

The effect of different concentrations of royal jelly supplementation on the morphology and apoptosis of drone sperm at different times after Cryoprotectant-Free Vitrification by drop method

Aliakbar Mohammadi¹, Adel Saberivand^{*2} and Hadi Hajarian³

Received: 2024-07-15

Accepted: 2025-02-13

¹ Ph.D. candidate, Theriogenology section, Dept. Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

² Theriogenology section, Dept. Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³ Associate Professor, Dept. Animal Science, Agriculture and Natural Resources Campus, Razi University, Kermanshah, Iran.

*Corresponding author: Email: a.saberivand@tabrizu.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research	Journal of Animal Science Research / vol.35 No.1/ 2025/pp 39-52 https://animalscience.tabrizu.ac.ir	OPEN ACCESS
© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/AS.2025.62511.1747		

Abstract:

Introduction: Honeybees are among the most important pollinators, playing a vital role in the pollination of cultivated plants and wild species. It is estimated that nearly 70% of crop plant species worldwide rely on honeybee pollination. The Farm-to-Fork strategy emphasizes that food production should have a neutral or positive environmental impact, mitigate climate change effects, prevent biodiversity loss, and ensure access to mineral-rich and sustainable food for all citizens. Beekeeping is one agricultural sector that aligns with all these sustainability criteria, as it is essentially climate-neutral and waste-free. However, recent reports of significant colony losses worldwide have raised concerns about the future of honeybees. Additionally, many native honeybee species have been replaced by commercial honeybees, reducing genetic diversity within subspecies of *Apis mellifera*. Colony losses directly impact genetic diversity. Successful sperm cryopreservation is an effective strategy for preserving honeybee genetic diversity, aiding in the selection of pest- and disease-resistant lines, and preventing further colony losses. The decline or loss of native and non-native bee species can negatively affect agricultural production and ecosystem functioning. Increasing honeybee production globally through improved genetic lines and enhanced colony management is feasible, with genetic traits identified using semen from superior drones. Cryopreservation of bee sperm has been explored as a means of maintaining genetic diversity in honeybee populations. Cryopreserved drone sperm retains viability and fertilization capacity, supporting successful artificial insemination outcomes and contributing to disease-resistant breeding lines and genetic conservation. Royal jelly (RJ), produced by young worker bees, contains water, carbohydrates, proteins, amino acids, lipids,

minerals, vitamins, and polyphenols. In 2002, a novel cryoprotectant-free vitrification method for human spermatozoa was introduced, using non-permeable additives like sugars to avoid the osmotic and toxic effects of high cryoprotectant concentrations, preserving sperm acrosome integrity and cytoskeletal structure. Our study aimed to enhance drone sperm preservation by incorporating royal jelly into the cryoprotectant-free vitrification extender.

Materials and Methods: Drone sperm from adult drones (36 days old) was collected using manual inversion. Various concentrations of royal jelly (0%, 0.5%, 1%, 2.5%, and 5%) were added to the extender. After preparation, a micropipette was used to drop 10 μ L aliquots of the sperm suspension directly into the cooling agent from a distance of 10 cm. A sphere immediately formed and floated to the surface. After 6 seconds in liquid nitrogen, the sphere solidified and sank to the bottom of the strainer. Once solidified, the spheres were collected, packaged into 1.8 mL cryotubes, and stored in a liquid nitrogen tank for 90 to 300 days before thawing. Thawing was performed by quickly submerging five spheres, one by one (no more than five at a time), into 3 mL of pre-warmed (37°C) Modified Hopkins extender solution, followed by gentle vortexing for 10 seconds. The warmed sperm suspension was then maintained at 37°C in a 5% CO₂ environment for 10 minutes, followed by centrifugation at 1000 g for 10 minutes. The resulting cell pellet was resuspended in 20 μ L of Modified Hopkins extender solution for quality evaluation. Data were analyzed using a completely randomized design with five replications. Sperm quality parameters, including morphology and apoptosis, were evaluated in vitro. To assess morphology, two eosin staining methods-crystal violet (acidic) and silver nitrate (alkaline)-were used. Eosin-crystal violet staining was performed according to Kondracki et al. (2005) as this acidic dye effectively stains sperm and is useful for detecting morphological characteristics. Silver nitrate staining was conducted based on the method of Andraszek and Smalec (2011), with morphology evaluation performed on 500 spermatozoa using phase-contrast microscopy at 400 $\times$ magnification. Results from silver nitrate staining were compared with those from eosin-crystal violet complexes, and only the percentage of normal sperm was reported. Apoptosis was measured using the fluorescein isothiocyanate annexin V apoptosis detection kit with 7-aminoactinomycin D. A total of 500 spermatozoa per sample were analyzed, with only the percentage of apoptotic sperm reported for each treatment.

Results and Discussion: Sperm morphology and apoptosis after vitrification/thawing with different RJ concentrations were evaluated at 0, 90, and 300 days. Our results showed that supplementation with 1% RJ significantly increased the percentage of normal sperm morphology (75.40 ± 3.50) compared to other groups across all storage durations. Lower to moderate concentrations of royal jelly improved sperm morphology, suggesting a stabilizing effect on cell structure and protection against vitrification-induced damage. This effect is likely due to RJ's bioactive compounds, which maintain cell membrane integrity and prevent structural abnormalities. Our findings, in agreement with previous studies, support RJ's antioxidant benefits in reducing apoptosis. This effect was particularly evident with 1% RJ across all time points post-thawing, significantly lowering sperm apoptosis compared to controls. The use of non-penetrating cryoprotectants likely enhanced plasma membrane flexibility during vitrification, reducing apoptosis by preventing damage to sperm DNA and membrane integrity. Conclusion: This study demonstrates that adding royal jelly at a concentration of 1% to vitrification diluents significantly enhances the quality of drone bee sperm preserved via cryoprotectant-free vitrification using the drop method. The notable improvements in normal morphology and reduction in apoptosis highlight RJ's potential as a beneficial additive to sperm vitrification protocols. Research into drone bee sperm quality presents promising applications, warranting further exploration of advanced methods such as computer-aided sperm analysis, novel fluorescent dyes, multiparametric tests, flow cytometry, and image analysis techniques. These efforts

aim to refine vitrification techniques and investigate RJ's long-term effects on sperm quality and queen fertility-critical factors for sustainable beekeeping and biodiversity conservation.

Keywords: Apoptosis, Cryoprotectant, Drone, Morphology, Royal jelly, Sperm, Vitrification.

تأثیر غلظت‌های مختلف ژله رویال بر ریخت شناسی و آپوپتوزیس اسپرماتوزوای زنبوران نر در زمان‌های مختلف پس از انجماد شیشه‌ای بدون سرما- محافظ به روش قطره‌ای

علی اکبر محمدی^۱، عادل صابری وند^{۲*} و هادی حجاریان^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۵

^۱ دانشجوی دکتری فناوری تولیدمثل در دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

^۲ استاد بخش مامایی و بیماری‌های تولید مثل، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

^۳ دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

*مسئول مکاتبه: Email: a.saberivand@tabrizu.ac.ir

چکیده:

زمینه مطالعاتی: حفاظت از اسپرم زنبوران نر یک راهبرد مؤثر برای حفاظت از گونه‌ها و تنوع ژنتیکی است. استفاده از رقیق‌کننده‌های طبیعی و روش‌های انجمادی مؤثر برای حفاظت از اسپرم زنبوران نر بسیار مهم است. **هدف:** هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی غلظت‌های مختلف ژله رویال بر کیفیت اسپرم زنبوران نر پس از انجماد شیشه‌ای بدون سرما محافظ به روش قطره‌ای بود. **روش کار:** نمونه‌های مایع منی از زنبوران نر بالغ (۳۶ روزه) به روش دستی جمع‌آوری شدند و با غلظت‌های مختلف ژله رویال (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد) در داخل محلول پایه اصلاح شده هاپکینز رقیق شدند. سپس با محلول انجمادی ۰/۵ مولار ساکارز به نسبت ۱:۱ ترکیب شده و به وسیله سمپلر، مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسپرم آماده شده از فاصله ۱۰ سانتی‌متری مستقیماً در نیتروژن مایع ریخته شد و به روش قطره‌ای منجمد شدند. این نمونه‌های اسپرم در زمان‌های مختلف (۰، ۹۰ و ۳۰۰ روز) نگهداری و سپس ذوب شدند. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار بررسی و فراسنجه‌های کیفیت اسپرم از جمله ریخت شناسی و آپوپتوزیس در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شدند. **نتایج:** نتایج نشان داد که بالاترین میزان ریخت شناسی طبیعی و کمترین میزان آپوپتوزیس اسپرم در زمان‌های مختلف (۰، ۹۰ و ۳۰۰ روز) مربوط به گروه ژله رویال ۱٪ بود. درصد ریخت شناسی طبیعی و آپوپتوزیس اسپرم در گروه‌های ژله رویال ۰/۵٪ و ۲/۵٪ نسبت به گروه‌های دیگر بهتر حفظ شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد انجماد و نگهداری اسپرم زنبوران نر با استفاده از انجماد شیشه‌ای بدون سرما محافظ به روش قطره‌ای و با افزودن مکمل ۱٪ ژله رویال اثرات مفیدی بر فراسنجه‌های منی زنبوران نر برای استفاده تلقیح مصنوعی ملکه به‌منظور تسریع برنامه‌های اصلاح نژادی و حفظ گرده‌افشان‌های حیاتی بسیار مناسب خواهد بود.

کلمات کلیدی: آپوپتوزیس، انجماد شیشه‌ای، اسپرم، زنبور نر، ژله رویال، ریخت‌شناسی، سرما محافظ

مقدمه

دارند. به عنوان مثال، تخمین زده شده است که تقریباً ۷۰٪

از انواع گیاهان زراعی در سراسر جهان به گرده افشانی به زنبورهای عسل وابسته هستند (پاتز و همکاران

زنبوران عسل یکی از مهم‌ترین گرده‌افشان‌ها هستند که در گرده‌افشانی گیاهان و گونه‌های وحشی نقش حیاتی

توانایی باروری آن در طول فرآیند انجماد و ذوب اسپرم منجر می‌شود. در سال‌های اخیر برای از بین بردن پراکسیداسیون لیپید و کاهش تلفات فراسنجه‌های کیفیت اسپرم، آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق کننده مایع منی اضافه می‌شوند (بوجاک و همکاران ۲۰۱۰ و آلچای و همکاران ۲۰۱۷).

ژله رویال یک ترشح ژلاتینی و کرمی است که توسط غدد هیپوفارنژال و فک پایین زنبوران عسل کارگر جوان (زنبوران پرستار) تولید می‌شود. ژله رویال از آب (۶۰-۷۰٪)، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه آزاد، لیپیدها، مواد معدنی، ویتامین‌ها و پلی فنل‌ها تشکیل شده است (وانگ و همکاران ۲۰۲۳). فلاونوئیدها، به ویژه نارینژنین، آکاستین، آپیزنین، کریزین، جنیستئین و ۱۰-هیدروکسی-۲-دسنوئیک اسید (کولازو و همکاران ۲۰۲۱ و بوتزان و همکاران ۲۰۲۳). اجزای کلیدی آنتی‌اکسیدانی ژله رویال هستند که اعتقاد بر این است که جنبه‌های ارتقا دهنده سلامت آنها از جمله اثرات ضدالتهابی، ضد میکروبی و ضد پیری را بر عهده دارند (لیو و همکاران ۲۰۰۸ و کوکوت و همکاران ۲۰۱۸ و کولازو و همکاران ۲۰۲۱). ژله رویال در انجماد اسپرم برای بهبود فراسنجه‌های کیفیت اسپرم پس از ذوب، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش نرخ لقاح در گاو نر (الششتاوی و همکاران ۲۰۲۳)، گاو میش (شهزاد و همکاران ۲۰۱۶)، خروس (هداوند و همکاران ۲۰۲۱)، زنبور نر (آلچای و همکاران ۲۰۱۹) و گراز (ایلجنکایت و همکاران ۲۰۲۰) استفاده شده است. علاوه بر این ژله رویال با موفقیت برای انجماد اسپرم زنبوران نر استفاده شده است. نتایج نشان داد که افزودن ۱٪ ژله رویال به اکستندر کیفیت پس از ذوب اسپرم زنبوران نر را افزایش داد (عبدالنور و همکاران ۲۰۲۰ و ایلجنکایت و همکاران ۲۰۲۰ و رهنما و همکاران ۲۰۲۰ و هداوند و همکاران ۲۰۲۱ و الششتاوی و همکاران ۲۰۲۳).

برای اولین بار ناروژ و همکاران (۲۰۰۲) روش جدیدی برای انجماد اسپرم انسان بدون سرما محافظ با ریختن

(۲۰۱۰). افزایش تولید محصولات زنبور عسل در جهان از طریق کلنی‌های مولد و بهبود یافته ژنتیکی امکان‌پذیر است (هاپکینز و هر ۲۰۱۰ و هاپکینز و همکاران ۲۰۱۲) و مشخصات ژنتیکی با استفاده از مایع منی از زنبوران نر برتر ژنتیکی شناسایی می‌شود (کوبی و همکاران ۲۰۱۳ و چاکماک و نور ۲۰۱۵ و گل و همکاران ۲۰۱۷). با این حال، گزارش‌های اخیر در مورد تلفات زیاد کلنی‌ها در سراسر جهان نگرانی عمومی درباره آینده زنبوران عسل را افزایش داده است (سوروکر و همکاران ۲۰۱۱ و کرمونت و همکاران ۲۰۱۴).

یک عامل محدود کننده تولیدمثل موفقیت‌آمیز کیفیت اسپرم است زیرا ملکه پس از تلقیح برای چندین سال اسپرم زنده را در اسپرماتکا خود ذخیره می‌کند، مطالعه کیفیت مایع منی در زنبور عسل بسیار مهم است برای اینکه موفقیت باروری ملکه، بقای کلنی، سطح بهره‌وری (پتیس و همکاران ۲۰۱۶) و همچنین موفقیت تلقیح مصنوعی را تعیین می‌کند (کالینر ۲۰۰۰ و کالینر ۲۰۰۴). کیفیت پایین اسپرم، ملکه‌های با کیفیت پایین‌تری تولید می‌کند و این یکی از دلایل اصلی از بین رفتن کلنی‌ها در نظر گرفته می‌شود و به همین دلیل مطالعه کیفیت اسپرم زنبوران نر نیز از اهمیت تحقیقاتی قابل توجهی برخوردار است (تارپی و اولیوارز ۲۰۱۴). برای حفظ و افزایش تنوع ژنتیکی در جمعیت کلنی‌های زنبور عسل می‌توان اسپرم زنبور نر را منجمد نمود. علاوه بر این، نشان داده شده است که تنوع ژنتیکی باعث افزایش مقاومت به بیماری در زنبورهای عسل می‌شود. با این حال، فرایندهای انجماد به دلیل تغییر دما، شوک سرمایی و تشکیل کریستال‌های یخ اثر مخربی بر اسپرماتوزوا دارند (پگ ۲۰۰۲). این اثرات باعث کاهش کیفیت اسپرم و توانایی باروری اسپرماتوزوا می‌شود. علاوه بر این، گونه‌های اکسیژن فعال در نتیجه پراکسیداسیون لیپید در غشای سیتوپلاسم در طی فرآیند انجماد-ذوب پدیدار می‌شوند. رادیکال‌های آزاد پدید آمده از طرق مختلف منجر به تنش در غشای سلول می‌شوند. این تنش به کاهش کیفیت اسپرم و

آپوتوزیس) زنبوران نر پس از انجماد شیشه‌ای بدون سرما محافظ به روش قطره‌ای برای ذخیره و نگهداری اسپرم برای بلندمدت در دمای 196°C - است.

مواد و روش‌ها (روش تحقیق)

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیگما خریداری شد.

مدیریت زنبور نر

این مطالعه در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان در سال ۱۴۰۱ انجام شد. پس از استقرار تعداد ۱۰ کلنی زنبور عسل برای پرورش زنبوران نر به وسیله سلول‌های موم نر بافت شروع شد که بیش از ۲۰۰۰ زنبور نر (۳۶ روزه) به طور تصادفی از کندوها جمع‌آوری شدند. این کار با استفاده از یک شبکه مانع ورود ملکه در ورودی کندو هنگام بازگشت زنبوران نر به کندو انجام شد (کالینز و دونوگی ۱۹۹۹ و وگنر و بینفلد ۲۰۱۲). بلافاصله قبل از جمع‌آوری اسپرم، زنبوران نر در یک قفس دست ساز به ابعاد $30 \times 30 \times 30$ سانتی‌متر با صفحه مشبک ۴ میلی‌متری (جایی که زنبوران نر قادر به پرواز و مدفوع باشند که به شروع انزال منی کمک می‌کند) قرار گرفتند (کالینز و دونوگی ۱۹۹۹).

مستقیم سوسپانسیون اسپرم در نیتروژن مایع معرفی کردند. آنها نرخ فوق العاده بالای انجماد را تا $10^6 \times 7/2$ درجه سانتی‌گراد در دقیقه گزارش کردند. در این روش قطره‌ای، تنها از مواد افزودنی غیرقابل نفوذ مانند قندها استفاده می‌شود که اثرات اسمزی و سمیت ناشی از غلظت‌های بالای کرایوپروتکتانت را از بین می‌برد. چندین مطالعه بهبود کیفیت اسپرم، کاهش تغییرات بیولوژیکی و کاهش تکه‌تکه شدن DNA در سلول‌های اسپرم پس از انجماد شیشه‌ای بدون سرما محافظ را نشان داده‌اند (آیزپوروا و همکاران ۲۰۱۷ و ایساچنکو و همکاران ۲۰۱۹ و عامر و همکاران ۲۰۲۱ و وانگ و همکاران ۲۰۲۲). سایر ویژگی‌های اسپرم از جمله یکپارچگی آکروزوم و ساختار اسکلت سلولی با این روش انجماد بهتر حفظ شدند و آن را به یک جایگزین امیدوارکننده برای حفظ کیفیت اسپرم در فناوری‌های کمک باروری تبدیل کردند (آیزپوروا و همکاران ۲۰۱۷). ذخیره طولانی مدت و موفقیت‌آمیز منی زنبوران نر به انتخاب و حفاظت از ویژگی‌های برتر ژنتیکی کمک می‌کند (هاپکینز و هر ۲۰۱۰). برای این منظور نگهداری اسپرم زنبور عسل نر برای بلند مدت که دارای ویژگی‌های ژنتیکی برتر است، امکان حفظ ویژگی‌های مشخص شده را فراهم می‌کند.

هدف از این تحقیق مقایسه غلظت‌های مختلف ژله رویال به منظور بهبود کیفیت اسپرم (ریخت‌شناسی و

Table 1: Hopkin's modified extender used to dilute drone sperm.

Materials	Amount	Materials	Amount
Penicillin	0.0125 g	Glycine	0.1 mM
Streptomycin	0.011 g	Proline	4.3 mM
EDTA	0.01 mM	Catalase	0.5 mg
Sodium phosphate dibasic	1 mM	BSA	2 mg
Sodium citrate	1 mM	KCl	82 mM
Glucose	2.7 mM	NaCl	83 mM
Arginine	0.57 mM	NaHCO ₃	5 mM
Tris base N- [tris(hydroxymethyl)methyl] - 2-aminoethanesulfonic acid (TES) buffer	30 mM	Royal jelly	(0, 0.5, 1, 2.5, and 5%)

Reagents were dissolved in a final volume of 100 mL of distilled water.

جمع‌آوری و رقیق‌سازی مایع منی

اسپرم زنبوران نر به وسیله لوله کاپیلاری ۰/۲ میلی‌لیتری با استفاده از سرنگ ویژه ۲۰ میلی‌لیتری با نوک شیشه‌ای باریک و دست‌ساز پس از انجام تکنیک واژگونی دستی (وگنر و بینفلد ۲۰۱۲) جمع‌آوری شدند. در ابتدا سرنگ با محلول نرمال سالین و آنتی‌بیوتیک (۱۰ گرم کلرید سدیم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با ۰/۲۵ گرم دی هیدروسترپتومایسین) پر شدند. برای جلوگیری از مخلوط شدن محلول نرمال سالین و مایع منی فضای هوایی بین محلول نمکی و منی اضافه شد. برای از بین بردن تفاوت‌های فردی، مایع منی جمع‌آوری شده با هم ادغام شدند. هر مایع منی به دو قسمت مساوی تقسیم شد و هر حجم از اسپرم ۱۵:۱ با محلول رقیق‌کننده اصلاح شده هاپکینز (جدول ۱) در دمای ۱۶°C همراه با غلظت‌های مختلف ژله رویال (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد)

تا غلظت نهایی حدود $10^6 \times 10^6$ اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق شدند (هاپکینز و همکاران ۲۰۱۲).

تهیه محلول انجمادی

محلول انجماد با حل کردن ۰/۵ مولار ساکارز در آب دو بار تقطیر تهیه شد. این محلول سپس از طریق یک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر شد. محلول نهایی انجماد اسپرم بدین شرح تهیه شد: محلول ساکارز ۰/۵ مولار به نسبت ۱:۱ با محلول رقیق‌کننده اصلاح شده هاپکینز رقیق شد و منجر به غلظت نهایی ساکارز ۰/۲۵ مولار گردید.

طراحی تجربی

طرح مطالعه حاضر در شکل ۱ نشان داده شده است که پس از رقیق‌سازی اسپرم با غلظت‌های مختلف ژله رویال و مخلوط کردن ۱:۱ با محلول انجمادی، فرآیند انجماد شیشه‌ای به روش قطره‌ای با ریختن مستقیم اسپرم در نیتروژن مایع صورت گرفت و پس از ذوب کردن، ریخت شناسی و آپوپتوزیس اسپرم زنبوران نر ارزیابی شد.

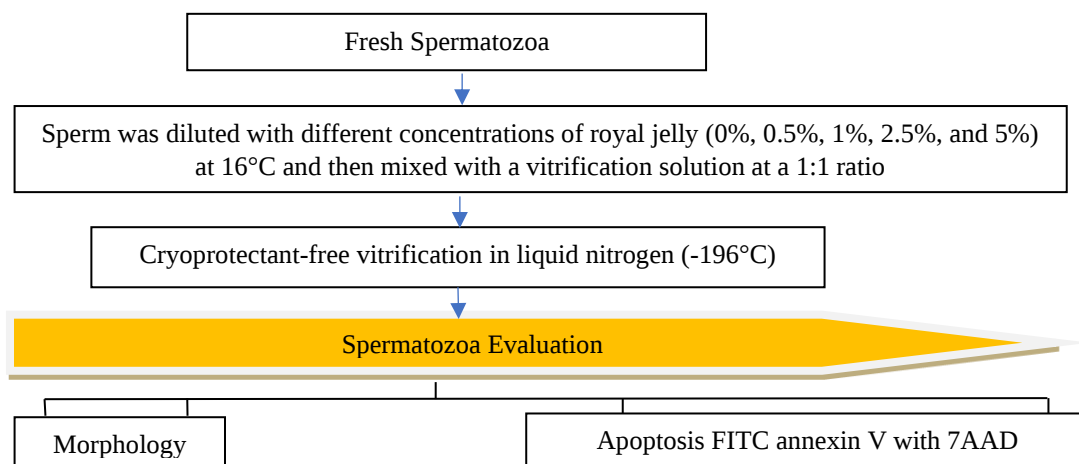


Figure 1 – Schematic design of the experiment

فرآیند انجماد شیشه‌ای بدون سرما محافظ به روش قطره‌ای و گرم کردن آن

پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم بوسیله سمپلر از فاصله ۱۰ سانتی‌متری مستقیماً داخل نیتروژن مایع ریخته شد. بلافاصله یک کره (گلوله) تشکیل شد و در سطح نیتروژن مایع شناور شد و پس از ۶ ثانیه به پایین صافی فرو رفت.

پس از انجماد، گلوله‌ها جمع‌آوری شده در داخل لوله‌های کرایوتایپ ۱/۸ میلی‌لیتری ذخیره شدند و به مدت صفر، ۹۰ و ۳۰۰ روز در یک مخزن حاوی نیتروژن مایع نگهداری شدند. فرآیند ذوب کردن گلوله‌ها با غوطه‌ور کردن سریع یک‌به‌یک (پنج گلوله در یک زمان) در ۳ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده اصلاح شده هاپکینز پیش گرم شده تا ۳۷°C همراه با چرخش ملایم به مدت ۱۰ ثانیه

ویوله به دست آمد و فقط درصد سلول‌های اسپرم طبیعی گزارش شدند.

ارزیابی آپوپتوزیس به روش فلوئورسین ایزوتیوسیانات آنکسین V با ۷-آمینوآکتینومایسین
برای اندازه‌گیری آپوپتوزیس از کیت تشخیص آپوپتوزیس فلوئورسین ایزوتیوسیانات آنکسین V با ۷-آمینوآکتینومایسین D استفاده شد. سلول‌های اسپرماتوزوا دو بار با بافر رنگ‌آمیزی سلول‌های سرد شسته و سپس در بافر اتصال‌دهنده آنکسین V مجدداً حل شدند. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی به لوله آزمایش ۵ میلی‌لیتر منتقل شدند. سلول‌های اسپرم با ۵ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی فلوئورسین ایزوتیوسیانات آنکسین V و ۷-آمینوآکتینومایسین D برچسب‌گذاری و به آرامی چرخانده شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (25°C) در تاریکی انکوبه شدند. یک قطره از محلول دابکو و ۱۰ میکرولیتر نمونه اسپرم رنگ‌آمیزی شده روی اسلاید قرار گرفت و به آرامی مخلوط شدند و سپس با یک روکش پوشانده و با لاک ناخن مهر و موم شدند. اسلایدها در زیر میکروسکوپ با استفاده از فیلترهای مناسب مشاهده شدند و در مجموع ۵۰۰ اسپرم در هر نمونه مورد بررسی قرار گرفتند و فقط درصد مقدار آپوپتوزیس بین تیمارها گزارش شد.

تحلیل آماری

داده‌ها پس از تأیید همگنی و نرمال بودن با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 تحت آنالیز واریانس (ANOVA) قرار گرفتند. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد) و ۵ تکرار در زمان‌های (۰، ۹۰ و ۳۰۰ روز) اجرا شدند. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه گردید. در صورت مشاهده اختلافات معنی‌دار، از آزمون توکی برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد ($P < 0.05$).

نتایج

ریخت شناسی اسپرم زنبوران نر پس از فرآیند انجماد و گرم‌شدن با غلظت‌های مختلف ژله رویال در سه زمان

انجام شد و سوسپانسیون اسپرم گرم شده در دمای 37°C در ۵٪ CO_2 به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. در نهایت پلت در ۲۰ میکرولیتر محلول اصلاح شده هاپکینز برای ارزیابی مورد نظر دوباره معلق شد.

ارزیابی ریخت شناسی اسپرم

جهت ارزیابی ریخت شناسی از دو روش رنگ‌آمیزی ائوزین - کریستال ویوله (رنگ اسیدی) و نیترات نقره (رنگ قلیایی) استفاده شد. رنگ‌آمیزی ائوزین - کریستال ویوله مطابق روش کوندراکی و همکارانش (۲۰۰۵) انجام گرفت. این رنگ اسیدی سلول‌های اسپرم را به خوبی رنگ می‌کند و برای تشخیص ویژگی‌های ریخت شناسی استفاده می‌شود روش کار بدین صورت است که ابتدا با کشیدن دقیق قطره اسپرم در یک اسلاید که قبلاً 37°C گرم شده بودند اسمیر تهیه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق خشک و سپس به مدت ۵ دقیقه با اتانول ۹۶٪ تثبیت گردید. پس از ۳۰ دقیقه، اسلایدها در آب مقطر شسته شدند و سپس با محلول آبی ۱۰٪ ائوزین به مدت ۲۰ تا ۶۰ ثانیه رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدهای رنگی در آب مقطر شسته شده و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه با رنگ کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شدند. پس از رنگ‌آمیزی اسلایدها به مدت ۲ دقیقه به آرامی با آب مقطر شسته و خشک شدند و ریخت شناسی ۵۰۰ اسپرماتوزوا با میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی شدند. رنگ‌آمیزی نیترات نقره مطابق روش آندراسک و اسمالک (۲۰۱۱) انجام گرفت. پس از تهیه اسمیر، مقدار ۴ قطره نیترات نقره بر روی اسمیر قرار گرفت و با یک کاور پوشانده شد و سپس به مدت ۲ دقیقه بر روی اسلایدی که قبلاً به دمای 70°C رسیده بود قرار گرفت تا به رنگ طلایی مایل به قهوه‌ای در بیاید و بعد از آن اسلایدها به مدت ۲ دقیقه به آرامی با آب مقطر شسته و خشک شدند و بلافاصله ریخت شناسی ۵۰۰ اسپرماتوزوا با میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۴۰۰ ارزیابی شدند. نتایج حاصل از رنگ نیترات نقره در مقایسه با ائوزین و کمپلکس کریستال

ژله رویال بالاترین ریخت شناسی طبیعی را نشان دادند. گروه ۱٪ ژله رویال بالاترین درصد ریخت شناسی طبیعی را پس از ۳۰۰ روز ($71/80 \pm 2/86$) ثبت کردند. در مقابل، گروه کنترل و گروه ۵٪ ژله رویال کمترین درصد ریخت شناسی طبیعی را پس از ۳۰۰ روز نشان دادند (به ترتیب $61/10 \pm 2/92$ و $62/40 \pm 2/50$).

متفاوت (، ۹۰ و ۳۰۰ روز) مورد ارزیابی قرار گرفت: با توجه به داده‌های نشان داده شده در جدول ۲، گروه ۱٪ ژله رویال در ۰ و ۹۰ روز پس از انجام، درصد ریخت شناسی طبیعی بیشتری را در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان داد. در حالی که درصد ریخت شناسی طبیعی با گذشت زمان در همه گروه‌ها پس از ۹۰ روز کاهش یافت، گروه ۵٪ ژله رویال سطح ریخت شناسی طبیعی خود را تقریباً بدون کاهش حفظ کردند. گروه‌های ۱٪ و ۲/۵٪

Table 2: Effect of royal jelly supplementation on drone sperm morphology after the sperm vitrification/thawing process by Droplet method.

RJ (%)	Time(day)		
	0	90	300
RJ 0 (Control)	66.80 ± 2.20^{bc}	64.00 ± 2.31^c	61.10 ± 2.92^c
RJ 0.5	68.90 ± 2.60^b	68.10 ± 2.13^b	67.70 ± 2.41^b
RJ 1	75.40 ± 3.50^a	72.20 ± 2.00^a	71.80 ± 2.86^a
RJ 2.5	72.80 ± 3.16^a	69.90 ± 1.85^b	68.90 ± 3.07^b
RJ 5	65.10 ± 2.08^c	62.10 ± 2.08^c	62.40 ± 2.50^c

All of the experiments were repeated 5 times. Data are presented as mean $\pm$ SE.

Data are presented as percentages, and different superscript letters (a-b-c) indicate significant differences among experimental groups.

به‌طورکلی این نتایج نشان داد که ژله رویال می‌تواند به‌عنوان یک عامل محافظتی مؤثر برای اسپرماتوزوای زنبوران نر در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد شیشه‌ای بدون سرمای محافظ عمل کند. بهینه‌ترین غلظت برای بهبود ریخت شناسی و کاهش آپوپتوزیس در این مطالعه ۱٪ بود.

داده‌های جدول ۳ نشان می‌دهد که نسبت درصد آپوپتوزیس در گروه ۱٪ ژله رویال ($29/20 \pm 3/61$) به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از سایر تیمارها در روز صفر بود و بین گروه ۵٪ و ۱۰٪ ژله رویال اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0.05$). همچنین کمترین درصد آپوپتوزیس در گروه ۱٪ ژله رویال در روز ۹۰ مشاهده شد که با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد و بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید و بیشترین درصد آپوپتوزیس مربوط به گروه کنترل بود. میزان درصد آپوپتوزیس پس از ۳۰۰ روز در گروه‌های ۵٪ و ۱۰٪ ژله رویال مشابه و در مقایسه با گروه‌های ۱٪ و ۲/۵٪ ژله رویال به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. نتایج نشان داد که ۱٪ ژله رویال پتانسیل کاهش درصد آپوپتوزیس را در طول فرآیند انجماد و گرم کردن را دارد.

Table 3: Effect of royal jelly supplementation on drone sperm apoptosis after the sperm vitrification/thawing process by Droplet method.

RJ (%)	Time(day)		
	0	90	300
RJ 0 (Control)	41.80 ± 3.74 ^a	43.70 ± 3.92 ^a	42.90 ± 2.45 ^a
RJ 0.5	38.50 ± 2.32 ^b	38.50 ± 2.22 ^{bc}	39.90 ± 1.73 ^b
RJ 1	29.20 ± 3.61 ^d	32.20 ± 3.50 ^d	31.90 ± 2.28 ^d
RJ 2.5	33.50 ± 2.42 ^c	36.60 ± 2.31 ^c	36.40 ± 2.30 ^c
RJ 5	38.60 ± 1.90 ^b	41.10 ± 2.08 ^{ab}	41.40 ± 1.84 ^b

All of the experiments were repeated 5 times. Data are presented as mean ± standard deviation.

Data are presented as percentages, and different superscript letters (a-b-c-d) indicate significant differences among experimental groups.

بحث

استرس اکسیداتیو طی فرآیند انجماد و گرم کردن، به‌طور نامطلوب بر کیفیت، ریخت شناسی و فراساختار اسپرم تأثیر می‌گذارد (گولف و کولچایوا ۲۰۲۳). آسیب اسپرم در این فرآیند عمدتاً به دلیل عدم تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن و سطح آنتی‌اکسیدان‌ها ایجاد می‌شود (لیو و همکاران ۲۰۲۱). ژله رویال به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و مزایای بالقوه در فرآیند انجماد، مورد توجه بسیاری از مطالعات قرار گرفته است. تحقیقات نشان داده‌اند که افزودن ژله رویال به رقیق‌کننده‌های منی می‌تواند وضعیت اکسید و احیا (ردوکس) را بهبود داده و کیفیت منی را افزایش دهد (آلچای و همکاران ۲۰۱۹). بنابراین، ریخت‌شناسی اسپرم پس از ذوب یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کیفیت اسپرم منجمد زنبور نر است که در برنامه آینده‌نگری تلقیح مصنوعی و باروری مطلوب ملکه نقش اساسی دارد (ابوحسن ابو و همکاران ۲۰۱۲ و گنیم و همکاران ۲۰۱۷ و الششتاوی و همکاران ۲۰۲۳). مطالعات نشان داده‌اند که نقص‌های ریخت‌شناسی اسپرم زنبوران نر مانند دم‌های برگشته و شکسته وجود دارد (تارلیه و همکاران ۱۹۹۹ و پاور و همکاران ۲۰۱۹). استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی مختلف به شناسایی دقیق ساختارهای اسپرم و آسیب‌های ناشی از انجماد و رقیق‌کننده‌ها کمک می‌کند (گارنر و همکاران ۱۹۹۴ و کالینز و دونوگیو ۱۹۹۹). نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن ۱٪ ژله رویال به اکستندر به طور قابل توجهی باعث افزایش درصد ریخت شناسی طبیعی اسپرم در مقایسه با سایر گروه‌ها در روزهای ۰، ۹۰ و ۳۰۰ پس از انجماد شد. بهبود ریخت شناسی اسپرم در غلظت‌های پایین تا

متوسط ژله رویال حاکی از آن است که این ماده به تثبیت ساختار سلولی و کاهش آسیب‌های فیزیکی ناشی از فرایند انجماد کمک می‌کند. این اثرات احتمالاً به دلیل حضور ترکیبات بیواکتیو نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها، فنولیک‌ها و فلاونوئیدها است که یکپارچگی غشاهای سلولی را حفظ کرده و از تغییرات غیرطبیعی در ساختار سلولی جلوگیری می‌نمایند (الششتاوی و همکاران ۲۰۲۳).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم به عنوان یک جزء محوری در قلمرو ارزیابی کیفیت اسپرم پس از انجماد برجسته می‌شود. میزان یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم بسته به روش‌ها و شرایط خاص انجماد مورد استفاده از جمله روش‌های انجمادی، عوامل آنتی‌اکسیدانی، رقیق‌کننده‌ها و غیره می‌تواند متفاوت باشد. تنها عامل محافظ سرمایی مورد استفاده در روش قطره‌ای ساکارز است که می‌تواند مستقیماً با لیپیدها و پروتئین‌های غشای اسپرم تعامل داشته باشد و رفتار انتقال فاز و حالت هیدراتاسیون آنها را تغییر دهد، بنابراین به تثبیت غشاء در طول فرآیند انجماد و ذوب کمک می‌کند (آنجوس و همکاران ۲۰۲۱)، زمانی که سلول‌های اسپرم در معرض شوک سرما قرار می‌گیرند، احتمال انتقال فاز لیپیدهای غشایی به طور قابل توجهی در افزایش می‌یابد که منجر به کاهش قابل توجهی در زنده‌مانی و افزایش آپوپتوزیس سلولی می‌شود (ریکر و همکاران ۲۰۰۶). یافته‌های ما نشان داد که ژله رویال ۱٪

اثرات محافظتی بهتری بر یکپارچگی DNA و کاهش آپوپتوزیس دارد. در مقابل، غلظت ژله رویال ۵٪ به طور قابل توجهی باعث افزایش تکه تکه شدن DNA در طول فرآیند منجمد-ذوب اسپرم زنبوران نر شد. به دنبال نتایج پژوهش حاضر مطالعات قبلی نشان داده است که گنجاندن ژله رویال در رژیم غذایی خروس (رهنما و همکاران ۲۰۲۰ و هداوند و همکاران ۲۰۲۱) یا استفاده از آن به عنوان مکمل در فرآیند انجماد، با کاهش آسیب‌های ناشی از سرمازدگی، یکپارچگی DNA اسپرم را در سایر گونه‌ها نیز بهبود می‌بخشد (صابری‌وند و همکاران ۲۰۲۲ و الششتاوی و همکاران ۲۰۲۳). ژله رویال به دلیل خواص بیولوژیکی و ترکیبات فنلی مانند لینورون، آندروگرافولید، ۱،۲-بنزن دی کربوکسیلیک اسید، دی ایزواکتیل استر، استراگول و ترانس آنتول، دارای قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد که از اسپرم در برابر اثرات مضر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. این ترکیبات پلی‌فنلی فرایندهای اکسیداتیو را از طریق مکانیسم‌های مختلف، از جمله مهار گونه‌های فعال اکسیژن، مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز، لیپوکسیژناز، نیتریک اکسید سنتاز و گزانتین اکسیداز و همچنین اتصال یون‌های فلزی به ساختارهای زیستی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA را مختل می‌کنند (لودوویچی و همکاران ۲۰۰۱) و ژله رویال می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش دهند که این فرآیند بر فعالیت میتوکندری و یکپارچگی DNA و کاهش آپوپتوزیس اسپرم کمک می‌کند (کارادنیز و همکاران ۲۰۱۱). همچنین ژله رویال الگوی بیان رونوشت‌های مرتبط با آپوپتوزیس (Bax و p53) در تخمک‌های بز را سرکوب کرد و فراوانی رونوشت ژن ضد آپوپتوزیس (Bcl-2) را پس از افزودن ژله رویال بر محیط بلوغ تخمک افزایش داد (ال نکیتی و همکاران ۲۰۰۷ و سیلیسی و همکاران ۲۰۰۹). از سوی دیگر، سطوح بالای ژله رویال در مطالعه حاضر باعث افزایش آپوپتوزیس اسپرم زنبوران نر در طول انجماد شد. این یافته نشان می‌دهد که مقدار بیش از حد

آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند منجر به کاهش تعادل اکسیداسیون و عملکرد سلولی را مختل کند (بوئید و بون ۲۰۱۰). که در نهایت منجر به قطعه قطعه شدن DNA و ناهنجاری کروموزومی می‌شود (مارکتی و همکاران ۲۰۰۲). بنابراین، نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات قبلی اثر آنتی‌اکسیدانی مفید ژله رویال در کاهش بروز آپوپتوزیس را تأیید می‌کند و همچنین استفاده از ۱ درصد ژله رویال در زمان‌های مختلف (۹۰، ۳۰۰ روز) پس از مرحله انجماد و گرم کردن، آپوپتوزیس اسپرم را نسبت به گروه کنترل کاهش داد. کاهش آپوپتوزیس اسپرماتوزوای تیمار شده با ژله رویال به ویژه در غلظت ۱٪، نشان‌دهنده اثرات حفاظتی قوی این ماده است که می‌تواند به کاهش استرس اکسیداتیو و جلوگیری از فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزیس کمک کنند. در این تحقیق فقط از عوامل انجماد غیرنفوذی برای افزایش انعطاف‌پذیری غشای پلاسمایی در فرآیند انجماد استفاده شد. حذف عوامل انجمادی نفوذی که بر غشای پلاسمایی، آکروزوم و DNA اسپرم تأثیر می‌گذارد و ممکن است دلیل کاهش آپوپتوزیس باشد (موری و گیسون ۲۰۲۲).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن ۱٪ و ۲/۵٪ ژله رویال به رقیق‌کننده انجمادی به طور قابل توجهی کیفیت اسپرم زنبوران نر با استفاده از انجماد شیشه‌ای بدون سرما محافظ به روش قطره‌ای را افزایش می‌دهد. نتایج تأکید دارند که ژله رویال به عنوان افزودنی مؤثر در انجماد اسپرم عمل می‌کند. استفاده از روش‌های پیشرفته مانند آنالیز کامپیوتری و فلوسیتومتری برای مطالعات آینده ضروری است. مکمل ژله رویال راهکاری امیدوارکننده برای حفظ تنوع ژنتیکی زنبور عسل و بهبود کیفیت اسپرم پس از ذوب ارائه می‌دهد. تحقیقات آینده باید بر بهینه‌سازی روش‌های انجماد و بررسی تأثیرات بلندمدت ۱٪ ژله رویال بر باروری ملکه متمرکز شوند تا از پرورش زنبورداری پایدار و حفظ تنوع زیستی بهتر حمایت شود.

تشکر و قدردانی

کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان که ما را در انجام

این تحقیق یاری کردند، صمیمانه تشکر می‌کنیم.

از مساعدت کارکنان دانشکده دامپزشکی تبریز، دانشکده

کشاورزی رازی کرمانشاه و مرکز تحقیقات، آموزش

References

- Abdelnour S, Abd El-Hack ME, Alagawany M, Taha AE, Elnesr S, Abd Elmonem OM, Swelum A, 2020. Useful impacts of royal jelly on reproductive sides, fertility rate and sperm traits of animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 104(6): 1798-1808.
- Abu D Abu Hassan H, Franken B, Hoffman R, Henkel R, 2012. Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function. *Andrologia* 44: 571-577.
- Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, Sarasa J, Romero A, Fernández MA, Gómez-Torres MJ, 2017. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human Reproduction* 32(10): 2007-2015.
- Alcay S, Cakmak S, Cakmak I, Mulkpınar E, Gokce E, Ustuner B, Sen H, Nur Z, 2019. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology* 87: 28-31.
- Alcay S, Toker N, Onder T, Gokce E, 2017. Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology* 74: 81-85.
- Amer M, Ismail S, GamalEl Din EF, Rashad EZ, Abd El Hakim W, Ragab A, 2021. Effect of cryoprotectant-free vitrification versus conventional freezing on human testicular sperm motility: a prospective comparative study. *Human Fertility* 24(5): 389-394.
- Andraszek K, Smalec E, 2011. The use of silver nitrate for the identification of spermatozoon structure in selected mammals. *Canadian Journal of Animal Science* 91(2): 239-246.
- Anjos C, Santos AL, Duarte D, Matias D, Cabrita E, 2021. Effect of trehalose and sucrose in post-thaw quality of *Crassostrea angulata* sperm. *Frontiers in Physiology* 12: 749735.
- Botezan S, Baci GM, Bagameri L, Paşca C, Dezmirean DS, 2023. Current status of the bioactive properties of royal jelly: a comprehensive review with a focus on its anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant effects. *Molecules* 28(3): 1510.
- Bouayed J, Bohn T, 2010. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3(4): 228-237.
- Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M, 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research* 89(1): 24-30.
- Çakmak S, Nur Z, 2015. Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. *Theriogenology* 83(4): 698-704.
- Clermont A, Eickermann M, Kraus F, Georges C, Hoffmann L, Beyer M, 2014. A survey on some factors potentially affecting losses of managed honey bee colonies in Luxembourg over the winters 2010/2011 and 2011/2012. *Journal of Apicultural Research* 53(1): 43-56.
- Cobey SW, Tarpay DR, Woyke J, 2013. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research* 52(4): 1-18.
- Collazo N, Carpena M, Nuñez-Estevez B, Otero P, Simal-Gandara J, Prieto MA, 2021. Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens. *Nutrients* 13(2): 543.
- Collins A, Donoghue A, 1999. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology* 51(8): 1513-1523.
- Collins AM, 2000. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie* 31(3): 421-429.
- Collins AM, 2004. Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *Journal of Apicultural Research* 43(4): 167-171.
- El-Nekeety A, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra HA, Abdel-Wahhab MA, 2007. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon* 50(2): 256-269.

- Elsheshtawy R, El-Aziz A, Tamer I, Nasr SM, 2023. Comparative study of royal jelly, turmeric, and wheat germ extenders on the cryosurvivability, sperm resistance, antioxidants, and fertility in cattle bulls. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences* 54(5): 883-893.
- Essani K, 2019. Stressing Cells: The Role of Cryoprotectants in ATMP Cryopreservation.
- Garner D, Johnson L, Yue S, Roth B, Haugland R, 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology* 15(6): 620-629.
- Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri R, 2017. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology* 5(5): 845-862.
- Gül A, Şahinler N, Onal AG, Hopkins BK, Sheppard W S, 2017. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology* 101: 109-113.
- Gulov A, Kolchaeva I, 2023. Long-term cooling (for a year or more) the sperm of honey bee drones. *Russian Agricultural Sciences* 49(5): 536-541.
- Hadavand Mirzaei A, Deldar H, Ansari Pirsaraei Z, Shohreh B, 2021. Royal jelly may improve sperm characteristics during preservation of rooster semen: Gene expression of antioxidant enzymes. *Reproduction in Domestic Animals* 56(4): 658-666.
- Hopkins BK, Herr C, 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie* 41(5): 548-556.
- 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.
- Iljenkaite A, Kerzienė S, Dauksiene A, Mikniene Z, Žilinskas H, Sutkeviciene N, 2020. The effect of royal jelly on boar sperm viability and motility during liquid storage for 96 hours. *Acta Veterinaria Brno* 89(1): 47-53.
- Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko E, 2019. Technologies for Cryoprotectant-Free Vitrification of Human Spermatozoa: Asepticity as a Criterion for Effectiveness. In *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices*: 643-654.
- Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M, 2011. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2011.
- Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I, 2018. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018.
- Kondracki S, Banaszewska D, Mielnicka C, 2005. The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *Cell Mol Biol Lett* 10(1): 3-13.
- Liu JR, Yang YC, Shi LS, Peng CC, 2008. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(23): 11447-11452.
- Liu X, Xu Y, Liu F, Pan Y, Miao L, Zhu Q, Tan S, 2021. The feasibility of antioxidants avoiding oxidative damages from reactive oxygen species in cryopreservation. *Frontiers in Chemistry* 9: 648684.
- Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, Dolara P, 2001. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 39(12): 1205-1210.
- Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P, 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction* 17(5): 1257-1265.
- Murray K A, Gibson M I, 2022. Chemical approaches to cryopreservation. *Nature Reviews Chemistry* 6(8): 579-593.
- Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, Mallmann P, Dattena M, Capobianco G, Peters D, 2002. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *CryoLetters* 23(2): 93-102.
- Pegg D, 2002. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York.
- Pettis JS, Rice N, Joselow K, vanEngelsdorp 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.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 25(6): 345-353.

- Power K, D'Anza E, Martano M, Albarella S, Ciotola F, Peretti V, Maiolino P, 2019. Morphological and morphometric analysis of the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*) spermatozoa: A preliminary study in Campania region. *Nucleus* 4: 0.61.
- Rahnama G, Deldar H, Ansari Pirsaraei Z, Kazemifard M, 2020. Oral administration of royal jelly may improve the preservation of rooster spermatozoa. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 104(6): 1768-1777.
- Ricker J, Linfor J, Delfino W, Kysar P, Scholtz E, Tablin F, Crowe J, Ball B, Meyers S, 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction* 74(2): 359-365.
- Saberivand A, Pashapour S, Noghani AE, Namvar Z, 2022. Synergistic effect of royal jelly in combination with glycerol and dimethyl sulfoxide on cryoprotection of Romanov ram sperm. *Cryobiology* 104: 87-97.
- Shahzad Q, Mehmood MU, Khan H, Husna A ul, Qadeer S, Azam A, Naseer Z, Ahmad E, Safdar M, Ahmad M, 2016. Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm. *Animal Reproduction Science* 167: 83-88.
- Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtas A, 2009. Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology* 74(3): 545-551.
- Soroker V, Hetzroni A, Yakobson B, David D, David A, Voet H, Slabezki Y, Efrat H, Levski S, Kamer Y, 2011. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie* 42(2): 192-199.
- Tarliyah L, Boedino A, Walujo D, 1999. Motility of honeybee *Apis mellifera* L. spermatozoa in various storage temperature in dilution media containing different glucose levels. *Media Veteriner* 6: 15-20.
- Tarpy DR, Olivarez Jr R, 2014. Measuring sperm viability over time in honey bee queens to determine patterns in stored-sperm and queen longevity. *Journal of Apicultural Research* 53(4): 493-495.
- Wang M, Todorov P, Wang W, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Isachenko V, 2022. Cryoprotectants-free vitrification and conventional freezing of human spermatozoa: a comparative transcript profiling. *International Journal of Molecular Sciences* 23(6): 3047.
- Wang Y, Wang Z, Liu X, Chi X, Xu B, 2023. Effects of sucrose feeding on the quality of royal jelly produced by honeybee *Apis mellifera* L. *Insects* 14(9): 742.
- Wegener J, Bienefeld K, 2012. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology* 77(3): 600-607.