como parte también de los objetivos del proyecto, se estudió en campo, el tiempo de maduración de las reinas vírgenes antes de ser inseminadas. Se logró determinar un tiempo de hasta 90 días, en que las reinas podían estar vírgenes antes de ser inseminadas. Su capacidad para producir crías hembras y desarrollar una colonia, no tenían mayores diferencias de una reina fecundada en forma natural. Los 90 días, fue el plazo máximo que nos permitió las condiciones climáticas imperantes en la zona en esas temporadas, estudiar la longevidad de las reinas vírgenes pre inseminado. Creemos que podemos seguir alargando este tiempo a 6 meses o más. *Por ello se propone hacer un nuevo estudio de longevidad de reinas vírgenes, con las siguientes variantes de gran impacto para la apicultura: (a) Mantener reinas vírgenes con el tiempo suficiente para inseminar con semen de contra estación de Europa u otras latitudes que puedan ser autorizadas por el SAG y (b) Mantener reinas vírgenes durante otoño e invierno hasta cosechar semen de zánganos sexualmente maduros en Chile.*

En forma complementaria al estudio de longevidad de reinas vírgenes, se realizaron inseminaciones instrumentales “express”. Vale decir, se inseminaban reinas vírgenes traídas por los clientes con semen de la empresa y en el mismo día se trasladaban a los apiarios de los clientes. Más del 90 % de estas reinas, tuvieron un apego exitoso en sus nuevas familias.

En el proceso de inseminación instrumental de abejas reinas con semen congelado/descongelado, se verificó en una primera instancia, si los espermios sobrevivientes

al proceso de crío, tenían la energía suficiente para emigrar desde la vagina hasta el oviducto central y luego desde allí hasta la espermateca.

La espermateca es el órgano de almacenamiento del esperma, común en el sistema reproductor de muchos insectos y otros invertebrados; en *Apis mellifera* solo las reinas están equipadas de este órgano siendo funcional, en cambio en las abejas obreras es vestigial o sea lo tienen en forma rudimental no funcional, aunque puede desarrollarse según la necesidad. La espermateca de *Apis mellifera* se encuentra en el abdomen, tiene forma de esfera, está conectada al oviducto a través del doto espermático, tiene más de un milímetro de diámetro y la pared está formada por una capa de células epiteliales rodeada de una densa red de finas tráqueas. Apoyada a la superficie de la pared están situadas las glándulas de la espermateca. Condiciones fisiológicas particulares permiten conservar por años el esperma, el cual se encuentra en un estado quiescente, con un metabolismo muy bajo manteniendo conservada su capacidad de fecundación. Las células espermáticas para sobrevivir años necesitan de oxígeno y sustancias nutritivas que son proporcionadas respectivamente por la densa red de finas tráqueas que rodea el órgano y de las glándulas de la espermateca, que secretan una solución nutritiva que además es necesaria para la activación y migración de los espermatozoides.

La espermateca de una reina virgen es totalmente transparente y de consistencia blanda, en cambio la de una reina fecundada o inseminada, pasada las 24 horas se puede ver de color gris anaranjado y con una consistencia dura.

Pasado 24 horas, de haber realizado inseminación instrumental con semen congelado/descongelado en los laboratorios de la empresa, se analizó en algunas abejas reinas, el estado de sus espermatecas, comprobando que los espermios habían recorrido exitosamente el camino desde la vagina hasta la espermateca. Este hito, constituyó un éxito sin precedentes en Chile, ya que quedaba demostrado en campo, que los espermios sobrevivían a la críoconservación y tenían la energía suficiente para hacer el largo camino hasta llegar a la espermateca. El siguiente paso era comprobar si mantenían la capacidad fecundante y con ello, producir abejas hembras.

Es importante destacar que la abeja reina tienen dos mecanismo de reproducción. Es la única hembra fértil que pone huevos fecundados que dan origen a abejas obreras infértiles y abejas reinas hijas y pone huevos no fecundados que dan origen a zánganos fértiles, por un mecanismo denominado partenogénesis.

La Partenogénesis es un concepto que se emplea en la biología para nombrar a un mecanismo reproductivo que comparten ciertas especies animales y vegetales. La partenogénesis se lleva a cabo cuando las células sexuales femeninas se dividen repetidamente sin que se hayan vinculado con anterioridad a un gameto de tipo masculino. Debido a sus características, la partenogénesis puede calificarse como una reproducción sexual de tipo monogamética (ya que cuenta con la intervención de una clase de célula sexual) o, incluso, como un mecanismo reproductivo asexual.

En el caso de las obreras y abejas reinas hijas, provienen de una reproducción sexual en donde se unen las dotaciones genéticas del zángano padre con los de la reina madre, produciendo una nueva combinación genética, formando cigotos diploides. Desde el punto de vista de transferencia genética, tanto las obreras y reinas hijas, son equivalente, la única

diferencia, es que las primeras no tienen desarrollado sus aparatos reproductivos por la menor alimentación con jalea real en su etapa larval.

Una vez que las abejas reinas inseminadas con semen congelado/descongelado, iniciaron su postura, se esperó 9 días para determinar en forma indirecta si las larvas generadas eran hembra o machos. Una vez que la reina pone un huevo, a los tres días nace una larva y al día 9 en caso de ser obrera, inicia el operculado (cerrado) de la celdilla. Si una vez operculada la celdilla es totalmente plana, es señal que se está frente a una hembra y si es más abultada es señal que es macho.

En los primeros días de postura de las reinas, las celdillas operculadas fueron totalmente planas, es decir, los primeros huevos fueron fecundados por espermios crio, que habían logrado tener la capacidad fecundante para ello. En los días siguientes, el ciclo de las reinas, generó celdillas operculadas más abultadas, lo que permitió concluir, que algo pasaba con los espermatozoides al interior de la espermateca de las reinas. Se abrieron algunas celdillas operculadas, y se verificó el desarrollo de abejas obreras y de unos zánganos de menor tamaño. A las obreras obtenidas de semen crio conservado, se les llamó "*obreras crio*" a los zánganos obtenidos de estos procesos, "*zánganos crio*" y luego a las reinas obtenidas "*reinas crio*". Nació desde ese momento una nueva casta de abejas: Las "abejas crio".

En ensayos posteriores de inseminación instrumental de abejas reinas, se determinó que los espermatozoides de los "zánganos crio" mantenían la misma capacidad fecundante y características de un zángano normal, la única diferencia radicaba en el volumen de semen producido que bordeaba en promedio a los 0,5 microlitros a diferencia de un zángano normal que apuntaba a valores cercanos a 1,0 microlitros.

En los ensayos no fue posible obtener "reinas crio" bajo los métodos de traslarve tradicionales de producción de reinas. La única forma de obtenerlas fue rediseñando un nuevo modelo de crianza, dejando a las propias abejas que eligieran dentro de las larvas disponibles en el marco introducido a las futuras reinas crio. Fue la única metodología que permitió obtener las primeras reinas crio, obtenidas tras un largo proceso de investigación, desarrollo, mucha observación de campo, y sobre todo la visión para cambiar de estrategia frente a las situaciones nuevas que se presentaban, logradas con la experiencia de trabajar toda una vida con abejas.

Al cierre de este proyecto FIA, queda la satisfacción de haber logrado todos los objetivos trazados en el programa inicial y cumplir otros que fueron naciendo en el camino. Como gran conclusión final, es factible técnicamente, producir abejas reinas a partir de espermatozoides crioconservados a menos 196 °C con nitrógeno líquido en Chile.

El proyecto de Crioconservación de semen de zánganos, amerita una segunda etapa de ejecución, ya que al término de él, quedan muchas interrogantes que por tiempo y recursos, no pudieron ser resueltas. Queda por estudiar: ¿Mueren los espermios en la espermateca de la reina o pierden su capacidad fecundante? Desde el momento que se insemina una reina con semen crio, ¿cuánto vive un espermio descongelado? ¿Qué características especiales tiene la espermateca de las reinas, que permite que los espermatozoides permanezcan vivos por años? Y finalmente, ¿Cómo aumentar la producción de reinas crio bajo un sistema de alta productividad?

HITOS PROYECTO CRIOPRESERVACIÓN SEMEN DE ZÁNGANOS EN CHILE.

N° Hito	Descripción	Fecha
1	Inicio proyecto de criopreservación semen zánganos.	01 – 07- 2013
2	Obtención de buffer para manejo en fresco semen de zánganos	10 – 10 -2013
3	Descripción morfológica espermios de zánganos	20 – 12-2013
4	Determinación de las condiciones óptimas para la criopreservación de semen de zángano.	24 -04 - 2014
5	Creación del primer criobanco de espermios de zánganos Apis mellífera en Chile	30 – 04 -2014
6	Primeros resultados en laboratorio de congelamiento y descongelamiento de semen de zánganos de Apis miellífera.	17 – 06- 2014
7	Extracción de semen en Santiago para verificar si existe alguna diferencia positiva de congelar semen fresco versus semen despachado desde Los Angeles.	05 – 11- 2014
8	Primera inseminación abejas reinas con semen crioconservado/descongelado en base a DMSO.	28 – 11- 2014
9	Segunda inseminación para producir reinas crío en base a DMSO.	05 – 01- 2015
10	Tercera inseminación para producir reinas crío en base a DMSO.	13 - 11- 2015
11	Primer nacimiento de reinas crío en Chile.	14 – 12- 2015
12	Cuarta inseminación para producir reinas crío en base TEST-YOLK.	04 – 01- 2016
13	Quinta inseminación para producir reinas crío. Receta mejorada en base DMSO.	29 - 11- 2016
14	Segundo nacimiento de reinas crío en Chile.	26 - 12- 2016
15	Término proyecto criopreservación espermatozoides de zánganos.	28 – 02- 2017

II. TEXTO PRINCIPAL

1. Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.

Existe un complejo sistema creado por la naturaleza encargado de equilibrar la denominada cadena trófica, en la que todos los seres vivos se hallan interconectados de alguna manera, y la supervivencia de unos depende del consumo de otros que se encuentran en eslabones más bajos. La pérdida de una especie puede suponer la posterior desaparición de otra u otras que dependan de ella para alimentarse.

Los perjuicios ambientales y económicos que provocaría la desaparición de las abejas productoras de miel es un tema que tiene trabajando a científicos de todo el mundo, buscando fórmulas para evitar el desastre. Para intentar dar respuesta a esta problemática, el Centro de Investigación Apícola Abejas del Biobío Limitada, obtuvo fondos de la Fundación para la Innovación Agraria para desarrollar por primera vez en Chile la inseminación asistida a abejas reinas vírgenes, con semen de zánganos previamente congelado, para optimizar los procesos de reproducción y aumentar así la natalidad de abejas reinas.

La inseminación instrumental de abejas reinas consiste en introducir semen de zánganos seleccionados a través de un microquirófano que permite controlar todas las etapas. Con esta técnica, se logra obtener abejas reinas 100% puras en sus razas, potenciar aspectos productivos, favorecer la autohigiene de las abejas, entre otras muchas ventajas.

La novedad de este procedimiento es que se realizó con semen de zángano que fue congelado a bajas temperaturas (-196°C), en nitrógeno líquido. Este procedimiento se realiza gracias a que el semen se mezcla con soluciones químicas denominadas agentes crioprotectores, que protegen a las células del daño producido por la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelamiento y descongelamiento, evitando posibles daños a la membrana plasmática.

El método de congelación aplicado en este caso es distinto a todo lo que se ha publicado en el resto del mundo (actualmente existen cuatro países que buscan introducir comercialmente el semen congelado). La diferencia radica en la velocidad del proceso y la concentración de las soluciones utilizadas (diferente combinación y concentración de crioprotectores).

En este proyecto se logró conocer un poco más acerca de la especie *Apis mellifera*, tanto a nivel morfológico, como a nivel reproductivo mediante la criopreservación.

El análisis de los resultados a indicado que la criopreservación es posible, además que parámetros como la evaluación de la viabilidad y potencial de membrana mitocondrial permite

tener una idea cercana de la condición en la cual se encuentran los espermatozoides de zángano congelados / descongelados.

Se obtuvo éxito en las pruebas de congelamiento, logrando porcentajes por sobre el 50% de viabilidad post-descongelamiento, dada como meta del proyecto. También se corroboró que el potencial de membrana mitocondrial se ve disminuido luego del proceso de congelamiento, pero aún se requiere un mayor número de muestras para ratificar esta información.

El proceso de criopreservación ha entregado información valiosa respecto a las posibilidades de extender el periodo de inseminación mas allá de la temporada de primavera /verano en el que normalmente se realiza.

Luego de las pruebas de campo, se pudo comprobar la eficiencia del proceso de criopreservación al obtener abejas de reinas inseminadas con semen criopreservado, este éxito nos lleva un nivel más arriba para estudiar diversos parámetros como por ejemplo si variaciones en el tiempo de criopreservación de las muestras afectara el proceso de producción de obreras, la eficiencia en la obtención de reinas a partir de semen criopreservado, como se ve afectada la fertilidad de zánganos criopreservados, entre otros.

El proyecto presentado a FIA, por Abejas del Bio Bío, empresa de la región del Bio Bío, pionera en Chile y cuarta a nivel mundial, en la aplicación de la técnica de inseminación instrumental de abejas reinas con uso comercial, tuvo como objetivo principal buscar uno o más métodos óptimos para la crioconservación de semen de zángano de apis mellífera de alta genética como herramienta de apoyo en procesos de inseminación instrumental. Para ello, gran parte del proyecto se desarrolló en instalaciones de Abejas del Bio Bío, aprovechando su experiencia y contratando en forma externa, a través de una licitación pública, los servicios de la Unidad de Endocrinología y Reproducción, Depto. de Fisiología Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, para buscar las metodologías adecuadas de crioconservación. Todo esto apoyado por universidades y centros de investigación de Estados Unidos, Francia y Alemania, los cuales fueron visitados durante la vida útil del proyecto.

El proyecto total fue de _____ de los cuales _____ fue financiado por FIA y el restante, por Abejas del Bio Bío y sus asociados en 43 meses de desarrollo, con fecha de inicio *el 01 de Julio de 2013* y fecha de término *el 28 de Febrero de 2017*.

Este trabajo partió de cero y en el transcurso del desarrollo del proyecto, se fue aunando la convicción que era posible lograr resultados tangibles que permitieran producir abejas reinas proveniente de espermatozoides sometidos a crioconservación y luego a descongelamiento. Se demostró que el espermio sobrevivía de una congelación y era capaz de tener energía fecundante, ya que se movilizaba hasta la espermateca y luego se trasladaba para producir hembras viables.

En Santiago, el 28 de Noviembre de 2014, se marcó un hito importante en la investigación en Chile y en Latinoamérica. La Fundación para la Innovación Agraria, en conjunto con la Pontificia Universidad Católica de Chile y el Centro de Investigación Apícola Abejas del Bio Bio Limitada, realizaban primera vez, inseminaciones asistidas o instrumental de abejas reinas vírgenes con semen de zánganos que había sido descongelado tras estar éstos varias semanas en proceso de crioconservación. Esta crucial hazaña fue realizada en la Unidad de Endocrinología y Reproducción, Depto. de Fisiología Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, donde fueron trasladados los equipos de inseminación por parte de Abejas del Bio Bío.

El equipo multidisciplinario chileno que trabajó en la investigación tendiente a buscar una o más metodologías de congelamiento y descongelamiento de semen de zánganos *Aois mellifera* con fines comerciales fueron:

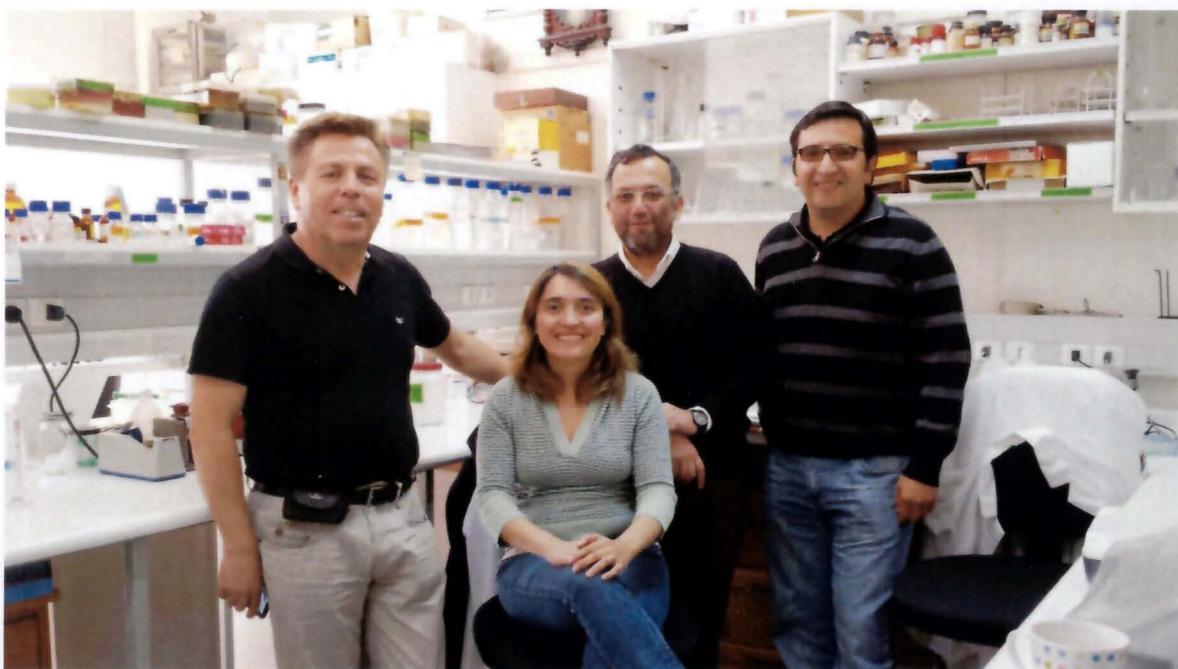


Imagen 1: Equipo de trabajo.

- a. Ricardo Daniel Moreno Mauro. Doctor en ciencia biológica, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Centro)
- b. Jaime Alfredo Palomino Mackenney. Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Campus Sur, Universidad de Chile. Santiago. (Lado derecho)
- c. Magdalena Cecilia Díaz Sepúlveda. Licenciada en Ciencia de la Biología, Pontificia Universidad Católica de Chile.(Centro)
- d. Ricardo Alberto Acuña Jara, Ingeniero Civil Industrial, experto en Inseminación de Abejas Reinas, Universidad de California, campus Davis, USA, representante legal de Abejas del Bio Bio Ltda.(Lado izquierdo)

La inseminación instrumental de abejas reinas se aplica en Chile desde el 2008, por Abejas del Bio Bio Limitada y consiste en introducir semen de zánganos seleccionados a través de un micro quirófano que permite controlar todas las etapas de la inseminación. Con esta técnica, se logra obtener abejas reinas 100 % puras a sus razas, potenciar aspectos productivos, favorecer la auto higiene de las abejas entre otras muchas ventajas que la técnica otorga.

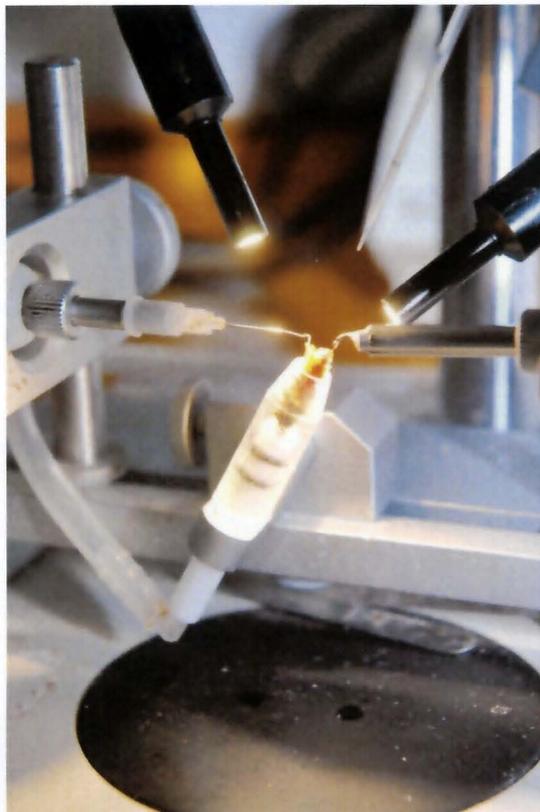


Imagen 2: Proceso de inseminación abejas reinas.

La crioconservación de semen de zánganos de las abejas productoras de miel, busca potenciar la producción de abejas reinas seleccionadas, alargar los procesos de producción de abejas reinas con fines exportables, industrializar las abejas reinas inseminadas para la producción de miel, polen, jalea real, propóleos y destacando además, que el proyecto permitía constituir un banco de semen de zánganos para apoyar la conservación de las abejas y estar en sintonía internacional en la cruzada de salvar a las abejas de su extinción.

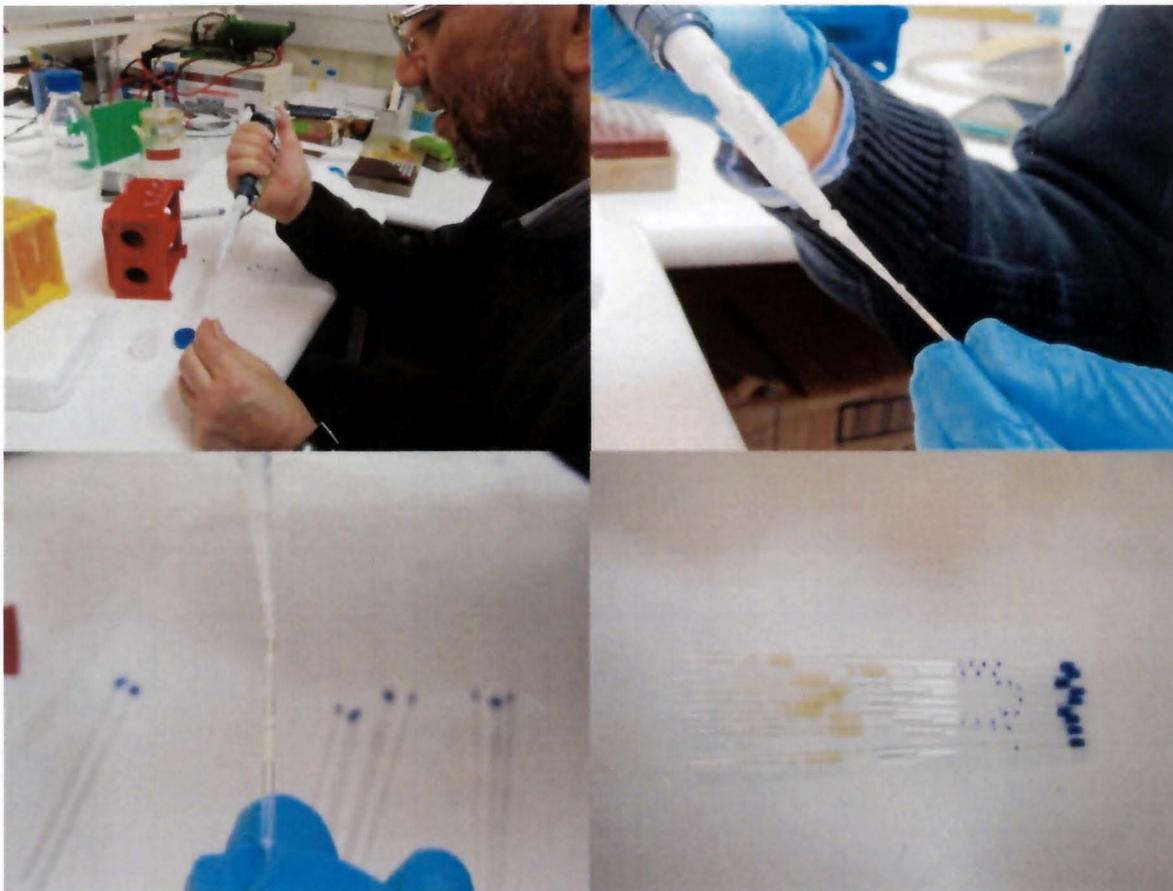


Imagen 3: Proceso de preparación pajuelas de semen zánganos para crioconservación.

Los resultados finales, indicaron que es posible producir reinas crío y que ellas pueden ser utilizadas para producir abejas reinas hijas las que podían ser comercializadas a nivel nacional e internacional.

De la misma manera, el proyecto demostró que era posible alargar la vida útil de una abeja reina virgen y esta podía ser inseminada con semen crioconservado o bien con semen fresco de otras latitudes en un rango de 4 a 90 días de edad de dicha abeja reina. Sólo este resultado, abrió una nueva ventana de exploración que puede impactar positivamente la apicultura mundial.

Quedó demostrado que una reina virgen, ya no tiene la presión de ser fecundada antes de los 7 días de su vida y que podía tener crías completamente viables y normales si era fecundada en un lapso de 90 días. Todo esto gracias a la aplicación de la técnica de inseminación instrumental.

Lo que no fue parte de este proyecto, quedando para un proyecto futuro fue el desarrollo de un kit práctico de inseminación de abejas con pajuelas crioconservadas de manera que

puedan ser trasladadas a cualquier punto del país, de la misma manera que hoy se hace con las pajuelas congeladas de semen de toro.

Hay mucho por hacer en este tema de la crioconservación del espermio de zánganos en Chile para acortar la brecha de avance que han logrado Estados Unidos y Alemania. Lamentamos mucho, que FIA no haya apoyado los dos proyectos presentado en los años siguientes que eran complementarios a este proyecto, con el mismo equipo de investigadores y los cuales tenían el compromiso de seguir perfeccionando la técnica, sólo era menester inyectar nuevos recursos para seguir avanzando.

2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

2.1. Descripción de objetivos y porcentaje de cumplimiento.

N° OE	Descripción OE	% de cumplimiento	Periodo programado logro objetivo
1	Identificación, caracterización y evaluación de procedimientos de crioconservación de espermatozoides de zánganos de <i>Apis mellífera</i> .	100 %	Marzo 2014
2	Evaluación piloto de programas de inseminación artificial con semen de zángano congelado, refrigerado y a temperatura ambiente.	100 %	Noviembre 2014
3	Estudiar la longevidad de las reinas inseminadas aplicando técnicas de crioconservación.	100 %	Noviembre 2015
4	Implementación de un criobanco que permita preservar material genético apícola, para programas de desarrollo productivo y para bioseguridad en Abejas del Bio Bío.	100 %	Diciembre 2015
5	Aumento del ciclo de producción de reinas inseminadas, para aumentar la oferta en el mercado nacional e internacional.	100 %	Enero 2016

2.2. Cuantificación de los resultados esperados.

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)			Valor Actual	
			Indicador (cuantificable)	Línea base (situación sin proyecto)	Meta proyecto	Resultado	% Avance
1	1	Procedimiento óptimo de crioconservación para semen de zánganos de apis mellífera	POC= N° espermios viables/N° espermios totales	0	50 %	75 %	100 %
2	1	Número de reinas óptimamente inseminadas y aceptadas por sus colonias.	RA= N° reinas aceptadas/ N° reinas totales inseminadas	0	50 %	95 %	100 %
3	1	Tiempo de vida reinas inseminadas instrumentalmente.	TRI= N° reinas vivas/N° reinas totales inseminadas	0	80 %	80 %	100 %
4	1	Número de pajuelas de semen de zánganos crioconservados por sobre un año y con uso viable para inseminación.	PV= N° pajuelas viables/N° pajuelas crioconservadas	0	70 %	82 %	100 %
5	1	Número de días adicionales para producción reinas.	DA= Días utilizados/Días potenciales	0	1,33	1,50	100 %

2.3. Descripción breve de los impactos obtenidos.

Este proyecto partió de cero y en el transcurso del desarrollo del proyecto, se fue aunando la convicción que era posible lograr resultados tangibles que permitieran producir abejas reinas proveniente de espermatozoides sometidos a crioconservación y luego a descongelamiento. Se demostró que el espermio sobrevive de una congelación y es capaz de tener energía fecundante, ya que se moviliza hasta la espermateca y luego se mueve para producir hembras viables.

Por los resultados obtenidos, es posible producir reinas crio y que ellas pueden ser utilizadas para producir abejas reinas hijas las que pueden ser comercializadas a nivel nacional e internacional.

De la misma manera, el proyecto demostró que es posible alargar la vida útil de una abeja reina virgen y esta puede ser inseminada con semen crioconservado o bien con semen fresco de otras latitudes en un rango de 4 a 90 días de edad de dicha abeja reina. Sólo este resultado, abre una ventana de exploración que puede impactar positivamente la apicultura mundial. Quedó demostrado que una reina virgen, ya no tiene la presión de ser fecundada antes de los 7 días de su vida y que puede tener crías completamente viables y normales si es fecundada en un lapso de 90 días. Todo esto gracias a la aplicación de la técnica de inseminación instrumental.

Lo que no es parte de este proyecto, quedando por desarrollar es un kit práctico de inseminación de abejas con pajuelas crioconservadas de manera que puedan ser trasladadas a cualquier punto del país, de la misma manera que hoy se hace con las pajuelas congeladas de semen de toro.

Hay mucho por hacer en este tema de la crioconservación del espermio de zánganos en Chile para acortar la brecha de avance que han logrado Estados Unidos y Alemania. Lamentamos mucho, que FIA no haya apoyado los dos proyectos presentado en los años siguientes que eran complementarios a este proyecto, con el mismo equipo de investigadores y los cuales tenían el compromiso de seguir perfeccionando la técnica, sólo era menester inyectar nuevos recursos para seguir avanzando.

El trabajo realizado entre el 2013 – 2017, fue perfeccionar la técnica de crioconservación de semen de zánganos, para aumentar la viabilidad de larvas de hembras que pudieran convertirse en reinas madres con técnica de traslarve u otras técnicas reproductivas amigables para cualquier apicultor nacional o internacional. Todo esto ha sido posible, porque el equipos de investigación pudo determinar una metodología para crioconservar espermatozoides de zánganos de *Apis mellífera* con resultados aceptables.

Hoy se sabe cómo es un espermio de zángano, su estructura, sus dimensiones, la cantidad de espermios en un microlitro. Gracias al proyecto, se tiene la certeza hoy que los espermios sobreviven a la congelación y descongelación, se puede medir su sobrevivencia. Que tienen la fortaleza para movilizarse desde el oviducto ventral hasta la espermoteca de la reina, se puede evaluar este movimiento en técnicamente. Que tienen la vitalidad para fecundar un huevo para producir hembras viables, se puede evaluar al noveno día (cuando aperculan las celdillas) o al momento de producir reinas críos. Hemos producido obreras crio, reinas crio y zánganos crio. Nuevos miembros que se deben sumar y considerar en la apicultura mundial, sumado a ello, el gran potencial genético que ellos pueden aportan a problemas que afectan hoy en día a las abejas.

En el proyecto tuvimos un desacierto al probar en un cuarto intento, una receta de crioconservación en base a yema de huevos, pero es parte de las incertidumbres por las cuales FIA apoyó este proyecto. A nivel general, el proyecto fue dando los resultados comprometidos inicialmente. Y la verdad, el equipo de trabajo está muy satisfecho por ello.

3. Aspectos metodológicos del proyecto:

- 3.1. Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

Se describen a continuación los protocolos y métodos utilizados para la “Conservación de Semen In Vitro de Apis mellifera para Incrementar la Producción de Abejas Reinas con Fines Exportables”.

CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE ZÁNGANO.

El proceso de criopreservación permite congelar espermatozoides de zángano en nitrógeno líquido (-196°C). Este proceso se realiza en varias etapas desde que el semen es obtenido hasta su almacenamiento en nitrógeno líquido (N₂), el cual se detalla a continuación:

1. Al recibir la muestra de semen, dilúyala en una proporción de 5:1 en buffer de semen de zángano, esta será su dilución de base.
 - De esta dilución debe extraer la cantidad necesaria para realizar los controles de motilidad, viabilidad y potencial de membrana (al menos 5µl).
2. Según la condición de criopreservación que desee, agregue el volumen de crioprotectores necesario para lograr la concentración final deseada.
 - Asegúrese de que la mezcla se realice suavemente tratando de evitar la producción de burbujas.
3. Con una micropipeta incorpore la muestra en una pajuela de vidrio flanqueando con buffer de semen de zángano antes y después de la muestra tal como se observa en la figura.

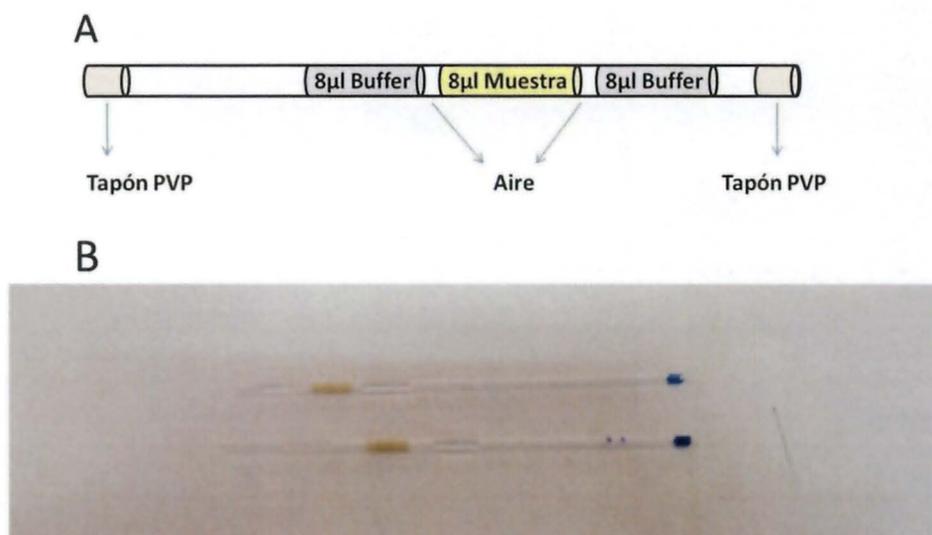


Imagen 4: Pajuelas de congelamiento. Arriba se muestra un esquema de como se procedió a ensamblar la pajuela y abajo se presenta fotos de dos pajuelas.

4. Para realizar un “precooling”, mantenga las muestras a 4°C por un periodo de 2 horas, en un refrigerador convencional.
5. Introduzca las muestras en el equipo de congelamiento programado, que en este caso fue un Cryologic 3300.

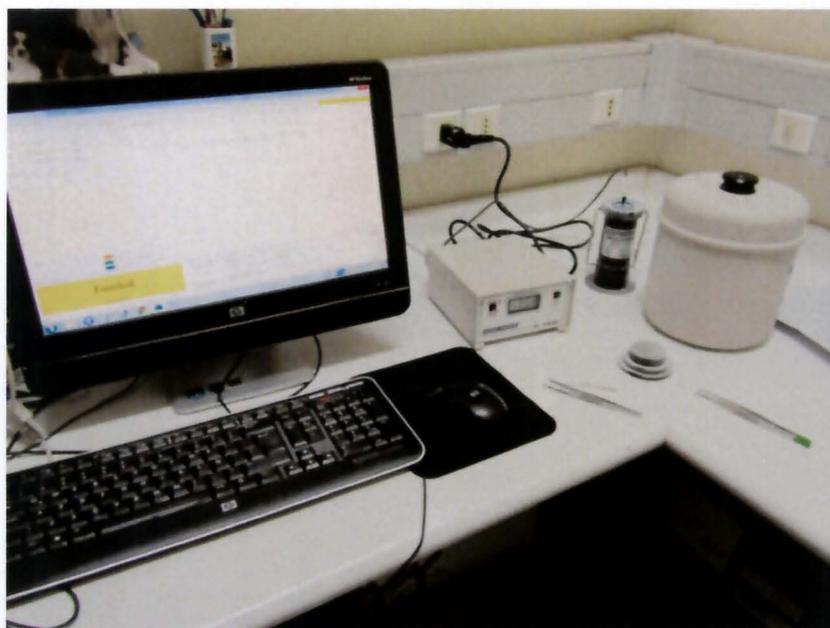


Imagen 5: Equipo automatizado y computarizado Cryologic 3300.

6. Seleccione el programa de congelamiento pre-ingresado (ver anexo 2) y cuando este finalice, sumerja las pajuelas directamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento final.



Imagen 6: Tanque de almacenamiento de las pajuelas.

DESCONGELAMIENTO.

El descongelamiento de las muestras se lleva a cabo tanto para utilizar las muestras en la inseminación de reinas, como para realizar la evaluación del estado de las muestras mediante distintos parámetros. Este proceso también tiene varios pasos, tal y como se indican a continuación:

1. Antes de comenzar debe regular la temperatura del baño termo regulado a 37°C.
2. Sacar las muestras cuidadosamente del contenedor de N₂, y rápidamente sumergirlas en un contenedor de transporte con nitrógeno.
 - Esta maniobra permite mantener controlada la temperatura de las pajuelas antes de comenzar el proceso de descongelamiento.
3. Saque una muestra del nitrógeno líquido a la vez, y déjela a temperatura ambiente por 10 segundos.
4. Inmediatamente sumerja la muestra en baño termostático a 37°C por 15 segundos.

5. Seque y corte con lápiz diamante los extremos de la pajuela para recolectar el semen.



Imagen 7: Materiales utilizados en proceso de congelación/descongelación, de izquierda a derecha: Pinza, Lápiz diamante, contenedor de transporte y gafas protectoras.

EVALUACIÓN DE MUESTRAS.

La evaluación de muestras permitirá cualificar y cuantificar las características de éstas luego del proceso de congelamiento/descongelamiento, los parámetros evaluados deben ser comparados con los controles respectivos antes del proceso de criopreservación. Entre estos parámetros encontramos:

Motilidad.

La Motilidad es evaluada a través de la observación microscópica de las muestras pre congeladas. En este caso, los espermatozoides de zángano son considerados motiles desde que presentan leves vibraciones, esto porque en condiciones naturales ellos se presentan como ovillos aglomerados que exhiben baja o nula posibilidad de desplazamiento. Ésta situación cambia al estar en contacto con los fluidos de la reina al momento de la fecundación.

Así, la evaluación de la motilidad es un parámetro cualitativo que se realiza por medio de un observador entrenado. Este proceso se realiza de la siguiente forma:

1. De la dilución de base (o de la muestra descongelada), tome $1\mu\text{l}$ y diluya en $999\mu\text{l}$ de buffer de semen de zángano.
 - Puede agitar suavemente o vortexear por 10 segundos para que la muestra se diluya completamente.

2. Incube por 20 minutos a 37°C.
3. Evaluar la motilidad de la muestra según la escala de características del semen.

Viabilidad Espermática.

Para determinar la viabilidad de los espermatozoides se escogió el método LIVE/DEAD Sperm Viability, ampliamente usado en la literatura, que permite cuantificar la viabilidad de las muestras mediante el uso de sondas fluorescentes. Este procedimiento se basa en que los espermatozoides muertos se visualizan con una sonda en color rojo (ioduro de propidio, IP), mientras que una sonda en color verde (SYBR) sirve para visualizar a los espermatozoides vivos.

Para realizar una evaluación de la viabilidad, siga los siguientes pasos:

1. Antes de comenzar debe descongelar los reactivos del kit y mantenerlos resguardados de la luz.
2. De la dilución de base (o de la muestra descongelada), tome 1µl y diluya en 143µl de buffer de semen de zángano.
 - Recuerde pipetear hasta que la muestra se vea bien diluida (sin grumos).
3. Agregue a esta segunda dilución 4µl de SYBR y 2µl de IP, pipetee suavemente para que la sonda llegue a toda la muestra.
4. Incube durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Llevar 10µl de la suspensión en portaobjeto y observar con un microscopio de epifluorescencia con magnificación de 400x.
6. Contar el número de espermatozoides vivos/muertos para establecer el porcentaje de viabilidad, según la siguiente ecuación:

$$(n^{\circ} \text{ espermatozoides vivos} / n^{\circ} \text{ espermatozoides totales}) \times 100$$

Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM).

La actividad de la mitocondria puede ser afectada por diversos factores, lo que implica un cambio en su potencial de membrana en respuesta a un estímulo determinado, en nuestro caso el congelamiento/descongelamiento.

La medición de la variación del potencial de la membrana se evaluó mediante la técnica de citometría de flujo y la sonda JC-1. Este procedimiento consiste en la agregación de moléculas al interior de la mitocondria, el cual depende exclusivamente de su despolarización, indicado por una disminución de la razón de fluorescencia rojo/verde (590/529nm). En este modelo nosotros esperamos ver un alto potencial de membrana para los espermatozoides activos (rojo/naranja), y un bajo potencial para los espermatozoides muertos (verde).

La evaluación del potencial de membrana mitocondrial se realiza en un citómetro de flujo mediante los siguientes pasos:

1. Antes de comenzar debe descongelar los reactivos del kit JC-1 y mantenerlos resguardados de la luz.
2. Prepare tres tubos de 1,5ml con 1 μ l de muestra en 999 μ l de buffer de semen de zángano cada uno (blanco, control (-), JC1).
3. Agregue 1 μ l de CCCP al tubo control (-) e incubar por 5 minutos a 37°C.
4. Agregue 10 μ l de JC-1 al tubo control (-) y al tubo JC-1 e incubar ambos por 30 minutos a 37°C.
 - El tubo blanco solo lleva la muestra diluida.
5. Centrifugue los tres tubos por 10 minutos a 1800rpm.
6. Resuspenda el pellet en 500 μ l de buffer de citometría (esto dependerá del equipo a utilizar, puede ser PBS).
7. Leer muestras en citómetro de flujo en canales 529 y 590nm.

4. Descripción de las actividades PROGRAMADAS y tareas EJECUTADAS para la consecución de los objetivos.

Actividad	Descripción Avance	Problemas y Desviaciones	Repercusiones	Acciones Correctivas
Asesorías internacionales.	La primera semana de Diciembre de 2013, se contrató los servicios profesionales por 5 días del experto apícola francés Sr. Gilles Fert.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Producción de zánganos de líneas genéticas conocidas e interesantes para uso apícola.	A partir de los primeros días de septiembre de 2013, se inició la actividad apícola y con ella, la incentivación de las colmenas para que generen zánganos.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Cosecha de zánganos sexualmente maduros para la extracción de semen.	En octubre de 2013, se inicia el proceso de inseminación instrumental de abejas reinas en los laboratorios de Abejas del Bio Bio, apoyado por la solución salina, creada por la Universidad Católica de Chile.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Extracción de semen en laboratorio de Abejas del Bio Bío.	Desde octubre de 2013 se procede a extraer semen de zánganos, pero las primeras muestras preparadas para la Universidad Católica se realizó el 13 de noviembre de 2013.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Entrega de muestras de semen a Universidad Católica, campus Santiago para inicio de investigación.	El 14 de noviembre de 2013, es entregada la primera pajueta con dosis de semen de zánganos suficiente para iniciar los estudios de crioconservación.	Un mes en relación a lo programado.	Ninguna relevante.	Aumentos de dosis para estudios.
Preparación de muestras.	La Unidad de Endocrinología y Reproducción, Depto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, internamente procede a preparar las muestras.	Un mes en relación a lo programado.	Ninguna relevante.	Aumentos de dosis para estudios.
Caracterización y análisis de viabilidad base pre métodos de crioconservación de espermatozoides de apis mellífera.	En Abril de 2014 se entrega informe.	Un mes en relación a lo programado.	Ninguna relevante.	Aumentos de dosis para estudios

Selección de métodos de acuerdo a naturaleza de espermatozoides de apis mellífera para crioconservación.	Decidir que metodologías se usarán para aplicar técnicas de congelamiento de espermios de zánganos que entreguen el mayor número de espermios vivos post descongelados.	Tres meses en relación a lo programado inicialmente.	Ninguna relevante, porque las abejas están en proceso de hibernación para hacer pruebas de campo.	Incorporación de semen alemán y francés a la investigación.
Aplicación del método de crioconservación.	Probar distintos procedimientos de congelamiento.	Tres meses en relación a lo programado inicialmente.	Ninguna relevante, porque las abejas están en proceso de hibernación para hacer pruebas de campo.	Incorporación de semen alemán y francés a la investigación.
Descongelamiento de semen para análisis de viabilidad en periodos de tiempo.	Probar distintos procedimientos de descongelamiento.	Tres meses en relación a lo programado inicialmente.	Ninguna relevante, porque las abejas están en proceso de hibernación para hacer pruebas de campo.	Incorporación de semen alemán y francés a la investigación.
Determinación de método óptimo.	Los resultados iniciales de congelamiento/ descongelamiento sugirieron además que la tasa de congelación de 3°C/min fue efectiva y que además la mezcla de crioprotectores daba mejores efectos que DMSO o Glicerol por separados. En conclusión en este primer semestre, se avanzó con la puesta en marcha de un protocolo de congelamiento/descongelamiento para semen de zánganos, el que debía ser perfeccionado a partir del segundo semestre de 2014	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Entrega de semen congelado a Abejas del Bio Bío, para pruebas de campo.	Se han realizado tres pruebas de campo con semen descongelado. El primero en dependencias de la PUC en Santiago y dos en la ciudad de Los Angeles.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Incentivo artificial abejas inicio primavera para la aceptación de	Alimentación artificial de las colmenas con un jarabe conformado por azúcar granulada en un 66 % de	Ninguna	Ninguna	Ninguna

larvas reales.	concentración, más complejos vitamínicos y productos sanitarios.			
Producción de abejas reinas vírgenes de líneas genéticas conocidas e interesantes para uso apícola	Generación de reinas vírgenes para iniciar proceso de inseminaciones.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Entrega de semen congelado a Abejas del Bio Bío, para pruebas de campo.	Entrega de pajuelas de semen congelado por parte de la Universidad Católica a la empresa.	A solicitud de Abejas del Bio Bío, se realizaron las primeras inseminaciones con semen crioconservado en instalaciones de la UC, para garantizar el correcto descongelado del semen.	Ninguna	Ninguna
Maduración sexual de abejas reinas para inseminación.	Desde Septiembre 2014 al cierre de este informe se producen y maduran abejas reinas vírgenes para inseminación.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Formación de babys fecundadores naturales para el apego de abejas reinas hermanas de reinas destinadas a inseminación. (Base de comparación 1).	Desde Septiembre 2014 al cierre de este informe se forman mini colmenas para el apego de abejas reinas hermanas.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Inseminación de abejas reinas con semen fresco. (Base de comparación 2).	Desde Septiembre 2014 al cierre de este informe se inseminan abejas reinas hermanas con semen fresco.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Primera inseminación de abejas reinas con semen crioconservado.	Actividad que se realizó el 28 de Noviembre de 2014, inseminando en los laboratorios de la UC, 12 reinas vírgenes con semen crioconservado y 5 abejas reinas vírgenes con semen fresco, como base de comparación.	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Maduración de apego de reinas inseminadas por 5 días en lugar oscuro.	Apego de reinas satisfactorio	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Instalación de babys fecundadores de centro experimental.	Instalación de babys en centro experimental.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Segunda inseminación de abejas reinas con semen crioconservado.	Actividad que se realizó el 06 de Enero de 2015, inseminando en los laboratorios de la empresa, 7 reinas vírgenes con semen crioconservado.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Maduración de apego de reinas inseminadas por 5 días en lugar oscuro.	100 % exitoso.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Instalación de babys fecundadores de centro experimental.	Babys fecundadores instalados.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Tercera inseminación de abejas reinas con semen crioconservado.	Actividad que se realizó el 13 de Noviembre de 2015, inseminando en los laboratorios de la empresa, 10 reinas vírgenes con semen crioconservado.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Maduración de apego de reinas inseminadas por 5 días en lugar oscuro.	80 % exitoso.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Instalación de babys fecundadores de centro experimental.	Babys fecundadores instalados con 40 % de eficiencia.	Condiciones climáticas en Noviembre 2015, (Bajas temperaturas y exceso de lluvias) perjudicaron el apego de las reinas.	Menor cantidad de muestras para observar su comportamiento. Desde el punto de vista de etapas siguientes, no afecta.	Repetir muestras en meses siguientes.
Revisión periódica de babys fecundadores para determinar estado de reinas inseminadas y sus crías.	Revisión permanente en cada proceso de inseminación con semen crioconservado.	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Preparación de pajuelas con semen de zánganos de apis mellífera.	Realizado por investigadores de PUC y Universidad de Chile.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Crioconservación de pajuelas con método óptimo.	Realizado por investigadores de PUC y Universidad de Chile.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Descongelamiento de pajuelas año 1 para análisis de viabilidad y pruebas de campo.	Efectuado en tercera inseminación en Noviembre de 2015.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Incentivo artificial a abejas inicio primavera y finales de otoño para la aceptación de larvas reales.	Se ha realizado durante las dos temporadas anteriores.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Producción de abejas reinas vírgenes de líneas genéticas conocidas e interesantes para uso apícola.	Se han producido reinas vírgenes.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Maduración sexual de abejas reinas para inseminación.	Se han madurado reinas vírgenes hasta 90 días pre inseminación.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Inseminación de abejas reinas con semen crioconservado.	Inseminación exitosa con producción de hembras, como se ha informado en informes técnicos.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Maduración de apego de reinas inseminadas por 5 días en lugar oscuro.	Proceso realizado en cada apego de reinas inseminadas.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Instalación de babys fecundadores de centro experimental.	Efectuado satisfactoriamente.	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Chequeo de aceptación de reinas inseminadas.	Chequeo permanente para controlar proceso productivos.	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Chequeo de postura de reinas inseminadas	Chequeo permanente para controlar proceso productivos	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Chequeo de evolución de crías hijas de reinas inseminadas.	Chequeo permanente para controlar proceso productivos	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Registro de aceptación de reinas inseminadas.	Chequeo permanente para controlar proceso productivos	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Mantenión de babys fecundadores.	Mantenión permanente.	Ninguna	Ninguna	Ninguna

5. Resultados del proyecto:

5.1 Resultados obtenidos.

Motilidad.

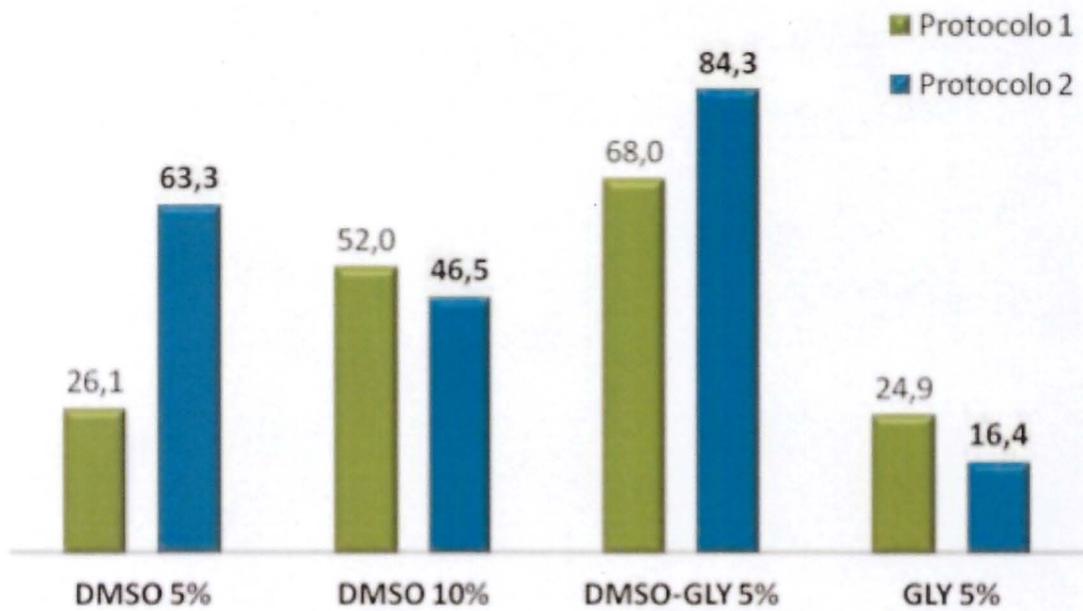
Evaluando el parámetro de motilidad de la sub-especie Cárnica, se observa que el 45,5% de las muestras no presentan motilidad observable y 54,5% presenta leves vibraciones o motilidad vigorosa (n=11). Con respecto a la sub-especie Italiana, 80% exhibe motilidad observable; sin embargo, el número de muestras de esta sub especie es menor (n=5). Una apreciación superficial de los porcentajes podría indicar que la sub-especie Italiana tiende a presentar una mayor motilidad pero, debido a su bajo número de muestras, esta conclusión aún no puede ser tomada como cierta.

Sub-especie	# Muestras	Motilidad	% de Motilidad
Cárnica	3	1	46
	3	2	27
	5	3	27
Total: 11			
Italiana	2	3	40
	2	2	40
	1	1	20
Total: 5			

TABLA 1: Motilidad de muestras de semen fresco de zángano Cárnico e Italiano.

Viabilidad Espermática.

Los resultados iniciales de congelamiento/descongelamiento indican que es posible congelar/descongelar semen de zángano y que se obtienen mejores porcentajes de viabilidad post-descongelamiento usando el protocolo 2 de congelamiento y la mezcla de crioprotectantes. Se observó que respecto al control, con el protocolo 2 se obtuvo un 63,3% de viabilidad con DMSO 5% y un 84,3% con DMSO-GLY 5%. Por otra parte, mediante el protocolo 1, se verificó un 68% de viabilidad en las condiciones de DMSO-GLY y un 52% con DMSO 10% (n=2). La viabilidad de los espermatozoides previa al proceso de congelamiento fue de un 72,6%.



GRÁFICA 1: Evaluación de Viabilidad Post-descongelamiento mediante el kit de viabilidad espermática Live and Dead.

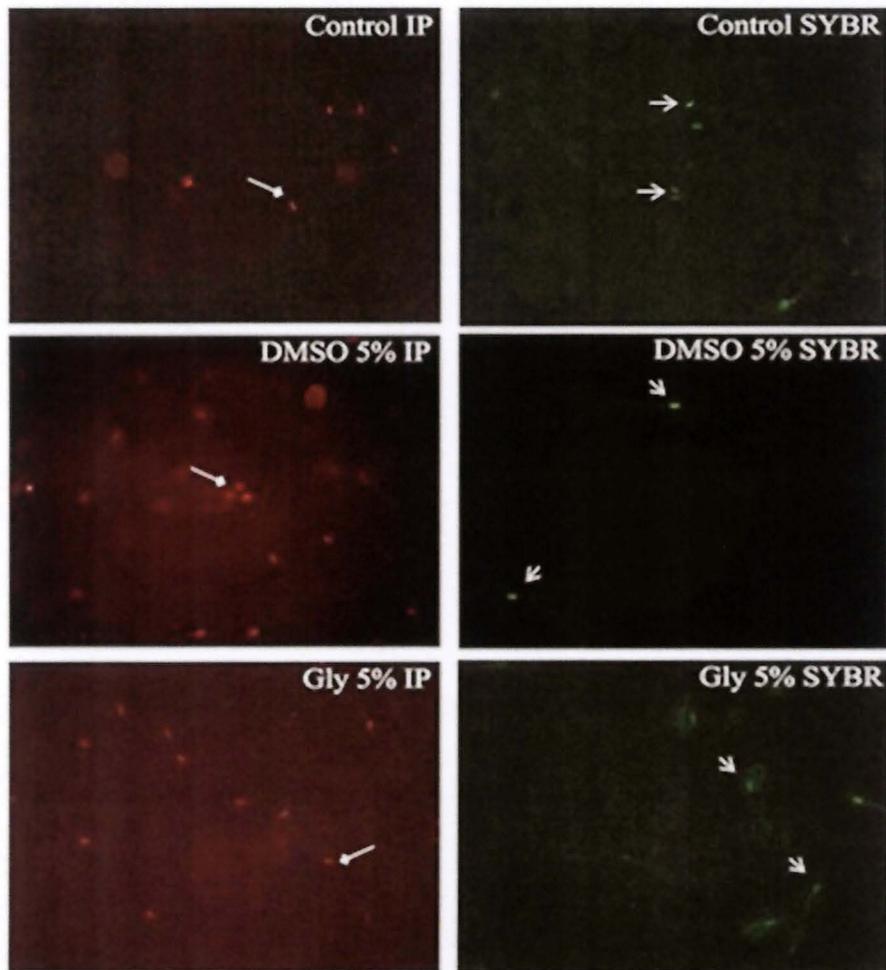


IMAGEN 8: Imágenes de microscopía de fluorescencia de espermatozoides de zángano utilizando el kit de viabilidad espermática Live and Dead. Este kit mide células vivas con la sonda fluorescente SYBR14 en verde y células muertas con yoduro de propidio (IP) en rojo. Arriba se muestra el control de las muestras pré-congelamiento; a la izquierda, el menor % de viabilidad obtenido y a la derecha, el mayor (ambos con el protocolo 2).

Una de las preocupaciones que se tenía es que la viabilidad de los espermatozoides de zángano podría verse afectada por su traslado desde las instalaciones de Abejas del Bio Bio hasta la Pontificia Universidad Católica. Para esto se realizó un estudio en que el semen se extrajo en las instalaciones de la Pontificia Universidad Católica. Los resultados de viabilidad indicaron que la viabilidad inicial de semen de zángano extraído en el laboratorio en la Pontificia Universidad Católica de Chile era similar a la viabilidad de semen extraído en las instalaciones de Abejas del Biobío y posteriormente enviado por correo postal.

Sub-especie	% de Viabilidad	
	Muestras Frescas	Muestras Correo
Cárnica	75,5	70 poner SD
	n=1	n=10
Italiana	66,8	83 poner SD, en todas
	n=3	n=2
Promedio	71,2	76,5 Poner SD

TABLA 2: Comparación de la Viabilidad de muestras de Cárnica e Italiana extraídas en la PUC y muestras extraídas en Abejas del Bio Bio y enviadas por correo postal.

Sin embargo, la viabilidad post-descongelamiento se vio significativamente disminuida cuando las muestras fueron congeladas inmediatamente después de su extracción. Con el desarrollo de una segunda prueba, fue posible observar que las muestras extraídas en la Universidad y dejadas a temperatura ambiente al menos por 24 horas, resistían más fácilmente al proceso de congelamiento, mostrando viabilidades post-descongelamiento más similares a las muestras extraídas en Los Ángeles.

		% Viabilidad Inicial	% Viabilidad Post-descongelamiento
Cárnica	Extracción/Congelamiento en el mismo día	75,5	0
		n=1	n=1

Italiana	Extracción/Congelamiento en el mismo día	69,9	7,8 SD
		n=1	n=2
Italiana	Congelamiento 1 día post- extracción	51,1	45,3
		n=1	n=1
	Congelamiento 3 días post- extracción	79,2	30,9
		n=1	n=1

TABLA 3: Comparación de la Viabilidad de muestras de Cárnica e Italiana extraídas y congeladas en el mismo día versus extracción y congelamiento en días distintos.

Con la introducción del semen de la sub-especie Italiana, aunque no se haya podido hacer un estudio más profundo, se percibe una tendencia al logro de mayores porcentajes de viabilidad cuando comparamos con la sub-especie Cárnica.

	% Viabilidad Inicial	% Viabilidad Post-descongelamiento (hasta 10 días de congelamiento)	% Viabilidad Post-descongelamiento (hasta 30 días de congelamiento)	% Viabilidad Post-descongelamiento (hasta 50 días de congelamiento)	% Viabilidad Post-descongelamiento (más 50 días de congelamiento)
Cárnica	74,6	20,1	15,6	12,6	4,4
Italiana	73,2	27	40,3	36	22,2

TABLA 4: Comparación de las Viabilidades Iniciales y Post-descongelamiento de las muestras de Cárnica e Italiana a lo largo del tiempo.

Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM).

El análisis de potencial de membrana mitocondrial se realizó sobre tres muestras, dos obtenidas en Los Ángeles y una en las instalaciones de la UC (Grupo Control) y luego se analizaron las mismas tres muestras después de seis meses de almacenamiento (Grupo Descongelado). El análisis realizado mediante citometría de flujo mostró que el porcentaje de espermatozoides teñidos naranja en el grupo control fue cercano al 100%, mientras que el grupo descongelado promedió un 75% de potencial mitocondrial.

Grupo	Pajuela	PMM (%)
Control	Muestra 1 Cárnica	99,6
	Muestra 2 Italiana	97,2
	Muestra 3 Cárnica	100
Descongelado	Muestra 1 Cárnica	53,5
	Muestra 2 Italiana	81,2
	Muestra 3 Cárnica	90,75
Promedio	Control	99
	Descongelado	75

TABLA 5: Resumen de resultados obtenidos por Citometría de Flujo con JC-1 para Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM). Las muestras 1 y 2 fueron obtenidas por correo postal y la muestra 3 fue extraída en instalaciones UC y mantenida por 24hrs antes de congelarla. En todos los casos se utilizó el protocolo 2 de congelamiento y la mezcla de crioprotectantes.

El análisis de citometría de flujo mostró que el porcentaje de espermatozoides teñidos naranja en el grupo control fue cercano al 100%, mientras que el grupo descongelado promedió un 75% de potencial mitocondrial.

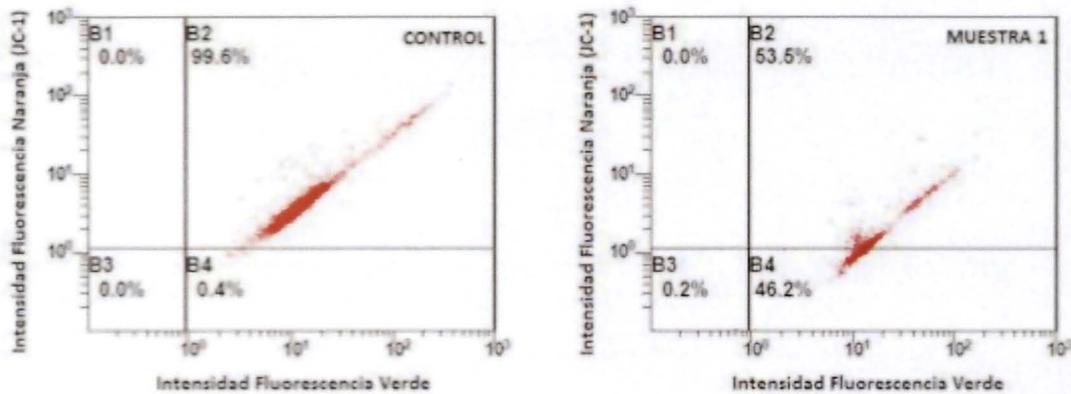


GRAFICO 2: Gráficos de citometría de flujo representativos del PMM de muestras con JC-1, control y descongeladas e la muestra 1 de subespecie Cárnica.

Por lo tanto, considerando que la expectativa inicial en este proceso fue obtener un éxito sobre el 50% de viabilidad, pudimos corroborar que los espermatozoides frescos presentan un alto potencial y que, luego de la congelación/descongelación el potencial de membrana tiende a disminuir tal como se puede observar en la figura 7. Sin embargo el PMM de las muestras descongeladas se mantiene sobre el 50%, lo que es un indicio del éxito de la técnica utilizada.

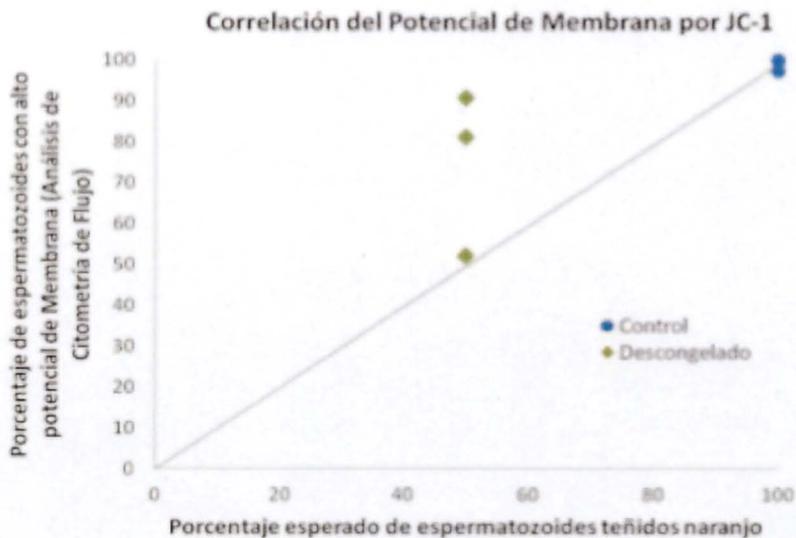


GRAFICO 3: Correlación entre el porcentaje de espermatozoides teñidos de naranja (alto potencial de membrana) con JC-1 por Citometría de Flujo.

Pruebas de Campo.

La última etapa de nuestros análisis correspondió a la realización de cinco pruebas de campo, que corresponden al proceso de inseminación con semen descongelado.

En una primera instancia se inseminaron 17 reinas vírgenes de dos especies distintas, cárnica e italiana, que presentaban 3 edades diferentes (39 días, 24 días y 9 días), lo que permitió observar la importancia de la edad de la reina en la producción de obreras, ya que por años se ha realizado luego de los primeros 7 días de nacimiento.

Se utilizó dos especies de zánganos, cárnica (extraído en el mismo día de la inseminación) o descongelado de cárnica o italiana (congelado en dos fechas previas). Se inseminaron en promedio 4µl de semen por reina

Reinas #	Especie ♀	Especie ♂	Nacimiento ♀	Semen	Fecha de Congelamiento	% viabilidad (inicial)	% viabilidad (post-desc)
1	cárnica	cárnica	19-oct	Fresco	-	75,5	(-)
2	italiana	cárnica	19-nov	Fresco	-		
3	italiana	cárnica	04-nov	Fresco	-		
4	italiana	cárnica	19-nov	Fresco	-		
5	italiana	cárnica	19-nov	Fresco	-		
6	cárnica	cárnica	19-oct	Descongelado	05-nov	74,4	34,8
7	italiana	cárnica	19-nov	Descongelado	05-nov		
8	italiana	cárnica	04-nov	Descongelado	05-nov		
9	italiana	italiana	19-oct	Descongelado	05-nov	91,2	28,4
10	italiana	italiana	19-nov	Descongelado	05-nov		
11	italiana	italiana	04-nov	Descongelado	05-nov		
12	italiana	cárnica	19-oct	Descongelado	26-nov	82,7	42,07
13	italiana	cárnica	19-nov	Descongelado	26-nov		
14	italiana	cárnica	19-nov	Descongelado	26-nov		
15	cárnica	italiana	19-nov	Descongelado	26-nov	74,9	52,06
16	italiana	italiana	19-nov	Descongelado	26-nov		
17	italiana	italiana	19-nov	Descongelado	26-nov		

TABLA 6: Diseño experimental de la primera prueba de campo.

5.2 Logro de Hitos.

N° RE	Hitos críticos	Fecha Programado	% Avance a la fecha	Fecha Real Cumplimiento
1	Entrega de primeras muestras de semen de zánganos a Universidad de Católica, para iniciar de estudios de crioconservación.	Octubre 2013	100 %	Noviembre 2013
1	Descripción morfológica semen de zánganos.	Noviembre 2013	100 %	Diciembre 2013
1	Aplicación de técnica(s) de crioconservación semen de zánganos	Enero 2014	100 %	Abril 2014
1	Análisis en laboratorio de viabilidad para espermios descongelados.	Marzo 2014	100 %	Junio 2014
1	Pruebas de campo para inseminación instrumental con semen descongelado.	Noviembre 2014	100 %	Enero 2015
1	Estudio de longevidad de reinas inseminadas con semen descongelado y comparación con semen conservado a temperatura ambiente y fecundación natural.	Noviembre 2015	100 %	Marzo 2016

Es importante tener en consideración que el proyecto inicial, consideraba como fecha de inicio el 02 de Enero de 2013. Los recursos para iniciar el proyecto, finalmente fueron entregados en Julio de 2013, esto explica el desfase entre las fechas programadas y las fechas de cumplimiento.

4 reinas crías, tras una serie de modificaciones al proceso normal de producción de abejas reinas y luego el 26 de Diciembre de 2016, 7 abejas reinas. Esta vez, con un mayor conocimiento, que permitió acelerar el proceso de producción antes de que los espermios perdieran su capacidad fecundante.



Imagen 9: Abejas reina N° 32, de raza italiana, inseminada con semen crío. Esta reina fue muy clave en el proceso investigación, ya que fue la primera reinas inseminada que generó hembras viables y permitió producir las primeras 4 abejas reinas crío.

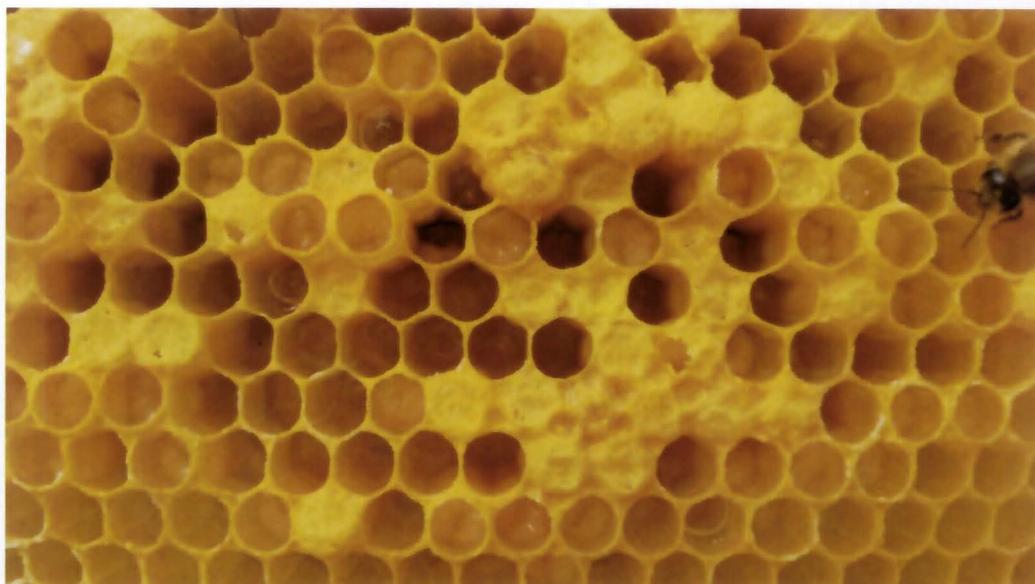


Imagen 10: Operculado de las celdillas con larvas de la abejas reina N° 32, de raza italiana, inseminada con semen crío. Las celdillas operculadas planas dieron origen a hembras crío y las más abultadas dieron origen a zánganos crío. Esto demostró que no todos los espermios contenidos en la reinas, lograban capacidad fecundante para generar hembras.



Imagen 11: Abejas crío (lado izquierdo) y zánganos críos (lado derecho), obtenidos al abrir las celdillas operculadas en el estadio 9 para el caso de las hembras y en el estadio 10 para el caso de los machos. La abeja reina madre de estas crías fue la abeja reina N° 32.



Imagen 12: Producción de abejas reinas crío. Después de varios intentos de aplicar la técnica de traslarve para la producción de abejas reinas crío, se optó por dejar que las propias mini colonias, eligieran las larvas para producir sus reinas. Esta mini colmena o baby fecundador estaba conformado por 200 gramos de abejas y eran las responsables de aceptar las abejas reinas inseminadas con semen congelado/descongelado. Familias similares, eran destinadas a recibir los marcos con huevos de día que colocaban las reinas inseminadas con semen crío, para dar paso al desarrollo de las celdillas reales que llevarían al nacimiento de las reinas, como se muestra en la imagen.



Imagen 13: Primera abeja reina crío de raza italiana obtenida en Chile en el Centro de investigación apícola Abejas del Bio Bío Ltda, Región del Bio Bio; hija de la abeja reina N°32, inseminada con semen críocongelado de la misma raza. Este hito se consiguió el 14 de Diciembre de 2015.

6. Problemas enfrentados durante la ejecución proyecto (legal, técnico, administrativo, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

En el proceso de ejecución del proyecto, existieron tres situaciones que se debieron enfrentar y tomar medidas correctivas para no afectara el desarrollo de las distintas etapas del proyecto.

Pero antes de ello, decir que fue todo un agrado trabajar con cada uno de los diferentes profesionales que nos tocó interactuar en todo los meses de ejecución del proyecto. Partiendo con los guardias que nos recibieron en la entrada, la secretaria recepcionista que atiende nuestros requerimientos iniciales, los ejecutivos técnico y financiero, la secretaria de la unidad programas y proyectos, la secretaria del director ejecutivo. Y en su momento, el director ejecutivo y el subdirector de FIA. Muchas gracias a todos ustedes y por favor siéntanse parte de los logros alcanzados en este proyecto.

Las tres situaciones fueron:

a) ***Atraso en la entrega de los fondos iniciales.***

El proyecto debía partir el 01 de Enero de 2013, cómo había sido solicitado en las base del concurso 2012. Sin embargo, los fondos fueron entregados a partir del segundo semestre de 2013. Tampoco se pudo imputar gastos en los primeros meses de 2013, por no estar firmado el contrato entre las partes. En concreto, el proyecto partió atrasado al menos en 3 meses, de mucha actividad apícola.

b) ***Cambio climático.***

Sin lugar a dudas, este factor fue muy perjudicial a la hora de programar las diferentes actividades apícolas que permitían avanzar en el proyecto. Por lo menos 5 años, las condiciones climáticas son distintas. Antes, las lluvias y frio, mermaban a partir de la segunda quincena de agosto y ya prácticamente de septiembre en adelante se podía trabajar en forma normal y creciente en las abejas. Ahora y con una proyección de 5 años atrás, el clima en la región del Bio Bío, es impredecible. Hasta noviembre se producen lluvia y frio lo que hace que las abejas estén desconcertadas y con un desarrollo lento en sus familias. Esta situación se hizo notar en los informes de avances y fue la principal razón por la cual, se solicitó una prorrogas de 6 meses más, para dar cumplimiento cabal de todas las actividades programadas.

c) **Reducción de los fondos al final del proyecto.**

Nunca se tuvo claridad del por qué nuestro proyecto al final de su etapa de ejecución, fue afectado con el recorte del aporte FIA por pese a que se indicó que los fondos eran necesarios y que afectarían las etapas finales, la reducción se hizo igual.

7. Difusión de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

Este proyecto se ha caracterizado por tener un alto impacto mediático en la sociedad chilena. Así se deja entrever a través de las distintas publicaciones realizadas en medios de comunicación del país, donde se destacan:

- OPIA – Julio 2013.
- Portal Frutícola – Octubre 2013.
- Fundación Terram – Julio 2014.
- El Mercurio – Julio 2014.
- La Cuarta – Noviembre 2014.
- XXV Reunión anual Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo – Septiembre 2014.
- Poster publicitario del proyecto – Septiembre 2014.
- El Mostrador – Diciembre 2014.
- Portal Pontificia Universidad Católica de Chile – Febrero 2015.
- Revista del Campo El Mercurio – Febrero 2018.
- Revista del Campo El Mercurio – Septiembre 2018.

Junto con ello, difusiones permanentes en el sitio web y Facebook de Abejas del Bio Bio Ltda.



CRIOPRESERVACIÓN IN VITRO DE SEMEN DE ZÁNGANO: COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA EN DOS SUB-ESPECIES DE APIS MELLIFERA

(In vitro Cryopreservation of sperm drones: comparison of the technique in two sub species of *Apis mellifera*)

Cruz-Fernandes L¹, Díaz MC¹, Acuña R², Palomino J³, Moreno RD¹

¹ Departamento de Fisiología, Unidad de Endocrinología y Reproducción, Pontificia Universidad Católica de Chile

² Centro de Investigación Apícola Abejas del Biobío Ltda.

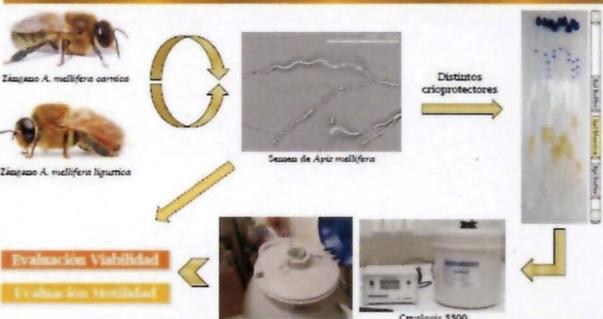
³ Departamento de Fomento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

INTRODUCCIÓN

La funcionalidad de una colmena depende de sus obreras -hembras resultantes de ovocitos fertilizados- y a su vez de la calidad del semen de los zánganos. El desarrollo y madurez de los zánganos es influenciado por el flujo de néctar (más abundante durante la primavera/verano), por lo que la disponibilidad de espermatozoides aptos para la inseminación se limita a un corto periodo de tiempo.

El objetivo de este trabajo fue crear, optimizar y comparar la eficiencia de un protocolo de criopreservación de semen de dos sub-especies de *Apis mellifera* -*Apis mellifera carnica* y *Apis mellifera ligustica* - para su uso a largo plazo, independiente de la época del año.

METODOLOGÍA



RESULTADOS

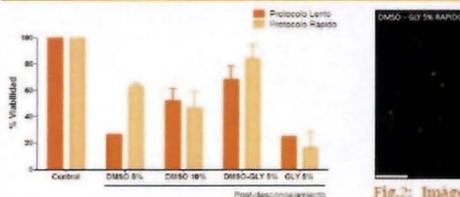


Fig.1: Porcentajes de viabilidad espermática post-descongelamiento de *A. mellifera* con distintas concentraciones de crioprotectores. Se observó que, con respecto al control, se obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad espermática (84,3%) usando una mezcla de crioprotectores DMSO-Glicerol (5%) y un protocolo de congelamiento rápido (n=2).

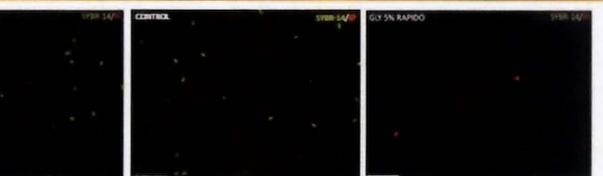


Fig.2: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de espermatozoides *A. mellifera* en condiciones de pre-congelamiento (control) y post-descongelamiento de dos protocolos distintos. En verde se observa espermatozoides vivos y en rojo espermatozoides muertos. Al centro se muestra la condición previa al congelamiento (viabilidad ~90%), a la izquierda da un congelamiento rápido con la mezcla de crioprotectores (viabilidad ~80%) y a la derecha, un congelamiento rápido con un único crioprotector (viabilidad ~15%). Barra: 25µm.

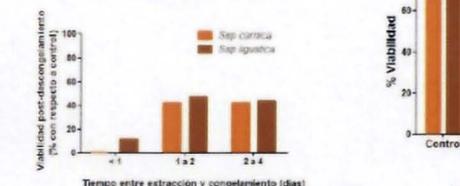


Fig.3: El tiempo entre la extracción y el congelamiento de los espermatozoides de ambas sub-especies modifica el porcentaje de viabilidad post-descongelamiento. La viabilidad post-descongelamiento de las muestras extraídas y congeladas el mismo día (< 1), es menor con respecto a aquellas que fueron extraídas y congeladas en días distintos en ambas sub-especies. *Ssp carnica* (n=3); *ssp ligustica* (n=4).

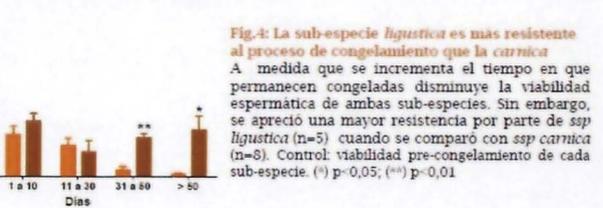


Fig.4: La sub-especie *ligustica* es más resistente al proceso de congelamiento que la *carnica*.

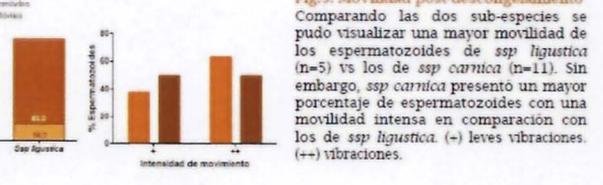


Fig.5: Movilidad post-descongelamiento. Comparando las dos sub-especies se pudo visualizar una mayor movilidad de los espermatozoides de *ssp ligustica* (n=5) vs los de *ssp carnica* (n=11). Sin embargo, *ssp carnica* presentó un mayor porcentaje de espermatozoides con una movilidad intensa en comparación con los de *ssp ligustica* (-) leves vibraciones. (++) vibraciones.

CONCLUSIONES

Estos resultados muestran que es posible llevar a cabo la criopreservación de espermatozoides de *Apis mellifera*. Sin embargo, su tasa de éxito parece depender de la sub-especie utilizada ya que se observaron tendencias de mayor resistencia al proceso de congelamiento y mayor motilidad post-descongelamiento en *Apis mellifera ligustica*.



Fig.6: Imagen representativa de postura de huevos fecundados por semen criopreservado. A la izquierda (tono más claro), se pueden visualizar larvas de *A. mellifera* en un estado de desarrollo más inicial y a la derecha (tono más oscuro), en un estado más avanzado con las celdillas operculadas. Observando más en pormenor las celdillas cerradas, se puede deducir que nascerán obreras ya que el operculo es uniforme y no cóncavo, como sucede en las celdillas que contienen zánganos.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto FIA: FYT-2013-0053

8. Productores participantes

Antecedentes globales de participación de productores

REGIÓN	TIPO PRODUCTOR	GÉNERO FEMENINO	GÉNERO MASCULINO	ETNIA (INDICAR SI CORRESPONDE)	TOTALES
Bio Bío	PRODUCTORES PEQUEÑOS	1	2	-	3
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES	-	-	-	-
-	PRODUCTORES PEQUEÑOS	-	-	-	-
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES	-	-	-	-

Antecedentes específicos de participación de productores

NOMBRE	UBICACIÓN PREDIO			Superficie Hàs	Fecha ingreso al proyecto
	Región	Comuna	Dirección Postal		
Andes Bees Limitada	Bio Bío	Los Angeles		20	01-07-2013
Colmenares Hortisur SPA	Bio Bío	Los Angeles		200	01-07-2013
Prado, Mann y Cía Limitada	Bio Bío	Los Angeles		40	01-07-2013

9. Conclusiones

- 9.1. Es factible técnicamente, producir abejas reinas a partir de espermatozoides crioconservados a menos 196 °C con nitrógeno líquido en Chile.
- 9.2. Se obtuvo un procedimiento para crioconservar semen de zángano a bajas temperaturas (-196°C), en nitrógeno líquido. Este procedimiento se realiza gracias a que el semen se mezcla con soluciones químicas denominadas agentes crioprotectores, que protegen a las células del daño producido por la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelamiento y descongelamiento, evitando posibles daños a la membrana plasmática.
- 9.3. El método de congelación aplicado en este caso es distinto a todo lo que se ha publicado en el resto del mundo. La diferencia radica en la velocidad del proceso y la concentración de las soluciones utilizadas (diferente combinación y concentración de crioprotectores).
- 9.4. En este proyecto se logró conocer un poco más acerca de la especie *Apis mellifera*, tanto a nivel morfológico, como a nivel reproductivo mediante la criopreservación.
- 9.5. El análisis de los resultados a indicado que la criopreservación es posible, además que parámetros como la evaluación de la viabilidad y potencial de membrana mitocondrial permite tener una idea cercana de la condición en la cual se encuentran los espermatozoides de zángano congelados / descongelados.
- 9.6. Se obtuvo éxito en las pruebas de congelamiento, logrando porcentajes por sobre el 50% de viabilidad post-descongelamiento, dada como meta del proyecto. También se corroboró que el potencial de membrana mitocondrial se ve disminuido luego del proceso de congelamiento, pero aún se requiere un mayor número de muestras para ratificar esta información.
- 9.7. El proceso de criopreservación ha entregado información valiosa respecto a las posibilidades de extender el periodo de inseminación mas allá de la temporada de primavera /verano en el que normalmente se realiza.
- 9.8. Se comprobó que los espermios descongelado recorren exitosamente el camino desde la vagina hasta la espermateca. Este hito, constituyó un éxito sin precedentes en Chile. Quedó demostrado en campo, que los espermios sobrevivían a la crioconservación y tenían la energía suficiente para hacer el largo camino hasta llegar a la espermateca.
- 9.9. Los espermatozoides congelados/descongelados son capaces de fecundar los huevos de las abejas reinas, generando hembras, que se pueden observar directamente en sus celdillas operculadas a partir de los 9 días.
- 9.10. Luego de las pruebas de campo, se pudo comprobar la eficiencia del proceso de criopreservación al obtener abejas de reinas inseminadas con semen criopreservado, este éxito permite acceder a un nivel más alto para estudiar diversos parámetros como por ejemplo si variaciones en el tiempo de criopreservación de las muestras afectara el proceso de producción de obreras, la eficiencia en la obtención de reinas a partir de

semen criopreservado, como se ve afectada la fertilidad de zánganos criopreservados, entre otros.

- 9.11. A las obreras obtenidas de semen crio conservado, se les llamó “obreras crio” a los zánganos obtenidos de estos procesos, “zánganos crio” y luego a las reinas obtenidas “reinas crio”. Gracias a este proyecto, nació una nueva casta de abejas: Las “abejas crio”.
- 9.12. Se determinó que los espermatozoides de los “zánganos crio” mantenían la misma capacidad fecundante y características de un zángano normal, la única diferencia radicaba en el volumen de semen producido que bordeaba en promedio a los 0,5 microlitros a diferencia de un zángano normal que apuntaba a valores cercanos a 1,0 microlitros.
- 9.13. El ciclo de las reinas inseminadas con semen congelado/descongelado cambia en el transcurso de los días, generando celdillas operculadas más abultadas, lo que permitió concluir, que algo pasaba con los espermatozoides al interior de la espermateca de las reinas.
- 9.14. Se logró determinar un tiempo de hasta 90 días, en que las reinas podían estar vírgenes antes de ser inseminadas. Su capacidad para producir crías hembras y desarrollar una colonia, no tenían mayores diferencias de una reina fecundada en forma natural. Los 90 días, fue el plazo máximo que permitieron las condiciones climáticas imperantes en la zona. Se tiene la convicción que es factible seguir alargando este tiempo a 6 meses o más.
- 9.15. En forma complementaria al estudio de longevidad de reinas vírgenes, se realizaron inseminaciones instrumentales “express”. Vale decir, se inseminaban reinas vírgenes traídas por los clientes con semen de la empresa y en el mismo día se trasladaban a los apiarios de los clientes. Más del 90 % de estas reinas, tuvieron un apego exitoso en sus nuevas familias.
- 9.16. Quedaron muchas interrogantes que por tiempo y recursos, no pudieron ser resueltas. Queda por estudiar: ¿Mueren los espermios en la espermateca de la reina o pierden su capacidad fecundante? Desde el momento que se insemina una reina con semen crio, ¿cuánto vive un espermio descongelado? ¿Qué características especiales tiene la espermateca de las reinas, que permite que los espermatozoides permanezcan vivos por años? Y finalmente, ¿Cómo aumentar la producción de reinas crio?
- 9.17. Es menester realizar una segunda etapa para perfeccionar la técnica de crioconservación de espermatozoides de zánganos para el género de *Apis Mellifera*.

10. Recomendaciones

Urge que los Gobiernos del mundo consideren a la apicultura de interés público y actividad prioritaria, dotándola de más fondos y apostando por su profesionalización, con cursos de formación profesional y postgrado universitarios oficiales. Asimismo, declarar la protección y preservación de los polinizadores como política pública y legislar en materia de urbanismo y agricultura, teniendo en cuenta las necesidades de estos agentes, es fundamental para no destruir sus hábitats y afectar a sus necesidades nutricionales, fomentando el crecimiento sostenible de los pueblos y ciudades con espacios verdes comprometidos con ellos, formando a los agricultores para que conozcan aquellas prácticas que son perjudiciales y que por desconocimiento aplican, así como los beneficios que las abejas y demás insectos representan para sus cultivos y la conservación del medio ambiente.



Imagen 14: Abejas polinizando semilleros de maravilla.

Legislar sobre penas por los delitos cometidos contra los polinizadores, tanto las privativas de libertad como las de distinta naturaleza, podría ser una buena medida para disuadir las malas prácticas que atentan contra estos insectos.

La disminución de las abejas y otros polinizadores durante los últimos años es alarmante, hasta el punto de situar a algunas especies al borde de la extinción. Las consecuencias directas de la desaparición de estos insectos serán la pérdida de una gran cantidad de cultivos y una profunda disminución de la calidad de los mismos, lo que provocará constantes hambrunas y consecuencias desastrosas, tanto para la raza humana como para otros muchos seres vivos.

Las abejas sufren este declive, en buena medida, por la actuación del ser humano, puesto que está detrás del cambio climático que comienza a percibirse y año tras año va en aumento, con intensas sequías y fenómenos atmosféricos extremos cada vez más frecuentes. Además hace uso para proteger sus cultivos de plaguicidas que en muchos casos son nocivos para la salud de estos insectos.

Entre tanto, la avispa asiática hace estragos por media Europa extendiéndose sin gran resistencia, y devorando ingentes cantidades de abejas para alimentar a sus crías y perjudicando algunos cultivos. Hasta el momento la respuesta de las administraciones está siendo dispersa y poco coordinada, ante la desesperación de los apicultores y las personas interesadas en el cuidado del medio ambiente, situación que ha de invertirse inmediatamente si se quiere controlar, puesto que su completa erradicación parece ya imposible.

A los anteriores problemas hay que sumar los producidos por algunas enfermedades, en gran medida producidas por ácaros como el Varroa, la Nosema que parece estar detrás del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas o la Loque americana, haciendo estragos en numerosas colmenas ante unas abejas con un sistema inmunitario debilitado por las carencias nutricionales que padecen fruto de los monocultivos, la reducción de sus hábitats, la desaparición de plantas autóctonas que les permitían alimentarse durante un periodo de tiempo adecuado o la contaminación de los cultivos con plaguicidas.

Una de cada tres colmenas está muriendo anualmente. Hay algo que las está matando y que tiene a las principales organizaciones agrarias y alimenticias a nivel mundial buscando una respuesta. La situación se ha vuelto cada vez más alarmante, porque lejos de la fama que tienen estos insectos como grandes productores de miel, tienen una labor crucial en nuestra cadena alimenticia: Entre el 70 y 80% de los vegetales y frutas que comemos (naranjas, duraznos, tomates, paltas, etc.) son polinizados por las abejas. Esto quiere decir que permiten su reproducción para que den fruto.

El problema está afectando a varios países. En Estados Unidos ha desaparecido el 60% de su población de abejas y hay estados en que el porcentaje alcanza el 80%. Europa es otro afectado, donde en Francia, Austria y Gran Bretaña han perdido la mitad de las colmenas. Por su parte, Brasil y Colombia también se han visto atañidos con el problema y si bien en Chile el panorama es más alentador, no se desmarca de la tendencia: Desde hace 8 años que las abejas mueren a una tasa anual del 15% o quizás más.

Desde la década del 80' que el ingreso principal de la apicultura en Chile no es la miel, sino la polinización de campos para la agricultura y la fruticultura. Por ejemplo, un árbol de paltos polinizado solo por abejas silvestres da 20 paltas, mientras que cuando se le pone a los pies una colmena, da 100 paltas.

En cuanto a las zonas más afectadas por la desaparición de abejas, los porcentajes se disparan en Chile afectados por sequía, donde la disminución es de un 50%. A esto se suman también el uso de plaguicidas, mal manejo del agua, ataque de varroa, transgénicos y las ondas electromagnéticas.

Nuestra empresa, pone a disposición y recomienda cuatro proyectos que pueden aportar a la cruzada internacional de salvar a las abejas y con ello, sigan contribuyendo en la polinización de frutas y semillas para la alimentación humana y animal, estos son:

- i. Estudio de longevidad de reinas vírgenes, con las siguientes variantes de gran impacto para la apicultura: (a) Mantener reinas vírgenes con el tiempo suficiente para inseminar con semen de contra estación de Europa u otras latitudes que puedan ser autorizadas por el SAG y (b) Mantener reinas vírgenes durante otoño e invierno hasta cosechar semen de zánganos sexualmente maduros en Chile.
- ii. Estudio de la partenogénesis de las abejas para desarrollar casta de abejas más eficientes para la polinización de frutas y huertos semilleros.
- iii. Desarrollo de abejas adaptadas al cambio climático para una agricultura sustentable nacional - VSH Chile – con fines productivos y comerciales.
- iv. Proyecto de Crioconservación de semen de zánganos - segunda etapa, para dar respuesta a: ¿Mueren los espermios en la espermateca de la reina o pierden su capacidad fecundante? Desde el momento que se insemina una reina con semen crio, ¿cuánto vive un espermio descongelado? ¿Qué características especiales tiene la espermateca de las reinas, que permite que los espermatozoides permanezcan vivos por años? Y finalmente, ¿Cómo aumentar la producción de reinas crio?

11. Otros aspectos de interés.

Este informe final, resume todos los antecedentes en detalle informados a FIA, en cada uno de los 6 informes de seguimientos técnicos. Cualquier información de interés pueden ser obtenidos en estos informes de seguimiento técnico.

12. Anexos

ANEXO 1: Morfología del espermatozoide.

En la literatura podemos encontrar algunas descripciones respecto de la ultraestructura del espermatozoide de *Apis mellifera* el cual se caracteriza por una longitud de 250- 270µm y un diámetro de 0,7 µm.

El complejo acrosomal, formado por el núcleo y acrosoma, es difícil de distinguir a simple vista.

El núcleo es homogéneo pero el acrosoma como vesícula probablemente no existe y solo encontremos un filamento acrosomal (Molyneux, Barrie;1987). Inmediatamente después de la zona anterior del núcleo encontramos anclados dos derivados mitocondriales, que están rodeados de fibrillas (Araujo et al, 2012).

Los derivados mitocondriales presentan un área central densa y en el derivado más grande se puede observar una estructura cristalina.

En conjunto con los derivados mitocondriales podemos encontrar también el axonema, formando un cuerpo triangular que se mantiene unido a través cuerpos accesorios entre el los derivados mitocondriales y el axonema, que dará origen al flagelo del espermatozoide.

El axonema presenta nueve accesorios de microtúbulos, nueve dobletes y un par central, los que también hemos visto mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

A continuación se presenta algunas de las imágenes que se lograron en el proyecto con espermatozoides de zánganos chilenos.

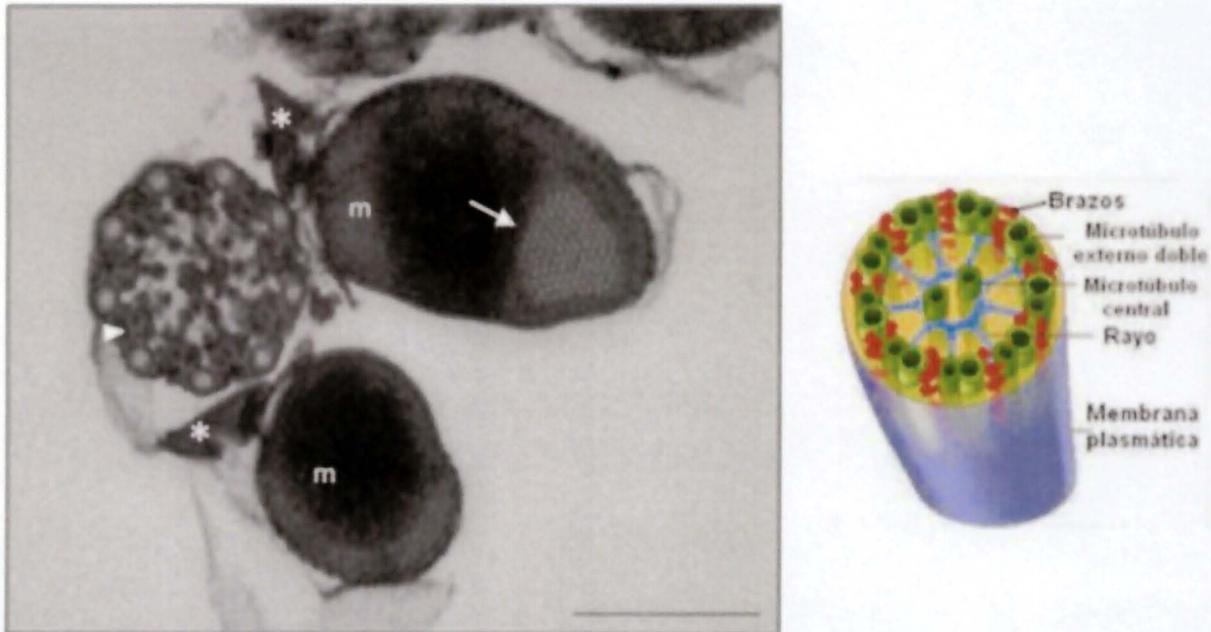


IMAGEN 15: Microscopia Electrónica de Transmisión (MET). Corte transversal de flagelo de espermatozoide de *A. mellifera*. Se observa axonema (cabeza de flecha) con estructura típica 9+9+2 (ver esquema a la izq). También se pueden observar derivados mitocondriales (m) con inclusiones cristalinas (flecha) y sobre estos se pueden distinguir cuerpos accesorios (asteriscos). Magnitud 87000X, barra escala 0,2 μ m.

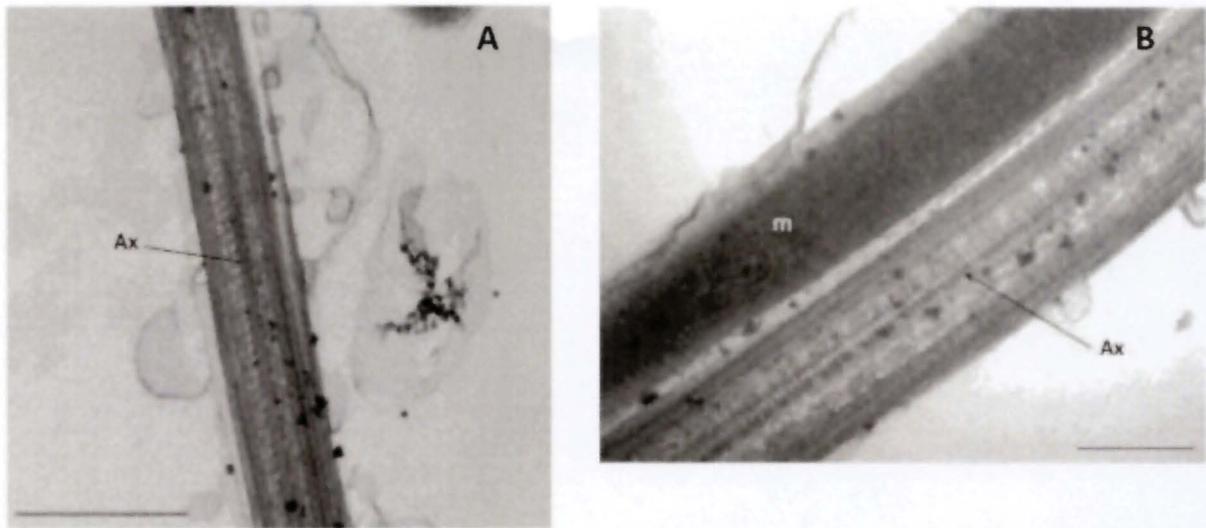


IMAGEN 16: MET. Corte longitudinal de flagelo de espermatozoide de *A. mellifera*. En A) se observa axonema (Ax), en la zona central y vainas fibrosas a los costados (Magnitud 43000X, barra escala 0,5 μ m), en B) se puede observar derivados mitocondriales (m) a lo largo del flagelo y Axonema central (Magnitud 87000X, barra escala 0,2 μ m)

Respecto al estudio de la morfología mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) hemos logrado observar que los espermatozoides frescos se presentan como ovillos muy entramados, que incluso se sobre enrollan en sí mismos, de la misma forma al diluir mas la muestra se puede observar su gran longitud. Estas características las podemos observar en las siguientes microfotografías:



IMAGEN 17: Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Espermatozoides de *A. mellifera*. Magnitud 3000X, barra escala 30 μ m.

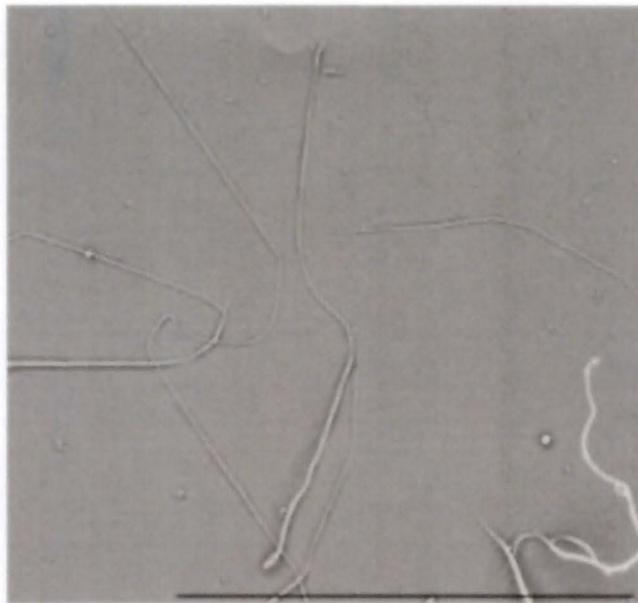


IMAGEN 18: Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Espermatozoide de *A. mellifera*. Magnitud 1000X, barra escala 100 μ m.