

Aparato de inseminación artificial (detalle).

Características espermáticas del zángano (*Apis Mellifica* L.)

García - Cuenca Ariati, I.; Pérez Fuentes, J.; Cuéllar Cariñanos, C.; Fontanillas Pérez, J.C.
Cátedra de Biología, Facultad de Veterinaria de Madrid

INTRODUCCION

Las abejas son insectos sociales que han despertado el interés del hombre desde tiempos remotos. De ellas se ha obtenido una fuente inagotable de productos, bien conocida desde la antigüedad. En un principio se buscaba la miel y la cera, y ya más adelante, también el polen, la jalea real y los propóleos.

La cría de abejas, al igual que el resto de las especies zootécnicas se enfrenta a un problema de selección de razas, problema genético siempre actual pero más difícil de solucionar en este caso por procedimientos naturales.

A diferencia con otras especies animales en las que es posible conocer la rama genealógica de ambos progenitores, en el caso de las abejas sólo es posible controlar, y no de forma sencilla, la procedencia de la reina. Las características genéticas de los machos por el contrario, son imposibles de controlar dada la forma de fecundación y máxime cuando son varios zánganos los que intervienen en una cópula.

La selección de la raza, en los colmenares en los que se lleva a cabo, se

realiza trasladando las colmenas con reinas vírgenes a zonas distintas, lo más lejos posible de su ubicación habitual, con el fin de evitar los problemas derivados de la consanguinidad.

Gracias a las nuevas técnicas de inseminación artificial, se consigue evitar estos problemas, pudiendo elegir tanto las reinas como los zánganos.

La utilización de estas técnicas de Inseminación Artificial hace que adquiera una gran importancia el estudio previo de las características espermáticas de *Apis mellifica*, a fin de permitirnos al igual que sucede en otras especies animales, el control de una serie de parámetros que están directamente relacionados con la calidad de semen y con las características de mejora de la descendencia.

En este trabajo se estudian experimentalmente las características espermáticas de *Apis mellifica*, determinando su morfología y concentración.

Este estudio se ha llevado a cabo en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M. por medio de cortes histológicos de aparatos genitales de zánganos y del semen recogido de ellos.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Organo copulador

El pene del macho de la abeja melífera está muy atrofiado. Tiene solamente dos pares de placas quitinosas finas, pegadas a la pared del cuerpo, que forman en la parte ventral el extremo del abdomen, no teniendo ninguna relación con la vehiculación del esperma.

Dicha vehiculación es realizada enteramente por el endophallus que se halla en el interior del abdomen. El endophallus es un saco blando, membranoso, con varios apéndices y zonas velludas. Está invaginado en el abdomen como un dedo de guante, siendo casi igual su longitud a la del abdomen del zángano. Su extremo está ampliado y tiene una placa quitinosa en forma de coma (bulbo). Un largo conducto eyaculador liga el endophallus con los testículos y las glándulas mucosas. Debido a su longitud, los órganos de acoplamiento de los zánganos tienen la forma de una "S". La parte inferior de la "S" está formada por el endophallus, la media por el conducto eyaculador y la superior por los testículos y las glándulas mucosas.

La forma del endophallus se puede ver mejor cuando está completamente

en eversión (Fig. 1), situación que se puede obtener presionando ligeramente el tórax de un zángano maduro. Su porción más ancha es la base (vestíbulo) de donde salen los dos cuernos.

El siguiente segmento del endophallus es el cervix o cuello, que es delgado y doblado ligeramente hacia arriba, siguiéndole el bulbo. Las placas quitinosas, dobladas también hacia el exte-

rior, se hallan en su parte superior con los picos orientados anteriormente.

El endophallus en eversión es transparente y está lleno de aire y hemolinfa. En su interior se puede ver el conducto eyaculador, delgado y uniforme, que durante el proceso de eversión sale de la cavidad abdominal con el endophallus, y se abre al exterior en su extremo. Esta es, pues, la abertura exterior de los órganos de acoplamiento

del zángano, por los que salen el esperma y el mucus.

Testículos y glándulas mucosas

Los testículos tienen forma oval y de color crema, situados muy anteriormente en el abdomen, a uno y a otro lado del intestino. Son unos cuerpos muy blandos, esponjosos, de 5-6 mm de longitud (en el zángano recién nacido), que se componen cerca de 200 testiolos (tubos espermáticos). Los espermatoцитos se desarrollan en la linfa a partir de las espermatoгонias. El segmento de paso desde el testículo, se denomina vaso deferente. En su porción media, el vaso deferente se amplía, formando la vesícula seminal.

Más caudalmente el vaso deferente, elástico y de un color blanco brillante, sigue un trayecto en forma de "S" y se abre después en el segmento inferior de la glándula mucosa. Las glándulas mucosas, izquierda y derecha, están unidas formando en la parte posterior un cuerpo en forma de "U", que es la parte mayor y más evidente de todo el aparato genital del zángano.

La pared del conducto deferente y de la glándula mucosa está formada por una musculatura muy fuerte, compuesta por dos o tres capas. Hacia la luz, la pared está cubierta de una capa de células epiteliales altas, con función secretora. En la vesícula seminal estas células producen un líquido nutritivo y de suspensión para los espermatozoides, y en la glándula mucosa, el mucus.

El tubo común de la glándula mucosa y de la vesícula seminal, se abre en el extremo bifurcado del conducto eyaculador, por lo que el esperma y el mucus llegan al bulbo del endophallus. El extremo del conducto eyaculador está obturado por una membrana quitinosa, fina, que se rompe en el momento de la eyaculación (Ruttner) (Fig. 2).

Proceso de maduración sexual

Los zánganos recién nacidos todavía no son maduros desde el punto de vista sexual, aunque parte de los espermatoцитos se han transformado ya en espermatozoides perfectos. En este momento comienza su migración desde los testículos hacia la vesícula seminal (Bishop 1920). Según Kurennoi

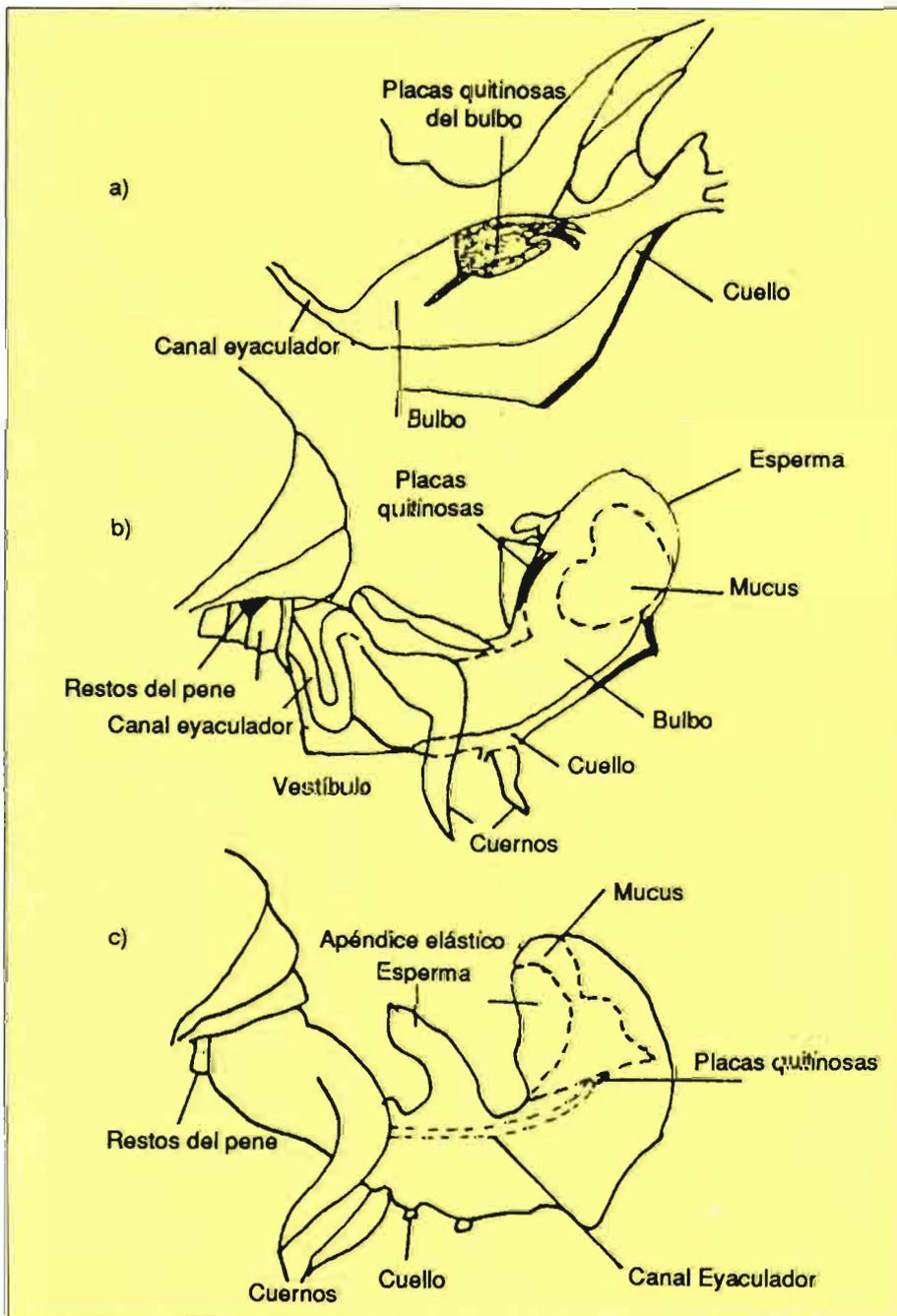


Fig. 1. Órgano copulador del zángano en eversión
 a) Eversión hasta el cuello
 b) Con un tercio de eversión y con eyaculación
 c) Eversión completa



Recogida de semen.

(1953) y Mindt (1962) la migración de los espermatozoides comienza a los dos o tres días después del nacimiento. La formación del mucus tiene lugar también después de la eclosión. Así se explica el que pueda, algunas veces, provocarse la eversión del endophallus en los zánganos jóvenes, pero sin que eyaculen.

Al octavo día de vida de los zánganos, la vesícula seminal está llena de espermatozoides y el volumen de los testículos vacíos, se reduce a un cuarto de su tamaño inicial. En la vesícula seminal, los espermatozoides sufren un segundo proceso de maduración, se fijan con sus extremos a las células glandulares de la pared donde permanecen algunos días (Bishop, 1920). Mientras tanto, las células glandulares evacúan su contenido entre los espermatozoides del interior de la vesícula seminal. De esta forma la vesícula seminal pasa a ser, en lugar de un saco vacío con una pared glandular gruesa, un saco lleno de semen con la pared delgada. A medida que maduran, la movilidad individual de los espermatozoides se incrementa.

Un proceso similar tiene lugar al mismo tiempo en las glándulas mucosas. Aquí la secreción de mucus de las células glandulares empieza poco antes de la eclosión, primero en la parte cercana a la zona apical de la glándula y después avanzando hacia su parte basal. Las células glandulares prácticamente se disuelven, de modo que a partir del quinto día de vida, las glándulas mucosas se llenan completamente de mucus líquido. En esta fase alcanzan la dimensión máxima de 5,5 mm.

Estos procesos que tienen lugar en el interior de los órganos de acoplamiento, se reflejan en el distinto resultado de la eversión provocada artificialmente, en los zánganos jóvenes. Hasta el quinto o sexto día, del endo-

phallus en eversión sólo se obtiene mucus. Este mucus es muy fluido y no homogéneo, con grumos blancos de mucus flotando en un líquido acuoso. Entre el octavo y décimo día de vida se puede obtener un esperma de color blanquecino, por lo general mezclado más o menos con el mucus, aún bastante fluido. Este esperma se coagula rápidamente y no sirve para la inseminación. El esperma maduro, de color crema amarillento y sin mezclar con mucus, se puede obtener mediante la eversión artificial sólo de zánganos de 12 días de edad, por lo menos (Rutner).

Composición del semen

El semen está formado por dos componentes, distintos según su procedencia:

- Los espermatozoides procedentes de los testículos.
- El líquido de la vesícula seminal y del bulbo del endophallus.

Los espermatozoides son de 250 μm de longitud (1/4 mm), y cuando están vivos tienen movimientos serpenteanes, mientras que muertos se enrollan por lo general varios juntos.

El esperma se puede diferenciar muy bien del mucus por sus colores amarillento y blanco respectivamente y por sus estructuras, estando dispuesto el esperma en grupos y el mucus de forma homogénea. Cuanto más elevado sea el contenido de espermatozoides, tanto más intenso será el color y mayor la viscosidad. En el eyaculado la proporción líquido/espermatozoides varía en volumen desde 1:1, hasta 1:2 según la temporada (Novak, 1960). El esperma del zángano tiene reacción neutra (pH 6'7-7'0) y los diluyentes reducen la duración de la vida de los espermatozoides (Bishop 1920, Jaycox 1960, Taber 1961), su movilidad se ve incrementada por las secreciones de la vesícula y del bulbo y por la secreción ligeramente alcalina de las glándulas de la espermateca, (Flanders 1939) y temporalmente por cualquier otro diluyente (Lensky y Schindler 1967). El agua y la hemolinfa matan rápidamente al esperma.

Según Mackensen, Tryasko y Woyke 1 μl de esperma contiene 7,5-9, 4 millones de espermatozoides. El volumen del esperma de un zángano es



Recogida de semen.

por término medio de 1,7 μl , pero por lo general en la jeringa de inseminación se introduce solamente uno o como máximo 1,5 μl (Woyke 1960).

Woyke (1960) dedujo que para que la espermateca de la reina estuviera completamente llena el número de espermatozoides debía ser de 5,28 millones, y descubrió que una inseminación artificial con hasta 6 μl de esperma asegura aproximadamente hasta 4,2 millones de espermatozoides, lo que resulta insuficiente. Una inseminación con 8-10 μl de esperma o dos inseminaciones con 4 μl por cada una, dieron los mismos resultados, ya que proporcionaron de 5,37 a 5,42 millones de espermatozoides en la espermateca.

Mackensen señala cantidades inferiores de espermatozoides que llegan a la espermateca. Constató que el promedio para las inseminaciones hechas una sola vez con 8 a 10 μl de esperma es de 3,16 a 3,32 respectivamente. Para 2 inseminaciones con 6 μl de esperma, determinó un número de 4,26 millones de espermatozoides. También, 2 inseminaciones con 2 y 3 μl cada una, fueron un poco más eficaces que las sencillas con 8 y 10 μl .

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este trabajo hemos utilizado el material que a continuación detallamos:

- Un aparato de inseminación artificial de reinas.
- Lupa estereoscópica.
- Microscopio binocular.
- Cámaras de Bürker.
- Pipetas de recuento de hematíes.
- Material diverso de laboratorio.

Para establecer las características morfológicas de los espermatozoides

TABLA I

	GUADALAJARA	MADRID	TOTAL
Datos	60	40	100
Media	1.963.315,79	3.691.666,67	2.518.857,14
Desv. Típica	±837.122,13	±639.202,17	±1.122.990,67
Error Media	±137.622,03	±144.029,29	±151.424,03
Error Desv. Típica	±96.662,53	±108.044,88	±106.589,55
Varianza	700.773 x 10 ⁶	408.579 x 10 ⁶	126.111 x 10 ⁷
Mediana	1.960.000	3.830.000	2.400.000
Límite Máximo	4.460.000	5.000.000	5.000.000
Límite Mínimo	530.000	2.730.000	530.000
Extensión	3.930.000	2.270.000	4.470.000

de *Apis mellifera*, se procedió a la observación microscópica de extensiones del esperma obtenido por eyaculación manual y de cortes histológicos.

El semen recogido para el estudio morfológico, se obtuvo utilizando un aparato de inseminación artificial (**Fotos 1 y 2**). Los zánganos se capturaron en el colmenar y seguidamente se llevaron al laboratorio, donde con una lupa binocular, y con la microjeringa del aparato de inseminación, antes citado, se procedió a la extracción del semen.

El primer paso para la extracción es seleccionar los zánganos maduros sexualmente y provocarles la eversión del pene y la eyaculación. Para ello se sujeta la cabeza y el torax del zángano entre el pulgar y el índice de la mano izquierda, manteniéndole con la parte ventral hacia arriba. Si el grado de madurez es elevado, ellos solos eyaculan mediante una presión suave y reiterada, realizada con el pulgar y el índice de la mano derecha sobre la parte dorsal del abdomen. Esta operación provoca por lo general la contracción de los músculos abdominales y una eversión parcial o, algunas veces, más o menos total del pene y la eyaculación. Si el pene está en eversión sólo parcialmente y el esperma no aparece, se comprime el abdomen progresivamente, desde la parte dorso-anterior hacia la parte ventro-posterior, para provocar la eversión forzada del pene, hasta que el esperma aparece. Sin la contracción abdominal la eversión raras veces se obtiene. La eversión total se consigue por compresión, obteniéndose una gran cantidad de esperma. Algunas veces los zánganos eya-

culan mejor si hacen primero ejercicios de vuelo o si se les permite volar hacia una ventana.

Producida la eyaculación del zángano, se lleva cerca de la punta de la jeringa de inseminación, bajo la lupa, sujetándolo con la mano izquierda. A la jeringa, previamente se le añade una pequeña porción de solución salina (nunca en contacto con el semen sino dejando una burbuja de aire entre el esperma y la solución) con el fin de evitar la desecación del mismo. Si lo único que pretendemos es obtener el semen para estudiarlo y no para realizar una inseminación artificial también podría sustituirse esta solución salina por agua. La superficie del esperma se pone en contacto con la punta de la jeringa bajo un ángulo aproximado de 45.º, aspirando el esperma lentamente y teniendo cuidado para no mezclarlo con el mucus (**Fotos 3 y 4**).

Para la obtención de muestras histológicas, se corta transversalmente un tergito abdominal con unas tijeras finas. Después se cortan los dos lados hasta la extremidad posterior del abdomen, se sacan las vesículas seminales cuidadosamente, y se corta con precaución allí donde se encuentran

las glándulas mucosas. Se colocan encima de un dedo y se pinzan cerca de la extremidad próxima al testículo.

Una vez obtenida la muestra se introduce en un fijador para su inclusión en parafina. Posteriormente se realizan cortes histológicos siguiendo la técnica de Ham, cuyos pasos fundamentales esquematizamos a continuación:

- 1) Fijación de la muestra en formol durante tres días.
- 2) Lavado con alcohol de 90º.
- 3) Deshidratación durante 24 horas por pases sucesivos en alcoholes de diferentes graduaciones ascendentes, finalizando con alcohol absoluto.
- 4) Introducción en xilol y parafina durante varias horas una vez extraída la muestra del alcohol absoluto.
- 5) Finalmente se deja en reposo durante 24 horas, en parafina fundida.

Terminado el proceso y mediante un microtomo de parafina se realizan los cortes convenientes y se procede a la tinción de los mismos con hematoxilina-eosina en solución acuosa. Seguidamente se montan en medio soluble en xilol, se colocan cubreobjetos y se comprimen fuertemente, proce-

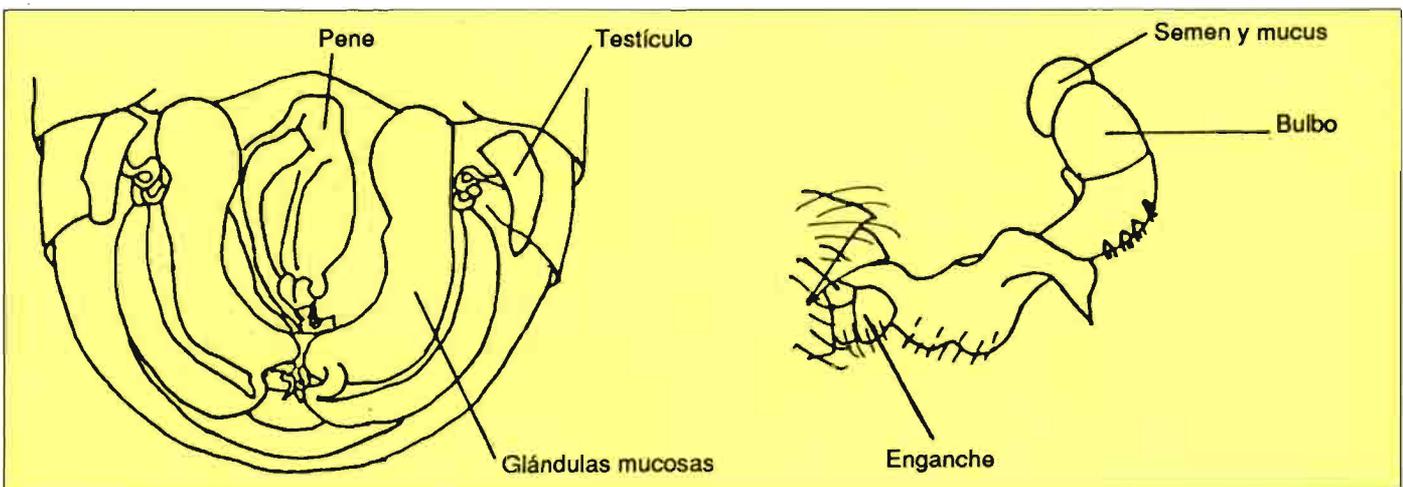
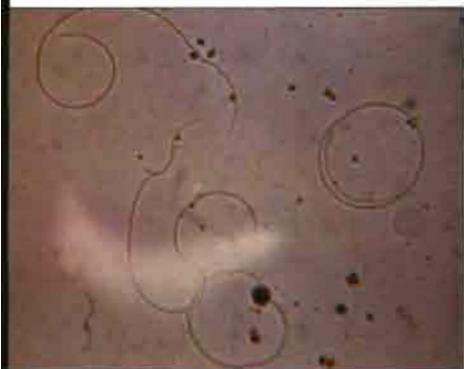


Fig. 2. Aparato reproductor del zángano.



Espermatozoides de *Apis mellifera*, sin teñir.

diéndose a su observación con el microscopio óptico.

Para el estudio de la concentración espermática, los zánganos se recogieron del colmenar de la Facultad de Veterinaria y del de la Excelentísima Diputación Provincial de Guadalajara. Las dosis seminales se obtuvieron a partir de la recogida de un número variable de zánganos, ya que éstos difieren muchísimo entre ellos en cuanto a la facilidad de eyaculación y a la cantidad de esperma que se recoge de ellos. Algunos no tienen esperma, en otros la eversión del pene y la eyaculación no se produce normalmente cuando se les estimula artificialmente; en otros la eversión es tan violenta que el esperma se proyecta y se pierde o también puede estallar el pene.

El semen recogido para el recuento de los espermatozoides se obtuvo por el procedimiento descrito anteriormente para el estudio morfológico.

Una vez obtenida una cantidad suficiente de semen, se coloca sobre un portaobjetos, y mediante una pipeta de recuento de hematíes se prepara con eosina una dilución 1:4.000, necesaria para el correcto conteo.

El recuento, en la dilución indicada 1:4.000, se realizó con una cámara de Bürker en la retícula mayor, dada la extraordinaria longitud de los flagelos. Se obtuvieron por este método 100 valores de recuentos, utilizándose la fórmula: $C = D \times V \times M$.

Como último paso de la experiencia, se efectuó, con los valores obtenidos, el estudio estadístico de los mismos.

RESULTADOS

Morfología

De las observaciones realizadas se puede deducir que los espermatozoi-

des de *Apis mellifera*, están morfológicamente constituidos por una cabeza pequeña y muy alargada, semejante a los espermatozoides de algunos gastrópodos, seguida de un largo flagelo indiferenciado de 250 μ de longitud no pudiendo distinguirse en éste con microscopio óptico, el tracto intermedio y la cola (Fotos 5 y 6).

Características seminales

El semen posee dos fracciones distintas:

— Los espermatozoides, procedentes de los testículos.

— El líquido de la vesícula seminal y del bulbo del endophallus.

Los espermatozoides tienen movimiento ondulatorio, y muertos se enrollan por lo general varios juntos.

La distribución del esperma y del mucus, así como la cantidad de esperma son variables. A medida que tiene lugar la eversión del pene aparece también el esperma, de color crema, seguido del mucus blanco. Esta variación del color nos permite diferenciar estas dos partes. Cuanto más elevado sea el contenido de espermatozoides, más intenso será el color y la viscosidad.

Recuento de espermatozoides

A partir de los datos obtenidos de los recuentos efectuados, se ha realizado el estudio estadístico correspondiente, cuyo resultado se expresa en la **Tabla I**.

CONCLUSIONES

1. El semen de *Apis mellifera* tiene una fracción espermática y otra mucosa.

2. El volumen de semen eyaculado, así como la concentración espermática, varía con el grado de madurez del zángano y con el propio individuo.

3. Los espermatozoides de *Apis mellifera* poseen una cabeza pequeña y alargada, semejante a los espermatozoides de algunos moluscos, seguida de un larguísimo flagelo indiferenciado.

4. La concentración espermática media del eyaculado de *Apis mellifera* es de 2.518.857 esperm./mm³.



Espermatozoide de *Apis mellifera* teñido con eosina.

BIBLIOGRAFIA

- BISHOP, G.H., 1920. *Fertilization in the honeybee I. The male sexual organs: Their histological structure and physiological functioning. II. Disposal of the sexual fluids in the organs of the female*. J. exper. Zool., 31 (2), 225-265, 267-286.
- CAMARGO, J.M.F. and GONCALVES, L.S., 1971. *Manipulation procedures in the technique of instrumental insemination of the queen honey bee*. Apidologie, 2, 239-246.
- GARCÍA CUENCA ARIATI, I. 1990. *Características espermáticas del zángano de apis mellifera (L.)*. Tesina presentada en la Facultad de Veterinaria de Madrid.
- GRASSE, P-P, 1977. *Traité de Zoologie*. Anatomie, systématique, Biologie. Tome VIII. Insectes. Ed. Masson Paris.
- HARBO, J.R. 1974. *A technique for handling stored semen of honey bees*. Ann. Entomol. Soc. Amer. 67, 191-194.
- JEAN PROST, P., 1989. *Apicultura*. Ed. MundiPrensa. Madrid.
- KURENNOI, N.M., 1953. *When are drones sexually mature*. Pchelovodstvo 11, 28-32.
- MACKENSEN, O., 1948. *A new syringe for the artificial insemination of queen bees*. Amer. Bee J. 88 (8), 412.
- MACKENSEN, O., 1955. *Further studies on a lethal series in the honey bees*. Hered. 46 (2), 72-74.
- MINDT, B., 1962. *Untersuchungen über das Leben der Drohnen, insbesondere Ernährung und Geschlechtsreife*. Z. Bienenforsch. 6 (1) 9-33.
- NOVAK, A.I., BLUM, M.S., TABER, S., LIZZO, J.A., 1960. *Separation and determination of seminal plasma and sperm aminoacids of the honey bee (Apis mellifera)*. Ann. Entomol. Soc. Amer. 53, 841-843.
- ROTHSCHILD, L., 1955. *The spermatozoa of the honey bee*. Trans. Roy. Ent. Soc. London. 107: 289.
- RUTTNER, F., 1961. *Leistungsvergleich künstlich besamter und natürlich begatteter Königinnen*. Bee Genetics 2, 16.
- RUTTNER, F., 1968. *Sexualité et reproduction*. In CHAUVIN R., *Traité de Biologie de l'Abeille*. 1, 145-185. Masson et Cie Paris.
- RUTTNER, F., 1974. *The instrumental insemination of the queen bee*. Apimondia.
- SMIRNOV, I.V., 1953. *Nuevos datos relativos al esperma de zángano*. Pchelovodstvo. 1953 (2), 22-27.
- TRYASKO, V.V., 1956. *Acoplamiento múltiple en las reinas*. Pchelovodstvo, 1. 50-54.
- WOYKE, J., 1960. *Acoplamiento natural e inseminación instrumental de las reinas*. Pszczeln. Zesz. Nauk. 4 (3-4), 183-275 (Summarized in Bee World, 1962, 43, 21-25).
- WOYKE, J., RUTTNER, F., 1958. *An anatomical study of the mating process in the honey bee*. Bee World 39, 3-18.