

Efecto de la yema de huevo sobre la criopreservación espermática de zángano (*Apis mellifera*)

Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*)

Loeza-Concha Henry¹  Domínguez-Rebolledo Álvaro*²  Copas-Medina Karen¹ 
Vivas-Rodríguez Jorge²  Escalera-Valente Francisco³  Ramón-Ugalde Julio¹ 

¹Instituto Tecnológico de Conkal, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Conkal, Yucatán, México, ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Mochochá, Yucatán, México. ³Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Compostela, Nayarit, México. *Autor de correspondencia: Domínguez-Rebolledo Álvaro. Instituto Tecnológico de Conkal, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Km 16.3 antigua carretera Mérida-Motul, Conkal, Yucatán. C.P. 97345. henryloeza_21@yahoo.com, dominguez.alvaro@inifap.gob.mx, copas.karen@gmail.com, vivas.jorge@inifap.gob.mx, franescalera@hotmail.com, julio.ramon9@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la yema de huevo entera (YHE) y centrifugada (YHC) y su interacción con dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol, sobre la criopreservación del semen de zángano. Se obtuvieron seis alícuotas de semen, las que se dividieron en cuatro tratamientos: T1 (YHC + glicerol), T2 (YHC + DMSO), T3 (YHE + glicerol) y T4 (YHE + DMSO). Las muestras diluidas se evaluaron después de 10 minutos de incubación a 37 °C y pos descongelación. La motilidad se evaluó subjetivamente (escala 4 a 0), la integridad de la membrana (test de Host) y la viabilidad (IP/SYBR-14). Los resultados se analizaron con un ANDEVA. Al momento de la dilución, el T1 fue el que mayor porcentaje de motilidad, viabilidad e integridad de la membrana presentó (grado 4, 95.75% ± 1.20, 89.75% ± 0.42, respectivamente), pos-descongelación el T2 fue el que mayor porcentaje presentó (grado 2, 59.10% ± 1.44, 84.35% ± 0.72, respectivamente). Los resultados demostraron que el T1 fue el que obtuvo los mejores parámetros espermáticos al momento de la dilución, mientras que, pos descongelación el T2 fue el diluyente que mejor criopreservó las muestras espermáticas de zángano.

Palabras clave: Yema de huevo, criopreservación, semen, zángano.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of whole yolk (WEY) and centrifuged yolk (CEY) and its interaction with dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol, on the cryopreservation of drone semen. Six aliquots of semen were obtained, which were divided into four treatments: T1 (CEY+ glycerol), T2 (CEY + DMSO), T3 (WEY + glycerol) and T4 (WEY + DMSO). The diluted samples were evaluated after 10 minutes of incubation at 37 °C and after thawing. Motility was evaluated subjectively (scale 4 to 0), membrane integrity (Host test) and viability (IP/ SYBR-14). The results were analyzed with ANOVA. At the time of dilution, T1 was the highest percentage of motility, viability and integrity of the membrane presented (grade 4, 95.75% ± 1.20, 89.75% ± 0.42, respectively), after thawing the T2 was the highest percentage presented (grade 2, 59.10% ± 1.44, 84.35% ± 0.72, respectively). The results showed that T1 was the one that obtained the best sperm parameters at the time of dilution, while, after thawing, T2 was the diluent that best cryopreserved sperm samples from drone.

Keywords: Egg yolk, cryopreservation, semen, drone.

INTRODUCCIÓN

La abeja *Apis mellifera* es la principal especie polinizadora empleada por el hombre para aumentar la productividad de los cultivos, y desempeña una importante función en el mantenimiento de la biodiversidad. En los últimos años, el sector apícola se ha visto gravemente amenazado por las pérdidas de colmenas que se han reportado, generando preocupación sobre la diversidad genética de las poblaciones de abejas melíferas (Cobey *et al.*, 2012). Se cree que estas pérdidas son debido a un fenómeno multifactorial, como el cambio climático, los insecticidas, agentes patógenos, las enfermedades virales, entre otros (Tentcheva *et al.*, 2004, vanEngelsdorp *et al.*, 2010, Guzmán-Novoa *et al.*, 2010, Neumann y Carreck, 2015).

En este sentido, una de las alternativas para poder preservar las abejas sería la criopreservación de células espermáticas de zánganos en nitrógeno líquido (NL₂), para su posterior uso en técnicas de inseminación instrumental. De este modo, se puede conservar el material genético a largo plazo y su disponibilidad de uso puede ser en cualquier época del año (Hopkins y Herr, 2010); sin embargo la criopreservación de células espermáticas de zángano presenta bajos porcentajes de criosuperviviencia (Taylor *et al.*, 2009), afectando negativamente en la producción de crías de reinas inseminadas instrumentalmente, logrando una tasa baja de fertilidad del 47%, con respecto al porcentaje con semen fresco que se encuentra entre un 95- 99% (Hopkins y Herr, 2010). Para minimizar los efectos negativos que se producen durante y después de la criopreservación, se han estudiado diversas soluciones; entre ellos, los crioprotectores como el glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol y la dimetilformamida; los cuales previenen la formación de cristales de hielo y protegen a los espermatozoides (Nouri *et al.*, 2013, Medeiros *et al.*, 2002). Sin embargo, entre los crioprotectores más utilizados en la congelación de semen de zángano se encuentran el Dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol. Del mismo modo, se han evaluado infinidad de componentes que se le añaden al diluyente de congelación; entre ellos la leche, glicocola, glicerina, yema de huevo, agua de coco y lecitina de soya. La finalidad de estos componentes es la de preservar las características funcionales de las células espermáticas, mantener el nivel de fertilidad adecuado y protegerlas de las lesiones provocadas por el choque térmico (Stornelli *et al.*, 2005; Dadkhah *et al.*, 2016; Wegener y Bienefeld, 2012).

Actualmente la yema de huevo es uno de los principales componentes más utilizados en la mayoría de los diluyentes de criopreservación de semen en casi todas las especies (Cabrera *et al.*, 2005, Kulaksiz *et al.*, 2010), ya que ejerce un efecto protector sobre las membranas de los espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación (Fernández-Santos *et al.*, 2006; Briand-Amirat *et al.*, 2007). Este efecto de protección se debe al aporte de lipoproteínas de baja densidad (LBD) compuestas por triglicéridos, fosfolípidos y colesterol (Moussa *et al.*, 2002).

Las LBD previenen la formación de cristales de hielo y protege la integridad de la membrana plasmática del choque frío (Hu *et al.*, 2010; Jian-Hong *et al.*, 2011). Asimismo, se ha documentado en diferentes estudios que la eliminación de las lipoproteínas de alta densidad (LAD), mejora la calidad del semen, antes y después de su congelación (Watson y Martin, 1975; Aboagla y Terada, 2004; Fernández-Santos *et al.*, 2006; Briand-Amirat *et al.*, 2007). Debido a esto, se ha recurrido a la centrifugación de la yema de huevo, con la finalidad de eliminar algunos de sus componentes y conservar principalmente las LBD, las cuales han permitido mejorar la congelabilidad del semen de varias especies (Fernández-Santos *et al.*, 2006; Briand-Amirat *et al.*, 2007; Pillet *et al.*, 2011; Nouri *et al.*, 2013). En zánganos, se ha documentado que cuando el diluyente de criopreservación contiene yema de huevo entera, la fertilidad de la reina inseminada se ve afectada con una disminución del número de huevos depositados en las celdas (Hopkins *et al.*, 2011). Asimismo, representa un riesgo para la fertilidad de las abejas reinas inseminadas, ya que las partículas de la yema de huevo pueden obstruir los oviductos de la espermateca y provocar una infección (Hopkins *et al.*, 2012).

Por todo lo anterior expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la yema de huevo entera y centrifugada y sus interacciones con dos tipos de crioprotectores (DMSO y glicerol), sobre la criopreservación del semen de zángano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización y características del área de estudio. La colecta de semen se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pesqueras (INIFAP), ubicado en el municipio de Mocochoá, Yucatán. Las muestras de semen se evaluaron en el laboratorio del Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO) del Instituto Tecnológico de Conkal.

Captura y manipulación de los zánganos. La captura de los zánganos se realizó mediante rejillas excluidoras, las cuales fueron colocadas frente de la piquera para evitar el ingreso de los zánganos a la colmena y así facilitar su captura. Estas rejillas se colocaron aproximadamente antes del mediodía, debido a que se aseguraba la salida de los zánganos para sus vuelos de rastreo, por lo que la captura se realizó a las 17:00 horas del mismo día, asegurando el regreso de los mismos. La finalidad de esta técnica es obtener individuos adultos de aproximadamente 16 días de vida (zángano maduro). Una vez capturados los zánganos, se colocaban en jaulas transportadoras de 15x15x5 cm; las cuales se llenaban a un 35 % de su capacidad, para que los zánganos pudieran moverse. Posteriormente los zánganos fueron resguardados en colmenas huérfanas, con la finalidad de mantenerlos alimentados durante toda la noche. Al día siguiente los zánganos fueron liberados en jaulas de vuelo de 40x40 cm, durante diez minutos, para alentar la defecación y con ello disminuir la contaminación de las muestras; así como para asegurar el llenado de sus sacos aéreos para obtener una mejor eversión del

endófalo (Taylor *et al.*, 2009).

Colecta de semen. Se utilizó la técnica descrita por Laidlaw (1977), que implica forzar de manera manual la eversión parcial y total del endófalo, ejerciendo presión en el tórax y abdomen. Una vez que se detectó el semen en el endófalo, se procedió a su colecta mediante la liberación de una gota de solución salina sobre el semen expuesto y con la ayuda de una jeringa Harbo Schley (ref. 104), y una lupa estereoscópica modelo SMZ zoom Schley (ref. 2.00) y se extrajo el semen. La obtención del semen en todos los zánganos se realizó hasta llenar un tubo capilar con capacidad de 100 μ l, para posteriormente ser criopreservado.

Procesamiento de la yema de huevo. Para la obtención de la yema de huevo entera, primero se esterilizó el huevo con alcohol al 70%, después se abrió el huevo cuidadosamente, vertiendo la yema sin romperla en un desyemador, para liberar completamente la yema de la clara. Para eliminar las membranas de la yema, se colocó sobre un papel filtro, haciéndola rodar para retener los restos y así poder extraer con una jeringa la yema de huevo. En el caso de la yema centrifugada, el procedimiento fue el mismo que el de la yema entera, sólo que a 20 ml de yema de huevo entera, se le agregó 20 ml de agua destilada y luego se centrifugó a 10.000 x g/20min, y finalmente se extrajo el sobrenadante de la yema obtenido por centrifugación (LBD), y el pellet que se formó en el fondo del tubo se desechó (LAD).

Diluyentes. Probamos cuatro diluyentes de acuerdo al método descrito por Harbo (1983). Los diluyentes se prepararon con pequeñas modificaciones, por lo que el T1 fue constituido con: 25% de glicerol, 25% de YHC el T2: 25% de DMSO, 25% de YHC, el T3: 25% de glicerol, 25% YHE y el T4: 25% DMSO, 25% YHE. Cada uno de los diluyentes fueron suspendidos con 50% de solución Buffer, con 2.27g p/v de Tris a 375 mm; 0.369g p/v de ácido cítrico a 124 mm, 7.28g p/v de glucosa a 41 mm y 0.025g p/v de estreptomina, con un pH de 7.0.

Preparación de las muestras. Las muestras de semen fueron diluidas con su respectivo tratamiento a una concentración 3:2. Posteriormente se dejó una alícuota de semen diluido (20 μ l), para su evaluación en fresco y el resto se utilizó para su congelación.

Evaluación de la calidad seminal en fresco y descongelado. Las variables que se evaluaron en el semen fresco fueron: la concentración, motilidad, viabilidad e integridad de la membrana espermática. A la descongelación, las variables evaluadas fueron las mismas que en fresco, a excepción de la concentración espermática que no se evaluó.

Concentración espermática. Se estimó mediante la técnica descrita por Taylor *et al.*, (2009), mezclando 2.5 μ l de semen puro en 497.5 μ l de agua destilada. El número de

espermatozoides se observó con una cámara de recuento celular de Buker, y con un microscopio de contraste de fases UOB UB203i a 400x.

Motilidad espermática. Se depositaron 5 µl de semen fresco en un porta objetos en una placa térmica a 37 °C; se estimó subjetivamente a través de observación visual, examinando al menos 5 campos de cada muestra en un microscopio óptico MO-a 400x a 40x. La valoración se estimó mediante la escala descrita por Locke y Peng (1993), donde: 4 indica más de un 50% de espermatozoides, presentando movimiento circular y movimiento progresivo; 3 indica presencia de movimiento circular y progresivo, y más del 50% con movimiento vibratorio; 2 indica más del 50% con movimiento vibratorio; 1 indica menos del 50% con movimiento vibratorio y 0 sin movimiento.

Viabilidad espermática. Se evaluó de acuerdo a la técnica descrita por Collins y Donoghue, (1999), con las tinciones de fluorescencia Ioduro de propidio y SYBR-14. Se depositó 1µl de cada fluorocromo en 100 µl de cada tratamiento diluido en solución salina (PBS), y se dejaron incubar en la oscuridad durante 5 minutos. Posteriormente se depositó 5 µl de cada muestra teñida sobre un porta objetos y un cubre objetos, para analizar las muestras con un microscopio de fluorescencias. Se analizaron cinco campos y se contaron 100 células, tomando como espermatozoides vivos los teñidos de color verde y los muertos aquellos que presentaban color rojo.

Integridad de la membrana espermática. Se evaluó mediante la técnica descrita por Nur *et al.* (2012), por lo que se agregó 1.0 µl de semen en 250 µl de agua destilada, seguidamente se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Finalizado el tiempo se colocaron 5 µl de la muestra en un porta objetos y cubre objetos de vidrio para realizar el conteo de 100 espermatozoides, entre los que presentaban colas enrolladas (E+) y no enrolladas (E-).

Criopreservación y descongelación de muestras espermáticas. Todas las muestras espermáticas de los tratamientos fueron envasadas en pajuelas de 0.25 ml y almacenadas en un recipiente con agua a temperatura ambiente (37 °C). Después el recipiente con las pajuelas se introdujo en un refrigerador durante 50 minutos, provocando de esta forma un descenso gradual de la temperatura a 5 °C/min. Posteriormente las pajuelas fueron colocadas a una distancia de 4 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 20 minutos, para su congelación y almacenamiento en NL₂ (Taylor *et al.*, 2009). Las muestras espermáticas fueron descongeladas mediante su inmersión en agua a 25 °C durante 60 segundos (Taylor *et al.*, 2009).

Análisis estadístico. Debido a que las variables mostraron parametricidad, se procedió a realizar un ANDEVA y posteriormente una prueba de Tukey para determinar las diferencias de medias; para ello se utilizó el Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20.0 (SPSS, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el semen fresco diluido, el T1 fue el que mejor preservó la motilidad, presentando un 50% de espermatozoides móviles circulares y movimientos progresivos (grado 4); después le siguió el T2 y T3, con movimientos circulares y progresivos, y más de un 50% de movimientos vibratorio (grado 3); y el T4 que fue el que presentó menos de 50% de movimientos vibratorio (grado 1). Se observó diferencia entre el T4 y los demás tratamientos ($p < 0.05$) (tabla 1). Estos resultados son similares a los reportados por Lensky y Schindler (1967) con semen fresco de zángano.

En el semen descongelado se observó que el T2 y T3 fueron los que obtuvieron una mayor motilidad, con más del 50% de movimientos vibratorios (grado 2); mientras que el T1 y T4 ($p > 0.05$) fueron los que presentaron más baja motilidad con menos de 50 % de movimientos (grado 1) (tabla 2). Se observó una reducción significativa de la motilidad antes y después del proceso de congelación ($p < 0.05$). Estos parámetros evaluados son difíciles de comparar con otros estudios, puesto que sólo describen la presencia o ausencia de movimiento, y no mencionan el tipo de movimiento (Hopkins y Herr, 2010; Taylor *et al.*, 2009).

Al parecer la yema de huevo entera o centrifugada y su interacción con el glicerol o DMSO, si actúan de manera diferente sobre la protección de los espermatozoides de zángano que se someten a congelación; por lo que es necesario encontrar el mejor diluyente que conserve o mejore la motilidad de los espermatozoides después de la criopreservación, ya que juega un papel importante en la migración de los espermatozoides a los oviductos laterales de la espermateca (Collins, 2000), e incluso se ha descrito que el movimiento flagelar de los espermatozoides puede aumentar la reproductividad de las reinas inseminadas (Tofilski, 2014). Normalmente la producción de crías obreras en abejas reina inseminadas con semen fresco es aproximadamente de 95 a 99%, mientras que con semen descongelado se producen menos del 50% de abejas obreras; observándose un mayor número de zánganos emergidos (huevos no fertilizados) (Hopkins *et al.*, 2012).

La viabilidad espermática del semen fresco diluido fue mayor en el T1 (95.75 ± 1.20) en comparación con el T3 ($93.58\% \pm 0.57$), el T2 (82.75 ± 1.93) y el T4 (38.83 ± 3.00). No se encontraron diferencias entre el T1 y T3 ($p > 0.05$) (Figura 2). Estos resultados son similares a los reportados por Nur *et al.* (2012), Collins y Pettis (2001) y Collins (2004) en semen fresco de zángano.

A la descongelación, la viabilidad fue mayor en el T2 ($59.10\% \pm 1.44$) en comparación con el T3 ($55.90\% \pm 0.98$), el T1 ($44.40\% \pm 0.66$) y el T4 ($33.65\% \pm 0.73$). No se encontraron diferencias entre el T1 y el T3 ($p > 0.05$), ni tampoco entre el T2 y el T3 ($p > 0.05$) (tabla 2). Se observó una reducción significativa de la viabilidad de los

espermatozoides antes y después del proceso de congelación ($p < 0.05$). Estos resultados obtenidos son inferiores a los reportados pos descongelación por Nur *et al.* (2012) con un 87.2% y Taylor *et al.* (2009) con un 68.3%.

La integridad de la membrana espermática en las muestras de semen fresco diluido fue mayor en el T1 ($89.75\% \pm 0.42$), en comparación con el T3 ($84.00\% \pm 1.08$), el T2 (80.12 ± 0.29) y el T4 (75.65 ± 0.25). Únicamente el T4 tuvo diferencias con los demás tratamientos ($p < 0.05$) (tabla 1). Los resultados son similares reportados por Nur *et al.* (2012) con un 92.2%.

Tabla 1. Efecto de la yema de huevo entera y centrifugada sobre la motilidad, viabilidad y endosmosis del semen fresco de zánganos

Tratamiento	Motilidad (0 a 4)	Viabilidad (%)	Host (%)
YHC + glicerol (T1)	4.00 ± 0.00 a	95.75 ± 1.20 a	89.75 ± 0.42 a
YHC + DMSO (T2)	2.33 ± 0.21 b	82.75 ± 1.93 b	80.12 ± 0.29 b
YHE + glicerol (T3)	2.67 ± 0.21 b	93.58 ± 0.57 a	84.00 ± 1.08 b
YHE + DMSO (T4)	2.00 ± 0.00 b	38.83 ± 3.00 c	75.65 ± 0.25 c

YHC: Yema de huevo centrifugada; YHE: Yema de huevo entera; DMSO: dimetilsulfóxido a, b diferentes literales por columna indican una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Tabla 2. Efecto de la yema de huevo entera y centrifugada sobre la motilidad, viabilidad y endosmosis del semen congelado de zánganos

Tratamiento	Motilidad (0 a 4)	Viabilidad (%)	Host (%)
YHC + glicerol (T1)	1.36 ± 0.12 a	44.40 ± 0.66 a	82.75 ± 0.71 a
YHC + DMSO (T2)	1.83 ± 0.11 b	59.10 ± 1.44 a	84.35 ± 0.72 a
YHE + glicerol (T3)	2.13 ± 0.17 b	55.90 ± 0.98 a	83.25 ± 0.11 a
YHE + DMSO (T4)	1.06 ± 0.45 a	33.65 ± 0.73 b	72.50 ± 0.73 b

YHC: Yema de huevo centrifugada; YHE: Yema de huevo entera; DMSO: dimetilsulfóxido a, b diferentes literales por columna indican una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

A la descongelación se presentó una mayor integridad de la membrana espermática, en las muestras donde se adicionó el T2 ($84.35\% \pm 0.72$); en comparación con el T3 ($83.25\% \pm 0.11$), el T1 ($82.75\% \pm 0.71$) y con el T4 ($72.50\% \pm 0.73$). No se encontraron diferencias entre el T1, T2 y T3 ($p > 0.05$) (tabla 2). No se encontraron diferencias en la reducción de la integridad de la membrana espermática, antes y después del proceso de congelación ($p > 0.05$). Se pudo observar que las membranas de la cola de los espermatozoides de zángano son muy resistentes al proceso de congelación-descongelación; esto pudo ser debido a que las membranas celulares los espermatozoides de zángano, responden bien a la regulación de los cambios osmóticos durante la congelación y descongelación celular, permitiendo el ingreso de los crioprotectores a las membranas y la expulsión del agua (Karger *et al.*, 2016; Watson, 2000).

CONCLUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que el diluyente a base de YHC + glicerol (T1) es el más idóneo para criopreservar muestras espermáticas de zángano.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado esta investigación por medio del proyecto de Ciencia Básica 164592.

LITERATURA CITADA

ABOAGLA EME, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62 (6), 1160-1172. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.013

BURLEY LM, Fel, RD, Saacke, RG. 2008. Supervivencia de espermatozoides de miel de abeja (*Hymenoptera: Apidae*) incubados a temperatura ambiente de drones expuestos a Miticidas. *Diario de Entomología Económica*, 101 (4), 1081-1087. DOI: 10.1093 / jee / 101.4.1081

BRIAND-AMIRAT L, Tainturier D, Anton M. 2007. Use of egg compounds for cryoprotection of spermatozoa. In Bioactive egg compounds. *Springer, Berlin, Heidelberg*. 259-264. ISBN: 13:978-3-540-37883. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-540-37885-3_30

CABRERA F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reproduction in domestic animals*. 40(3):191-195. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2005.00544.x

COBEY S, Sheppard WS, Tarpay DR. 2012. Status of breeding practices and genetic diversity in domestic US honey bees. Honey bee colony health: challenges and sustainable solutions. *CRC Press, Boca Raton*. Pp. 25-36. ISBN-13: 978-1439879405 Disponible En: https://www.researchgate.net/publication/303873161_Status_of_breeding_practices_and_genetic_diversity_in_domestic_US_honey_bees

COLLINS AM. 2004. Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *Journal of Apicultural Research*. 43: 167-171. DOI: 10.1080 / 00218839.2004.11101131

COLLINS AM, Pettis JS. 2001. Effect of *Varroa* infestation on semen quality. *American Bee Journal*. 141 (8), 590. Disponible en: <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=118617>

COLLINS AM, Donoghue AM. 1999. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*, 51(8):1513-1523. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00094-1

COLLINS AM. 2000. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie*. 31(3): 421-429. DOI: 10.1051/apido:2000132

DADKHAH F, Nehzati-Paghaleh G, Zhandi M, Emamverdi M, Hopkins BK. 2016. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *Journal of Apicultural Researc*. 55(4):279-283. DOI: 10.1080/00218839.2016.1243292

FERNÁNDEZ-SANTOS MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. 2006. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology*. 66(8):1931-1942. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.05.012

GUZMÁN-NOVOA E, Eccles L, Calvete Y, MCGOWAN J, Kelly PG, Correa-Benítez A. 2010. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*. 41:443-450. DOI: 10.1051/apido/2009076

HARBO JR. 1983. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196 C). *Annals of the Entomological Society of America*. 76(5): 890-891. DOI: 10.1093/aesa/76.5.890

HOPKINS BK, Herr C. 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*. 41:548-556. DOI: 10.1051/apido/20010006

HOPKINS BK, Baker PJ, Sheppard, WS, Herr C. 2011. The importance of egg-yolk in the cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) semen. *Cryobiology*. 3(63):333. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.09.102

HOPKINS BK, Herr C, Sheppard WS. 2012. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*. 24(8):1079-1083. DOI: 10.1071/RD11088

HU J, Li Q, Zan L, Jiang Z, An J, Wang L, Jia Y. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci*. 117:11-17. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2009.04.001

JIAN-HONG H, Zhong-Liang J, Rui-Kai L, Qing-Wang L, Shu-Shan Z, Lin-Sen Z, Yao-

Kun L, Xin L. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 62: 83-87. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2010.12.007

KARGER S, Geiser B, Grau M, Burfeind O, Heuwieser W, Arlt SP. 2016. Prognostic value of a pre-freeze hypo-osmotic swelling test on the post-thaw quality of dog semen. *Animal reproduction science*. 166:141-147. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.015

KULAKSIZ R, Çebi Ç, Akçay E, Daşkın A. 2010. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small ruminant research*. 88(1):12-15. DOI: doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.014

LAILAW H, Lorenzen C. 1977. Laidlaw instrumental insemination instrument [Queen honey bees]. *American Bee Journal* (USA). Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US7728540>

LOCKE SJ, Peng YS. 1993. The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiological entomology*. 18:144-148. DOI: 10.1111/j.1365-3032.1993.tb00461.x

LENSKY Y, Schindler H. 1967. Motility and reversible inactivation of honeybee spermatozoa in vivo and in vitro. *Les Annales de l'Abeille*, 10 (1), 5-16. DOI: 10.1051/apido:19670101

MEDEIROS A, Gomes G, Carmo M, Papa FO, Alvarenga MA. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*. 58 (2): 273-276. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)00898-1

MOUSSA M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57:1695-1706. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)00682-9

NEUMANN P, Carreck NL. 2015. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49:1-6. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.01

NOURI H, Towhidi A, Zhandi M, Sadeghi R. 2013. The effects of centrifuged egg yolk used with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze miniature Caspian horse semen. *Journal of equine veterinary science*. 33:1050-1053. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.03.184

NUR Z, Seven-Cakmak S, Ustuner B, Cakmak I, Erturk M, Abramson CI, Sağırkaya H, Soyulu MK. 2012. The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*. 43:31-38. DOI: 10.1007/s13592-

011-0073-1

PILLET E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*. 75:105-114. DOI: 10.1016 / j.theriogenology.2010.07.015

SPSS, IBM (2011). Estadísticas de IBM SPSS para Windows, versión 20.0. *Nueva York: IBM Corp, 440*

STORNELLI MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*. 25. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11180/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

TAYLOR MA, Guzman-Novoa E, Morfin N, Buhr MM. 2009. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera L.*) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*. 72:149-59. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.02.012

TOFILSKI A. 2014. A scientific note on amoeboid movement of honey bee semen. *Apidologie*. 45(5) 637-640. DOI: 10.1007 / s13592-014-0269-2

TENTCHEVA D, Gauthier L, Zappu Ila N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera L.* and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and environmental microbiology*, 70:7185-7191. DOI: 10.1128 / AEM.70.12.7185-7191.2004

VANENGELSDORP D, Hayes Jr J, Underwood RM, Pettis JS. 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of apicultural research*. 49:7-14. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.03

WEGENER J, Bienefeld K. 2012. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*. 77:600–607. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.08.036

WATSON PF, Martin ICA. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Australian journal of biological sciences*. 28(2):145-152. DOI: 10.1071/BI9750145

WATSON, PF. 2000. Las causas de la reducción de la fertilidad con semen crioconservado. *Ciencia de la reproducción animal*, 60, 481-492. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00099-3