

Comparación entre la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente

S.M.A. Pires*, A. Josa**, A.R. Costa*

*Escola Superior Agrária de Bragança (Departamento de Zootecnia), Apartado 1172, 5301-855 Bragança-Portugal E-mail: spires@ipb.pt

**Facultad de Veterinaria de Zaragoza (Departamento de Patología Animal), Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza-España

Resumen

La inseminación instrumental es una técnica fundamental en el momento de plantear la selección y mejora de las abejas melíferas, no solo por la necesidad de preservar nuestros ecotipos locales, sino también por la necesidad de mejorarlos, procurando colonias con características que aumenten la producción y ofrezcan resistencia a las enfermedades (abejas resistentes a varroasis, ascosferosis, etc.).

Este estudio fue realizado con el objetivo de comparar la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente. Siguiendo la técnica de inseminación de Schley o el acoplamiento natural, comparamos los tratamientos con enfoque en el porcentaje de pérdidas, la eficacia del tipo de tratamiento, la aceptación de las reinas en las colmenas y la producción de reinas vivas y fértiles después de su introducción en las colmenas. El estudio estadístico de la información fue realizado usando el test del χ^2 .

En el laboratorio de Fisiología e Reproducción de la Escuela Superior Agrária de Bragança, realizamos la inseminación de 30 reinas y en la colmena de fecundación se dejaron acoplar naturalmente 26 reinas. Todas las reinas fueron seleccionadas según su comportamiento higiénico y productivo.

Con la inseminación instrumental, obtuvimos 80% de reinas fertilizadas y con el acoplamiento natural obtuvimos 85%. Fueron detectadas diferencias significativas ($P < 0,01$) en la aceptación de las reinas después de su introducción en las colonias de acuerdo con el tipo de fecundación. En la inseminación instrumental la aceptación en las colmenas fue de 58,4%, y en la fecundación natural fue de 72,7%. Del mismo modo, el número total de reinas vivas y fértiles varió significativamente ($P < 0,01$) según el tipo de fecundación a que fueron sometidas las reinas. Con la inseminación instrumental, obtuvimos una producción de 47,6% de reinas vivas y fértiles mientras que con la fecundación natural se observó mejores resultados (61,5%).

Palabras clave: *Apis mellifera*, Reinas, Acoplamiento natural, Inseminación instrumental

Summary

Comparison of the activity of the colonies of *Apis mellifera* L. submitted to instrumental insemination with that of the colonies naturally fertilized

Instrumental insemination is a fundamental technique in the moment when we select and improve the honeybee, not only in order to preserve our local ecotypes, but also due to the necessity to improve them, looking for hives with characteristics that increase the production and offer resistance to diseases (bees resistant to Varroa, Ascospaeriosis, etc.).

This study was carried out with the aim of comparing the activity of the colonies of *Apis mellifera* L. submitted to instrumental insemination with the activity of the colonies naturally mated. Following Schley's insemination technique or natural mating, we compared treatments with regards to the percentage of losses, the effectiveness of the kind of treatment, the acceptance of the queens in the hives and the production of fertile queens that survived their introduction in the hives. The statistical analysis of the information was done using the χ^2 Test.

In the laboratory of Physiology and Reproduction of Superior Agrarian School of Bragança, we carried out the insemination of 30 queens and in the mating hive 26 queens were allowed to mate naturally. All the queens were selected according to their hygienic behaviour and their productiveness.

With the instrumental insemination we obtained 80% of fertilized queens and, with the natural mating we obtained 85%. There were different frequencies ($P < 0,01$) in the acceptance of the queens after their introduction in the colonies according to the kind of fertilization. Through the instrumental insemination the acceptance in the hives was 58.4%, and with natural fecundation was 72.7%. Likewise, the total number of fertile and living queens varied significantly ($P < 0,01$) according to the kind of technique that was used. With the instrumental insemination, we obtained a production of 47.6% of fertile and living queens while the natural mated queens showed better results (61.5%).

Key words: *Apis mellifera*, queens, natural mating, instrumental insemination

Introducción

Según Harbo (1986) los principios básicos de la inseminación instrumental en apicultura fueron desarrollados entre los años 1926 a 1947, iniciándose la técnica moderna en los EE.UU. con el trabajo de Watson en el año de 1927 (Woyke, 1976; Laidlaw, 1989a,b; Schley y Guth, 1990; Crane, 1992; Morse, 1994). Este método se basaba en la utilización de una microaguja fijada a un micro-manipulador, la reina se fijaba con un hilo de seda a un pedazo de madera y la cámara del agujón era abierta con una pinza mantenida con la mano (Woyke, 1976 y Laidlaw, 1989b). Además, Watson (1927) introdujo otras características que se mantienen en la actualidad en la práctica de la inseminación, como son, la utilización del microscopio y luz artificial, la decapitación de los zánganos para provocar la eyaculación, la utilización del esperma de varios zánganos en la inseminación e incluso desechó la denominación de "inseminación artificial" por la de "inseminación instrumental", como añade Laidlaw (1989a).

Otras particularidades fueron perfeccionadas a lo largo del tiempo y aportaron mejoras a esta técnica, como por ejemplo, la observación hecha por Mackensen (1947) donde se provoca que una reina ponga huevos tratándola dos veces con CO_2 (Woyke, 1976; Mackensen y Ruttner, 1976; Harbo, 1986; Laidlaw, 1989a,b). Las dos narcosis se pueden realizar en el tiempo de 10 minutos y se practican a intervalos de un día, pudiendo estar o no seguidas por la inseminación; pero también se puede administrar un tercer tratamiento, para estar seguros del éxito, como añadieron Mackensen y Ruttner (1976).

Una particularidad relativa a los machos es el hecho de que el esperma de los zánganos puede conservarse "in vitro" a temperaturas mayores a 0 °C, durante algún tiempo (Taber y Blum, 1960 y Taber, 1961, citados por Woyke, 1976), más precisamente, en la jeringa almacenado a una temperatura de 20 a 25 °C durante dos días (Harbo, 1986). Además, cuando se mezcla con estreptomina y se introduce en capilares de vidrio, cerrados y conservados a una temperatura

de 13-15 °C, todavía se puede lograr fecundar con él después de 35 semanas (Poole y Taber, 1970, citados por Woyke, 1976).

En lo que respecta a la técnica de introducción de reinas, la introducción de la reina en un núcleo de 3-5 cuadros, con suficientes abejas jóvenes y cría operculada, es uno de los métodos recomendados y biológicamente más adecuado para su manutención (Drescher, 1976).

Este estudio fue realizado con el objetivo de comparar la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente, en lo que concierne a su aceptación según el tipo de apareamiento.

Material y métodos

Este estudio fue realizado en la ciudad de Bragança, perteneciente a la provincial de Trás-Os-Montes y ubicada en el Nordeste de Portugal, cuyas coordenadas son latitud 41° 49' N, longitud 6° 40' W y se encuentra, aproximadamente, a 720 m de altitud.

El ensayo se llevó a cabo entre Julio de 1995 y mayo de 1997, en uno de los colmenares experimentales que el Instituto Politécnico de Bragança posee en el área de influencia del Parque Natural de Montesinho y en el laboratorio de Fisiología e Reproducción de la Escuela Superior Agrária de Bragança. Esta es una zona de gran atracción melífera, por la variedad de flora que presenta el matorral. Las cuarenta colonias testadas estaban alojadas en colmenas del modelo Lusitana, de diseño nacional. Caracteres destacados de éstas son el hecho de que solamente llevan medias alzas, con una población agrupada entre dos a cuatro alzas y un cuerpo de cámara de cría. El origen del apiário es simple, una vez que fue

formado por enjambres autóctonos ya existentes en el colmenar. A su vez, el manejo es estable, pues, no hacen trashumancia.

Material utilizado en la inseminación instrumental

Para el desarrollo de la metodología de la inseminación instrumental se utilizó un aparato de inseminación tipo estándar, según Schley, y además se emplearon los siguientes accesorios:

- una lupa binocular con una ampliación de 7 a 20 aumentos, la cual tiene un brazo flexible y giratorio;
- tubos capilares, para la conservación del esperma;
- marcadores de colores diferentes, para identificar la edad de los zánganos;
- caja de vuelo Andersen, para el transporte de los machos y recolección del esperma;
- jaulas pequeñas, para el transporte de las reinas con 5-10 acompañantes;
- botella de CO₂.

Material empleado en la introducción de reinas (enjaulado)

Para la realización de la técnica de introducción se emplearon unas jaulas de plástico, blancas, pequeñas y rectangulares similares a las jaulas de introducción de Miller, aunque diferían de estas en que solo tienen un orificio de entrada.

Preparación de las reinas para la inseminación

Las reinas destinadas para la inseminación fueron mantenidas en libertad en los "baby-núcleos" o núcleos de fecundación, desde la eclosión hasta el quinto o sexto día

de vida. Para evitar el vuelo no controlado de estas reinas se instaló, delante de la piquera, un excluidor, cuyos separadores eran de plástico.

En el día de la inseminación, las reinas fueron transportadas por la mañana desde el colmenar de fecundación hasta el laboratorio, en una jaula pequeña con 5 a 10 acompañantes y el respectivo alimentador con "candi" en pasta. La distancia aproximada fue de 20 Km.

Preparación de la cría y mantenimiento de los zánganos para la inseminación

Para la producción de los zánganos se partió de colonias seleccionadas del mismo colmenar, conocidas por su excelente capacidad limpiadora y su rendimiento como criadoras. Algunos días antes de la eclosión, los panales con cría de zánganos eran marcados con alfileres, con el objeto de controlar su eclosión. Para conocer la edad mínima de los zánganos presentes durante 2 a 3 días, a lo largo de la eclosión, los individuos recién nacidos fueron marcados con tinta de colores diferentes. Esto se realizó a primeros de junio de 1996.

Al cabo de algunos días (10 a 12 días), los zánganos eran llevados de las colmenas al laboratorio de Fisiología y Reproducción de la Escuela Superior Agrária (Instituto Politéc-

nico de Bragança), en una caja de vuelo tipo Andersen, descrita por Dustmann *et al.* (1991). La caja fue construida manualmente, de madera con una parte de red de alambre, un alimentador y una jaula para separar los zánganos de las eventuales obreras agregadas para su cuidado (en número por lo menos igual al de los machos). Los zánganos fueron capturados en la piquera cuando regresaban del campo.

Preparación de la inseminación instrumental

Se siguió la técnica de inseminación de Schley, descrita por Schley y Guth (1990) y Dustmann *et al.* (1991). Fueron utilizados en media 10 a 12 zánganos, por cada reina inseminada, los cuales tenían una edad aproximada de 10 a 12 días.

La recolección del esperma se realizó a mediados de junio, mediante recogida artificial, prensando el abdomen de cada zángano, y éste fue conservado en tubos capilares a temperatura ambiente de 21 °C (una a dos semanas), como describieron Harbo y Williams (1987), Harbo (1989) y Guth (1990). Se utilizó como diluyente la solución salina fisiológica de Hyes, de sencilla elaboración y eficacia comprobada, de acuerdo con varios autores, Ruttner y Tryasko (1976), Moritz (1989), Kuhnert (1990) y Dustmann *et al.* (1991) (tabla 1).

Tabla 1. Composición de la solución fisiológica de Hyes (Ruttner y Tryasko, 1976)
Table 1. Physiological saline solution according to Hyes (Ruttner and Tryasko, 1976)

| Componentes | Cantidad (Gramos) |
|---|-------------------|
| Cloruro de sodio (NaCl) | 9,0 |
| Cloruro de calcio (KCl) | 0,2 |
| Cloruro de potasio (CaCl) | 0,2 |
| Hidrocarbonato de sodio (NaHCO ₃) | 0,2 |
| Diluyendo en 1000 ml de agua destilada | |

Las inseminaciones se efectuaron a finales del mismo mes, para las cuales se respetaron los siguientes pasos: toma del espermatozoide en la jeringa, instalación y narcosis de la reina e inseminación.

Mantenimiento de las reinas después de la inseminación

Las reinas inseminadas fueron introducidas en las jaulas para posterior transporte hasta el colmenar de fecundación, donde se dejaron libres en los respectivos "baby-núcleos". El excludor se sacó de la piquera solo después de haber comprobado el inicio de la puesta.

Técnica de introducción de las reinas

Se siguió la técnica de las jaulas de introducción, según Miller descrito por Laidlaw (1979) y Ruttner (1987).

El día anterior a la realización del repoblamiento se dejaron huérfanas 33 colmenas del apiario. A su vez, las jóvenes reinas, ya marcadas, se transportaban del colmenar de fecundación en las jaulas de introducción tipo Miller. Estas reinas, inseminadas instrumentalmente o fecundadas naturalmente, se introdujeron sobre un panal, en la zona de la cría a punto de nacer. El principio básico de esta técnica de introducción tiene como objetivo estimular las abejas de la colonia a consumir la solución azucarada del comparti-

miento del "candy", permitiendo de esta forma, su entrada y familiarización con la reina. Al cabo de dos a tres días, la entrada se queda libre y las obreras pueden entrar en el compartimiento donde está la reina y ésta, ya aceptada, puede salir. Pasados 8 a 10 días se puede verificar la aceptación verificando si hay puesta en los cuadros de la colmena o observando la reina marcada.

Estudio estadístico

Hemos aplicado el test del χ^2 (Snedecor y Cochran, 1980) para evaluar la frecuencia de los datos del grado de aceptación de las reinas seleccionadas (inseminadas instrumentalmente y fecundadas naturalmente).

Resultados

Tras la realización de la inseminación instrumental y mediante el acoplamiento natural, hemos expresado en la tabla 2 la comparación entre tratamientos, relativos al porcentaje de pérdidas, eficacia del tipo de tratamiento, aceptación de las reinas en las colonias y producción de reinas fértiles y vivas después de su introducción en las colonias. Mediante los dos tratamientos pudimos estudiar con mayor detalle la eficacia durante el período de apareamiento.

Tabla 2. Comparación entre los dos tipos de fecundación a que fueron sometidas las reinas seleccionadas

Table 2. Comparison of the two types of fecundation to which the selected queens were submitted

| Técnica | N.º de reinas | %total de pérdidas | % de la eficacia | % de aceptación en las colonias | % total de reinas vivas y fértiles en producción |
|---------------------------|---------------|--------------------|------------------|---------------------------------|--|
| Inseminación instrumental | 30 | 20,0 | 80,0 | 58,4 | 46,7 |
| Fecundación natural | 26 | 15,0 | 85,0 | 72,7 | 61,5 |

En la inseminación instrumental obtuvimos pérdidas del orden del 20% que fueron debidas, en parte (7%) a la muerte de las reinas en el transporte desde el colmenar de fecundación hasta el laboratorio donde hacíamos la inseminación y posteriormente, del laboratorio hasta el colmenar de fecundación. Las otras pérdidas, del orden del 13%, fueron observadas en los "núcleos baby", ya después de la inseminación. A su vez, en la fecundación natural las pérdidas fueron inferiores (15%) y presumiblemente ocurrieron en los vuelos de apareamiento.

En lo que concierne al éxito de cada técnica puede observarse que obtuvimos una eficacia del orden de los 80% con la insemina-

ción instrumental, una vez que esta es la tasa de reinas fértiles después de la aplicación de la técnica de inseminación.

También se puede observar una tasa del 85% resultante de los acoplamientos naturales, sin embargo, esta diferencia no es muy elevada si hacemos la comparación entre los dos tipos de fecundación.

Por otra parte, para contrastar los resultados entre la aceptación de las reinas inseminadas y fecundadas naturalmente, así como el porcentaje de dichas reinas vivas y fértiles después de su introducción en las colonias, realizamos una prueba de contingencia usando el estadístico χ^2 , para probar la hipótesis de independencia nula entre ambas variables (tabla 3).

Tabla 3. Valores de χ^2 y respectivo grado de significación aplicados a las frecuencias obtenidas de la aceptación de las reinas después de su introducción en las colonias, y del número de reinas vivas y fértiles entre los dos tipos de fecundación

Table 3. Values of χ^2 and respective degree of significance applied to the frequencies obtained regarding the acceptance of the queens after their introduction in the colonies and the number of fertile and living queens in the two kinds of fecundation

| I.I./N.F. | χ^2 | Valores de P |
|-------------------|----------|--------------|
| % aceptación | 4,978 | 0,01 |
| % total de reinas | 4,537 | 0,01 |

Obtuvimos un χ^2 bajo pero significativo ($P < 0,01$), por lo que rechazamos la hipótesis nula y afirmamos que existe asociación y, por tanto, hay diferentes frecuencias en la aceptación de las reinas en las colonias según el tipo de apareamiento. Con la inseminación instrumental obtuvimos un porcentaje de aceptación en las colonias de 58,4%, mientras que con la fecundación natural fue de 72,7%. Este hecho

demuestra la dificultad que hay, muchas veces, en la aceptación de reinas inseminadas instrumentalmente. Vemos también que, efectivamente hay diferencias significativas ($P < 0,01$) entre el número total de reinas vivas y fértiles (total de reinas), respecto al tipo de técnica seguida, lo que está relacionado con el bajo o elevado grado de aceptación de dichas reinas en las colonias.

Discusión

Las inseminaciones se efectuaron casi a finales de junio y además de las temperaturas elevadas existentes, fue necesario recorrer una distancia aproximada de 20 Km. Por lo cual, pensamos que estas razones pueden explicar posibles daños que hayan ocurrido y provocado la muerte de las reinas.

Las pérdidas observadas en los "núcleos baby" (13%), ya después de la inseminación, demuestran posiblemente el papel importante que juega la experiencia del inseminador. Aunque ya habíamos comprobado la técnica de inseminación instrumental, todavía no la hacíamos con mucha frecuencia.

Del valor obtenido con la inseminación instrumental deducimos que nuestra tasa es normal, una vez que, según Ruttner (1987), una eficacia del 80% de reinas fértiles puede ser considerada como satisfactoria. Estos resultados están en concordancia con otros trabajos preliminares, como el de Ruttner (1961), quien constató en 10 reinas acopladas naturalmente una capacidad de puesta de un 106% y en sus hermanas (10) inseminadas instrumentalmente un 92%, en comparación con el promedio general. Ya posteriormente, Woyke y Ruttner (1976) añadieron que parece que las reinas acopladas naturalmente viven, por término medio más, pero que estas diferencias son insignificantes en el primer año.

El gran número de reinas introducidas y no aceptadas puede ser explicado por el hecho de que estábamos en una época en que la flora melífera ya había pasado su clímax y así, el flujo de néctar era más bajo y las abejas estaban más agresivas, consecuentemente disminuyendo el grado de aceptación de las reinas. Otros factores externos pueden ser señalados tales como el pillaje, la estación del año y las condiciones climáticas en el período de la introducción (Ruttner,

1983). Este autor afirmó que el éxito de la introducción depende no solo de esto, sino también de una multiplicidad de factores, tales como, las condiciones de la reina residente (edad, puesta y actividad), las condiciones de la reina a introducir (tipo de apareamiento, daños en el transporte, actividad de puesta, producción de feromonas), el tamaño y peso de las reinas y las condiciones de la propia colonia que vaya a recibir la joven reina (raza, agresividad, desarrollo estacional y la proporción entre las abejas jóvenes y las más viejas).

Por tanto, cabe suponer que aunque sean muchos los métodos recomendados para la introducción de las reinas en las colonias parece que no hay referencias disponibles de alguno infalible ya que la aceptación de una reina o su no aceptación por parte de la colonia sigue siendo aún difícil de entender.

Así, nuestros resultados están de acuerdo con la bibliografía revisada sobre las mismas técnicas aplicadas por los varios autores, entre ellos, Drescher (1976), Ruttner (1983), (1987), Jean-Prost (1989) y Woyke (1989).

Conclusiones

Teniendo en cuenta las condiciones en que se desarrolló al presente trabajo, las metodologías utilizadas y los resultados obtenidos, pensamos que es posible sacar el siguiente conjunto de conclusiones:

- Mediante la inseminación instrumental las abejas locales presentaron una fertilidad del orden del 80%. Sin embargo debe mejorarse la metodología ya que el porcentaje total de reinas vivas y fértiles obtenidas es sensiblemente inferior a la fecundación natural (46,7% vs 61,5%).
- El porcentaje de aceptación de las reinas en las colonias varía significativamente con

el tipo de fecundación a que fueron sometidas. Con la inseminación instrumental la aceptación de las reinas en las colonias fue de 58,4%, y con las acopladas naturalmente de 72,7%.

Bibliografía

- Crane E, 1992. Bees and beekeeping: science, practice and word resources, 612 pp. Heinemann Newnes, Oxford (Reino Unido).
- Drescher W, 1976. Cría y mantenimiento de las reinas y de los zánganos, pp. 25-38. En: Inseminación Artificial de las Reinas de Abejas (2ª edición). Friedrich Ruttner (Ed.), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Dustmann JH, Kuhnert M, Schley P, Tiesler K, 1991. Instrumental insemination of queen bees, pp. 23. Ed. Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen (Alemania).
- Guth J, 1990. La conservación de sperme, pp. 108-109. En: Elevage, Sélection et Insémination Instrumentale des Reines D'Abeilles. J. Guth (Ed.), Ed. Syndicat National D'Apiculture, Paris (Francia).
- Harbo JR, 1986. Propagation and instrumental insemination, pp. 361-389. En: Bee Genetics and Breeding. Thomas E. Rinderer (Ed.), Ed. Academic Press Inc., Orlando (EEUU).
- Harbo JR, 1989. Sperm Storage, pp. 59-64. En: The instrumental insemination of the queen bee. R.F.A. Moritz (Ed.), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Harbo JR, Williams JL, 1987. Effect of above freezing temperature on temporary storage of honey-bee spermatozoa. J. Apic. Res. 26, 53-55.
- Jean-Prost P, 1989. Apicultura. Conocimiento de la abeja-Manejo de la colmena. Mundi Prensa (Ed.), 726 pp., Madrid (España).
- Kuhnert ME, 1990. La technique d'homogénéisation du sperme d'abeille, pp. 102-111. En: Elevage, Sélection et Insémination Instrumentale

des Reines D'Abeilles. J. Guth (Ed.), Ed. Syndicat National D'Apiculture, Paris (Francia).

Laidlaw HHJR, 1979. Contemporary queen rearing. Dadant y Sons Inc. (Ed.), 199 pp., Hamilton (EEUU).

Laidlaw HHJR, 1989a. Instrumental insemination of honey-bee queens. Pictorial instructional manual. Dadant y Sons Inc. (Ed.), 144 pp., Hamilton (EEUU).

Laidlaw HHJR, 1989b. Origin and development of instrumental insemination of queen bees, pp 9-18. En: The Instrumental Insemination of the Queen Bee. R.F.A. Moritz (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).

Mackensen O, 1947. Effect of carbon dioxide on initial oviposition of artificially inseminated and virgin queen bees. J. Econ. Entomol., 40, 344-349.

Mackensen O, Ruttner F, 1976. Técnica de inseminación, pp. 69-86. En: Inseminación artificial de las reinas de abejas. Friedrich Ruttner (Ed.), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).

Moritz RFA, 1989. The insemination procedure, pp. 65-84. En: The instrumental insemination of the queen bee. R.F.A. Moritz (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).

Morse RA, 1994. Rearing queen honey bees, 128pp. Wicwas Press (Ed.), Cheshire (EEUU).

Poole HK, Taber S, 1970. In vitro preservation of honeybee semen enhanced by storage at 13-15°C. Ann. Ent. Soc. Amer. 63, 1673-1674.

Ruttner F, 1961. Insemination mit sperma von einem einzgen drohn. Bee Genetics, 2, 15.

Ruttner F, 1987. Cría de reinas, pp. 119-125. En: Lo mejor de vida apícola (1982-1986) F. Ruttner (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).

Ruttner F, Tryasko VV, 1976. Anatomy and physiology of reproduction, pp. 11-24. En: The instrumental insemination of the queen bee. R.F.A. Moritz (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).

Ruttner H, 1983. Transport and introduction, pp. 279-294. En: Queen rearing - Biological basis

- and technical instruction. F. Ruttner (Ed), Ed. Apimondia, Bucharest (Rumania).
- Schley P, Guth J, 1990. Insémination instrumentale, pp. 61-102. En: *Elevage, selection et insemination instrumentale des reines d'abeilles*. J. Guth (Ed.), Ed. Syndicat National D'Apiculture, Paris (Francia).
- Snedecor GW, Cochran WG, 1980. *Statistical methods*, 185 pp. Iowa State University Press, Ames (EEUU).
- Taber S, 1961. Forceps designed for transferring honey bee eggs. *J. Econ. Entomol.* 54, 247-250
- Taber S, Blum MS, 1960. Preservation of honey bee semen. *Science* 131, 1734-1735.
- Woyke J, 1976. Historia de la inseminación instrumental de la abeja melífera, pp. 7-11. En: *Inseminación artificial de las reinas de abejas*. Friedrich Ruttner (Ed.), Ed. Apimondia, Madrid (España)
- Woyke J, 1989. Correct queen maintenance before and after instrumental insemination, tested in Egypt. *J. Apic. Res.* 28(4), 187-190.
- Woyke J, Ruttner F, 1976. Resultados, pp. 87-92. En: *Inseminación artificial de las reinas de abejas*. Friedrich Ruttner (Ed.), Ed. Apimondia, Madrid (España).
- (Aceptado para publicación el 23 de mayo de 2005)