

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN ZÁNGANOS DE *APIS MELLIFERA IBERIENSIS*

Yániz, JL^{1*}, Palacín I¹, Santolaria, P¹

Grupo de investigación BIOFITER, Instituto Universitario de Ciencias Ambientales (IUCA),
Departamento de Producción Animal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de
Zaragoza, Huesca, España
*yaniz@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La calidad del semen de los zánganos es fundamental para el éxito reproductivo de la reina, que a su vez determina la supervivencia y el nivel productivo de la colmena (Pettis et al. 2016). Por otro lado, la utilización de semen de calidad es esencial para obtener una mayor eficacia en la inseminación artificial de reinas seleccionadas (Collins 2004).

A diferencia de otras especies ganaderas, en las que el análisis de la calidad seminal esta ampliamente estudiado y estandarizado, en el caso de las abejas el estudio de las características seminales del zángano no está tan extendido. En algunos estudios se han evaluado parámetros como el volumen, la concentración, la viabilidad o la movilidad espermática (Ciereszko, et al. 2017), aunque se requiere un esfuerzo para estandarizar los métodos de evaluación.

En abejas, la evaluación de la movilidad espermática se ha realizado en muy pocos trabajos, probablemente debido a la dificultad que conlleva esta determinación por la morfología filiforme de los espermatozoides del zángano. Sin embargo, una adecuada movilidad es necesaria para que se produzca la migración de los espermatozoides a la espermateca de la reina y la posterior fecundación, existiendo una importante correlación entre la movilidad espermática y el éxito de inseminación en reinas (Wegener et al., 2012). A diferencia de la movilidad, el estudio de la integridad de la membrana plasmática (viabilidad), es uno de los parámetros de calidad seminal que más se han empleado en esta especie, principalmente combinando los fluorocromo SYBR-14 y yoduro de propidio. Otras combinaciones de fluorocromos se han utilizado muy ocasionalmente y, en la mayoría de los casos, la determinación de este parámetro se ha realizado mediante recuento manual.

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la calidad seminal del zángano de la subespecie *Apis mellifera iberiensis*, analizando el efecto del soporte utilizado en la determinación de la movilidad espermática y adaptando un protocolo de evaluación de la integridad de la membrana plasmática previamente desarrollado en mamíferos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se realizó durante la época de producción de miel (marzo-junio, 2018), incluyendo zánganos de la especie *Apis mellifera iberiensis* capturados en apiarios en la provincia de Huesca (España).

Se analizó el semen de 30 zánganos procedentes de 3 colmenas diferentes (10 de cada colmena). Los zánganos se capturaron en su regreso a la colmena bloqueando la entrada a la misma con un excluidor, para posteriormente ser transportados al laboratorio. La extracción del semen se realizó dentro de la primera hora tras la captura utilizando procedimientos estandarizados (Cobey et al. 2013). Tras la extracción, el semen se diluyó en medio de Kiev, ajustado la concentración a 30-50 millones de espermatozoides/ml.

La movilidad espermática se estudió en diferentes soportes: Porta-cubreobjetos (cubreobjetos de 22 x 22 mm; Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany); cámara Makler (10 µm profundidad; Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel); y cámara Leja (10-µm profundidad; Leja, Nieuw-Vennep, the Netherlands). Se utilizó un microscopio de contraste de fases negativo con un objetivo 10x (Olympus BX40, Olympus Optical, Tokyo, Japan) equipado con una platina termostaticada (35°C) y una cámara digital Basler (modelo A312f; Basler AG, Vision Technologies, Ahrensburg, Germany), para la captura de videos y el posterior análisis de movilidad espermática. El mismo operario analizó la movilidad de todas las muestras subjetivamente, determinando los parámetros de movilidad total (MT, %) si los espermatozoides presentaban algún tipo de actividad, movilidad progresiva (MP, %) si la

cabeza espermática presentaba desplazamiento, y la circularidad espermática (MC, %) si los espermatozoides móviles presentaban una forma circular (cabeza y cola superpuestas). Por otro lado, se determinó la integridad de la membrana plasmática mediante un protocolo previamente adaptado en mamíferos (Yániz et al., 2013), que combina de naranja de acridina y yoduro de propidio. Este protocolo resulta muy económico y evita la necesidad de incubar las muestras antes de su evaluación. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el módulo de viabilidad del Open-CASA (Alquezar-Baeta et al., 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de los diferentes soportes estudiados (Porta, Makler y Leja) sobre las características de movilidad de los espermatozoides de zánganos, se describen en la Tabla 1. Se observó una menor proporción de espermatozoides móviles totales en el sistema porta-cubreobjetos, comparado con las otras dos cámaras (Makler y Leja). El porcentaje de espermatozoides progresivos móviles fue significativamente mayor en la cámara Leja, en la que la difusión de la muestra se realiza por capilaridad, que en los soportes de carga mediante gota (Porta y Makler, Tabla 1). La mayoría de los estudios que evalúan la movilidad espermática en zánganos usan el porta-cubre objetos como soporte de referencia (Taylor et al. 2009; Wegener et al. 2012; Ciereszko, et al. 2017)). Sin embargo, los resultados del presente estudio indican que la utilización de este soporte no es adecuada, ya que provoca una clara disminución de la movilidad total y progresiva con respecto a la observada en las cámaras Makler y Leja.

Por otro lado, se estudió el movimiento circular de los espermatozoides puesto que es considerado como un indicador de la calidad espermática en zánganos (Wegener et al. 2012; Ciereszko, et al. 2017). En este caso, se observó un comportamiento diferente, con un menor porcentaje de espermatozoides circulares en la cámara Leja. En la cámara Makler y el portaobjetos se apreció con mucha frecuencia la adherencia de la cabeza de los espermatozoides al soporte, seguido casi inmediatamente por un enrollamiento de los mismos y un cese del movimiento progresivo. Esto parece indicar que la circularidad es un mal indicador de la calidad seminal en esta especie.

Por último, la evaluación de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante la combinación de naranja de acridina y yoduro de propidio fue exitosa, permitiendo discriminar con claridad los espermatozoides vivos (todo el espermatozoide de un color verde intenso) y muertos (cabeza espermática roja). La utilización del OpenCASA permitió una determinación rápida y fiable de este parámetro de calidad seminal. Por último, existió una clara correspondencia entre los resultados de movilidad total en la cámara Makler y los de viabilidad espermática, que también se midieron en esta misma cámara.

El estudio confirma que el tipo de soporte utilizado en la evaluación de la calidad seminal en zánganos *Apis mellifera iberiensis* afecta significativamente al resultado final y que la combinación de naranja de acridina y yoduro de propidio es una buena alternativa para la evaluación de la integridad de la membrana plasmática en esta especie.

Tabla 1. Valores seminales (media \pm E.S.) de movilidad evaluada en diferentes soportes (Porta-cubre objetos, cámara Makler y cámara Leja) y viabilidad de espermatozoides de zánganos *Apis mellifera iberiensis*

%	Porta	Makler	Leja
Viabilidad	70,58 \pm 1,92	70,58 \pm 1,92	70,58 \pm 1,92
MT	65,24 \pm 3,13 ^a	70,52 \pm 2,39 ^{ab}	79,78 \pm 2,04 ^b
MP	13,78 \pm 2,52 ^a	31,61 \pm 2,88 ^b	59,83 \pm 2,80 ^c
MC	62,43 \pm 4,67 ^a	75,63 \pm 4,97 ^a	17,47 \pm 3,26 ^b

MT: movilidad total; MP: movilidad progresiva; MC: movilidad circular (% sobre MT). Superíndices^{a-c}, indican diferencias significativas entre soportes (P < 0.001).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alquezar-Baeta C.; Gimeno-Martos S.; Miguel-Jimenez S.; Santolaria P.; Yaniz J.; Palacin I.; Casao A.; Cebrian-Perez J. A.; Muino-Blanco T.; Perez-Pe R., 2019: OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. PLoS Comput Biol, 15 e1006691.
- Ciereszko A., Wilde, J., Dietrich, G.J., Siuda, M., Bak, B., Judycka, S., Karol, H. 2017. Apidologie 48(2): 211-222.
- Cobey, S.W., Tarpy, D.R., Woyke, J. 2013. J Apicult Res 52(4).
- Collins, A.M. 2004 Invertebr Reprod Dev 45(3): 231-237.
- Pettis, J.S., Rice, N., Joselow, J., vanEngelsdorp, D., Chaimanee, V. 2016. PloS one 11(5): e0147220.
- Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G., Muller, K., Bienefeld, K. 2012. Cryobiology 65(2): 126-131.
- Taylor, M.A., Guzman-Novoa, E., Morfin, N., Buhr, M.M. 2009. Theriogenology 72(2): 149-159.
- Yániz J.L., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Gosálvez, J., López-Fernández, C., Santolaria, P. 2013. Reprod Domest Anim 48(4): 598-603.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Empresa y Competitividad (MINECO, proyecto AGL2017-85030-R) y el Gobierno de Aragón-Fondo Social Europeo del (DGA-FSE, proyecto A07-17R).

SEMINAL QUALITY ASSESSMENT IN *APIS MELLIFERA IBERIENSIS* DRONES

ABSTRACT: Drone semen quality is fundamental for the reproductive success of the honey bee queen, and to obtain greater efficiency in the artificial insemination of selected queens. This study was designed to analyze the effect of the viewing support used in the results of drone sperm motility and to adapt a protocol for the plasma membrane integrity assessment in this species. The effect of three different sample devices (slide-coverslip, Makler and Leja chambers) on sperm motility parameters of honey bee drones was compared. A lower proportion of motile and progressive sperm was observed in slide-coverslip and in slide-coverslip and Makler, respectively, than in Leja chamber, while the percentage of circular sperm showed an opposite behaviour. The use of acridine orange and propidium iodide allowed a fast and clear assessment of the sperm plasma membrane integrity of this species. This study confirms that the chamber used significantly affects the result of sperm motility, and that the combination of acridine orange and propidium iodide is a good alternative for the plasma membrane integrity assessment in honey bee drone sperm.

Keywords: *Apis mellifera iberiensis*, semen quality, sperm motility, sperm viability.