

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 741**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/076 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2016 PCT/US2016/029351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16176200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2016 E 16786993 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3288378**

54 Título: **Uso de savia de árbol para conservar líneas celulares espermáticas**

30 Prioridad:

27.04.2015 US 201562153197 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.10.2020

73 Titular/es:

**CRYOSAPS LLC (100.0%)
206 West Main Street
Waterford, WI 53185, US**

72 Inventor/es:

ROBINSON, MEG, A.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 788 741 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de savia de árbol para conservar líneas celulares espermáticas

5 Antecedentes

En general, la presente invención se refiere al uso de savia de árbol para crioconservar celulares espermáticas de aves y mamíferos, preferentemente para su uso en la industria avícola, en la conservación de aves de presa y en la conservación de especies aviares amenazadas o en peligro. La presente invención se puede usar también en la industria bovina, la industria porcina, la industria equina y en medicina veterinaria de mamíferos.

Los espermatozoides de las aves tienen una forma que hace que sean difíciles de congelar. Los espermatozoides son largos y delgados y tienen forma de látigo. Esto hace que las células sean muy susceptibles a las lesiones criogénicas ya que tienen un área superficial muy grande que puede ser dañada con facilidad durante la congelación o el procesamiento. El espermatozoide de mamíferos también se beneficiará de la presente invención, ya que, incluso aunque estas células son más fáciles de congelar, siguen siendo susceptibles a lesiones debidas a los procesos criogénicos. (Referencia; "Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges?", J.A. Long, 2006 Laboratorio de biotecnología y germoplasma, Instituto de Recursos Naturales y Animales, Centro de investigación agrícola de Beltsville, Servicio de investigación agrícola, DAEU, Beltsville, MD 20705, 2006 Asociación de ciencias avícolas, Inc., aceptado el 10 de septiembre de 2005).

Actualmente, se congelan espermatozoides de ave utilizando diversas técnicas. Una técnica emplea la adición de un crioprotector a un medio fluido que suspende y sustenta a las células. La primera etapa del procedimiento es recoger el semen y añadirle después un extensor líquido. Un extensor de semen es un diluyente líquido que se añade al semen para mantener su capacidad de fertilización. El extensor permite transportar el semen hasta la hembra, en lugar de tener que aproximar el macho y la hembra entre sí. Un extensor de congelación especial permite también la crioconservación del espermatozoide ("semen congelado"), que se puede transportar para su uso, o para usar *in situ* en una fecha posterior.

La mezcla extensor/células se coloca después en un refrigerador para enfriar la mezcla hasta una temperatura deseada que permita a las células alinear los componentes lipídicos en su membrana celular externa antes de la congelación. Esto es una forma de "aclimatación al frío" y ayuda a las células a sobrevivir al proceso criogénico. El método reduce también la disminución del gradiente térmico, por el que han de pasar las células antes de alcanzar el punto de congelación, y reduce el daño celular cuando son congeladas.

Una vez que las células se han enfriado/aclimatado, se añade el crioprotector a la mezcla extensor/células, la mezcla se envasa rápidamente y, o bien se somete a congelación ultrarrápida mediante inmersión rápida en el nitrógeno líquido, se granula y se congela de forma ultrarrápida y después se envasa en crioviales, o bien se suspende sobre el nitrógeno líquido y se expone a los vapores para una congelación más lenta antes de su inmersión en el nitrógeno líquido. Se puede efectuar la congelación rápida y la congelación lenta en función de los requerimientos de la especie. Los diferentes crioprotectores que se añaden a la mezcla incluyen habitualmente DMSO (dimetilsulfóxido), MA (metilacetamida) y DMA (dimetilacetamida). Estos compuestos químicos actúan como crioprotectores intracelulares mientras que los compuestos químicos a los que no es permeable la pared celular actúan como crioprotectores extracelulares. Estos son conocidos también por dañar la pared celular durante la crioconservación y perjudicar la fertilidad.

En la técnica sigue siendo necesario un modo mejor y más eficaz para conservar el semen de aves y mamíferos. Los siguientes documentos también hacen referencia a:

- Blanco *et al.* (2012) *Animal Reproduction Science*, 131 (1-2): páginas 1-8 relativas a los efectos de las velocidades de congelado y descongelado sobre la criosupervivencia de espermatozoides de pavo y de grulla canadiense; y
- KR-A-2012/0123213 relativo a una composición para la conservación de espermatozoides aviar y a un método de conservación que emplea la misma.

55 Sumario de la invención

En una realización, la presente invención es un método de crioconservación de semen que comprende (a) combinar el espermatozoide que se va a crioconservar y una composición que comprende (1) un crioprotector, que comprende una o más savias de árbol; y (2) un medio extensor para producir una combinación espermatozoide/medio y (b) someter la combinación a condiciones que lleven a la crioconservación del espermatozoide, produciendo así una combinación crioconservada que comprende espermatozoides crioconservados. En una versión de la invención, el espermatozoide es espermatozoide aviar. En una versión, el espermatozoide procede del azor del norte (*Accipiter gentilis*).

En otra versión de la invención, el espermatozoide procede de una especie mamífera no humana, seleccionada preferentemente entre el grupo que consiste en vacas, cerdos y caballos.

En una versión de la invención, la savia es savia de arce o savia de abedul, preferentemente savias de primer flujo.

5 En una versión, la presente invención es la combinación crioconservada resultante del método descrito anteriormente.

10 En otra versión, la presente invención es un método de fertilización de un óvulo que comprende las etapas de descongelar una combinación crioconservada producida mediante el método de la invención e introducir la combinación en un óvulo no fertilizado, en el que el óvulo llega a ser fertilizado. En una versión adicional, la invención es una composición que comprende una mezcla de un medio de conservación y esperma, en la que el medio de conservación comprende: (1) un crioprotector, que comprende una o más savias de árbol; y (2) un medio extensor.

15 **Descripción de la invención**

En general, la presente invención es un método y un medio que son útiles para la crioconservación de esperma que emplean savias de árbol. En otra realización, la presente invención es una composición que comprende la mezcla del medio de conservación y el esperma, que emplea savias de árbol.

20 Aunque la presente invención es útil para todos los espermatozoides animales, la invención se usa más preferentemente con esperma aviar debido a las especiales necesidades fisiológicas de las muestras aviares. Especies aviares preferentes incluyen aves de presa (tales como falconiformes y estirigiformes) y especies comerciales tales como pavos, pollos (galliformes) y patos (anseriformes). Otras especies aviares preferentes incluyen, si bien no se limitan a las mismas, paseriformes y psitaciformes.

25 En otra versión de la invención, puede ser deseable conservar el esperma de otras especies mamíferas que incluyen vacas (familia de los bóvidos), cerdos (familia de los suidos), caballos (familia de los equinos) y aplicaciones en medicina veterinaria, incluyendo especies caninas (cánidos) y felinas (félidos).

30 Un método de crioconservación de esperma que comprende: (a) combinar el esperma que se va a crioconservar y una composición que comprende (1) un crioprotector, que comprende una o más savias de árbol; y (2) un medio extensor para producir una combinación esperma/medio; y (b) someter la combinación a condiciones que lleven a la crioconservación del esperma, produciendo así una combinación crioconservada que comprende esperma crioconservado.

35 El extensor de esperma habitual contiene normalmente compuestos químicos para estabilizar y proteger las membranas celulares. Los ejemplos que siguen emplean la fórmula del extensor de pavo de Beltsville (*Beltsville Turkey Extender* o BTE) con la excepción de que se elimina la fructosa como ingrediente. La fructosa se sustituyó por sacarosa y constituye una fórmula de extensor aparte, también una realización preferente de la presente invención. Se encontró que al semen de azor no le iba bien con la fructosa como fuente de energía cuando se sometía a crioconservación. Esta observación es cierta también para otras líneas celulares animales.

La fórmula del extensor preferente para el semen de azor, y otras muestras de semen aviar normales, consiste en

| |
|--|
| Difosfato de potasio 3H ₂ O 12,7 gramos |
| Glutamato de sodio 8,675 gramos |
| Sacarosa para sustituir a la fructosa (anhidra) 5,000 gramos |
| Acetato de sodio 3H ₂ O 4,255 gramos |
| TES 1,95 gramos |
| Ácido N-tris-hidroximetil-metil-2-amino-etanosulfónico |
| Citrato de potasio 0,64 gramos |
| Monofosfato de potasio 0,65 gramos |
| Cloruro de magnesio 0,338 gramos |
| Agua purificada, se añaden 1022 ml a los ingredientes secos. |

45 Esto constituye una fórmula completa del extensor preferente para semen de azor para crioconservación. La sacarosa se excluye a menudo de esta fórmula y se suministra simplemente mediante la adición de savias de árbol que contienen sacarosa de forma natural. Otras fórmulas de base pueden ser preferentes para otras líneas celulares en otras especies de modo que cumplan los requerimientos específicos de la especie. El azúcar suministrado a la

fórmula puede proceder de la savia como en la lista de ejemplos de la hoja de cálculo Excel.

La presente invención implica el uso de savia de árbol como crioprotector. La savia de árbol es un fluido transportado en células del xilema (traqueidas o elementos de los vasos) o en elementos de tubos cribosos del floema de una planta. Se definen dos tipos de savia: la savia del xilema y la savia del floema. En la presente definición se incluyen ambos tipos de savia.

La savia de árbol se produce en un momento del año en el que los árboles están sometidos a estrés por frío y a congelación en intervalos de temperatura que son muy dañinos para las células que los inventores están intentando congelar. Los árboles sobreviven a temperaturas desde el punto de congelación hasta $-51\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-60\text{ }^{\circ}\text{F}$). Los árboles sobreviven también a los cambios diarios de las temperaturas en los que el árbol puede sobrevivir a temperaturas por encima del punto de congelación o por debajo del mismo. La savia de árbol tiene propiedades que le permiten sustentar la vida celular incluso cuando está congelada y cuando pasa por rigurosos ciclos de congelación y descongelación y temperaturas extremas diariamente. Contiene varios azúcares, proteínas anticongelantes, carbohidratos, minerales, compuestos fenólicos y otros compuestos que proporcionan propiedades crioprotectoras. Algunos de estos compuestos ya han sido descritos.

Las especies de árboles que son más útiles en la presente invención incluyen especies de arce resistentes al frío, especies de abedul, especies de chopo, especies de álamo temblón y otros árboles que pueden ser sangrados o de los que se pueden extraer compuestos químicos o fluidos. Se incluyen las especies de árboles de los bosques caducifolios de mayor latitud aunque no se mencionen de forma directa en el presente documento.

Un factor común de estos árboles es la cantidad de azúcar en la savia. Los azúcares tienen propiedades crioprotectoras. Algunas fórmulas de extensor aviar requieren a menudo un 0,5 % de sacarosa o de fructosa. La mayoría de las especies de árboles cumplen o superan este requerimiento de porcentaje de azúcar. El arce presenta un intervalo desde aproximadamente un 0,5 % a un 4,0 % de sacarosa. Otro factor común que tienen estos árboles es que tienen compuestos crioprotectores distintos al azúcar en su savia. Estos compuestos químicos pueden proporcionar mayores propiedades crioprotectoras que los azúcares simples que se miden fácilmente.

Hay más de 128 especies de arce en todo el mundo. El arce azucarero (*Acer saccharum*) y el arce negro (*Acer nigrum*) producen la mayor parte del azúcar en sus savias. El arce rojo (*Acer rubrum*) y el arce plateado (*Acer saccharinum*) producen menos azúcar pero están en latitudes en las que probablemente posean propiedades crioprotectoras similares en su savia. Estas dos últimas especies son una de las versiones preferentes de la presente invención debido a su menor contenido de azúcar y a sus potencialmente superiores propiedades crioprotectoras en la savia que no proceden de los azúcares.

Las especies de abedul (Familia *Betulaceae*, Género *Betula*), chopo (Familia *Salicaceae*, Género *Populus*) y álamo temblón (Familia *Salicaceae*, Género *Populus*) proceden de latitudes mayores de los Estados Unidos y Canadá y tienen un menor contenido de azúcar en su savia que las especies de arce (especies de *Acer*). Los compuestos químicos crioprotectores distintos al azúcar presentes en su savia probablemente estarán en mayor cantidad ya que estas especies sobreviven en un medio más extremo con intervalos de temperatura que varían ampliamente por debajo del punto de congelación, y los árboles tienen un menor contenido en su savia de azúcares conocidos por ser crioprotectores.

Veintitrés especies de árboles que pueden ser sangrados en Estados Unidos y que son útiles en la presente invención incluyen, si bien no se limitan a los mismos, el arce azucarero (*Acer saccharum*), arce negro (*Acer nigrum*), arce rojo (*Acer rubrum*), arce plateado (*Acer saccharinum*), arce de Noruega (*Acer platanooides*), arce negundo (*Acer negundo*), arce de hoja grande (*Acer macrophyllum*), arce cañón o arce de dientes grandes (*Acer grandidentatum*), arce de las Montañas Rocosas (*Acer glabrum*), gorosoe (*Acer mono*), nogal gris americano o nogal blanco americano (*Juglans cinerea*), nogal negro americano (*Juglans nigra*), nogal japonés (*Juglans ailantifolia*), nogal inglés (*Juglans regia*), abedul papirífero (*Betula papyrifera*), abedul amarillo (*Betula alleghaniensis*), abedul negro (*Betula lenta*), abedul de río (*Betula nigra*), abedul gris (*Betula populifolia*), abedul blanco europeo (*Betula pendula*), sicomoro (*Platanus occidentalis*), arce de Manchuria, y carpe negro o falso carpe (*Ostrya virginiana*).

Preferentemente, se empezaría con fórmulas de extensor diseñadas para la conservación o almacenamiento de esperma animal. Normalmente, la cantidad inicial de savia añadida a la fórmula de extensor modificada constituirá la solución inicial fisiológicamente próxima a la osmolaridad del semen crudo y proporcionará crioprotección a las células. El intervalo de osmolaridad inicial requerido se determina mediante la medición de la osmolaridad del semen crudo.

El semen de azor tiene una osmolaridad de aproximadamente 341 miliosmoles. Adiciones posteriores de combinaciones extensor/savia aumentan la osmolaridad de la mezcla para deshidratar las células inmediatamente antes de congelar. La deshidratación de las células justo antes de su congelación, aumenta su supervivencia.

Se determina un nivel ideal de osmolaridad mediante los resultados finales de la supervivencia de las células en cuestión y la capacidad de la muestra almacenada para crear gametocitos femeninos fértiles. Es conocido que

diferentes especies de aves tienen células espermáticas que toleran extremos de osmolaridad diferentes. Algunos espermatozoides aviares sobreviven a una osmolaridad muy elevada y otros no. [Véase "Species Variation in Osmotic, Cryoprotectant, and Cooling Rate Tolerance in Poultry, Eagle, and Peregrine Falcon Spermatozoa"; Juan M. Blanco, George Gee, David E. Wildt, y Ann M. Donoghue; *Biology of Reproduction*, 1 Oct de 2000, Vol. 63 n.º 4 1164-1171]. El uso de la savia permite eliminar otros crioprotectores tóxicos de la mezcla y/o reducir la cantidad de crioprotectores tóxicos usados. Además, puede ser deseable añadir crioprotectores adicionales a la mezcla.

Una combinación esperma/savia-extensor normal de la presente invención es la siguiente: El volumen final de la combinación esperma/savia-extensor no debe ser superior a diluciones 1:3 constituyendo el semen un cuarto del volumen final. Diluciones del semen mayores que esta pueden afectar a la fertilidad por simple dilución.

En una versión preferente de la invención, la savia comprende al menos un 30 % de la combinación final esperma/savia-extensor. En otra versión de la invención, la savia comprende al menos un 10-80 % de la combinación final esperma/savia-extensor, preferentemente aproximadamente un 50 %.

La dilución en exceso reduce la fertilidad espermática de la muestra. La cantidad de savia necesaria para proporcionar crioprotección a la mezcla varía considerablemente debido a la variación entre las especies de árboles en cuanto a tipos y propiedades de los crioprotectores.

El presente inventor ha estado modificando la fórmula del extensor lo suficiente como para permitir que la savia se combine en la mezcla de modo que esta mezcla sustente las células cuando son congeladas en nitrógeno líquido (N₂L) con o sin el uso de un crioprotector adicional. Un ejemplo normal de extensor incluye los ingredientes secos del extensor de pavo de Beltsville sin la fructosa (BTE menos fructosa) como fórmula de base con la que trabajar.

La savia del arce y del abedul se añadieron después al BTE menos fructosa y se usó en diferentes proporciones a fin de conservar las células espermáticas. Una fórmula que conservó bien las células en N₂L incluía 1 parte de semen crudo, 1 parte de BTE menos fructosa con un 0,5 % de sacarosa añadida de nuevo, 2 partes de BTE menos fructosa con savia añadida, a fin de suministrar su volumen líquido. El esperma y el BTE menos fructosa con un 0,5 % de sacarosa añadida de nuevo; se mezclaron en un vial Eppendorf de 0,5 ml en el refrigerador. El volumen correspondiente de BTE menos fructosa con savia como su diluyente líquido se colocó también en el refrigerador aunque en un tubo separado. Se dejaron equilibrar ambos tubos a una temperatura igual durante 10 minutos antes de mezclarlos, envasarlos y someterlos a congelación ultrarrápida. La operación se efectuó en el refrigerador a 6 °C (42 °F) de modo que no hubiera fluctuaciones de temperatura que estresaran al semen. Esta forma de "aclimatación" al frío permite a los componentes lipídicos de la pared celular alinearse antes de su congelación para ayudar a prevenir daños de la estructura celular.

Por tanto, una versión preferente de la presente invención comprende una composición, en la que 1 parte del volumen es semen crudo; 1 parte del volumen es extensor, tal como BTE sin fructosa, más un 0,5 % de sacarosa añadida de nuevo; y 2 partes del volumen total era BTE sin fructosa con savia de arce o de abedul. Preferentemente se debe usar en esta mezcla un mínimo de un 50 % de savia en volumen. Las muestras con un 50 % de savia en volumen tenía una supervivencia mucho mejor tras descongelar que las muestras con un porcentaje menor.

El envasado consistió en la colocación del semen en un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar con uno de los extremos sellado. El extremo opuesto se mantuvo abierto. Este tubo capilar se colocó después dentro de una pajuela para aves de plástico convencional y el extremo opuesto del algodón se dobló para cerrarlo. A continuación, la pajuela para aves se colocó dentro de una pajita de plástico que tenía orificios practicados en los laterales. Estos orificios permitían que el N₂L entrara y rodeara rápidamente la pajuela para aves a medida que se sumergía esta. Los orificios en la pajita permitían también al envase drenar y respirar a medida que se descongelaba para no explotar.

La crioconservación se puede llevar a cabo en cualquier momento después de la producción de la combinación medio/esperma siempre que el almacenamiento no afecte negativamente a la viabilidad del esperma. Por ejemplo, la crioconservación se puede llevar a cabo a menudo en un periodo de hasta 180 minutos tras la producción de la combinación esperma/medio sin pérdida de fertilidad. Las muestras deben enfriarse para extender la vida útil antes de congelar. Una temperatura normal para almacenar semen aviar es 5 °C. El enfriamiento del semen ayuda a que se alineen los componentes lipídicos de la pared celular antes de su congelación. Esto aumenta la supervivencia de las células.

La conservación se efectúa normalmente a una temperatura de -198 °C. En realizaciones específicas, la crioconservación se efectúa a una temperatura entre aproximadamente -80 °C y aproximadamente -198 °C. En una realización preferente, la crioconservación tiene lugar en un baño/cartucho de nitrógeno líquido y los viales se almacenan a -198 °C. El almacenamiento a largo plazo se puede conseguir colocando los viales o pajuelas de almacenamiento en un cartucho de nitrógeno líquido. Sería deseable usar el esperma conservado para fertilizar un gametocito femenino, célula germinal femenina u óvulo.

Antes de usar el esperma para inseminación artificial o de incubarlo con un gameto femenino, normalmente el

esperma se descongela y también se puede lavar. Las muestras de esperma se descongelan a menudo en baños de agua fría o de agua templada, estando determinados los requerimientos de temperatura por los requerimientos de las células de la especie y por el tipo de crioprotector usado en la mezcla. Los espermatozoides aviares se descongelan normalmente en baños de agua helada o en baños de agua fría y los espermatozoides bovinos se descongelan normalmente en baños de agua templada que es la temperatura corporal. La inseminación se efectúa inmediatamente después de la descongelación. El esperma se concentra a veces en gránulos con los contenidos de diferentes pajuelas combinados y se centrifuga para formar un gránulo de semen.

En todas las realizaciones descritas en el presente documento, el esperma crioconservado resultante se puede almacenar indefinidamente.

La capacidad de fertilización o la capacidad del esperma se pueden evaluar empleando métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como métodos *in vitro*, que incluyen evaluar la capacidad para fertilizar los oocitos/gametos femeninos con los que se combinan/incuban (su capacidad para formar embriones, por ejemplo) y/o métodos *in vivo*, que incluyen evaluar la producción de crías por las hembras en las que se han implantado los oocitos/gametos femeninos fertilizados (mamíferos). La capacidad de fertilización o la capacidad se pueden evaluar empleando métodos disponibles tales como un ensayo funcional que incluye, si bien no se limita a los mismos, un ensayo de motilidad, un ensayo de viabilidad, un ensayo de hemizona (unión del esperma a la zona pelúcida), o penetración del semen en oocitos de aves o mamíferos sin zona.

La comercialización de la crioconservación de semen aviar ha evitado a los científicos durante décadas. El proceso de congelación no ha tenido el suficiente éxito. Artículos recientes citan aproximadamente de un 35 a un 40 % de motilidad del semen después de descongelar. Véase; "Comparative cryopreservation of avian spermatozoa; Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival". de Juan M. Blanco, Julie Long, George Gee, David E. Wildt, Ann M. Donoghue. Recibido el 24 de mayo de 2010. Aceptado el 10 de diciembre de 2010. Elsevier B.V.

La presente invención, que comprende la mejora del empleo de savia como único crioprotector, demostró a menudo más de un 50 % de supervivencia basada en las tinciones vivos/muertos efectuadas después de descongelar las muestras. Algunos ejemplos mostraban hasta un 73 % de supervivencia tras descongelar sin el uso de un crioprotector adicional. Tras combinar esta exitosa idea con las otras exitosas ideas de la ciencia en la actualidad, la supervivencia del semen probablemente será lo suficientemente elevada como para constituir una empresa de crioconservación de semen comercialmente viable.

Otras especies animales se beneficiarán probablemente de esta invención también. Existen numerosos artículos de científicos intentando congelar el semen de otras especies animales con éxito limitado. El empleo de savia de árbol recolectada en el primer deshielo del invierno y usada en crioconservación de líneas celulares es un éxito excitante y ahora documentado. El éxito de este proceso se debe evaluar también basado en la mejora de la fertilidad y la capacidad de eclosión de los huevos producidos por hembras inseminadas con semen congelado.

Ejemplos

En general, la presente invención se refiere al uso de savia de árbol para crioconservar líneas de esperma aviar, preferentemente para su uso en la industria avícola, en la conservación de aves de presa y en la conservación de especies aviares amenazadas o en peligro y otras especies aviares. También es útil en cerdos (familia de los suidos), vacas (familia de los bóvidos), caballos (familia de los equinos) perros (familia de los cánidos) y gatos (familia de los félidos).

La tabla 1 contiene los resultados de muchas pruebas experimentales. En general, se obtuvo savia de arce de árboles nativos del suroeste de Wisconsin. La osmolaridad del arce # 3 es de 100 miliosmoles.

Los ingredientes secos crudos para el medio preferente fueron los siguientes: La fórmula del extensor de pavo de Beltsville sin la fructosa; tenía savia de arce o savia de abedul añadida para un volumen final de 100 ml. (el inventor añadió 90 ml de savia para conseguir un volumen final de los ingredientes secos y húmedos totales de 100 ml).

El inventor comenzó con un conjunto de ingredientes secos que era para 1/10 de la fórmula convencional enumerada anteriormente. Añadió 90 ml de savia de arce a un frasco y 90 ml de savia de abedul a otro frasco para tener un volumen final de 100 ml en cada frasco. No se añadió ningún otro crioprotector a la mezcla. La fructosa se había eliminado de modo que la fuente de energía para el semen provenía de la sacarosa que ya había en la savia. Las células que se están intentando conservar no parecen metabolizar bien la fructosa y necesitan sacarosa en la fórmula para sobrevivir a la congelación.

La savia se usó con su concentración máxima en los frascos de reserva, aunque se usó en diferentes proporciones cuando se añadió al semen crudo. A veces se usó una dilución 1:1:2 (1 parte de semen: 1 parte de BTE sin fructosa, más un 1/ % de sacarosa: 2 partes de BTE más savia); a veces se usó una dilución 1:1:1. A veces se usó una dilución 1:1:1 en donde la mezcla final era de un 33 % de semen y un 66 % de savia, añadiendo la savia a la mezcla

de base y a la mezcla final antes de la congelación. En todos los casos, no se añadió otro crioprotector a la muestra y se usó solamente la savia para conservar las células en el nitrógeno líquido. Las células sobrevivieron en gran porcentaje incluso cuando no se añadió a la mezcla un crioprotector (penetrante o no penetrante) adicional.

- 5 Los experimentos se efectuaron también usando savia del abedul de Alaska. Igualmente, a los ingredientes secos crudos para el extensor de pavo de Beltsville sin fructosa (1/10 del volumen de la fórmula convencional) se añadió savia de abedul para un volumen final de 100 ml. [La fórmula para un volumen convencional de un litro de BTE se ha enumerado anteriormente]. No se añadió ningún otro crioprotector a la mezcla.
- 10 La savia de arce se almacenó en botellas de plástico de 100 ml, con aproximadamente 16 botellas por caja de cartón, con la parte superior abierta. La parte superior de la botella expulsó los minerales y otros compuestos químicos dejando cristales de hielo arriba. El centro de la botella no se congeló y permaneció en un estado casi vítreo sin congelarse completamente después de 24 horas. Este tipo de congelación es crítico para tener éxito cuando se efectúa la crioconservación. Evita la formación de cristales de hielo que dañan las células. [Referencia;
- 15 "Investigation of Chemical and Physical Properties of Southwestern Wisconsin Maple Syrup"; de Hiroyuki Takano, tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para el Master del Grado de ciencias con especialización en Ciencias alimentarias y nutricionales. Martin G. Ondrus, director de tesis; Escuela de Posgrado de la Universidad de Wisconsin-Stout, diciembre de 2005]
- 20 La savia del abedul se obtuvo en Alaska a través de una empresa de sirope llamada Alaska Wild Harvest LLC, dba Kahiltna Birchworks, PO Box 2267, Palmer, Alaska 99645. El inventor obtuvo savias de primer y segundo flujo para experimentación. Esta savia contiene tres veces menos azúcar en promedio que la savia de arce. Este árbol procede de latitudes mayores que están sometidas a temperaturas y cambios de temperatura más severos que los de los bosques de Wisconsin. La savia de abedul se congela muy lentamente en el arcón congelador y de forma similar a la savia de arce mencionada en el párrafo anterior.

La primera muestra de semen que se congeló procedía de un azor del norte (*Accipiter gentilis*) macho usando una fórmula de extensor que se modificó para incluir la savia de arce. Esta fórmula consistía en todos los ingredientes secos del extensor de pavo de Beltsville con los porcentajes habituales, pero sin fructosa. Se añadieron 90 ml de savia de arce para un volumen final de 100 ml. (Esto es, 1/10 de la fórmula convencional del BTE). Un cien por cien del líquido añadido a la fórmula era savia de arce. El contenido de sacarosa de la savia de arce se da en la bibliografía como una cantidad del 2-2,6 %. No se midió el nivel exacto de sacarosa de esta savia aunque se estimó que era de aproximadamente un 2 % ya que era una savia de primer flujo. El nivel mínimo de azúcar necesario para el extensor de pavo de Beltsville es del 0,5 %. Por tanto, esta fórmula acabó conteniendo más azúcar (que el extensor comercial) ya que la savia tenía 4-5 veces el nivel de azúcar necesario, de forma natural.

Esta primera fórmula contenía 4-5 veces el azúcar necesario, haciéndolo hiperosmolar de modo que el esperma perdía gradualmente motilidad a temperatura ambiente. Sin embargo, una muestra de semen congelado (muestra # 69, tabla 1) del azor del norte (*Accipiter gentilis*) se sometió inmediatamente a congelación ultrarrápida después de mezclarlo con la combinación extensor-savia 1:2 (1 parte de semen y 2 partes de combinación extensor-savia) y un 58 % de las células sobrevivieron al proceso de congelación y descongelación basándose en la tinción vivos/muertos (eosina/nigrosina) y observaciones visuales. Esta muestra se descongeló en un baño de agua fría a aproximadamente 12,8°C (55 °F) después de estar en el cartucho de nitrógeno líquido durante un día. Estas células siguieron perdiendo motilidad a aproximadamente o exactamente la misma velocidad que una muestra que se había mezclado y mantenido a temperatura ambiente debido a la constitución química de la muestra. Sin embargo, las células sobrevivieron al proceso de congelación permaneciendo esencialmente inalteradas. La motilidad y el movimiento lineal de las células permanecieron prácticamente intactos, al no ser modificados por el proceso de congelación. Este fue el primer éxito documentado del inventor y superó sus expectativas. La supervivencia de las células tras la congelación demostró un gran éxito.

50 No se introdujeron otros crioprotectores en la muestra. Esta fórmula es claramente hiperosmolar (y perjudicial para las células) ya que contenía al menos un 2 % de sacarosa y el esperma solo necesitaba un 0,5 % de sacarosa.

El inventor halló un 58 % de supervivencia después de descongelar basándose en la tinción vivos/muertos (eosina/nigrosina) de esta primera muestra. Se contaron un centenar de células usando un contador de células de laboratorio convencional y se estableció este simple porcentaje. Este superaba a las referencias de la bibliografía del 25 % con crioprotectores convencionales tales como DMA y MA. Una tasa de supervivencia superior al 25 %, preferentemente superior al 40 % o al 50 %, indica el éxito del experimento.

60 Se congeló después una segunda muestra de 22 µl de semen (muestra #81, tabla 1). Se añadieron 22 µl de extensor de pavo de Beltsville, sin fructosa, más un 0,5 % de sacarosa, al semen en un tubo Eppendorf de 0,5 ml y se colocó en el refrigerador. Se colocaron 44 µl de BTE con savia de arce en un tubo separado, también en el refrigerador a 5,6 °C (42 °F). Los dos líquidos se combinaron tras su aclimatación en el refrigerador durante 10 minutos. El volumen total fue de 88 µl. La muestra se envasó en 2 tubos capilares de 75 µl recubiertos con Mylar, colocados en pajuelas para aves, estas se colocaron después en pajitas ventiladas y se sometieron a congelación ultrarrápida. Ambas pajuelas se descongelaron en un baño de agua a 12,8°C (55 °F). Se produjeron 2 pajuelas a

partir de una muestra de semen. La muestra 1 tenía un 25-30 % de esperma vivo con motilidad progresiva y con una velocidad de desplazamiento normal y una tinción vivos/muertos de 50 vivos/50 muertos. La segunda pajuela tenía un 55 % de motilidad progresiva con motilidad normal y una tinción vivos/muertos de 57 vivos/43 muertos. La supervivencia del semen aumentó cuando el porcentaje de savia de arce se redujo al 50 %.

5 Se congelaron muestras adicionales de semen de este azor macho. Los resultados se enumeran en la tabla 1, tabla que expone muestras de semen en las que se usó savia de arce o savia de abedul exclusivamente para la crioconservación. El semen del azor del norte (*Accipiter gentilis*) se usó en todos los experimentos.

10 En la tabla 1 el inventor enumera las muestras que han tenido éxito y las que no en la columna titulada "¿Esta muestra es factible?" Las muestras se registraron como Sí, No, y Quizás. Hay una columna que registra el éxito o la falta de éxito; de modo que es sencillo revisar rápidamente la tabla buscando a lo largo de esta única columna. Se tuvo éxito al congelar muestras en N₂L en cuanto se comenzó a añadir la savia de arce natural a la fórmula. Las células de semen sobrevivieron a la crioconservación cuando se usó solamente savia de árbol como crioprotector, 15 incluso cuando no se usaron otros crioprotectores químicos. Las muestras del inventor sobrevivieron al trauma de la congelación casi como si no hubieran sido nunca congeladas; y continuaron nadando a su velocidad normal en línea recta. Finalmente las células perdieron motilidad debido a problemas con la solución en la que se encontraban.

20 Cabe señalar particularmente que algunas de las muestras sobrevivieron con porcentajes de supervivencia y motilidad incluso mayores sin la adición de otros crioprotectores y en las que solamente se usó la savia. La muestra 84 sobrevivió la que mejor y está próxima a los porcentajes máximos de supervivencia y motilidad registrados, conocidos por los científicos que trabajan en este campo de la crioconservación, con una tinción vivos/muertos en % de 73V/27M y una segunda muestra con una tinción vivos/muertos en % de 64V/36M. Las muestras 67, 69, 70, 71, 72, 80, 81, 84, 93, 97, 118, 120, 126 y 128 muestran resultados muy prometedores con una motilidad progresiva 25 hacia adelante y unos porcentajes de la tinción vivos/muertos enumerada en la lista anterior. En la tabla siguiente se enumeran igualmente otras muestras que muestran también esta tendencia.

| Porcentaje de supervivencia en tinción vivos/muertos | Números de las muestras de la tabla 1 |
|--|---|
| 0-4 % de supervivencia | 106, 113, 116, 117 |
| 5-9 % de supervivencia | 82, 100, 101, 105, 109, 110, 115, 116 |
| 10-14 % de supervivencia | 82, 88, 95, 105, 107, 110, 111, 111, 113, 114 |
| 15-19 % de supervivencia | 87, 88, 93, 100, 107, 108, 109, 115 |
| 20-24 % de supervivencia | 82, 91, 100, 102, 103, 106, 108 |
| 25-29 % de supervivencia | 99, 99, 114, 116, 117 |
| 30-34 % de supervivencia | 72, 77, 83, 89, 90, 90, 102, 109, 109, 119, 119 |
| 35-39 % de supervivencia | 44, 77, 77, 85, 91, 92, 99, 111 |
| 40-44 % de supervivencia | 68, 85, 80 |
| 45-49 % de supervivencia | 72, 83, 118 |
| 50-54 % de supervivencia | 81, 97, 103, 105, 107, 110, 112 |
| 55-59 % de supervivencia | 69, 80, 81, 93, 93, 128 |
| 60-64 % de supervivencia | 84, 120 |
| 65-69 % de supervivencia | 72, 76 |
| 70-74 % de supervivencia | 84 |

30 Algunas de las muestras mostraban características de inactividad y, de acuerdo con la tinción vivos/muertos, sobrevivieron a la congelación aunque no eran móviles. Las células vivas no absorben la tinción vivos/muertos y aparecen blancas sobre el portaobjetos del microscopio, incluso cuando ya no son móviles. Estas muestras probablemente no están muertas y se pueden "resucitar" y hacerlas móviles con técnicas conocidas. Muchas de las muestras tenían células con características celulares gruesas normales tras la congelación y no parecían estar 35 distorsionadas o dañadas por el proceso de congelación; en las tinciones vivos/muertos. Estas tinciones se han conservado para futuras referencias.

40 La savia es el ingrediente clave para la crioconservación ya que no es tóxica, no tiene agentes contagiosos que transmitir al esperma, es abundante, tiene propiedades crioconservantes claves, está en estado líquido de forma natural, se puede recolectar sin contaminación bacteriana, y no es viscosa (espesa) de modo que no afecta a la motilidad espermática a través del medio fluido. Es un producto natural que es muy improbable que contenga

compuestos químicos adulterantes.

Se prevén optimizaciones normales de la presente invención. En primer lugar, será necesario desarrollar la base líquida optimizada que sustenta las líneas celulares que han de ser conservadas y modificarla después para permitir la adición de la savia a la mezcla en varios porcentajes, de modo que la savia no añada compuestos químicos en concentraciones que podrían matar a las células, sino que sigan permitiendo la crioconservación. (Por ejemplo, la osmolaridad de la savia de arce que obtuvo el inventor era de 100 miliosmoles). Esta osmolaridad parece ser demasiado elevada cuando se añadía directamente a los ingredientes secos de la fórmula de pavo de Beltsville que no tenía fructosa añadida a la misma. Las células sobrevivieron a la congelación en un estado excelente, aunque perdieron motilidad posiblemente debido a la hiperosmolaridad del aproximadamente 2 % de sacarosa de la savia de arce).

En segundo lugar, el ingrediente de savia se puede optimizar simplemente seleccionando diferentes especies de árboles para usar. El contenido de azúcares en las savias varía según la especie de árbol y lo mismo para los otros compuestos químicos que actúan como crioprotectores naturales distintos a los azúcares. Los productores de sirope usan arces que producen la mayor parte del azúcar y algunos productores de sirope usan abedules para este proceso. Ellos saben que si la savia de arce se reduce por ebullición, se requieren 20-50 unidades por unidad de sirope. Si la savia de abedul se reduce por ebullición, se requieren 150 unidades por unidad de sirope. Los productores de sirope tienden a no usar especies de arce que producen un contenido bajo de azúcar en la savia. Además, estos árboles sobreviven también a las temperaturas rigurosas y a los extremos de temperatura, y se deben adaptar bien para sobrevivir sin azúcar como crioprotector principal, lo que implica que otros compuestos químicos de la savia distintos a los azúcares, están actuando como tal.

Adicionalmente, puede ser deseable usar una combinación de savias. Se usaron combinaciones de las fórmulas de savia de arce y abedul en la experimentación registrada en la tabla 1. Se consiguieron altas tasas de éxito con esta combinación.

Adicionalmente, la savia recogida en diferentes momentos durante el proceso de sangrado puede dar algunos resultados beneficiosos. Las savias de flujo posterior son más bajas en los azúcares observados en el primer flujo, mientras los árboles todavía están sufriendo y sobreviviendo al estrés por temperaturas extremas. La osmolaridad de las savias recogidas en diferentes momentos puede ser ventajosa.

Adicionalmente, los extractos de las savias pueden proporcionar beneficios mediante el descubrimiento de proteínas o compuestos anticongelantes recientemente descubiertos que se podrían usar con este proceso. [Referencia; "When plant cells can survive ultra-low temperatures"; Pawl M. Pukacki, Laboratorio de fisiología de estrés abiótico, Instituto de dendrología, Academia polaca de ciencias, Kornik, Polonia].

Fórmulas adecuadas del extensor para 2015 y estudio de supervivencia de semen

Fórmula número 1; Extensor de pavo de Beltsville, sin fructosa, más 90 ml de savia de arce, procedente del sangrado de primer flujo, c.s. hasta 100 ml. Fechado en botella el 11/3/2015 y mezclado el 27/3/2015. El pH inicial se registró como 7,5 y después, tras haberlo mezclado, el pH era de 6,73 con el dispositivo del inventor.

La savia de arce tiene un 2-2,6 % de sacarosa que es 4-5 veces más elevado e hiperosmolar. El BTE contiene normalmente un 0,5 % de fructosa. Sin embargo, a los huevos de azor no les va bien la fructosa y deben tener sacarosa para sobrevivir.

Fórmula número 2; Extensor de pavo de Beltsville, sin fructosa, más 90 ml de savia de abedul de Alaska, savia de primer flujo, c.s. hasta 100 ml, fechado en botella el 11/3/2015 y mezclado el 11/4/2015. El pH inicial se registró como 7,5 y después, tras la mezcla, el dispositivo del inventor dio una lectura de 7,62.

Fórmula número 3; Extensor de pavo de Beltsville, sin fructosa, más un 0,5 % de sacarosa, más un 16 % de metilacetamida en peso. El pH era de 7,78. Más 0,2 mg de inositol (deberían haber sido 0,02 mg de inositol). Tenía un volumen total de aproximadamente 10 ml

Fórmula número 4; Extensor de pavo de Beltsville, sin fructosa, más un 0,5 % de sacarosa. El pH era de 7,36. El agua se hirvió y probablemente tenga una baja presión de oxígeno.

Las **fórmulas de Purdy** eran una simple adición de savia de arce, en volumen, al BTE. Las osmolaridades eran las enumeradas.

BTE, Control, sin savia añadida, 352 mOsm
 BTE, 5 % de savia de arce, 339 mOsm
 BTE, 10 % de savia de arce, 326 mOsm
 BTE, 20 % de savia de arce, 308 mOsm

La osmolaridad del 20 % de savia de arce era demasiado baja para sustentar las células debido al hinchamiento de las mismas.

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora | Proporción semen:extensor | ?Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento de la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---|---|------------------|-------------------|---|-------------------------------------|---|
| 4 | 31/3/2014 | 6/4/2011 | Squirt | Juniper | 1 a 2 | NO | | Menos de un 1 % móvil tras descongelar. La mayoría estaban muertos | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 9,1 | Diluyente #1 | Desconocido | Desconocido | |
| 5 | 11/4/2013 | 9/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 3 | NO | | Muestra grande de 40-50 µl | Congelación ultrarrápida | 9,1 | Diluyente #1 | 2 | Desconocido | |
| 6 | 25/3/2014 | 21/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 2 | NO | | Cierta contaminación por uratos. 0 % de motilidad tras descongelar | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 9,1 | Diluyente #1 | Desconocido | Tubo capilar Natelson con 2 tapones | Esta pajuela para almacenamiento conservó bien y no explotó |
| 7 | X | 23/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 2 | NO | 520 mg/dl | Pequeña cantidad de contaminación por uratos. 0 % de motilidad cuando se descongeló. En sangre el glucómetro mostraba una lectura de 520 mg/dl. Hubo reducción de la velocidad de motilidad antes de la congelación ¿O el diluyente era demasiado espeso? | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 9,1 | Diluyente #1 | Desconocido | Desconocido | |
| 8 | 11/4/2013 | 11/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 2 | NO | | Hubo un tiempo de mezcla de 2 minutos, se llevó directamente al tanque y se sumergió. Se descongeló el 11/4/2013 y había un 0 % de motilidad | Congelación ultrarrápida | 8,86 | Diluyente #2 | 2 | Desconocido | |
| 9 | X | 15/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 4 | NO | 435 mg/dl | Escasa motilidad tras descongelar. Menos de un 1 %. | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 8,86 | Diluyente #2 | Desconocido | Desconocido | |
| 10 | 11/4/2013 | 16/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 4 | NO | | Gran contaminación por uratos, por lo que se diluyó con un extensor y el semen sobrevivió. 0 % de motilidad tras descongelar | Congelación ultrarrápida | 8,86 | Diluyente #2 | 2 | | |
| 11 | 3/3/2014 | 16/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 1 | NO | | 0 % de motilidad tras descongelar | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 | 8,86 | Diluyente #2 | Desconocido | Desconocido | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de Congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--|---|------------------|-------------------|---|-------------------------------------|---|
| 12 | 11/4/2013 | 24/4/2011 | Squirt | | 1 a 2 | NO | | Se observó 2 células en movimiento Casi sin supervivencia | segundos antes de la inmersión Congelación ultrarrápida | 8,6 | Diluyente #2 | 2 | Desconocido | |
| 13 | 31/3/2014 | 25/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 2 | NO | | 0 % de motilidad tras descongelar | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 8,6 | Diluyente #2 | Desconocido | Desconocido | |
| 14 | 24/3/2013 | 26/4/2011 | Squirt | Juniper | 1 a 2 | NO | | 0 % de motilidad tras descongelar | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 9,08 | Diluyente #3 | Desconocido | Desconocido | |
| 15 | 24/3/2013 | 26/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 0 | NO | GS 5 mg/dl reensayado como 66 mg/dl | 2 % móvil cuestionable tras descongelar | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | Desconocido | Ninguno | Desconocido | Desconocido | |
| 16 | 31/3/2014 | 27/4/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 2 | NO | | 0 % de motilidad tras descongelar | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 9,08 | Diluyente #3 | Desconocido | Desconocido | |
| 17 | 24/3/2014 | 29/4/2011 | Jasper | Ninguna | 1 a 2 | NO | | Mueren rápidamente cuando se ve como una preparación húmeda con o sin congelación. 0 % de motilidad tras descongelar | Congelación ultrarrápida | 9,08 | Diluyente #3 | 3 | tubo capilar Natelson con 2 tapones | Esta pajuela para almacenamiento conservó bien y no explotó |
| 18 | 26/3/2014 | 25/4/2011 | Squirt | Juniper | Desconocida | NO | | 1-5 % de motilidad tras descongelar | Congelación ultrarrápida | 9,18 | Diluyente #4 | 2 | tubo capilar Natelson con 2 tapones | |
| 19 | 25/3/2014 | 30/4/2011 | Squirt | Juniper | 1 a 2 | NO | | La aglutinación por la cola es un problema. Sobrevive 3-4 horas a 1.a. Se observa una prep. húmeda con buen tamaño de muestra antes de congelar. | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 7,06 | Trucha | Desconocido | tubo capilar Natelson con 2 tapones | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de Congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--|---|------------------|-------------------|---|-------------------------------------|---|
| 20 | 25/3/2014 | 1/5/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 3 | NO | | Tras descongelar se vio un 5 % o menos en movimiento y un 1 % de motilidad progresiva. Después se puso en Juniper | Congelación ultrarrápida o suspensión sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos antes de la inmersión | 7,08 | Trucha | Desconocido | Tubo capilar Natekson con 2 tapones | Explotó y se perdió. |
| 21 | 11/4/2013 | 3/5/2011 | Squirt | Ninguna | 1 a 2 | NO | | Se observa antes de congelar. La aglutinación por la cola es un problema; hay una disminución de la supervivencia después de congelar el extensor en el refrigerador y usario tras descongelar. Dilución también no 1 a 2. Se observa una prep. humeda con tamaño traza. Explotó al descongelar. Tubo capilar encontrado y las trazas mostraban un 0 % de motilidad. | Congelación ultrarrápida | 7,08 | Trucha | 2 | Tubo capilar Natekson con 2 tapones | |
| 22 | 11/4/2013 | 6/4/2013 | Squirt | Ninguna | 1 a 3 | NO | | Buena supervivencia en diluyente con 0 sin congelación. Sobrevivió de 1:30 pm a 6:50 pm, cierta supervivencia a temperatura ambiente. Cuando se descongeló después de congelar hubo un 0 % de supervivencia | Congelación ultrarrápida | 7,08 | Trucha | 5 | Desconocido | |
| 23 | 30/3/2014 | 4/5/2011 | Squirt | Juniper | 1 a 2 | SI | | Cierta contaminación por uratos 0 % de motilidad tras descongelar | Suspendido sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos para exponerlo a los vapores del nitrógeno líquido y después Congelación ultrarrápida. | 7,18 | Trucha #2 | Desconocido | Tubo capilar Natekson con 2 tapones | Esta pajuela para almacenamiento conservó bien y no explotó |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporcion semen:extensor | ?Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--|---|------------------|-------------------|---|-------------------------------------|--|
| 24 | 2/4/2014 | 14/5/2011 | Squirt | Juniper | 2 a 5 | QUIZÁS | | parecia mejor: Extensor mejor usado fresco y no congelado: Las células murieron más rápidamente sobre este portabiotos y hubo más aglutinación. Extensor se almacenado en vial de 5 cm ³ y estaba más frío en el momento de uso. (importante = choque frío) | Suspendido sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos para exponerlo a los vapores del nitrógeno líquido y después congelación ultrarrápida. | 7,16 | Trucha #2 | Flotando sobre nitrógeno líquido y perdido fuera del recipiente | Tubo capilar Natelson con 2 tapones | Explotó tras descongelar aunque no se perdió la muestra. |
| 25 | 13/6/2013 | 10/4/2013 | Squirt | Ninguna | 1 a 4 | NO | | Gran contaminación por uratos. Tras descongelar había menos de un 5 % de motilidad debido al daño por la explosión de nitrógeno líquido. Kevin retiró esta del bidón. Usado en Juniper el día que se llenó el tanque. | Congelación ultrarrápida | 7,16 | Trucha #2 | 5 | Desconocido | |
| 26 | 11/4/2013 | 11/4/2013 | Squirt | Ninguna | 1 a 3 | NO | | Contaminación menor por uratos, 1 % de buena motilidad progresiva con descongelación en agua helada. | Congelación ultrarrápida. | 7,16 | Trucha #2 | 5 | Desconocido | |
| 27 | 2/6/2013 | 11/4/2013 | Squirt | Ninguna | 1 a 8 | NO | | Contaminación menor por uratos, 0 % de motilidad progresiva con descongelación en agua fría. Crioprotector no usado | Congelación ultrarrápida. | | Ninguna | 5 | Desconocido | |
| 28 | 3/6/2013 | 12/4/2013 | Squirt | Ninguna | 1 a 4 | NO | | Se perdió la mayoría de la muestra. No se pudo evaluar. No se observó supervivencia en las diluidas con agua. Descongelación en agua fría. | Congelación ultrarrápida. | 7,16 | Trucha #2 | 5 | Desconocido | |
| 29 | 31/3/2014 | 5/7/2011 | Squirt | Juniper | 1 a 3 | NO | | Menos aglutinación por la cola con esta formula. Muerte celular más rápida aunque tras 20 minutos solamente. Quizas un 30 % de supervivencia, un 5 % de motilidad progresiva en la 1ª hora. Ninguno vivo en la prep. húmeda a las 6:50 pm. (recogida a la 1 pm). | Suspendido sobre nitrógeno líquido durante 30 segundos para exponerlo a los vapores del nitrógeno líquido y después congelación ultrarrápida. | 7,14 | Leche #1 | Desconocido. | Tubo capilar Natelson con 2 tapones | Esta pajuela para almacenamiento conservó bien y no explotó. |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento de la muestra y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---|--|------------------|--|---|--|--|
| 30 | 14/4/2013 | 4/4/2013 | Squirt | | 1 a 2 | NO | | Impresión, el espermia murió rápidamente en este extensor. Menos de un 1 % móvil tras descongelar y puesto en Juniper el 31/3/2014. | Congelación ultrarrápida. | 7,42 | Trucha #2 más scobitol y arabinogalactina. | 5 | Desconocido | |
| 31 | 30/3/2014 | 30/5/2013 | Squirt | Juniper | 1 a 4 | QUIZAS | | No se observó motilidad en prep. húmeda fresca. Observadas 7 células con mucha movilidad. 1 célula se movió rápido y se movió a la izquierda. La trucha #2 más 1/4 de cucharada scobitol y 1/8 de cuchará de arabinogalactina. Trazas de muestra tras la explosión. Observada cierta motilidad. | 10 mm de semen hasta 45 mm de extensor de pavo. Acimatado en el refrigerador durante 30 minutos. Se añadieron 3 µl (unidades) de DMA. Se expuso a los vapores durante 10 minutos y después se cobocó en nitrógeno líquido. | | Extensor de pavo más DMA | 6 | Pajuela de semen comercial con tapones de botón. VERDE EN LA PARTE SUPERIOR DEL RECIPIENTE DE ALUMINIO | Exploió y se perdió. |
| 32 | x 2014 | 31/5/2013 | Squirt | Juniper | 15 % | NO | | 8 mm de semen colocados en extensor de pavo a temperatura ambiente se llevaron al refrigerador durante un tiempo de acimatado de 30 minutos. Se añadieron 3 unidades de DMA a un volumen total de 50 mm. Colectado rápidamente sobre nitrógeno líquido en menos de 60 segundos. | Semen acimatado en el refrigerador durante 30 minutos, DMA añadido después, expuesto a los vapores durante 10 minutos y después sumergido en nitrógeno líquido. | | Extensor de pavo más DMA (6%) | 6 | Pajuela de semen comercial con tapones de botón. VERDE EN LA PARTE SUPERIOR DEL RECIPIENTE DE ALUMINIO | ENCONTRADO FLOTANDO EN EL TANQUE SIN LA ETIQUETA |
| 33 | X 2014 | 1/6/2013 | Squirt | Juniper | 44 % | NO | | Se colocaron 22 mm de semen en extensor de pavo a temperatura ambiente y | Semen acimatado en el refrigerador durante 30 minutos, DMA añadido después, y | | Extensor de pavo más DMA | 6 | Pajuela de semen comercial con | ENCONTRADO FLOTANDO EN EL TANQUE |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--|--|------------------|--------------------------|---|--|--|
| 34 | 29/5/2014 | 2/6/2013 | Squirt | Juniper | 48 % | NO | | <p>se colocaron en el refrigerador y aclimatado durante 30 minutos. Se añadieron 3 unidades/jul de DMA y se colocó sobre el nitrógeno líquido en menos de 60 segundos. Se expuso a los vapores durante 10 minutos y después se sometió a congelación ultrarrápida.</p> <p>Se colocaron 24 mm de semen en extensor de pavo a temperatura ambiente hasta un volumen de 47 mm y después se aclimataron en el refrigerador durante 30 minutos. Se añadieron rápidamente 3 jul de DMA y después la muestra se expuso a los vapores (en menos de 60 segundos) durante 10 minutos y se sumergió en nitrógeno líquido.</p> | expuesto a los vapores durante 10 minutos y después sumergido en nitrógeno líquido. | | Extensor de pavo más DMA | 6 | <p>taponés de botón. VERDE EN LA PARTE SUPERIOR DEL RECIPIENTE DE ALUMINIO</p> <p>Pajuela de semen comercial con tapones de botón. VERDE EN LA PARTE SUPERIOR DEL RECIPIENTE DE ALUMINIO</p> | <p>MENOS LA ETIQUETA</p> <p>ENCONTRADO FLOTANDO EN EL TANQUE MENOS LA ETIQUETA</p> |
| 35 | 3/4/2014 | 28/5/2013 | Squirt | Juniper | 20 % | NO | | <p>Se recogieron 8-10 mm de semen y se añadió extensor de pavo que estaba a la temperatura del refrigerador. El volumen final con DMA era de 50 µl/mm. Se usaron 35 mm de extensor y 5 jul de DMA para conseguir un 10 % en DMA. "Ninguna motilidad" se vio (probablemente demasiado frío) en frots de la prep. húmeda fresca. Cuando se descongeló en agua helada se vio un 5-10 % en movimiento. Solamente un 1 % con buena aunque no excelente motilidad progresiva. Hubo una pérdida progresiva de motilidad</p> | Semen aclimatado en el refrigerador durante 30 minutos, DMA añadido después, expuesto a los vapores durante 10 minutos y después sumergido en nitrógeno líquido. | | Extensor de pavo más DMA | 6 | <p>Pajuela de semen comercial con tapones de botón. VERDE EN LA PARTE SUPERIOR DEL RECIPIENTE DE ALUMINIO.</p> | <p>Explotó y no se perdió. Pero la explosión fue fuerte y las células de semen probablemente sufrieron daños debido al trauma. El inventor supone que esta muestra fue a Juniper porque se encontraron 4</p> |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--|-----------------------------------|------------------|---------------------------------|---|---|---|
| 36 | X 2014 | 29/5/2013 | Squirt | Juniper | 8 % | | | <p>en minutos. (45 minutos). Esto es que probablemente la muestra fue a Juniper el 4/3.</p> <p>Se recogieron 4 mm de semen y se añadió extensor de pavo que estaba a la temperatura del refrigerador hasta un volumen de 47 mm. Esto se dejó en el refrigerador a 4.4 °C (40 °F) de 7 am a 6:30 pm. Se añadieron rápidamente 3 µl de DMA y, en menos de un minuto, se expuso a los vapores durante 10 minutos y se sumergió. 50 % de excelente movilidad de la muestra traza observada antes de añadir el DMA.</p> | Véase la nota anterior | | Extensor de pavo más DMA | 6 | Desconocido | flotando libres sobre el nitrógeno líquido y no etiquetada. |
| 37 | 26/3/2014 | 3/6/2013 | Squirt | Ninguna | 8 % | | | <p>Se recogieron 4 mm de semen y se añadió extensor de pavo hasta un volumen de 45 mm. Se aclimató durante 30 minutos y se añadieron 5 µl de DMA (10 %). Se sometió a congelación ultrarrápida.</p> | Congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo más DMA | 5 | Pajuela de semen comercial con tapones de botón. ROJO EN LA PARTE SUPERIOR DEL RECIPIENTE DE ALUMINIO | Explató y se perdió. |
| 38 | 26/3/2014 | 3/6/2013 | Squirt | Ninguna | 8 % | NO | | <p>Se recogieron 2 mm de semen y se añadieron 23 mm de extensor de pavo y se aclimataron en el refrigerador durante 30 minutos. Se añadió rápidamente DMA (10 %) y</p> | Congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo más DMA (10 %) | 5 | Pajuela de semen comercial con tapones de botón. ROJO EN LA PARTE SUPERIOR DEL | Explató y se perdió. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--|--|------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|--|
| 39 | 26/3/2014 | Squirt | Ninguna | 8 % | NO | | se sometió a congelación ultrarrápida en menos de un minuto. Se recogieron 4 mm de semen y se añadieron 45 mm de extensor de pavo y se acimataron en el refrigerador durante 30 minutos. Se añadieron 5 µl de DMA (10 %) y se sometió a congelación ultrarrápida tras mezclar en menos de un minuto. | Congelación ultrarrápida | | Extensor de pavo más DMA (10 %) | 5 | RECIPIENTE DE ALUMINIO Pajuela de semen comercial con tapones de borch en LA PARTE SUPERIOR DEL RECIPIENTE DE ALUMINIO | Explotó y se perdió. |
| 40 | 26/3/2014 | Squirt | Ninguna | 4 % | NO | | Se recogieron 1 mm de semen y se añadieron 8 mm de extensor de pavo y se acimataron en el refrigerador durante 30 minutos. Se añadieron 2 µl de DMA y se sometió a congelación ultrarrápida tras mezclar en menos de un minuto. | Congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo más DMA (18 %) | 5 | Pajuela de semen comercial con tapones de borch en LA PARTE SUPERIOR DEL RECIPIENTE DE ALUMINIO | Explotó y se perdió. Los tubos capilares de vidrio recubiertos con plástico reforzado soportan las explosiones. |
| 41 | 2014 | Squirt | Juniper | | SI | | 4 TUBOS QUE SE CONSERVARON EN 2013 SE COLGARON EN TUBOS DE PLÁSTICO COMERCIALES CON ESFERAS PARA SELLAR LOS EXTREMOS. EL SEMEN ESTABA EN TUBOS CAPILARES QUE SE ENCANTARON FLOTANDO SOBRE EL NITRÓGENO LÍQUIDO PERO PERDIERON LAS ETIQUETAS. ALGUNAS DE ESTAS MUESTRAS TENDRAN UN 25 % DE SUPERVIVENCIA DE LAS MUESTRAS DE SEMEN | VÉANSE LAS NOTAS SOBRE LAS MUESTRAS DE 2013. | | Extensor de pavo más DMA | | | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|--|--|------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---|---|
| 42 | | 2/5/2014 | Squirt | | 3 mm de Semen por 30 unidades de extensor de pavo, más 1.5 unidades de DIMA | | | <p>Y SE MOVÍAN ACTIVAMENTE HACIA ADELANTE. ESTAS SE COLOCARON EN JUNIPER. UNA DE LAS MUESTRAS ROJAS Y CUATRO DE LAS MUESTRAS VERDES PARECÍA QUE ERAN LAS QUE SE HABÍAN USADO PARA I.A. EN JUNIPER. NO SE SABE QUE TUBO ERA CUÁL PERO SE SABE QUE SE PERDIERON 3 MUESTRAS ROJAS TRAS DESCONGELAR DEBIDO A LA EXPLOSIÓN. LAS MUESTRAS RESTANTES NO TUVIERON FUGAS AL CONTENEDOR PRIMARIO. LA MAYORÍA DE LAS MUESTRAS VERDES NO SE PERDIERON. SE VACIÓ POR COMPLETO EL TANQUE DE TODAS LAS MUESTRAS EN 2014. VOLVIENDO A EMPEZAR. SE COLOCARON EN EL TANQUE 16 MUESTRAS PARA 2013</p> <p>Sin uratos. Baja celularidad</p> | En el refrigerador 10 minutos para acimatación, más 1.5 unidades de DIMA, expuesto a los vapores durante 10 minutos y sumergido inmediatamente en NaL. | 6.74 | Extensor de pavo más DIMA, 5% de DIMA | #2 | #42, pajuela blanca, tubo Natelson, cerrado con tapa firmemente por 1 extremo y sin tapa en el extremo opuesto. | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|----------------------------|---------------------------|--|--|------------------|--------------------------------------|---|---|--|
| 43 | | 1/5/2014 | Squirt | | 5 mm de semen, diluido a un volumen de 30 mm, añadidas 1,5 unidades de DMA | | | Cierta contaminación por uratos. Baja celularidad. | Aclimatado en el refrigerador 10 minutos, más 1,5 unidades de DMA (5 %), expuesto a los vapores durante 10 minutos, 1 minuto después de añadir el DMA y sumergido en NaL. | 6,74 | Extensor de pavo más DMA, 5 % de DMA | #2 | #43. Pajuela blanca, tubo capilar convencional, más dos Critocaps y un tapón Natelson | |
| 44 | 1/3/2016 | 3/5/2014 | Squirt | | | NO | | Sin uratos. Baja celularidad. ¡El semen de azor requiere helada. Baja celularidad debido a la edad del mechero. Menos de un 10 % móvil. No se puede elevar la función vivos/muertos porque la celularidad es demasiado baja. | Aclimatado en el refrigerador 10 minutos, más 3 µl de DMA (6 %). Aclimatado en el refrigerador durante 10 minutos, expuesto a los vapores 10 minutos y sumergido después en NaL. | 6,74 | Extensor de pavo más 6 % de DMA | #2 | #44. Pajuela blanca, tubo capilar convencional, más 2 Critocaps y 1 tapón Natelson | La pajuela explotó al descongelar, pero un extremo se mantuvo cerrado. |
| 45 | 29/3/2015 | 4/5/2014 | Squirt | | 2 mm de semen más 18 mm de extensor de pavo hasta un volumen total de 20 mm. | NO | | Sin uratos. Baja celularidad. ¡El semen de azor requiere sacarosa y no fructosa para sobrevivir a la congelación!!! Esto se debe a que estas células sobrevivieron en el extensor de trucha #2 y no en el extensor de pavo que tiene fructosa. Se debe usar el extensor de pavo de Belsville sin fructosa, con sacarosa añadida de nuevo hasta un 0,5 % (1/2 %). | Aclimatado en el refrigerador 10 minutos, más 2 µl de DMA (10 %), expuesto a los vapores durante 10 minutos y sumergido después en NaL. | 6,74 | Extensor de pavo más 10 % de DMA | #2 | #45. Pajuela blanca, tubo capilar convencional, más 2 tapones en uno extremo y arrolla en el extremo opuesto. | |
| 46 | | 4/5/2014 | Squirt | | 5 mm de semen más 19 mm de extensor de pavo, más 2 µl de DMA | | | Bajo número de uratos. Baja celularidad. | Aclimatado en el refrigerador (1,7 °C (35 °F)), más 2 µl de DMA, expuesto a los vapores durante 10 minutos y sumergido en NaL. | 6,74 | Extensor de pavo más 10 % de DMA | #2 | #46. Pajuela blanca, no registrado el tipo de tubo | |
| 47 | | 5/5/2014 | Squirt | | 1-40 mm de muestra | | | 1 lado de la muestra dividida contenía más uratos que el | Aclimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F) durante minutos 10 minutos, una | 6,74 | Extensor de pavo | #2 | #47. dos tubos, | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ?Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|---|---|------------------|---|---|--|---|
| 48 | | 6/5/2014 | Squirt | | contaminada con uratos, dividida en muestras de 2-20 mm, más 28 mm de extensor de pavo, más 3 µl de DMA (8 %). 6 mm de semen más 14 mm de extensor de pavo hasta un volumen total de 20 mm, más 1,5 µl de DMA (7 %). | | | otro, semen solo en un punto del tubo, así que separado en 1/2 para tener la mayoría de los uratos en 1 tubo. Baja celularidad. Sin uratos. Baja celularidad | muestra expuesta a los vapores durante 7 minutos y la otra durante 10 minutos, y sumergida después en N ₂ L. | 6,74 | más 6 % de DMA Extensor de pavo más 7 % de DMA | #2 | Pajuela blanca, tubo Natelson, más arcilla y tapón Natelson en el extremo en punta y tapón Natelson en el extremo superior. Pajuela blanca, tubo capilar Natelson, más arcilla en ambos extremos y tapón Natelson en el extremo en punta. | |
| 49 | | 6/5/2014 | Squirt | | 10-16 mm de semen más 47 mm de extensor de pavo, más 3 µl de DMA. | | | Muchos uratos. Pequeña cantidad de semen en un punto. Volumen final de 50 mm. Baja celularidad. | Acimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F), 1,5 µl de DMA añadidos, expuesto a los vapores durante 10 minutos y sumergido en N ₂ L. Acimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F), más 3 µl de DMA, expuesto a los vapores 10 minutos y sumergido en N ₂ L. | 6,74 | Extensor de pavo más 6 % de DMA | #2 | Pajuela blanca, tubo Natelson, más arcilla en ambos extremos y tapón de caucho en el extremo en punta. | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|---|--|------------------|----------------------------------|---|--|---|
| 50 | | 7/5/2014 | Squirt | | 6 mm de semen más 19 mm de extensor de pavo, más 2 µl de DMA | | | Sin uratos. Baja celularidad | Aclimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F) durante 10 minutos, más 2 µl de DMA (7 %), expuesto a los vapores durante 10 minutos y sumergido después en N ₂ L. | 6,74 | Extensor de pavo más 7 % de DMA | #2 | Pajuela blanca, tubo capilar de 75 µl convencional, más 1 Critocap y un tapón Nateison en uno extremo y arcilla en el extremo opuesto. | |
| 51 | | 7/5/2014 | Squirt | | 6 mm de semen más 19 mm de extensor de pavo, más 1,25 µl de DMA (5 %) | | | Sin uratos. Baja celularidad. Observadas muchas células explotadas. ¡El semen de azor requiere sacarosa y no fructosa para sobrevivir a la congelación! Esto se debe a que estas células sobrevivieron en el extensor de trucha #2 y no en el extensor de pavo que tiene fructosa. Se debe usar el extensor de pavo de Beltsville sin fructosa, con sacarosa añadida de nuevo hasta un 0,5 % (1/2 %). | Aclimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F), añadidos 1,25 µl de DMA (5 %), expuesto a los vapores durante 10 minutos y sumergido en N ₂ L. | 6,74 | Extensor de pavo con 5 % de DMA | #2 | Pajuela blanca, tubo capilar de 75 µl convencional, más un Critocap en un extremo y un tapón Nateison en el otro | |
| 52 | 29/3/2015 | 9/5/2014 | Squirt | Ninguna | 5 mm de semen y aproximadamente 8 mm de uratos, más 27 mm de extensor de pavo hasta un volumen total de 40 mm, más 2,7 µl de DMA (6 %). | NO | | Uratos acuosos observados en 8 de los 13 mm del volumen inicial total del semen, es decir, aproximadamente 5 mm de semen presentes. Baja celularidad. ¡El semen de azor requiere sacarosa y no fructosa para sobrevivir! ¡Estas células no pueden usar fructosa y esta es la razón de que estas células sobrevivan en el extensor Trucha #2! | Aclimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F), añadidos 2,7 µl de DMA, expuesto a los vapores 10 minutos y sumergido en N ₂ L. | 6,74 | Extensor de pavo con 6 % de DMA. | #2 | Pajuela blanca, tubo capilar Nateison, más arcilla en ambos extremos y tapón Nateison en el extremo en punta | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|--|---|------------------|---------------------------------|---|---|---|
| 53 | | 10/5/2014 | Squirt | | 16 mm de semen más 22 mm de extensor de pavo hasta un volumen total de 38 mm, más 2,23 µl de DMA (6 %). | | | Sin uratos y celularidad baja aunque aumentando. | Acimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F) durante 15 minutos, añadidos 2,23 µl de DMA, expuesto a los vapores 10 minutos y sumergido en N ₂ L. | 6,74 | Extensor de pavo con 6 % de DMA | #2 | Pajuela blanca, tubo capilar Natelson, más arcilla en ambos extremos y tapón Natelson en el extremo en punta | |
| 54 | | 22/5/2014 | Squirt | | 5 mm de semen más 15 mm de extensor de pavo hasta un volumen final de 2 mm, más 1 µl de DMA (5 %). | | | Sin uratos y celularidad baja aunque aumentando. | Acimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F) durante 15 minutos, más 1 µl de DMA (5 %), expuesto a los vapores 10 minutos y sumergido en N ₂ L. | 6,74 | Extensor de pavo con 6 % de DMA | #2 | Pajuela blanca, tubo capilar de 75 µl convencional, arcilla en un extremo y un tapón Natelson y un Critocap en el otro extremo. | |
| 55 | | 12/5/2014 | Squirt | | 14 mm de semen más 23 mm de extensor de pavo hasta un total de 47 mm, más 2,5 µl de DMA (5 %). | | | Unos pocos uratos, aunque no muchos. Baja celularidad pero aumentando. | Acimatado en el refrigerador a 1,7 °C (35 °F) durante 15 minutos, añadidos 2,5 µl de DMA, expuesto a los vapores 10 minutos y sumergido en N ₂ L. | 6,74 | Extensor de pavo con 5 % de DMA | #2 | Pajuela blanca, tubo Natelson más arcilla en el extremo en punta y tapones Natelson en ambos extremos. | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---|--|--|------------------|--|---|--|--|
| 56 | 14/5/2014 | 13/5/2014 | Squirt | Ninguna | 4 mm de semen más 20 mm de extensor de pavo, más 5 % de sirope de arce, más 1 µl de DMA (5 %). | No | Desconocido, el dispositivo no pudo leer el número. | Sin uratos. La celularidad es baja pero aumentando. La pajuela en almacenamiento no tuvo fugas y la supervivencia de las células fue escasa. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos, más 1 µl de DMA (5 %), expuesto a los vapores durante 10 minutos y sumergido en N ₂ L. | 6,74 | Extensor de pavo, con sirope de arce, con un 5 % de DMA. | #2 | Pajuela roja, tubo Natelson, con arcilla y tapón Natelson en el extremo en punta y solo arcilla en el extremo ancho. | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
| 57 | 4/4/2015 | 22/3/2015 | Odin | Ninguna | 8 mm de semen más 11 µl de extensor de pavo de Beltsville (sin modificar), más 1 µl de DMA. Volumen total de 20 µl. | No | | No sobrevivió semen a la criopreservación. La fructosa de la muestra es el supuesto problema porque ralentiza la velocidad de los espermatozoides hasta la mitad en muestras frescas extendidas con este TE. Es necesario revisar el crioprotector. Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador ¡¡El semen de azor requiere sacarosa y no fructosa para sobrevivir a la congelación!!! Esto se debe a que estas células sobrevivieron en el extensor de trucha #2 y no en el extensor de pavo que tiene fructosa. Se debe usar el extensor de pavo de Beltsville sin fructosa, con sacarosa añadida de nuevo en un 0,5 % (1/2 %). | Acimatado en el refrigerador durante 10 minutos, más 1 µl de DMA (5 %), sumergido en N ₂ L. | | Solo extensor de pavo. | Recipiente #4 del tanque 2. | Pajuela roja. Esta era un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar y sellado en ambos extremos, más 2 Critocaps, más un tapón verde azulado en el extremo del semen. | Los tapones explotaron en los extremos y se perdió la mayoría de la muestra. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|----------------------------|---------------------------|--|---|------------------|---|---|--|---|
| 58 | 4/18/2015 | 3/23/2015 | Odin | Ninguna | 30 µl de semen más 30 µl de extensor de pavo más inositol, más 2,6 µl de DMA, volumen total de 62,6 µl. | NO | | Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. Pérdida de muestra por todo el garaje ya que explotó. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos, más 3 µl de DMA | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor | Recipiente #4 del segundo tanque | Pajita roja, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps y un tapón verde azulado. Más recipiente de aluminio. | La muestra explotó por todo el garaje. |
| 59 | 4/18/2015 | 3/23/2015 | Odin | Ninguna | 30 µl de semen más 30 µl de extensor de pavo más inositol, más 2,6 µl de DMA, volumen total de 62,6 µl. Esto supone un 4 % de DMA. | NO | | Una muestra que se dejó en el tubo antes de congelar tenía un 25 % de supervivencia basada en una tinción vivos/muertos. Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. Menos de un 1 % móvil con baño de agua a 12,8 °C (55 °F) y calentamiento con las manos. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos, más 2,6 µl de DMA y después sometido a congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor | Recipiente #4 del segundo tanque. | Pajita roja, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps y un tapón verde azulado. Con recipiente de aluminio | Buen rendimiento del tubo |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|--|--|------------------|--|---|--|--|
| 60 | 18/4/2015 | 25/3/2015 | Odin | Ninguna | 12 µl de semen más 24 µl de extensor de pavo más inositol. Más 2 µl de DMA. Volumen total de 38 µl. Esto supone un 5 % de DMA | NO | | Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. No hubo supervivencia tras descongelar. Descongelado en un baño de agua fría a 12,8°C (55 °F) y calentamiento con las manos. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor | Recipiente #4 del segundo tanque. | Pajita roja, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps y un tapón verde azulado. Con recipiente de aluminio. | Exploió pero quedó muestra. |
| 61 | 18/4/2015 | 25/3/2015 | Odin | Ninguna | 10 µl de semen más 18 µl de extensor de pavo más inositol, más 2 µl de DMA hasta un volumen total de 30 µl. 6,6 % de DMA | NO | | Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. Descongelado en un baño de agua fría a 12,8°C (55 °F) y calentamiento con las manos. Las células no sobrevivieron. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor. | Recipiente #3 del tanque 2. | Pajita roja, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps y un tapón verde azulado. | Buen rendimiento de la pajuela |
| 62 | 15/4/2015 | 27/3/2015 | Odin | Ninguna | 15 µl de semen más 30 µl de extensor de pavo de Beltsville más inositol, más 2 µl de DMA, o un 4,25 % | NO | | Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. Descongelado en un baño de agua fría a 12,8°C (55 °F) y colocado después en una placa calefactora. Menos de un 1 % de supervivencia. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor. | Recipiente #3 del tanque 2. | Pajita roja, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps. | La pajuela explotó al descongelar, aunque pero se conservó la muestra. |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|--|--|------------------|--|---|--|--|
| 63 | 15/4/2015 | 27/3/2015 | Odin | Ninguna | DMA 20 µl de semen más 37 µl de extensor de pavo de Beltsville más inositol, más 3 µl de DMA, 5 % de DMA | NO | | Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. Descongelado en un baño de agua fría a 12,8°C (55 °F). Las células no sobrevivieron. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor. | Recipiente #3 del tanque 2. | Y un tapón verde azulado. Pajita blanca, con un tubo capilar recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps y un tapón verde azulado. | Buen rendimiento del tubo |
| 64 | 15/4/2015 | 28/3/2015 | Odin | Ninguna | 16 µl de semen más 29 µl de extensor de pavo de Beltsville con inositol, más 3 µl de DMA, 6,25 % de DMA | NO | | Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. Descongelado en un baño de agua fría a 12,8°C (55 °F). Las células no sobrevivieron. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor | Recipiente #3 del tanque 2. | Pajita roja, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps y un tapón verde azulado. | El tubo explotó. Se perdió la mayoría de la muestra. |
| 65 | 15/4/2015 | 28/3/2015 | Odin | Ninguna | 14 µl de semen más 16 µl de extensor de pavo de Beltsville más inositol, más 2 µl de DMA, 6,25 % de DMA | NO | | Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. Descongelado en un baño de agua fría a 12,8°C (55 °F) y colocado después en una placa calefactora. Las células no sobrevivieron. | Acimatado en el refrigerador durante 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor. | Recipiente #3 del tanque 2. | Pajita roja, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps y un tapón verde azulado | Buen rendimiento del tubo |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen: extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajueta | Rendimiento de la pajueta en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|--|---|---|---|---|--|---|---|
| 66 | 15/4/2015 | 28/3/2015 | Odin | Ninguna | 13 µl de semen en 20 µl de extensor de pavo de Beltsville más 2 µl de DMA, 5,7 % de DMA. | NO | | Todas las muestras de 2015 se colocaron en tubos Eppendorf que ya estaban en el refrigerador. Puede haber choque por temperatura. Puede hacer demasiado frío cerca de las bobinas del refrigerador. | Aclimatado en el refrigerador durante 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | | Extensor de pavo de Beltsville más 2 mg de inositol hasta 10 ml de extensor | #3 del tanque 2. | Pajita blanca, con un tubo capilar recubierto con Mylar, sellado en ambos extremos, con dos Critocaps y un tapón verde azulado. No había muestra en el tubo al descongelar. | Pajuela vacía tras descongelar |
| 67 | 30/3/2015 | 29/3/2015 | Odin | Ninguna | 16 µl de semen más 24 µl de BTE, sin fructosa, más savia de arce, ningún otro crioprotector | QUIZÁ | 5 veces superior que el BTE normalmente por lo que es hiperosmolar | Esta muestra se sometió a congelación ultrarrápida sin acimatación. Cuando fue descongelada siguió viviendo justo como hizo la muestra observada a temperatura ambiente Tenía aproximadamente un 11 % de motilidad y menos de la mitad de ellos tenían buena motilidad progresiva tras descongelar. Una muestra que se dejó sobre un portaojetos a temp. amb. tenía espermátides maduras que dejaron de moverse a los 5 minutos, aunque a las espermátides inmaduras les fue bien y continuaron en movimiento. La velocidad de movimiento era mucho mayor y esto es claramente una mejora con respecto al BTE con fructosa. Se puede asumir que el semen de azor necesita sacarosa para sobrevivir. | Sin acimatación Congelación ultrarrápida. | SAVIA. Extensor de pavo de Beltsville, sin fructosa, más savia de arce, primer flujo, árbol número 3. | #2 del tanque 2. | Pajita naranja, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, con arcilla en ambos extremos, más Critocaps. | Quedó una muestra traza tras descongelar debido a la explosión | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento de la muestra y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--|---|------------------|--|---|--|---|
| 68 | 15/4/2015 | 29/3/2015 | Odin | Ninguna | ? | NO | | <p>La savia tenía una osmolaridad de 100 miliosmoles y se añadió a los ingredientes secos del BTE sin fructosa. Esto añadió sacarosa en una cantidad 5 veces el porcentaje requerido y la hizo hiperosmolar. Provocó la muerte de las células maduras. Las espermátides inmaduras, con paredes celulares inmaduras, pudieron igualar la presión osmótica. Savia de arce con 0,5-2,6 % de sacarosa. Esta es savia de primer flujo así que tiene más sacarosa que la de último flujo. Las diferentes especies de arce tienen diferentes porcentajes de sacarosa</p> <p>6 % de DMA. Sin supervivencia</p> | Sin aclimatación, congelación ultrarrápida. | | Posiblemente el mismo que el de las muestras anteriores y posteriores a esta línea | Recipiente #3 del tanque 2. | Pajita roja, en funda de aluminio, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, con arcilla y Critocap con tapón verde azulado en un extremo, y arcilla y Critocap en el otro extremo. | Buen rendimiento de la pajuela. No explotó. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|--------------------------------|---|---|--|------------------|--|---|--|---|
| 69 | 31/3/2015 | 29/3/2015 | Odin | Ninguna | 19 µl de semen más 38 µl de BTE, más savia de arce, primer flujo, árbol número 3. Ningún otro crioprotector | QUIZÁS. MÁS ÉXITO DEL ESPERADO | Sacarosa, probablemente 5 veces la necesaria, así que la muestra es hiperosmolar. | Se perdió la mayoría de la muestra al descongelar. La traza en la muestra tenía un 66% de motilidad basada en estimaciones visuales. 25 de 43 vivos en un recuento de desplazamiento con el contador. En una tinción había 58 vivos/42 muertos! | No se efectuó aclimatación y se sometió a congelación ultrarrápida. Se llevó al garaje sobre paquetes de gel frío. | | SAVIA, BTE, sin fructosa, más savia de arce, primer flujo, árbol número 3. | Recipiente #2 del tanque 2. | Funda de aluminio con una pajita blanca, con un tubo capilar de 75 µl, 1 extremo abierto, otro cerrado con arcilla, 1 Critocap, 1 tapón verde azulado | Esta pajuela funcionó bien y no explotó, aunque el tapón verde azulado ancho en el extremo ralentizó la descongelación. El extremo abierto es la clave de este éxito. |
| 70 | 15/4/2015 | 3/4/2015 | Odin | Ninguna | 25 µl de semen, más BTE, sin fructosa, más 50 µl de savia de arce. Ningún otro crioprotector. | Sí, pero puede ser mejor. | Sacarosa, probablemente 5 veces la necesaria, así que la muestra es hiperosmolar. | Este tubo está completamente lleno. 5-10% de motilidad tras descongelar con motilidad normal. Descongelado en un baño de agua a 12,8°C (55°F) y colocado después en una placa calefactora. | No se efectuó aclimatación y se sometió a congelación ultrarrápida. Se llevó al garaje sobre paquetes de gel frío. | | SAVIA, BTE, sin fructosa, más savia de arce, primer flujo, árbol número 3. | Recipiente #2 del tanque 2. | Pajita roja con orificios, más pajuela para aves de plástico, con un tubo capilar de 75 µl, 1 extremo abierto, otro extremo con arcilla, deslizado en la pajuela para aves con algodón hacia abajo. La pajuela está ventilada. | Buen rendimiento de la pajuela. No explotó |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---|--|--|------------------|--|---|--|---|
| 71 | 15/4/2015 | 3/4/2015 | Odin | Ninguna | 16 µl de semen, más BTE, sin fructosa, más 28 µl de savia de arce. Ningún otro crioprotector. | Sí | Sacarosa, probablemente 5 veces la necesaria, así que la muestra es hiperosmolar. | Descongelado en un baño de agua a 12,8°C (55 °F) y colocado después en una placa calefactora. 10 % de motilidad al descongelar y después las células reducen su motilidad al 5 % estimada visualmente a lo largo de 5 minutos. | No se efectuó aclimatación y se sometió a congelación ultrarrápida. Se llevó al garaje sobre paquetes de gel frío. | | SAVIA, BTE, sin fructosa, más savia de arce, primer flujo, árbol número 3. | Recipiente #2, Tanque 2. | Pajita roja con orificios, más pajuela para aves de plástico, con un tubo capilar de 75 µl, 1 extremo abierto, el otro extremo con arcilla, deslizado en la pajuela para aves con algodón hacia abajo. | Buen rendimiento de la pajuela. |
| 72 | 15/4/2015 | 4/4/2015 | Odin | Ninguna | 13 µl de semen, más BTE, sin fructosa, más 26 µl de savia de arce. Ningún otro crioprotector. | Sí | Sacarosa, probablemente 5 veces la necesaria, así que la muestra es hiperosmolar. | Descongelado en un baño de agua a 12,8°C (55 °F) y después en una placa calefactora. Motilidad casi normal del 20 % y motilidad estimada visualmente. ¡Se descongeló rápido! ¡La pajita ventilada es la clave! | No se efectuó aclimatación y se sometió a congelación ultrarrápida. Se llevó al garaje sobre paquetes de gel frío. | | SAVIA, BTE, sin fructosa, más savia de arce, primer flujo. Árbol número 3 | Recipiente #2 del tanque 2. | Pajita roja con orificios, más pajuela para aves de plástico, con un tubo capilar de 75 µl, 1 extremo abierto, el otro extremo con arcilla, deslizado en la pajuela para aves con algodón hacia abajo. | Buen rendimiento de la pajuela. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|----------------------------|--|---|--|------------------|---|---|---|---|
| 73 | 15/4/2015 | 12/4/2015 | Odin | Ninguna | 20 µl de semen, más 40 µl de savia de ABEDUL | NO | Nivel de sacarosa registrado de 479 mg/dl en un glucómetro Accu-Check. | A temperatura ambiente, las células se ralentizan rápidamente en una prep. húmeda, probablemente todavía demasiado hiperosmolar. Sin movilidad tras descongelar en un baño de agua a 12.8°C (55 °F) y después una placa calefactora. | No se efectuó aclimatación y se sometió a congelación ultrarrápida. | | SAVIA, BTE, sin fructosa, más savia de ABEDUL. Menos sacarosa que la savia de arce | Recipiente #1 del tanque 2 | Pajita rosa, más pajuela para aves de plástico, más un tubo capilar de 75 µl con 1 extremo sellado con arcilla, con algodón hacia abajo sobre la pajuela para aves. Número sobre la pajuela: 67 | Buen rendimiento de la pajuela. No explotó. |
| 74 | 14/4/2015 | 12/4/2015 | Odin | NINGUNA | 42 µl de semen, más BTE, sin fructosa, más sacarosa, añadidos a 75 µl de BTE, sin fructosa, más sacarosa (1/2 %) más MA (metilacetamida) | QUIZÁS | | 14/4/2015 Muestra #1: Pajuela naranja. Descongelado en agua fría y después colocado una placa calefactora. 5-10 % de movilidad de un espermatozoide con aspecto normal. El resto se mueven un poco aunque no se desplazan hacia adelante. | Se produjeron 2 muestras debido al volumen de la muestra. Ambas se sometieron a congelación ultrarrápida. No se usaron paquetes de gel | | 16 % del MA usado como mitad de la muestra de modo que la concentración final de la MA era del 8 %. | Recipiente #3 en bidón #1 | Pajillas naranja (#68 en la pajuela) y rosa (#68 en la pajuela), con una pajuela para aves de plástico en su interior, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, con un extremo con arcilla, con algodón hacia abajo sobre la pajuela para aves. | |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|--|---|--|---------------------------|--|---|-----------------|------------------------------|
| 75 | | 13/4/2015 | Odin | | 45 µl de semen dividido entre 3 pajuelas, BTE sin fructosa, más 12 % de sacarosa, más 84 µl de BTE (el mismo que antes) con MA (mellacetamida). | | | Separado en 3 pajuelas ya que era demasiado grande. Sobre paquetes de gel menos de 2 minutos y después congelación ultrarápida. | 16 % del MA usado como mitad de la muestra de modo que la concentración final de la MA era del 8 %. | | | Recipiente #3. Tanque #1. | 3 pajuelas verdes sin orificios. Pajuelas para aves de plástico con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, con 1 extremo con arcilla, con algodón hacia abajo sobre la pajuela para aves. | | |
| 76 | 28/2/2016 | 14/4/2015 | Odin | Ninguna | 7 µl de semen con 26 µl de BTE sin fructosa, más 12 % de sacarosa, más 2 µl del crioprotector DMA. Volumen final de 35 µl. | Si | | La muestra se preparó a temperatura ambiente con todos los componentes congelados al fondo del tanque a 21,1 °C (70 °F). 28/2/2016 Pajuela verde azulada, No ventilada, 80 % de células viables, 10 % en movimiento activo. Descongelado en un baño de agua a 5 °C (41 °F). Tinción 65 vivos/45 muertos. | Extensor de pavo de Belsville, sin fructosa, más un 0,5 % de sacarosa. | 7,5 en la tira de pH después de descongelar. | Recipiente #3. Tanque #1. | Pajuela más pajuela para aves de plástico más un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar con arcilla en 1 extremo. Con algodón hacia abajo sobre la pajuela para aves. No ventilado. De color azul. | | | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Tipo de diluyente en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|---|---------------------------|--|---|--|--|---|--|------------------------------|
| 77 | 28/2/2016, 1/3/2016 | 14/4/2015 | Odín | Ninguna | 55 µl de semen más 110 µl de BTE, sin fructosa, más 12 % de sacarosa, enfríos en el refrigerador durante 10 minutos, más 6 µl de DMA. | Esta es una de las primeras muestras SIN FRUCTOSA más DMA para ensayar si es la fructosa o la DMA la que hace que las muestras fallen. 28/2/2016 Si, no hay movimiento en el tubo verde. Descongelado en un baño de agua a 5 °C (41 °F). Ligera deformidad celular con una tinción 39 vivos/61 muertos. Muestra inactiva 1/3/2016. Si, 10 % en movimiento | | Todos los materiales comienzan a temperatura ambiente (21,1 °C (70 °F)) y se llevan al refrigerador para enfriarlos a 5 °C (41 °F). Se usaron paquetes de gel frío para llevarlo al garaje. 28/2/2016. Descongelado en un baño de agua a 5 °C (41 °F) y una placa calefactora con 39 vivos/61 muertos. 1/3/2016. Descongelado en un baño de agua a 5 °C (41 °F) y una placa calefactora con un 10 % moviéndose normalmente y un 50 % vitreado en el sitio. | Congelación ultrarrápida después de 10 minutos de aclimatación a 5 °C (41 °F) | 7.5 de pH en la tira de pH después de descongelar. | BTE, sin fructosa, 12 % sacarosa y DMA | Recipiente #3 en bidón #1 | 3 pajuelas, verde claro, verde oscuro y naranja, con una pajuela para aves en su interior y un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar en su interior. La pajuela verde no estaba ventilada y la pajuela naranja no estaba ventilada. | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|--|---------------------------|---|---|------------------|--|---|--|---|
| 78 | 18/4/2015, 18/4/2015 | 15/4/2015 | Odin | Ninguna | 38 µl de semen, más 75 µl de savia de abedul, BTE sin fructosa, primer flujo. | normal y un 5% vibrando. Descongelado en un baño de agua a 5 °C (41 °F). Tinción 32 vivos/68 muertos. Quizás, porque la savia conserva el semen cuando es congelado. Aunque la cantidad de savia se ha de reducir. Respuesta similar para la savia de arce. Las células sobreviven a la congelación pero dejan de moverse debido a la hiperosmolaridad. | | Adimantado a 5 °C (41 °F) en refrigerador con savia separada del semen hasta colocarlo en tubos capilares para su congelación. Acimantado durante 10 minutos. 18/4/2015. Descongelado en un baño de agua a 5 °C (41 °F). La muestra 1 mostraba un 5 % de los espermatozoides moviéndose hacia adelante normalmente y con una tinción vivos/muertos de 32/68. 18/5/2015. La muestra 2 tenía aproximadamente un 5 % moviéndose hacia adelante normalmente con una tinción vivos/muertos de 34/65. | Congelación ultrarrápida después de 10 minutos de acimantación a 5 °C (41 °F) | | BTE, sin fructosa, más savia de abedul | Recipiente #3 en bidón #2. | 2 pajuelas rosas, ventiladas, con una pajuela para aves y un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar en su interior. Arcilla en uno de los extremos y dejándolo abierto por arriba. | Almacenamiento con una pajuela ventilada, una pajuela para aves en su interior (pajuela para aves doblada en el extremo superior y algodón abajo) con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, arcilla en uno de los extremos solamente y el otro extremo abierto al N ₂ . El de MEJOR rendimiento. Se mantuvo el material abierto de modo que |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|-------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|--|---------------------------|--|--|------------------|--------------------------------------|---|---|---|
| 79 | 18/4/2015; 18/4/2015 | 17/4/2015 | Odín | Ninguna | 28 µl de semen, más 28 µl de BTE, sin fructosa, más 1/2 % de sacarosa, más 55 µl de savia de abedul en BTE sin fructosa, volumen final de 112 µl con 1:3 de semen y extensor de savia de abedul. | Quizás, porque la savia conserva el semen cuando es congelado, aunque la cantidad de savia se ha de reducir. Respuesta similar para la savia de arce. Las células sobreviven a la congelación pero pierden motilidad debido a la hiperosmolaridad. | | Esta era savia de abedul de primer flujo de Alaska. Se aclimató tras la mezcla únicamente colocándola entre paquetes de gel que estaban a 5 °C (41 °F) en el refrigerador y después se sometió a congelación ultrarrápida. Se prepararon dos pajuelas a partir de esta muestra. Una era una pajita amarilla ventilada y la otra una pajita verde ventilada. Un tubo tenía un 2-5 % de esperma moviéndose hacia adelante según estimación visual con una tinción vivos/muertos de 21/79. El segundo tubo tenía un 0 % de motilidad progresiva y no se efectuó la tinción vivos/muertos. Descongelado en un baño de agua fría a 12,8 °C (55 °F). | No se aclimató la muestra en el refrigerador. Se mezcló, se colocó en tubos y después se colocó entre paquetes de gel en el refrigerador, se llevó al bidón de N ₂ y se sometió a congelación ultrarrápida. | | Savia de abedul en BTE, sin fructosa | Recipiente #3, Tanque #2. | 2 pajitas, una amarilla y una verde, las dos ventiladas y con orificios; con una pajuela para aves, algodón hacia abajo, doblada en el extremo superior; con tubos capilares de 75 µl, con arcilla en un extremo. | no explotara. Todas las muestras se almacenaron de este modo de aquí en adelante. Bien, sin problemas |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ?Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|----------------------------|---------------------------|--|---|------------------|-------------------------------------|---|--|---|
| 80 | 18/4/2015, 18/4/2015 | 17/4/2015 | Odin | Ninguna | 50 µl de semen tenían 50 µl de BTE, sin fructosa, más 1/2 % de sacarosa añadidos conjuntamente en 1 tubo. Después, se añadieron 100 µl de BTE, sin fructosa, más savia de arce para un volumen final de 200 µl. Constituyendo el semen 1/4 de la mezcla total. | Quizás, Quizás | | Descongelado en un baño de agua fría a 12,8 °C (55 °F). 18/4/2015. Primera muestra: 2-3 % de motilidad normal, con una tinción vivos/muertos de 57/43; 18/4/2015. La segunda muestra tenía un 5-10 % de motilidad progresiva normal y una tinción vivos/muertos de 42/58; | Acimatada en el refrigerador durante 10 minutos en tubos separados, combinada después y envasada, sometida luego a congelación ultrarrápida | | Savia de arce en BTE, sin fructosa. | Recipiente #3, Tanque #2. | 2 pajilas, una naranja y una rosa, las dos ventiladas con una pajuela para aves en su interior, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar en su interior. | Bien, sin problemas. |
| 81 | 18/4/2015, 18/4/2015 | 18/4/2015 | Odin | Ninguna | 22 µl de semen tenían 22 µl de BTE, sin fructosa, más 1/2 % de sacarosa añadidos a 1 tubo. Después, se añadieron 44 µl de BTE, sin fructosa, más savia de arce para un volumen final | Si, Si | | Descongelado en un baño de agua fría a 12,8 °C (55 °F). 18/4/2015. La primera muestra tenía un 25-30 % de motilidad normal, con una tinción vivos/muertos de 50/50; 18/4/2015. La segunda muestra tenía aproximadamente un 55 % de motilidad progresiva normal, con una tinción vivos/muertos de 57/43. Se contaron 100 células en cada grupo. | Acimatado durante 10 minutos en el refrigerador a 5 °C (41 °F) y sometido después a congelación ultrarrápida | | Savia de arce en BTE, sin fructosa | Recipiente #3, Tanque #2. | 2 pajilas que estaban ventiladas con una pajuela para aves en su interior, el extremo del algodón abajo; tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, con arcilla en un extremo | Bien, sin problemas. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre la supervivencia y el almacenamiento de la muestra | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|--|---------------------------|--|--|--|--------------------------------------|---|---|--|
| 82 | 10/5/2015, 24/2/2016, Pajuela verde - Recipiente 5 2/3/2016 Pajuela verde - Recipiente 6 | 20/4/2015 | Odin | Ninguna | volumen de 88 µl más 65 µl de semen, más 65 µl de BTE, sin fructosa, más 1/2 % de sacarosa. Después 130 µl de BTE sin fructosa más savia de abedul, primer flujo | Si, Quizás; No, No | | Aclimatado a 5 °C (41 °F) en refrigerador con savia separada del semen hasta colocarlo en tubos capilares para su congelación. Acimato durante 10 minutos. Después sometido a congelación ultrarrápida, descongelación en agua helada, 10-15 % de buena movilidad. Tinción 24 vivos/76 muertos. 24/2/2016, Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F), 2-3 % de buena movilidad progresiva, pH de 7,0-7,2 con una tinción vivos/muertos de 22/76, 2/3/2016, Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Esperma Pajuela verde, Recipiente 6. Esperma con movilidad escasa, con una tinción vivos/muertos de 10/90. Las células están muy distorsionadas. 2/3/2016, Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Sin movilidad y las células están muy deformadas con 7 vivos/59 muertos. | Semen y BTE - Fruc. + 1/2 % de sacarosa. Acimato en un tubo separado de savia de abedul, BTE a 5,6 °C (42 °F) en el refrigerador durante 10 minutos, combinado y envasado después en 4 tubos. Tubo capilar de 75 µl, sellado por un extremo; colocado en una pajuela para aves, algodón abajo, dentro de una pajila ventilada. Se prepararon 4 pajuelas. Todas las pajilas verdes. | El pH en la tira de pH tras descongelar era de 7,0, 7,2, 7,0, 7,5. | Savia de abedul en BTE, sin fructosa | 2 pajuelas en el recipiente #6, tanque 1, y 2 pajuelas en el recipiente #5, tanque 1. | 4 pajilas verdes que estaban ventiladas, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, dentro de una pajuela para aves, dentro de una pajila ventilada | No explota pero se descongela demasiado despacio |
| 83 | 03/5/2015, 06/3/2016, 06/3/2016 | 20/4/2015 | Odin | Ninguna | 60 µl de semen, más 60 µl de BTE - fructosa, + 1/2 % de sacarosa. Después 60 µl de BTE más savia de arce, primer flujo, árbol | No, No, 6/3/2016 Pajuela amarilla. Entró agua en la muestra. Si, 6/3/2016 Pajuela amarilla | | Acimato a 5 °C (41 °F) en refrigerador con savia separada del semen hasta colocarlo en tubos capilares para su congelación. Acimato durante 10 minutos. Después sometido a congelación ultrarrápida, 3/5/2016, Descongelado en agua helada, 2 % de movilidad progresiva. Tinción vivos/muertos, 39 vivos/61 muertos. 6/3/2016, Descongelado en agua helada | Semen y BTE - Fruc. + 1/2 % de sacarosa. Acimato en un tubo separado de savia de arce, BTE a 5,6 °C (42 °F) en el refrigerador durante 10 minutos, combinado y envasado después en 4 tubos, tubo capilar de 75 µl, sellado por un extremo; colocado en una pajuela para aves, algodón abajo, dentro de una pajila ventilada. | El pH en la tira de pH tras descongelar era de 7,5-8, 7,0, 7,0 | Savia de arce en BTE, sin fructosa. | 2 pajuelas en el recipiente #6, tanque 1, y 1 pajuela en el recipiente #5, tanque 1. | 3 pajilas amarillas que estaban ventiladas, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, dentro de una pajuela para aves, dentro de una pajila ventilada | Bueno |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en madri | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------------------|-----------------------------|---------------|-------------------|--|-------------------------------------|---------------------------|--|---|--|--|---|--|--|
| 84 | 3/5/2015, 1/3/2016, 6/3/2016 | 21/4/2015 | Odm | Ninguna | #3, añadidos para un volumen final de 180 µl. 50 µl de semen tenían 50 µl de BTE, sin fructosa, más 1% de sacarosa añadidos conjuntamente a 1 tubo. Después se añadieron 100 µl de BTE, sin fructosa, más savia de arce para un volumen final de 200 µl. Constituyendo el semen 1/4 de la mezcla total. | Sí, sí, sí | | Agua a 5 °C (41 °F). 1 % de motilidad y 1 % moviéndose en el sitio. Tinción de 33 vivos/67 muertos. Mucha aglutinación. Quedó expuesto al agua en la descongelación debido a que perdió el sello del extremo del tubo. 30/6/2016. Descongelado en un baño de agua helada. Un 15-20 % son móviles. Hay aglutinación. 49 vivos/51 muertos. Acimado a 6,7 °C (44 °F) en refrigerador con savia separada del semen hasta colocarlo en tubos capilares para su congelación. Acimado durante 10 minutos. Después sometido a congelación ultrarrápida. 3/5/2015. Descongelado en un baño de agua helada. 55-60 % de motilidad progresiva. Tinción vivos/muertos, 39/61. No se midió el pH. 1/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Más de la mitad con motilidad progresiva y rápida, pH de 7, con una tinción de 64 vivos/36 muertos. 06/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Más del 60 % son móviles con ligera deformidad. Tiene motilidad rápida con una tinción de 73 vivos/27 muertos. | Preparadas 3 pajuelas. 3 pajuelas amarillentas. Semen y BTE - Fruc, + 1/2 % de sacarosa. Acimado en un tubo separado de savia de arce, BTE a 6,7 °C (44 °F) en el refrigerador durante 10 minutos, combinado y envasado después en 3 tubos, tubo capilar de 75 µl, sellado por un extremo; colocado en una pajuela para aves, algodón abajo; dentro de una pajuela ventilada. Preparadas 3 pajuelas. 3 pajuelas rosas. | 1/3/2016pH en la tira de pH de 7. 6/3/2016pH en la tira de pH de 7,5. | Savia de arce en BTE, sin fructosa. | 2 pajuelas en el recipiente #6, lanque 1, y 1 pajuela en el recipiente #5, Tanque #1. | ventilada | Los tubos se almacenaron bien aunque es mejor usar la pajula y el tubo capilar recubierto con Mylar solamente. |
| 85 | 2/3/2016 2/3/2016 | 21/4/2015 | Odm | Ninguna | 50 µl de semen tenían 50 µl de BTE, sin fructosa, más 1% de | Quizás - Inactiva, Quizás, inactiva | | Acimado a 6,7 °C (44 °F) en refrigerador con savia separada del semen hasta colocarlo en tubos capilares para su congelación. Acimado 10 minutos. Después sometido a congelación | Semen y BTE - Fruc, + 1/2 % de sacarosa, acimado en un tubo separado de savia de arce. BTE a 6,7 °C (44 °F) en refrigerador durante 10 minutos, combinado, | El pH en la tira de pH era de 7,0. El pH en la tira de pH era de 7,0 | Savia de arce en BTE, sin fructosa con o sin 10 % de | 2 pajuelas en el recipiente #6, lanque 1, y 1 pajuela en el recipiente #5. | 3 pajetas amarillentas que estaban ventiladas, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre la supervivencia y el almacenamiento del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|-------------------------|-----------------------------|---------------|-------------------|---|--|---------------------------|---|--|--|--|---|---|---|
| 86 | 03/5/2015; 03/5/2015 | 21/4/2015 | Odín | Ninguna | sacarosa añadidos conjuntamente a 1 tubo. Después se añadieron 50 µl de BTE. Sin fructosa, más savia de arce para un volumen final de 150 µl, constituyendo el semen 1/3 de la mezcla total. 10 µl de semen más 10 µl de BTE - Fruc. + 1/2 % de sacarosa, MAS YEMA. Después 12 µl de BTE - Fruc. más savia de arce, primer flujo, arbol 3. | No. Quizás | | ultrarrápida 2/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada y colocado después en una placa calefactora. Tenía un 5 % de motilidad progresiva y una linción de 36 vivos/64 muertos. 2/3/2016. Pajuela amarilla. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Menos de un 1 % son móviles y con una linción de 40 vivos/60 muertos | Se añadieron todos los volúmenes. Sin aclimatación. Congelación ultrarrápida. Añadido un 10 % de yema | | Savia de arce en BTE. sin fructosa/con 10 % de yema. | Recipiente #5. Tanque #1. | 1 pajuela rosa que estaba ventilada, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, dentro de una pajuela para aves, dentro de una pajuela | |
| 87 | 7/3/2016 | 22/4/2015 | Odín | Ninguna | 16 µl de semen más 16 µl de BTE - Fruc. + 1/2 % de sacarosa, MAS YEMA. Después 16 µl | Quizás - Inactiva. Las células no están muy distorsionadas aunque probablemente inactivas y no | | Aclimatado en el refrigerador en tubos separados a 6.1 °C (43 °F). Mezclado, envasado y sometido después a congelación ultrarrápida. 7/3/2016. Pajuela rosa. 1 % de motilidad/Células no distorsionadas. Tinción 19 vivos/81 muertos. | Aclimatado durante 10 minutos en el refrigerador a 6.1 °C (43 °F) y sometido después a congelación ultrarrápida. Añadido un 10 % de yema | pH de 7 en la tira de pH tras descongelar. | Savia de arce en BTE. sin fructosa/con yema. | Recipiente #6 en bidón #1. | Color desconocido de la pajuela. Era una pajuela rosa ventilada. | Se almacena bien, pero se descongela demasiado despacio |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|---|---------------------------|--|--|--|--|--|---|---|
| 88 | 3/5/2015, 2/3/2016. Pajuela rosa. Recipiente #6. 6/3/2016. Pajuela rosa. Recipiente #6. | 22/4/2015 | Odin | Ninguna | BTE-Fruc, Savia de arce, más 10 % yema. Volumen final de 48 µl. 53 µl de semen, más fructosa, + 1/2 % sacarosa, MAS YEMA. Después 53 µl de BTE- fructosa, + savia de arce más 10 % de YEMA | Sí, No. Descongelación demasiado caliente. La descongelación en agua no fría no es mejor. | | Aclimatado en el refrigerador en tubos separados a 6,1 °C (43 °F). Mezclado, envasado y sometido después a congelación ultrarrápida. 3/5/2015. Descongelado en agua helada, un 10 % de motilidad progresiva. pH 7. Tinción vivos/muertos 38 vivos/62 muertos. 2/3/2016. Descongelado en un baño de agua a 12,8 °C (55 °F). Menos de un 1 % móvil, muchas células deformadas con una tinción de 16 vivos/64 muertos. 6/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada. 0 % móvil. Células no deformadas con una tinción de 13 vivos/87 muertos. | Aclimatado durante 10 minutos en el refrigerador a 6,1 °C (43 °F), sometido después a congelación ultrarrápida. 10 % de yema añadido. | 2016. El pH en la tira de pH era de 7. El pH en la tira de pH era de 7 | Savia de arce en BTE, sin fructosa con yema. | El recipiente #6 en el bidón #1 tenía 2 pajuelas rosas, y el Recipiente #5 en el bidón #1 tenía 1 pajuela rosa | Dos pajuelas rosas que estaban ventiladas, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar dentro de una pajuela para aves, | Las pajuelas funcionan bien pero aísian demasiado descongelación. |
| 89 | 10/5/2015, 2/3/2016 | 23/4/2015 | Odin | Ninguna | 45 µl de semen con 55 µl de BTE- fructosa, + 1/2 % sacarosa y YEMA añadida en un 10 %. Después 35 µl de BTE + savia de arce de modo que llega a ser | No, No | | Aclimatado en el refrigerador en tubos separados a 6,1 °C (43 °F). Mezclado, envasado, y sometido después a congelación ultrarrápida. 10/5/2015 Una muestra traza de este tubo sobrevivió bien a temperatura ambiente. pH 7. Descongelación en baño de agua helada. Menos de un 1 % de motilidad. No se pudo efectuar una tinción vivos/muertos. No se pudo interpretar la tinción vivos/muerto debido a la yema presente en la muestra. 2/3/2016. Tubo naranja. | Aclimatado durante 10 minutos en el refrigerador a 6,1 °C (43 °F) y sometido después a congelación ultrarrápida. Añadido un 10 % de yema. | 2016. pH en la tira de pH de 7,0. | Savia de arce en BTE, sin fructosa más YEMA. | El recipiente #6 tiene 1 pajuela naranja, y el recipiente #5 tiene 1 pajuela naranja. | Dos pajuelas naranjas, ventiladas, con tubos capilares de 75 µl recubiertos con Mylar dentro de pajuelas para aves. | No explota pero se descongela demasiado despacio |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|--|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|---|---------------------------|---|--|---|---|---|--|---|
| 90 | 03/5/2015, 1/3/2016, 2/3/2016, Recipiente #6, Pajuela verde. | 23/4/2015 | Odin | Ninguna | 26 % de savia de abedul. 45 µl de semen con BTE - fructosa, + 1/2 % sacarosa y YEMA añadida en un 10 %. Después 32 µl de BTE + savia de abedul de modo que llega a ser un 19,7 % de savia de abedul. | Quizás. Quizás, parece inactiva. Quizás, parece inactiva. | | Descongelado en un baño de agua helada. Menos de un 1 % móvil con una tinción 33 vivos/67 muertos. Muchas células están deformadas. Acimatado en el refrigerador en tubos separados a 6,1°C (43 °F). Mezclado, envasado y sometido después a congelación ultrarrápida. 3/5/2015. Descongelado en un baño de agua a 12,8 °C (55 °F). Menos de un 1 % móvil o sin motilidad. 11/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada. Sin motilidad aunque las células no están deformadas con una tinción de 34 vivos/66 muertos = Inactividad. 2/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada. Sin motilidad pero las células no están deformadas con una tinción de 31 vivos/69 muertas = Inactividad. | Acimatado durante 10 minutos en el refrigerador a 6,1 °C (43 °F) y después a sometido a congelación ultrarrápida 10 % de yema añadido. | pH en la tira de pH de 7,0, 7,0, 7,0. | Savia de abedul en BTE, sin fructosa, más yema. | El recipiente #6 tiene 2 pajuelas verdes, y el recipiente #5 tiene 1 pajuela verde. | Tres pajulas verdes, ventiladas con tubos capilares de 75 µl recubierto con Mylar dentro de pajuelas para aves. | No explota pero se descongela demasiado despacio. |
| 91 | 24/2/2016. Pajita verde del recipiente #4. 24/2/2016. Pajita azul oscuro del recipiente #4. | 24/4/2015 | Odin | Ninguna | 30 µl de semen con BTE - fructosa + 1/2 % de sacarosa. Después, 30 µl de BTE - fructosa, + 1/2 % de sacarosa más 18 % de MA (diluído a un porcentaje total del 4,5 % de. | Quizás. Quizás parece inactiva. | | Mezclado a temperatura ambiente y colocado después entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F). Después sometido a congelación ultrarrápida. 24/2/2016. Pajita verde del recipiente #4. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Células no deformadas y un 2-3 % de motilidad con una tinción de 23 vivos/77 muertos. 24/2/2016. Pajita azul oscuro del recipiente #4. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Un 80 % de células no deformadas y un 1 % de motilidad, aunque este tubo tenía | Bajada de temperatura usando solamente paquetes de gel. | pH en la tira de pH tras descongelar de 7,5, 7,5. | Solo MA | Recipiente #4, Tanque 1, 2 pajuelas, una es verde y la otra es morado oscuro. | 2 pajulas, una verde y la otra azul oscuro. Ventiladas, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar dentro de una pajuela para aves. | |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|--|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|--|---------------------------|---|---|---|-------------------|---|--|---|
| 92 | 28/2/2016 | 25/4/2015 | Odin | Ninguna | MA) 15 µl de semen más 15 µl de BTE - fructosa, + 1/2 % sacarosa, más 15 µl de BTE - fructosa, + 1/2 % sacarosa más 18 % de MA (final de 6 % de MA) | Quizás parece inactiva con un 10 % de movimiento | | un 10-20 % de células deformadas global con una tinción de 35 vivos/65 muertos. Mezclado a temperatura ambiente y colocado después entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F). Congelación ultrarrápida 28/2/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Pajuela ventilada con un 10 % de motilidad progresiva y una tinción de 35 vivos/65 muertos. Ligera deformación celular. | Bajada de temperatura usando solamente paquetes de gel. | | MA solamente | Recipiente 3, tanque 1, 1 pajuela verde. | 1 pajuela verde ventilada, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar dentro de una pajuela para aves | Se almacena bien, pero se descongela demasiado despacio |
| 93 | 24/2/2016, Pajuela verde - Recipiente #4. 24/2/2016 Pajuela verde- Recipiente #4. 24/2/2016 Pajuela verde- Recipiente #4 | 24/4/2015 | Odin | Ninguna | 45 µl de semen, con 45 µl de BTE - fructosa, + 1/2 % sacarosa. Posteriormente, 45 µl de BTE - fructosa, + 1/2 % sacarosa más 18 % de MA = concentración final del 6 % de MA. | Sí, Sí, Sí | | Enfriado 10 minutos a 7,2 °C (45 °F). Mezclado, envasado y después sometido a congelación ultrarrápida. 24/2/2016. Pajuela verde - Recipiente #4. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Células no deformadas con un 2-3 % móvil. Inactivo pero vivo con una tinción de 55 vivos/45 muertos. 24/2/2016. Pajuela verde - Recipiente #4. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Células no deformadas con un 25-30 % motilidad decreciente durante 5 minutos con una tinción de 57 vivos/43 muertos. 24/2/2016. Pajuela verde del recipiente #4. Descongelado en un baño de | Enfriado a 7,2 °C (45 °F) durante 10 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | El pH en la tira de pH tras descongelar era de 7,5, 7,5, 7,5. | MA solamente | Recipiente 4, tanque 1, 3 pajuelas verdes todas aquí. | 3 pajuelas verdes ventiladas, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar dentro de una pajuela para aves. | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|----------------------------|---------------------------|--|---|--|-------------------|---|---|--|
| 94 | 10/5/2015, 10/5/2015 | 25/4/2015 | Odin | Ninguna | 20 µl de semen, más 55 µl de BTE - fructosa, + 1/2 % de sacarosa. Después, 4,9 µl de DMA añadidos. | No | | Enfriado durante 10 minutos y DMA añadido después. Descongelación en agua helada. Casi sin motilidad. No se determinó la tinción vivos/muertos; el DMA no funciona. | Enfriado a 7,2 °C (45 °F) durante 10 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | DMA | 2016 pH 7 | Recipiente #5, Tanque #1. | 1 pajilla naranja con 2 pajuelas para aves dentro de esta ya que faltaban grapas y 1 pajilla se quedó con una grapa, marcada con #89. | Pajilla ventilada con pajuela para aves y tubo capilar recubierto con Mylar dentro de pajuelas para aves |
| 95 | 3/5/2015, 6/3/2016, Pajuela naranja | 26/4/2015 | Odin | Ninguna | 22 µl de semen más 66 µl de BTE + 10 % de savia de arce. FORMULA DE PURDY | No. Quizás | | EL INVENTOR COMIENZA LAS FORMULAS DE PURDY QUE SON BTE CON DIFERENTES PORCENTAJES DE SAVIA DE ARCE EN LA DILUCIÓN. ESTAS CONTIENEN FRUCTOSA Y SACAROSA. VEASE LA HOJA SOBRE ESTAS FORMULAS. 3/5/2016 Descongelación en baño de agua helada. 2 % de motilidad progresiva, pH de 7 en papel de pH. 06/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Pajuela naranja con un 2 % de | Se mezcló a temperatura ambiente sin aclimatación y después se sometió a congelación ultrarrápida. La falta de aclimatación reduce la supervivencia de las células. | Purdy 10 % de savia de arce, 326 mOsm. | 5 y 6. Tanque #1. | 2 pajillas naranjas con tubos capilares de 75 µl recubiertos con Mylar dentro de pajuelas para aves | Pajilla ventilada con pajuela para aves y tubo capilar recubierto con Mylar dentro de pajuelas descongela demasiado despacio. | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|---|---------------------------|---|---|---|---------------------------------------|--|--|---|
| 96 | 10/5/2015 | 27/4/2015 | Odin | Ninguna | 18 µl de semen con 54 µl de Purdy 10% de savia de arce. Diluciones 1:3 | No | | motilidad progresiva y 2% moviéndose en el sitio, con una tinción de 14 vivos/86 muertos. 10/5/2016 Descongelación en baño de agua helada. 1-3% de estos con motilidad progresiva. Tinción vivos/muertos de 31 vivos/69 muertos. Comentarios: la fructosa, la no aclimatación y el pH elevado pueden ser un problema. | Se mezcló a temperatura ambiente sin aclimatación y después se sometió a congelación ultrarrápida. | | Purdy 10% de savia de arce, 326 mOsm. | Recipiente #5, Tanque #1. Pajita amarillo claro | 1 pajita amarillo claro, con un tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar dentro de una pajuela para aves. | |
| 97 | 6/3/2016 Pajita rosa. Recipiente #6 | 27/4/2015 | Odin | Ninguna | 12 µl de semen con 36 µl de Purdy 10% de savia de arce. | ¡Sí! | | 6/3/2016 Sin aclimatación y se descongeló en un baño de agua helada. Más del 50% en movimiento con un 20% moviéndose normalmente. La tinción era 52 vivos/48 muertos. | Se mezcló a temperatura ambiente, se colocó entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F) y se sometió después a congelación ultrarrápida. | pH de 7 en la tira de pH tras descongelar. | Purdy 10% de savia de arce, 326 mOsm. | Recipiente #6 Tanque 1. Pajita rosa. | 1 pajita rosa que estaba ventilada, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, dentro de una pajuela para aves, dentro de una pajuela | Se almacena bien, pero se descongela demasiado despacio |
| 98 | | | | | Fórmulas de Purdy empezando con la #95 | | | Fórmulas de Purdy empezando con la #95 | Fórmulas de Purdy empezando con la #95 | | | | | |
| 99 | 24/2/2016 Recipiente #5, Pajita rosa. 24/2/2016 Recipiente #4, Pajita rosa. 24/2/2016. Recipiente #4, Pajita rosa | 27/4/2015 | Odin | Ninguna | 50 µl de semen con 100 µl de Purdy 10% de savia de arce | Quizás la savia parece reducir el movimiento = inactividad. Quizás = Lo mismo. Quizás = Lo mismo. | | Procesado a temperatura ambiente, colocado entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F) y después sometido a congelación ultrarrápida. 24/2/2016. Pajuela rosa. Recipiente #5. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Sin movimiento. No se midió el pH. Células muy deformadas y con una tinción de 27 vivos/73 muertos. 24/2/2016. Pajita rosa. Recipiente #4. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). | Se mezcló a temperatura ambiente, se colocó entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F) y se sometió después a congelación ultrarrápida. | 24/2/2016. Pajuela rosa. No se midió el pH. Segunda pajuela. pH de 7,5. No se midió el pH para la última pajuela. | Purdy 20% de savia de arce, 308 mOsm. | El recipiente #4 tiene 2 pajitas rosas y el recipiente #5 tiene 1 pajita rosa. | 3 pajitas rosas que estaban ventiladas, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, dentro de una pajuela para aves, dentro de una pajita. | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|--|---------------------------|--|---|---|--|--|--|---|
| 100 | 16/5/2015, 6/3/2016, 7/3/2016. Pajuela verde del Recipiente #6. 13/3/2016 Pajuela verde del Recipiente #6. | 28/4/2015 | Odin | Ninguna | 70 µl de semen más 210 µl de Purdy BTE + 20 % de savia de arce, 308 mOsm. | Quizás inactiva. Quizás inactiva. No, No | | Casi sin movimiento y las células muy distorsionadas. Con una de tinción 29 vivos/71 muertos. 24/2/2016. Pajuela rosa. Recipiente #4. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Menos de un 1 % con motilidad progresiva y las células estaban distorsionadas. 36 vivos/64 muertos. Procesado a temperatura ambiente, colocado entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F) y después sometido a congelación ultrarrápida. 16/5/2015. Descongelado en agua helada, 1-5 % con buena motilidad aunque la motilidad disminuye rápidamente. La tinción vivos/muertos muestra 39 vivos/61 muertos, 30 vivos/70 muertos. Una placa calefactora sobre el microscopio parece acelerar la pérdida de motilidad. 6/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F), 10- 15 % de motilidad con movimiento hacia adelante. Muchas células están distorsionadas debido a la baja osmolaridad. La tinción era de 17 vivos/83 muertos. 7/3/2016. Pajuela verde. Descongelado en un baño de agua helada. Con un 1-2 % en movimiento. Las células estaban muy distorsionadas y con una de tinción 20 vivos/80 muertos. 13/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada y las células estaban muy distorsionadas. Menos de un 1 % de motilidad y con una tinción de 9 vivos/91 muertos. | Se mezcló a temperatura ambiente, se colocó entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F) y se sometió después a congelación ultrarrápida. | 6/3/2016 pH 7 en la tira de pH tras descongelar. 6/3/2016. pH 7 en la tira de pH tras descongelar. | Purdy 20 % de savia de arce, 308 mOsm. | Tres pajuelas verdes en el recipiente #6, 1 pajuela en el recipiente #5. | 4 pajuelas verdes que estaban ventiladas, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, una pajuela para aves, dentro de la pajuela. | Bueno, almacena bien, pero se descongela demasiado despacio |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|--|---------------------------|---|---|---|--|--|---|---|
| 101 | 3/5/2015, 2/3/2015 Pajuela amarilla. Recipiente #6 | 29/4/2015 | Odin | Ninguna | 20 µl de semen más 60 µl de Purdy, 10 % de savia de arce | Desconocido ya que la muestra del recipiente #5 se salió de la pajuela. Quizás | | 2/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Pajuela amarilla. Células muy deformadas. Tinción 3 vivos/97 muertos. | Se mezcló a temperatura ambiente, se colocó entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F) durante 2 minutos y se sometió ultrarrápida. | 2/3/2016 pH 7 en la tira de pH tras descongelar. | Purdy 10 % de savia de arce | Dos pajuelas amarillas, una en el recipiente #6 y una en el recipiente #5. | 2 pajillas amarillas que estaban ventiladas, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, dentro de una pajuela para aves, dentro de la pajilla. | La pajilla no contiene tubo capilar. Perdido en el tanque. |
| 102 | 10/5/2015, 2/3/2016. Pajuela naranja del recipiente #6. 6/3/2016. Pajuela naranja del recipiente #6. | 30/4/2015 | Odin | Ninguna | 52 µl de semen con 104 µl de Purdy 5 % de savia de arce | Quizás, Quizás, Muchas células hinchadas y distorsionadas | | Procesado a temperatura ambiente, colocado entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F) durante 2 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. 10/5/2015. Descongelado en un baño de agua a 21,1 °C (70 °F). Tinción vivos/muertos: 28 vivos/72 muertos. 2/3/2016. Pajilla naranja. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Tenía un 10 % de motilidad progresiva con muchas células deformadas. La velocidad de la motilidad aumentó al calentar. Con una tinción de 33 vivos/67 muertos. 06/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Tenía un 10-15 % de motilidad progresiva y muchas células hinchadas y deformadas. 21 vivos/79 muertos. La velocidad de la motilidad aumentó al calentar. | Se mezcló a temperatura ambiente, se colocó entre paquetes de gel a 6,1 °C (43 °F) durante 2 minutos y se sometió ultrarrápida. Sin aclimatación. | 2/3/2016 pH de 7, 06/3/2016 pH de 7 | Purdy 5 % de savia de arce. | 3 pajillas naranjas, 2 en el recipiente #6 y 1 en el recipiente #5. | 3 pajillas naranjas que estaban ventiladas, tubo capilar de 75 µl dentro de una pajuela para aves. | Bueno, se almacena bien, pero se descongela demasiado despacio. |
| 103 | 3/5/2015, 10/5/2016, 21/3/2016. Pajuela verde | 30/4/2015 | Odin | Ninguna | 65 µl de semen, más Purdy 10 % de savia de arce más | NO, quizás, Si = Inactiva. Si = | | Se mezcló a temperatura ambiente sin aclimatación y después congelación ultrarrápida. pH de 7,5, 0 % de motilidad, no efectuada la tinción vivos/muertos. | Se mezcló a temperatura ambiente sin aclimatación y después congelación ultrarrápida. | 7,5 y 7, 7,7. | Purdy 10 % de savia de arce más 5 % de | 4 pajillas verdes, 2 pajuelas en el recipiente #5 | 4 pajillas verdes que estaban ventiladas. | Bueno |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Machos donante | Gallina receptora | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---|-----------------------------|----------------|-------------------|--|--|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 104 | 3/5/2015 Recipiente #6, 13/3/2016 Pajuela verde Recipiente #6 | 1/5/2015 | Odin | Ninguna | 5 % (13 µl) de DIMA. Sin acimatación | Inactiva | | Muestra descongelada el 10/5/2015. Baño de agua helada. pH de 7.2. 3 % de motilidad. Tinción vivos/muertos de 23 vivos/77 muertos. 2/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Observado un 2 % móvil. Casi sin deformación macroscópica de las células. Con una tinción de 52 vivos/48 muertos. Cuanto más tiempo se calentaba sobre la placa, mayor era la motilidad hasta un 4 %. 13/3/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Menos de un 1 % de motilidad. Ligera deformidad celular y una tinción de 20 vivos/80 muertos. | Se mezcló a temperatura ambiente sin acimatación y después se sometió a congelación ultrarrápida. | 7 | (13 µl) de DIMA. | 2 pajuelas en el recipiente #6. | tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, dentro de una pajuela para aves, dentro de una pajila ventilada. | |
| 105 | 04/4/2016, 08/4/2016, 10/4/2016 | 25/3/2016 | Odin | Ninguna | 8 µl de semen más 8 µl de Purdy 10 % de savia de arce más arabinogalactina . (sin MA), más Purdy 10 % savia de arce más arabinogalactina más 12% de MA. 55 µl de semen; más 55 µl de BTE conisin fructosa más 1/2 % de sacarosa; | Quizás; Se cometió un error ajustando el pH en el 2° medio usado. | | 03/5/2015. Las células no funcionan bien con esto a temperatura ambiente. Descongelado en agua helada. Menos de un 2 % móvil. No electuada la tinción vivos/muertos. 4/4/2016. Descongelado en un baño de agua helada. Sin motilidad y con una tinción de 54 vivos/46 muertos. 8/4/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F) y después palmeado para calentarlo. Sin motilidad y con una tinción de 4 vivos/96 | Enfriado 15 minutos y añadido el 2° diluyente. Envasado rápidamente y después congelación ultrarrápida. | 7,51 y 7,23. (ajustado erróneamente y malo para la motilidad) | Purdy 10 % de savia de arce más arabinogalactina y después 12% de MA. Extensores de 2015 que contienen savia. El segundo diluyente tenía un pH | Pajuela amarilla en el recipiente #5 2 pajuelas en el recipiente #6, 1 pajuela en el recipiente #5 | Pajila amarilla que estaba ventilada, tubo capilar de 75 µl recubierto con Mylar, dentro de una pajuela para aves, dentro de una pajila ventilada. Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo. Dentro de una pajila pequeña | Bueno Se almacena bien y se descongela bien. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------|-------------------|---|--|---------------------------|---|---|--|---------------------------|---|---|---|
| 106 | 3/4/2016, 8/4/2016, 10/4/2016 | 26/3/2016 | | Ninguna | más 55 µl de BTE con/sin fructosa + savia de arce de primer flujo, árbol #3, 2015 | Uso de bicarbonato para cambiar el pH de 6.48 a 7.23. Esto parece perjudicar la motilidad (mala). Usadas 30 gotas de bicarbonato desde una jeringa de insulina de baja dosis a un tubo de 10 cm ³ . | | muy muertos. 10/4/2016. Descongelado en un baño de agua helada a 5 °C (41 °F). Sin motilidad y con una tinción de 12 vivos/88 muertos. | Acimatado en el refrigerador a 5,6 °C (42 °F) durante 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | 7.51 y 7.23. (ajustado erróneamente y malo para la motilidad). | ajustado con bicarbonato. | 2 pajuelas en el recipiente #6 y 1 pajuela en el recipiente #5. | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo. Dentro de una pajita pequeña ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |
| | | | | | 50 µl de semen más 50 µl de BTE - Fruc, + 1/2 % de sacarosa; más 100 µl de BTE - Fruc + savia de arce de primer flujo, 2015 | Quizás; Se cometió un error ajustando el pH en el 2º medio usado. Uso de bicarbonato para cambiar el pH de 6.48 a 7.23. Esto parece perjudicar la motilidad (mala). Usadas 30 | | 3/4/2016. Acetular. pH de 8 en la tira de pH. No observadas células en la tinción VM. 8/4/2015. Descongelado en un baño de agua helada y después palmeado para calentarlo. pH próximo a 8 en la tira de pH. No observadas células. Usadas. Sin tinción VM. 10/4/2016. Descongelado en agua helada, pH próximo a 7.5 en la tira de pH. Sin motilidad observada. 21 vivos/79 muertos. | | Extensores de 2015 que contienen savia. El segundo diluyente tenía un pH ajustado con bicarbonato. | | | | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ?Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|--------------------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|---|---------------------------|---|---|--|--|--|---|---|
| 107 | 8/4/2016, 4/4/2016, 8/4/2016 | 26/3/2016 | Odin | Ninguna | 47 µl de semen más 23 µl de BTE - Fruc, + 1/2 % de sacarosa; más 65 µl de BTE - fructosa + savia de arce de 1 ^{er} flujo, 2015 | gotas de bicarbonato desde una jeringa de insulina de baja dosis a un tubo de 10 cm ³ . Quizás: <u>Se cometió un error al ajustar el pH</u> en el 2 ^o medio usado. Uso de bicarbonato para cambiar el pH de 6.48 a 7.23. Esto parece perjudicar la motilidad (mala). Usadas 30 gotas de bicarbonato desde una jeringa de insulina de baja dosis a un tubo de 10 cm ³ . | | 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7 en la tira de pH. Sin motilidad. Con una tinción de 53 vivos/47 muertos. 8/4/2016. Descongelado en agua helada y después palmeado para calentarlo. El pH en la tira de pH era de 7.2. Sin motilidad. Tinción de 15 vivos/85 muertos. 8/4/2016. Descongelado en agua helada y después palmeado para calentarlo. pH de 7.5 en la tira de pH. Tinción de 13 vivos/87 muertos. | Acimatado 16 minutos a 5.6 °C (42 °F) y envasado en 3 pajuelas y sometido a congelación ultrarrápida. | El pH era de 7.51 y luego (ajustado de 7.23 erróneamente y malo para la motilidad) | Extensores de 2015 que contienen savia. El segundo diluyente tenía un pH ajustado con bicarbonato. | 2 pajuelas en el recipiente #5 y 1 pajuela en el recipiente #5 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo, dentro de una pajita pequeña ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |
| 108 | 4/4/2016, 4/10/2016, 10/4/2016 | 27/3/2016 | Odin | Ninguna | 40 µl de semen; más 20 µl de BTE - | Quizás: <u>Se cometió un error al ajustar</u> | | 4/4/2016. Tubo capilar perdido de la pajuela al tanque. 10/4/2016. Descongelado en agua helada. Sin motilidad. pH de 7.2 No se efectuó la | Acimatado 16 minutos a 5.6 °C (42 °F) y envasado en 3 pajuelas y sometido a congelación ultrarrápida. | El pH era de 7.51 y luego (ajustado de 7.23) | Extensores de 2015 que contienen savia | 2 pajuelas en el recipiente #8 y 1 pajuela en | tubo capilar recubierto con Mylar, sellado | Se almacena bien y se descongela bien. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento | |
|--------|---|-----------------------------|---------------|-------------------|---|---|---------------------------|--|---|---|--|---|---|--|---|--|
| 109 | 4/4/2016, 4/4/2016, 10/4/2016, 10/4/2016 | 27/3/2016 | Odin | Ninguna | Fruc + 1/2 % de sacarosa, más 40 µl de BTE - fructosa + savia de arce de 1º flujo. Árbol #3, 2015 | el pH en el 2º medio usado. Uso de bicarbonato para cambiar el pH de 6.48 a 7.23. Esto parece perjudicar la motilidad (mala). Usadas 30 gotas de bicarbonato desde una jeringa de insulina de baja dosis a un tubo de 10 cm³. | | linción VM 10/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7.2 en la tira de pH. Menos de un 1 % móvil. 24 vivos/76 muertos. | Acimatado 16 minutos a 5.6 °C (42 °F) y envasado en 4 pajuelas y sometido a congelación ultrarrápida. | El pH era de 7.51 y luego (ajustado) erróneamente y malo para la motilidad) | Extensores de 2015 que contienen savia. El segundo diluyente tenía un pH ajustado con bicarbonato. | en ellos. El segundo diluyente tenía un pH ajustado con bicarbonato | el recipiente #5 | 2 pajuelas en el recipiente #6 y 2 pajuelas en el recipiente #5. | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajuela ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |
| | | | | | 40 µl de semen; más 40 µl de BTE - Fruc + 1/2 % de sacarosa; más 80 µl de BTE - Fruc + savia de arce de 1er flujo. Árbol #3, 2015 | Quizás: Se cometió un error alustando el pH en el 2º medio usado. Uso de bicarbonato para cambiar el pH de 6.48 a 7.23. Esto parece | | 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 8 en la tira de pH. Sin motilidad. Con una linción de 30 vivos/70 muertos. 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7.2 en la tira de pH. Sin motilidad. linción de 30 vivos/70 muertos 10/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7.5 en la tira de pH. Sin motilidad y con una linción de 19 vivos/61 muertos. 10/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7.5. | | El pH era de 7.51 y luego (ajustado) erróneamente y malo para la motilidad) | Extensores de 2015 que contienen savia. El segundo diluyente tenía un pH ajustado con bicarbonato. | en ellos. El segundo diluyente tenía un pH ajustado con bicarbonato | el recipiente #5 | 2 pajuelas en el recipiente #6 y 2 pajuelas en el recipiente #5. | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajuela ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|---|---------------------------|--|---|--|--|---|--|---|
| 110 | 3/4/2016, 5/4/2016, 10/4/2010 | 28/3/2016 | Odin | Ninguna | 30 µl de semen; más 30 µl de BTE - Fruc + 1/2 % de sacarosa; más BTE - fructosa + savia de arce de 1er flujo, 2015 | perjudicar la motilidad (maia). Usadas 30 gotas de bicarbonato desde una jeringa de insulina de baja dosis a un tubo de 10 cm ³ . Quizás; Se cometió un error ajustando el pH en el 2º medio usado. Uso de bicarbonato para cambiar el pH de 6.48 a 7.23. Esto parece perjudicar la motilidad (maia). Usadas 30 gotas de bicarbonato desde una jeringa de insulina de baja dosis a un tubo de 10 cm ³ . | | 3/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7.2 en la tira de pH. Sin motilidad. Tinción de 51 vivos/49 muertos. 5/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7 en la tira de pH. Sin motilidad. Con una tinción de 5 vivos/95 muertos 10/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7.2 en la tira de pH. Sin motilidad. Tinción de 16 vivos/84 muertos. | Acimatado 16 minutos en el refrigerador a 5.6 °C (42 °F) y sometido después a congelación ultrarrápida. | El pH era de 7.51 y luego de 7.23 (ajustado erróneamente y malo para la motilidad) | Extensores de 2015 que contienen savia. El segundo diluyente tenía un pH ajustado con bicarbonato. | 2 pajuelas en el recipiente #6 y 1 pajuela en el recipiente #5. | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajita ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|--|---------------------------|--|--|---|--|--|---|---|
| 111 | 4/4/2016, 8/4/2016, 8/04/2016 | 28/3/2016 | Odin | Ninguna | 40 µl de semen; más 40 µl de BTE - Fruc. + 1/2 % de sacarosa; más 60 µl de BTE - Fruc. + savia de arce de 1 ^{er} flujo. Arbol #3, 2015 | Quizás; Se cometió un error ajustando el pH en el 2^o medio usado. Uso de bicarbonato para cambiar el pH de 6.48 a 7.23. Esto parece perjudicar la motilidad (maia). Usadas 30 gotas de bicarbonato desde una jeringa de insulina de baja dosis a un tubo de 10 cm ³ . | | 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7.2 en la tira de pH. Sin motilidad y con una tinción de 35 vivos/65 muertos. 8/4/2016. Descongelado en agua helada y después palmeado para calentarlo. pH de 7.2 en la tira de pH. Tinción de 5 vivos/95 muertos. 8/4/2016 Menos de un 1 % de motilidad. Descongelado en agua helada. pH de 7.2 en la tira de pH. Tinción de 7 vivos/93 muertos. | Acimatado durante 18 minutos en el refrigerador a 5.6 °C (42 °F) y sometido después a congelación ultrarrápida. | El pH era de 7.51 y luego de 7.23 (ajustado erróneamente y malo para la motilidad). | Extensores de 2015 que contienen savia. El segundo diluyente tenía un pH ajustado con bicarbonato. | 2 pajuelas en el recipiente #6 y 1 pajuela en el recipiente #5 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajilla ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |
| 112 | 4/4/2016, 5/4/2016, 5/4/2016 | 30/3/2016 | Odin | Ninguna | 42 µl de semen; más 42 µl de BTE sin fructosa + 1/2 % de sacarosa (pH 7.4); más 65 µl de BTE - Fruc. + savia de arce de 1 ^{er} flujo. | Si, una muestra funcionó muy bien y el inventor se pregunta si se congela más lentamente. | | 04/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7.5 en la tira de pH. Tinción de 25 vivos/75 muertos. 5/4/2015. Descongelado en agua helada y después palmeado para calentarlo. 50 % de motilidad. pH de 7.5 en la tira de pH. Tinción de 53 vivos/47 muertos. 5/4/2016. Descongelado en agua helada y después palmeado para calentarlo. Sin motilidad. 8 vivos/92 muertos. Requiere congelar despacio y al menos un 30 % de savia para | Acimatado en paquetes de gel a 5.6 °C (42 °F) durante 16 minutos. Después sometido a congelación ultrarrápida. Una muestra quedó atrapada en el recipiente y se quedó encima del N ₂ L y no se pudo someter a congelación ultrarrápida. Las otras muestras del grupo se sometieron a congelación ultrarrápida y murieron. | 7.4 y después 7.23, ambos diluyentes de 2015 con savia que tuvieron ajustes de pH que fueron mal. | BTE sin fructosa, más 1/2 % de sacarosa con un pH ajustado con bicarbonato de 7.51 a 7.4; | 1 pajuela en el recipiente #5 y 2 pajuelas en el recipiente #4 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajilla ventilada | El sello tiende a desprenderse al descongelar debido a la presión del N ₂ L dentro del tubo capilar. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ?Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|---|---------------------------|---|---|---|---|---|--|---|
| 113 | 4/4/2016, 5/4/2016, 8/4/2016 | 30/3/2016 | Odin | Ninguna | Savia del árbol #3 (2015), (pH 7,23) 35 µl de semen: más 35 µl de BTE - Fruc + 1/2 % de sacarosa (pH 7,4); más 35 µl de BTE - Fruc + savia de arce de 1er flujo, árbol #3, 2015. (pH 7,23). | Quizás: El ajuste de pH en los dos diluyentes está estresando demasiado a las células y defiene la motilidad | | que las células sobrevivan. El ajuste de pH es malo para estas muestras. | Acimatado durante 16 minutos en el refrigerador a 6,1 °C (42 °F) y sometido después a congelación ultrarrápida. | 7,4 y después 7,23, ambos diluyentes de 2015 con savia que tuvieron ajustes de pH que fueron mal. | Después se añadieron BTE - fructosa + savia de arce, árbol #3, con un pH ajustado con bicarbonato a 7,23. | 1 pajuela en el recipiente #5 y 2 pajuelas en el recipiente #4. | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajita ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |
| | | | | | | | | Después se añadieron BTE - fructosa + savia de arce, árbol #3, con un pH ajustado con bicarbonato a 7,23. | | | Después se añadieron BTE - fructosa + savia de arce, árbol #3, con un pH ajustado con bicarbonato a 7,23. | | | |
| | | | | | | | | 4/4/2016. Descongelado en agua helada. No observadas células. No se midió el pH. Sin tinción VM. | | | | | | |
| | | | | | | | | 5/4/2016. Descongelado en agua helada. Sin motilidad. No se midió el pH. Tinción de 19 vivos/81 muertos. | | | | | | |
| | | | | | | | | 8/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7,3. Sin motilidad y con una tinción de 12 vivos/88 muertos. | | | | | | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|--|---------------------------|--|---|---|--|--|--|---|
| 114 | 4/4/2016, 5/4/2016, | 2/4/2016 | Odin | Ninguna | 25 µl de semen; más 25 µl de BTE - Fruc + 1/2 % de sacarosa (pH 7.4); más 35 µl de BTE - Fruc + savia de arce de 1er flujo (pH 7.23). 2015. Ningún otro crioprotector | Quizás; es necesario modificar el pH y la velocidad de congelación. Ralentizar la congelación y disminuir el pH para reducir el metabolismo celular. | | 4/4/2016. Descongelado en agua helada. Sin motilidad. pH 8 en la tira de pH. Tinción de 26 vivos/73 muertos. 5/4/2016. Descongelado en agua helada y sin motilidad. pH de 7,4 en la tira de pH. Tinción de 10 vivos/90 muertos. Se usó muy poca savia y la congelación ha de ser lenta. El pH se ha de reducir en los extensores de partida. | Acimatado durante 16 minutos en el refrigerador a 6,1 °C (42 °F) y sometido después a congelación ultrarrápida. | 7.4 y después 7,23, ambos diluyentes de 2015 con savia que tuvieron ajustes de pH que fueron mal. | BTE sin fructosa, más 1/2 % de sacarosa con un pH ajustado con bicarbonato de 7,51 a 7,4; Después se añadieron BTE - fructosa + arce, árbol #3, con un pH ajustado con bicarbonato a 7,23. | 1 tubo en el recipiente #5 y 1 tubo en el recipiente #4. | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajita ventilada | |
| 115 | 3/4/2016, 5/4/2016, 5/4/2016, 5/4/2016 | 3/4/2016 | Odin | Ninguna | 65 µl de semen; más 65 µl de BTE - Fruc + 1/2 % de sacarosa (pH 7,4); más 65 µl de BTE - Fruc + savia de arce de 1er flujo, 2015 (pH 7,23) | Quizás; es necesario modificar el pH y la velocidad de congelación. Ralentizar la congelación y disminuir el pH para reducir el metabolismo celular. | | 3/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de la tira de pH de 7,4. Sin motilidad. Con una tinción de 17 vivos/84 muertos. Es necesario aumentar el porcentaje de savia a partir de un 33 %. 5/4/2016. Muestra perdida ya que se perdió el sello al descongelar. 5/4/2016. Descongelado en agua helada y después palmado para calentarlo ya que se perdió el sello. pH de 7,5 en la tira de pH. Sin motilidad. Tinción de 8 vivos/92 muertos 5/4/2016. Descongelado en agua helada | Acimatado 20 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida | | | | | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|---|---------------------------|---|---|----------------------------|---|---|--|---|
| 116 | 4/4/2016, 4/4/2016, 4/4/2016 | 4/4/2016 | Odin | Ninguna | 40 µl de semen; más extensor de semen de azor = BTE - Fruc + 1/2 % de sacarosa, con pH 6,27. Más 80 µl de BTE - Fruc + arce de Manchuria + glutatión + ácido N,N-bis.... sulfónico | NO, NO, NO. Error en la fórmula que define la motilidad en las muestras. La adición de glutatión y ácido N,N-bis... sulfónico no debería haberse hecho. | | 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7. Tinción 0 vivos/100 muertos. Sin motilidad. 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7. Tinción de 25 vivos/75 muertos. Sin motilidad. 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH de 7. Tinción de 9 vivos/91 muertos. Sin motilidad | Acimatado 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | pH 6,27 y después pH 6,74. | Arce de Manchuria + BTE - Fruc con pH ajustado de 6,74 con adición de glutatión + ácido N,N-bis.... sulfónico | 3 pajuelas en el recipiente #3 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajita ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |
| 117 | 4/4/2016, 4/4/2016, 4/4/2016 | 4/4/2016 | Odin | Ninguna | 40 µl de semen; más extensor de azor (pH 6,27); más 80 µl de BTE - Fruc + arce de Manchuria. 1 ^{er} flujo. glutatión + ácido N,N-bis.... sulfónico | NO, NO, NO. Error en la fórmula que define la motilidad en las muestras. La adición de glutatión y ácido N,N-bis... sulfónico no debería haberse | | 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH 7. Sin motilidad. 28 vivos/72 muertos. 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH 7 Sin motilidad y con una tinción de 0 vivos/100 muertos. 4/4/2016. Descongelado en agua helada. pH 7. Sin motilidad. Muestra demasiado pequeña para una tinción vivos/muertos. Falta 1 pajuela. | Acimatado 15 minutos y después sometido a congelación ultrarrápida. | pH 6,27 y después pH 6,74 | Arce de Manchuria + BTE - Fruc con pH ajustado de 6,74 con adición de glutatión + ácido N,N-bis.... sulfónico | 4 pajuelas en el recipiente #3 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajita ventilada | Se almacena bien y se descongela bien. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|---------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|--|---------------------------|---|--|---------------------|--|---|---|---|
| 118 | 4/5/2016. () | 4/5/2016 | Odin | Ninguna | 33 µl de semen; más 66 µl de BTE - Fruc + savia de arce, árbol #3, 2015. No se acimató con un extensor. Solo se acimató el semen en su propio tubo y después se añadió la savia. | hecho Sí, la simple adición de savia permitió sobrevivir a las células. | Valor Brix 2,5 | 5/4/2016. Descongelado en agua helada. El pH de la tira de pH era de 7. Un 15-20 % moviéndose inicialmente. 47 vivos/53 muertos. La acimatación más prolongada puede haber aumentado la supervivencia. Pero una acimatación más prolongada reduce la supervivencia en los tubos seminales de las aves cuando no se ha añadido un extensor. | El semen se acimató en su propio tubo durante 5 minutos y después se añadió la savia de arce, árbol #3 (2015). Después se bajó lentamente hasta el N ₂ L. | pH 6,48 | BTE - Fructosa + arce, savia #3 (2015). (pH original 6,48 desde 2015) | 2 pajuelas en el recipiente #3 | Tubo capilar recubierto con Mylar + Critocap + tapón azul + pajita ventilada | |
| 119 | 10/4/2016, 11/4/2016, () | 5/4/2016 | Odin | | Vuelta a las fórmulas de 2015. La modificación del pH que efectuó el inventor estaba deteniendo la motilidad de las células de modo que este volvió a los extensores de referencia. 45 µl de semen; más 45 µl de BTE - Fructosa + | Sí, Sí | Valor Brix 2,5 | 10/4/2016. Descongelado en agua helada, pH 7 en la tira de ensayo. Aproximadamente un 5 % vibrando en el sitio. 30 vivos/70 muertos. Probablemente habría ido mejor si se hubiera expuesto a los vapores más tiempo. 11/4/2016. Descongelado en agua helada, pH 7 en la tira de ensayo. Algunos vibrando en el sitio aunque no se mueven hacia adelante. 31 vivos/68 muertos. Se requieren 90 segundos para procesar 1 muestra en 4 tubos. | Colocado en el recipiente #5 sobre vapores de nitrógeno líquido durante 10 segundos y después sometido a congelación ultrarrápida con inmersión lenta. | 7,51 y después 6,48 | BTE - Fructosa + Sacarosa (pH 7,51), después BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015. (pH 6,48). | #5 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo, dentro de una pajita pequeña ventilada | El sello tiende a desprenderse al descongelar debido a la presión del N ₂ L dentro del tubo capilar. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|--|---------------------------|--|--|--------------------|---|---|---|---|
| 120 | 10/4/2016 | 8/4/2016 | Odin | | <p>1/2 % de sacarosa (pH 7.51). Más 90 µl de BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015 (pH 6,48)</p> <p>Vuelta a las fórmulas de 2015 La modificación del pH que efectuó el inventor estaba deteniendo la motilidad de las células de modo que este volvió a los extensores de referencia. 45 µl de semen, después 45 µl de BTE - Fructosa + 1/2 % Sacarosa (pH 7.51); después se añadió 90 µl de BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015 (p</p> | Sí. Las fórmulas de savia originales de 2015 sustentan bien las células. | | <p>10/4/2016. Descongelado en agua helada. Un 50 % móvil inicialmente hasta aproximadamente un 5 % móvil durante aproximadamente 10 minutos. 62 vivos/36 muertos. Se requirieron 90 segundos para empaquetar las 4 pajuelas y este retraso en colocarlas en el N₂L probablemente permitió disipar el gradiente osmótico a través de las células, permitiendo que la célula se rehidrata antes de la congelación. Esto es una conjetura, pero anotado como problema en las referencias. Necesita un tiempo de procesamiento menor. El inventor almacenó una pequeña muestra de este tubo en el refrigerador desde las 7:30 am hasta la 1:30 am y más del 75 % se movían hacia adelante y en línea recta (no congelados).</p> | Se aclimató 16 minutos a 5.6 °C (42 °F), después se expuso a los vapores 15 segundos y luego se bajó lentamente hasta el N ₂ L. | 7,51, después 6,48 | BTE - Fructosa + 1/2 % Sacarosa (pH 7.51); después BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015 (pH 6,48). | 4 pajuelas en el recipiente #3 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo, dentro de una pajita pequeña ventilada | El sello tiende a desprenderse al descongelar debido a la presión del N ₂ L dentro del tubo capilar. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|--|--|--------------------------|---|---|--|---|
| 121 | | 6/4/2016 | Odin | | Vuelta a las fórmulas de 2015. La modificación del pH que efectuó el inventor estaba deteniendo la motilidad de las células de modo que este volvió a los extensores de referencia. 55 µl de semen; más 55 µl de BTE - Fructosa + 1/2 % Sacarosa (pH 7,51); Más 100 µl de BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015 (pH 6,48) | | Valor Brix 2,5 | | Se aclimató 15 minutos a 5,6 °C (42 °F), después se expuso a los vapores 15 segundos y luego se bajó lentamente hasta el N ₂ L. | 7,51, después 6,48 | BTE - Fructosa + 1/2 % Sacarosa (pH 7,51); después BTE - Fructosa más savia de arce #3, 2015. (pH 6,48) | 2 pajuelas en el recipiente #3. | Tubo capilar Natelson con 1 tapón en una pajita grande ventilada (naranja) | |
| 122 | | 7/4/2016 | Odin | | Vuelta a las fórmulas de 2015. La modificación del pH que efectuó el inventor estaba deteniendo la motilidad de las células de modo que | | Valor Brix 2,5 | | Se aclimató 15 minutos a 5,6 °C (42 °F), después se expuso a los vapores 15 segundos y luego se bajó lentamente hasta el N ₂ L. | pH 7,51, después pH 6,48 | BTE - Fruc + 1/2 % de sacarosa (pH 7,51); después BTE - Fruc + savia de arce de 1 ^{er} flujo, 2015 | 1 pajuela en el recipiente #3. | Tubo capilar Natelson + tapón + pajita grande ventilada (verde) | |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajueta | Rendimiento de la pajueta en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|--|-----------------------------------|------------------|-------------------|---|-----------------|---|
| 123 | | 8/4/2016 | Odin | | este volvió a los extensores de referencia. Vuelta a las fórmulas de 2015. La modificación del pH que efectuó el inventor deteniendo la motilidad de las células de modo que este volvió a los extensores de referencia. | | Valor Brix 2.5 | | | | | | | |
| 124 | | 7/4/2015 | Odin | | Vuelta a las fórmulas de 2015 La modificación del pH que efectuó el inventor estaba deteniendo la motilidad de las células de modo que este volvió a los extensores de referencia. | | Valor Brix 2.5 | | | | | | | |
| 125 | | 8/4/2016 | Odin | | Vuelta a las fórmulas de 2015. La modificación del pH que efectuó el inventor | | Valor Brix 25 | | | | | | | |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Callina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ?Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Tipo de recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|-------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|---|---|-----------------------|--|---|--|---|
| 126 | 10/4/2016, 11/4/2016 | 8/4/2016 | Odim | | estaba deteniendo la motilidad de las células de modo que este volvió a los extensores de referencia. Vuelta a las fórmulas de 2015 La modificación del pH que efectuó el inventor estaba deteniendo la motilidad de las células de modo que este volvió a los extensores de referencia. 40 µl de semen; más 40 µl de BTE - Fructosa + 1/2 % Sacarosa 2015 (pH 7,51); Más 80 µl de BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015 (pH 6,46) | Quizás, Sí | Valor Brix 2,5 | En el recipiente #4 muestra traza porque se perdió el sello del tubo capilar. Descongelado en un baño de agua helada. pH no determinado. No efectuada la tinción V/M. 10 % moviéndose hacia adelante con buena motilidad; 11/4/2016. Descongelado en agua helada. pH 7. Un 30 % móvil según estimación visual. 50 vivos/50 muertos. | Aclimatado durante 15 minutos a 5,6 °C (42 °F) en el refrigerador y sometido después a congelación ultrarápida en N ₂ L. | 7,51, después pH 6,48 | BTE- Fructosa + 1/2 % Sacarosa, 2015 (pH 7,51), después se añadió BTE - Fructosa + savia de arce, árbol #3, 2015 (pH 6,48) | Tres pajuelas en el recipiente #5, 1 pajuela en el recipiente #4. | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajita ventilada | El sello tiende a desprenderse al descongelar debido a la presión del N ₂ L dentro del tubo capilar. |

TABLA 1

| Número | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|----------------------------|---------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------|-------------------|---|--|---|
| 127 | | 10/4/2016 | Odin | | Vuelta a las fórmulas de 2015. La modificación del pH que efectuó el inventor estaba deteniendo la motilidad de las células de modo que este volvió a los extensores de referencia. La savia de ABEDUL COMIENZA AQUÍ. 40 µl de semen; más 40 µl de BTE - fructosa + savia de abedul de Alaska, 1 ^{er} flujo (pH 7,56), después se añadió 40 µl de BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015 (pH 6,48); | | | | | 7,56, después pH 6,48 | | #4 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajita ventilada | |

TABLA 1

| Numero | Fecha de uso del semen | Fecha de recogida del semen | Macho donante | Gallina receptora del semen | Proporción semen:extensor | ¿Esta muestra es factible? | Nivel de glucosa en mg/dl | Comentarios sobre el almacenamiento y la supervivencia del semen | Modo de congelación de la muestra | pH del diluyente | Tipo de diluyente | Tipo de Recipiente del tanque en el que se localiza | Tipo de pajuela | Rendimiento de la pajuela en almacenamiento |
|--------|------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---|----------------------------|---------------------------|---|--|----------------------|---|---|---|---|
| 128 | 10/4/2016 | 10/4/2016 | Odin | | 40 µl de semen; más 40 µl de BTE - fructosa + savia de abedul de Alaska, 1 ^{er} flujo (pH 7,56), más 40 µl de BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015 (pH 6,48); | Si | | 10/4/2016 Descongelado en agua helada, pH de 7 en la tira de pH, 25 % moviéndose hacia adelante. Con una tinción de 57 vivos/43 muertos. | Acimatado durante 15 minutos, luego suspendido sobre vapores de N ₂ L durante 15 segundos y después se bajó lentamente hasta el N ₂ L. | 7,56 después pH 6,48 | BTE - fructosa + savia de abedul de Alaska, 1 ^{er} flujo (pH 7,56) y después BTE - Fructosa + savia de arce #3, 2015 (pH 6,48) | 3 pajuelas en el recipient e #4 | Tubo capilar recubierto con Mylar, sellado por un extremo con una pajilla ventilada | El sello tiende a desprenderse al descongelar debido a la presión del N ₂ L dentro del tubo capilar. |

REIVINDICACIONES

1. Un método de crioconservación de esperma que comprende:
 - 5 a. combinar el esperma que se va a crioconservar y una composición que comprende (1) un crioprotector, que comprende una o más savias de árbol; y (2) un medio extensor para producir una combinación esperma/medio; y
 - b. someter la combinación a condiciones que lleven a la crioconservación del esperma, produciendo así una combinación crioconservada que comprende esperma crioconservado.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el esperma crioconservado de la etapa (b) demuestra una supervivencia superior al 50 % después de descongelar, tal como se demuestra mediante tinción vivos/muertos con eosina/nigrosina.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la una o más savias de árbol es el único crioprotector.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se añade un crioprotector adicional.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
 - 20 (i) el esperma es esperma aviar; o
 - (ii) el esperma procede del azor del norte (*Accipiter gentilis*).
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el esperma procede de una especie seleccionada entre el grupo que consiste en especies caninas, aviáres, bovinas, porcinas y equinas.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
 - (i) la savia es savia de arce o savia de abedul; o
 - (ii) la savia es savia de arce o savia de abedul y la savia es savia de primer flujo.
- 30 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio extensor no contiene fructosa.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el método la etapa adicional de someter la combinación a una temperatura entre -80 °C y -198 °C durante un periodo de al menos un día.
- 35 10. La combinación crioconservada resultante del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 11. Un método de fertilización de un óvulo que comprende las etapas de descongelar una combinación crioconservada producida mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores e introducir la combinación en un óvulo no fertilizado, en el que el óvulo llega a ser fertilizado.
- 45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el huevo es un huevo de ave o un huevo de mamífero.
13. Una composición que comprende una mezcla de un medio de conservación y esperma, en la que el medio de conservación comprende: (1) un crioprotector, que comprende una o más savias de árbol; y (2) un medio extensor.
- 50 14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la savia es al menos el 50 % en volumen de la composición.
15. La composición de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en la que la savia de árbol se selecciona entre savia de abedul o savia de arce.