

# Importancia del análisis y la conservación del semen de abeja melífera (*Apis mellifera*) bajo condiciones tropicales

## Francisco Sevilla-Benavides

Estudiante del DOCINADE  
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica  
✉ fsevillabenavides@gmail.com

## Olivier Castro-Morales

Escuela de Agronomía  
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica  
✉ ocastro@itcr.ac.cr

## Víctor Hugo Quesada-Obando

Apiario Abejas del Arenal, El Castillo de Peñas Blancas  
San Ramón, Alajuela, Costa Rica  
✉ quesadaporra@hotmail.com

## Laura Murillo-Sabillón

Estudiante Licenciatura en Agronomía  
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica  
✉ lauraluciams8@estudiantec.cr

## Anthony Valverde-Abarca

Escuela de Agronomía  
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica  
✉ anvalverde@tec.ac.cr

## Resumen

Las abejas cumplen un rol fundamental en la polinización natural de las plantas y cultivos agrícolas, sin embargo, las malas prácticas agrícolas están reduciendo las poblaciones apícolas en los ecosistemas. El conocimiento de la biología de la reproducción en esta especie permitiría la introducción de líneas genéticas mejoradas para caracteres como productividad, docilidad o resistencia a enfermedades en las poblaciones naturales. Además, la utilización de técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial favorecería la multiplicación de colmenas en los apiarios y el aumento de las poblaciones amenazadas. La caracterización espermática del semen de zángano es importante para disponer de germoplasma de buena calidad para la inseminación de las abejas reinas. El objetivo del presente trabajo fue describir las estructuras reproductivas de los zánganos de la especie *Apis mellifera*, y las características del semen de zánganos en términos de su movilidad, dilución y morfología para mejorar nuestro entendimiento actual sobre la reproducción de estos insectos con fines agro-productivos.

## Palabras claves:

Apicultura, Zootecnia, Reproducción, Espermatozoide.



## Introducción

En apicultura, el conocimiento del entorno biológico mediante el cual los polinizadores naturales llevan a cabo su función es fundamental para la reproducción de las especies vegetales y la conservación de los agentes polinizadores como las abejas del género *Apis mellifera* (Lobo & Bravo Méndez, 2021). En la actualidad existe preocupación por la pérdida de colonias debido a múltiples factores relacionados con el cambio climático, malas prácticas agrícolas y la disminución de los hábitats en los ecosistemas utilizados por las abejas (Clermont et al., 2015; Pettis et al., 2016). Las abejas estimulan la polinización cruzada de los vegetales, permitiendo una mayor variabilidad genética en estos y por ende una mayor resistencia a plagas y enfermedades, como también una mayor productividad agrícola y silvestre (Chautá-Mellizo et al., 2012). Por otro lado, la inseminación artificial en abejas es una aplicación de la reproducción asistida que permite mejorar las poblaciones de acuerdo con los objetivos de selección genética como, por ejemplo, caracteres productivos, caracteres de comportamiento como la disminución del instinto de defensa (agresividad), o caracteres de resistencia a enfermedades (Flores et al., 1998). Para mejorar las técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial es necesario conocer la biología del espermatozoide de zángano (Collins, 2015) y el estudio de la calidad del esperma con el que se está inseminando las abejas reinas (Yániz et al., 2020).

## Relevancia de la línea de estudio

Los ecosistemas terrestres han sido utilizados para satisfacer las necesidades de las sociedades humanas, de tal modo, que se ha generado cambios considerables a los bosques y hábitats de las especies de animales silvestres y demás. De acuerdo con Naciones Unidas, un 8% de las razas de animales conocidas han desaparecido y alrededor del 22% del total de animales se encuentran en peligro de extinción. Por su parte, las abejas son parte del grupo de animales polinizadores de gran importancia para el desarrollo del sector agrícola, y también han presentado ciertas afectaciones por el cambio de sus hábitats y la pérdida de la biodiversidad en los mismos. En Costa Rica se han desarrollado algunos estudios que han comprobado estas afectaciones (Brosi et al., 2007; Escobedo-Kenefic et al., 2020).

Al menos el 70% de las especies de cultivos son polinizados por las abejas (Potts et al., 2010). Por esto, la relevancia de analizar y reducir las afectaciones sobre estos grupos, debe ser un compromiso para los investigadores. Se han determinado diferentes factores que han contribuido con la afectación de las poblaciones de abejas (Dainat et al., 2012), también la reproducción de estos insectos y la calidad del semen de los zánganos, podrían tener un impacto sobre una actividad reproductiva exitosa en las abejas, pero este campo no ha sido evaluado con profundidad y las evaluaciones sobre la calidad seminal se han basado en la determinación del volumen, la concentración y la integridad espermática, sin un análisis respectivo sobre la funcionalidad del esperma (Yániz et al., 2020). El manejo del semen

de zánganos ha permitido utilizar técnicas como la inseminación artificial o instrumental (Collins, 2000). Además, el estudio del semen en la abeja *Apis mellifera* podría mejorar el manejo de las colmenas seleccionando los mejores caracteres productivos, genéticos y con mayor adaptación a los hábitats, mediante programas de selección en los sistemas apícolas (Borsuk et al., 2013). A pesar de esto, en nuestro país se requiere más información sobre el comportamiento de los zánganos, de los posibles factores que afectan su calidad reproductiva, y en cuánto a las técnicas de reproducción y evaluación en estas especies se debe generar más información que permita estandarizar las mismas y que sean más eficientes (Silvestre et al., 2023). Por otro lado, la información generada en nuestras investigaciones debe llegar a los productores apícolas, para estandarizar los sistemas productivos. El objetivo del presente trabajo es describir las estructuras reproductivas de los zánganos de la especie *Apis mellifera*, y las características seminales actuales analizadas en el Laboratorio de Reproducción Animal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (AndroTEC) y discutir sobre las proyecciones de investigaciones que se requieren sobre esta especie en el ámbito reproductivo.

## Descripción del proceso de extracción del semen de zánganos de la especie *Apis mellifera*.

Después de 14 días de eclosionados, los zánganos alcanzan la madurez y están listos para la colección de semen o reproducción (Cobey et al., 2013). Para la recolección del semen, se puede realizar mediante dos procesos, por disección de las vesículas seminales o por inducción manual (Yániz et al., 2020). Durante la inducción manual se seleccionan los zánganos reproductores y se les realiza una leve presión entre el tórax y abdomen, y siguiendo hasta la parte posterior del abdomen (en dirección apical o "hacia atrás"). El proceso de extracción del semen se realiza en dos pasos después de la presión ejercida sobre el abdomen, donde se produce una eversión parcial o exposición de algunas estructuras reproductivas (Figura 1) y luego una eversión total del endofalo (estructura reproductiva copuladora del zángano) donde se realiza la colecta del semen.

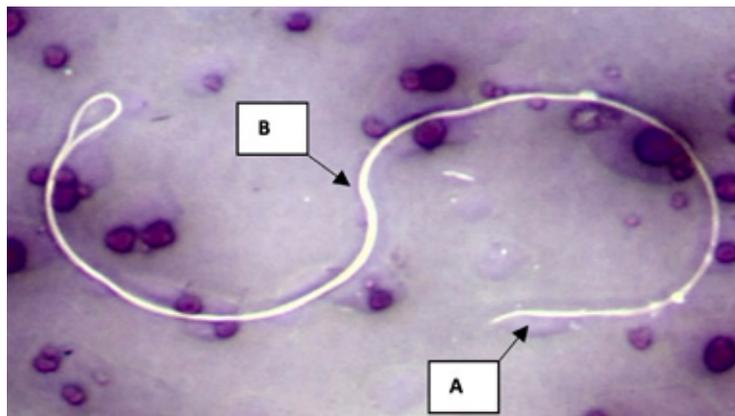


**Figura 1.** Exposición parcial de las estructuras reproductivas del zángano, obsérvese los cónulos expuestos, La Fortuna, San Carlos, Alajuela, Costa Rica, 2023.

Durante la eversión total se debe considerar que algunos zánganos pueden llegar a defecar y contaminar la muestra del semen, también pueden presentarse casos donde estos no eyaculen o se logre colectar una proporción menor a un microlitro de semen; normalmente se utiliza entre 8-12 microlitros de semen durante la inseminación artificial de una abeja reina (Cobey et al., 2013).

## Caracterización de los espermatozoides del zángano de la especie *Apis mellifera*

Los espermatozoides de la especie *Apis mellifera*, son filamentosos y alargados, con longitudes de hasta 250-270  $\mu\text{m}$  (micrómetros) (Yániz et al., 2020). Esto indica que son mucho más largos que los espermatozoides de otras especies de animales. Además, por su forma filamentososa es difícil identificar la base de la cabeza del espermatozoide (acrosoma) y el núcleo de este. En la Figura 2, se presenta un espermatozoide teñido mediante una tinción que fija las células espermáticas (tinción eosina + nigrosina) y visto en microscopio a mil aumentos.



**Figura 2.** Espermatozoide de zángano de la especie *Apis mellifera*. A) Cabeza del espermatozoide (núcleo y acrosoma), B) Flagelo o cola del espermatozoide, magnificación:1000X, tinción Eosina-nigrosina, Laboratorio de Reproducción animal (AndroTEC), 2023.



**Figura 3.** Movimiento ondulatorio y circular de espermatozoide de zángano de la especie *Apis mellifera*., magnificación:400X, tinción Eosina-nigrosina, Laboratorio de Reproducción animal (AndroTEC), 2023.

Por la forma del acrosoma y que no posee un centroeide que pueda identificarse fácilmente por los sistemas de análisis seminales asistidos por computadora (*Computer-Assisted Semen Analysis, CASA systems*) (Bompart et al., 2018; Soler et al., 2017; Valverde et al., 2020; Valverde & Madrigal Valverde, 2018), hasta el momento no se ha creado una metodología estandarizada para el análisis del movimiento de las células espermáticas de los zánganos. Sin embargo, se han realizado algunos estudios donde se ha logrado determinar algunas características sobre el movimiento celular en esta especie (Figura 3); en estos se han utilizado algunas escalas de acuerdo con el movimiento de las células que se observan en microscopio y han relacionado este movimiento circular con la calidad del

movimiento en esta especie; también, se ha comprobado que esto podría estar influenciado por otros factores (Yániz et al., 2020), por lo que el estudio y la estandarización del movimiento espermático en la especie *Apis Mellifera* es un área de estudio que requiere atención e investigación.

Para la estandarización de la evaluación del semen, se podrían utilizar algunas tecnologías como el *iSperm*<sup>®</sup> (sistema CASA portátil) o el Open CASA v2 (sistema CASA de acceso libre), ya que esto facilitaría el acceso a los apicultores después de que se validen las metodologías empleadas. Inicialmente se han realizado unas primeras evaluaciones con el *iSperm*<sup>®</sup> (Figura 4), donde se ha logrado observar el movimiento circular de las células espermáticas, sin determinar actualmente un porcentaje de movilidad total o la progresividad de estas en la trayectoria celular.



**Figura 4.** Análisis en campo de semen de zángano (*Apis mellifera*) con el *iSperm*<sup>®</sup>, realizado por parte del equipo del Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC), 2023.

## Proyecciones de trabajos en esta especie y consideración final.

Actualmente, se están desarrollando alianzas y colaboraciones con algunos productores desde el Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC), para desarrollar y validar metodologías de análisis seminal para la especie *Apis mellifera*. También, se pretende estudiar las metodologías empleadas para la inseminación instrumental que actualmente se realiza por parte de algunos apicultores y determinar posibles mejoras para la efectividad de estas, así como posibles formas de conservación para el material genético de esta especie y el estudio de aquellos factores que puedan afectar su reproducción. Es necesario generar más información sobre nuestro entendimiento actual de la reproducción de las abejas del grupo apini (Apinae) del género *Apis*, como también de los meliponinos (abejas sin aguijón), con el propósito de mejorar la producción y conservaciones de especies que podríamos considerar amenazadas en los ecosistemas. La Universidad está llamada a apoyar los esfuerzos de investigación, generación de conocimiento, extensión y acción social en comunidades rurales donde se desarrollan estas actividades agro-productivas desde un enfoque sostenible y en concomitancia con un estilo de vida que dignifique el trabajo en el campo, con una filosofía conservacionista de las especies nativas de plantas y animales integradas en los entornos rurales, para llevar a cabo un verdadero manejo sostenible de los recursos naturales.

## Referencias

- Bompart, D., García-Molina, A., Valverde, A., Caldeira, C., Yániz, J., Núñez de Murga, M., & Soler, C. (2018). CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 810–819. <https://doi.org/10.1071/RD17551>
- Borsuk, G., Strachecka, A., Olszewski, K., Paleolog, J., Chobotow, J., & Anusiewicz, M. (2013). Proteolytic system of the sperm of *Apis mellifera* drones. *Biologia*, 68(3), 533–538. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0174-6>
- Brosi, B. J., Daily, G. C., & Ehrlich, P. R. (2007). Bee community shifts with landscape context in a tropical countryside. *Ecological Applications*, 17(2), 418–430. <https://doi.org/10.1890/06-0029>
- Clermont, A., Eickermann, M., Kraus, F., Georges, C., Hoffmann, L., & Beyer, M. (2015). A survey on some factors potentially affecting losses of managed honey bee colonies in Luxembourg over the winters 2010/2011 and 2011/2012. *Http://Dx.Doi.Org/10.3896/IBRA.1.53.1.04*, 53(1), 43–56. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.04>
- Chautá-Mellizo, A.; Campbel, S.A.; Bonilla, M.A.; Thaler, J.S.; Poveda, K. 2012. Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. *Basic and Applied Ecology*, 13: 524-532. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2012.08.013>
- Cobey, S. W., Tarpy, D. R., & Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–18. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.09>
- Collins, A. M. (2000). Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie*, 31(3), 421–429. <https://doi.org/10.1051/apido:2000132>
- Collins, A. M. (2015). Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/00218839.2004.11101131*, 43(4), 167–171. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101131>
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., & Neumann, P. (2012). Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *PLoS ONE*, 7(2), e32151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>
- Escobedo-Kenefic, N., Landaverde-González, P., Theodorou, P., Cardona, E., Dardón, M. J., Martínez, O., & Domínguez, C. A. (2020). Disentangling the effects of local resources, landscape heterogeneity and climatic seasonality on bee diversity and plant-pollinator networks in tropical highlands. *Oecologia*, 194(3), 333–344. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04715-8>
- Flores, J. M., Ruíz, J. A., Ruz, J. M., Puerta, F., Campano, F., Padilla, F., & Bustos, M. (1998). Inseminación artificial de abejas reinas. *Archivos de Zootecnia*, 47, 343–345.
- Lobo, J. A., & Bravo Méndez, Y. (2021). Diversity and foraging patterns of bees on flowers of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 69(2), 494–506. <https://doi.org/10.15517/RBT.V69I2.44076>
- Pettis, J. S., Rice, N., Joselow, K., Van Engelsdorp, D., & Chaimanee, V. (2016). Colony Failure Linked to Low Sperm Viability in Honey Bee (*Apis mellifera*) Queens and an Exploration of Potential Causative Factors. *PLOS ONE*, 11(2), e0147220. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0147220>
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Silvestre, M. A., Soler, C., Mocé, E., Roldan, E. R. S., & Yániz, J. L. (2023). The Importance of Studying Factors That Affect the In Vitro Evaluation of Semen Quality to Predict Potential Fertility in Males. *Biology*, 12(2), 235. <https://doi.org/10.3390/biology12020235>

- Soler, C., Valverde, A., Bompart, D., Fereidounfar, S., Sancho, M., Yániz, J., Garcia-Molina, A., & Korneenko-Zhilyaev, Yu. A. (2017). New methods of semen analysis by casa. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya (Agricultural Biology)*, 52(2). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.2.232eng>
- Valverde, A., Barquero, V., & Soler, C. (2020). The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 29(3), 189–198. <https://doi.org/10.22358/jafs/127691/2020>
- Valverde, A., & Madrigal Valverde, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613>
- Yániz, J. L., Silvestre, M. A., & Santolaria, P. (2020). Sperm Quality Assessment in Honey Bee Drones. *Biology*, 9(7), 174. <https://doi.org/10.3390/biology9070174>

## Sobre los autores:

### Francisco Sevilla-Benavides

Francisco Sevilla es ingeniero Agrónomo graduado del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Ha participado como asistente especial de los proyectos; "Evaluación de la fertilidad asociada a la calidad seminal de verracos en granjas porcinas de la Región Huetar Norte"; "Desarrollo de la metodología de análisis integrado de semen en ganado *Bos indicus*" y actualmente es estudiante del Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE) del ITCR-UNA-UNED, donde además es asistente especial de investigación de posgrado, relacionado con el proyecto "(PROTASPERM)", todos adscritos a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión. <https://orcid.org/0000-0003-1480-4141>

### Olivier Castro-Morales

Olivier Castro es profesor, investigador y extensionista. Biólogo, posee una maestría académica en Manejo de Recursos Naturales de la Universidad Estatal a Distancia de Costa Rica, con énfasis en vida silvestre. <https://orcid.org/0000-0003-3817-9459>

### Víctor Hugo Quesada-Obando

Víctor Hugo Quesada es Técnico Medio en Agropecuaria. Naturalista, investigador y apicultor de la Zona Norte de Costa Rica. Presidente de la Asociación de Apicultores Productores de la Zona Norte (AAPIDEN)

### Laura Murillo-Sabillón

Laura Murillo es estudiante de licenciatura de Ingeniería en Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Participó como asistente del proyecto "Evaluación de la fertilidad asociada a la calidad seminal de verracos en granjas porcinas de la Región Huetar Norte" y actualmente es asistente del proyecto de investigación PROTASPERM, ambos adscritos a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión. <https://orcid.org/0000-0002-8628-4651>

### Anthony Valverde-Abarca

Anthony Valverde es Ingeniero Agrónomo Zootecnista (UCR), Máster en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción por la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y Doctor en Biodiversidad y Biología Evolutiva por la Universitat de València. Profesor de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) desde 2008. En 2014, creó el Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC) enfocado en el análisis seminal, con el objetivo de promover el desarrollo tecnológico y la investigación en evaluación espermática. Es investigador consolidado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del TEC. Ha publicado más de 75 artículos científicos en revistas indexadas y posee un índice H de 21 con más de 1k citaciones. Tiene más de 10 años de experiencia en investigación y sus líneas se centran en el estudio de la biología de la reproducción animal. <https://orcid.org/0000-0002-3191-6965>