

А. Н. Гулов<sup>1</sup>, Е. О. Ларькина<sup>2</sup>

## Перспективы краткосрочного хранения спермы трутней медоносной пчелы

**Аннотация.** *Сохранение спермы трутней медоносных пчел в сочетании с инструментальным осеменением пчелиных маток является эффективной стратегией для сохранения видов и их генетического разнообразия. Метод низкотемпературного замораживания спермы трутней решает задачи по сохранению генетических ресурсов медоносной пчелы и необходим для проведения селекционно-генетических исследований. В практическом пчеловодстве существует потребность в разработке технологии консервирования спермы трутней в условиях положительных температур без криоконсервации, с целью круглогодичного искусственного осеменения пчелиных маток. Но на сегодняшний день, медоносная пчела — единственный объект, для которого эти методы находятся на стадии экспериментальной разработки. В данной статье приводятся результаты исследований по краткосрочному хранению спермы трутней медоносной пчелы при положительных температурах. Дана сравнительная оценка способам хранения спермы, разбавленной в питательной среде и неразбавленной с использованием противомикробных средств. Контрольные и опытные образцы спермы исследовались по истечении 30 и 60 сут хранения с использованием методик оценки качества спермы и физиологических показателей искусственно осемененных маток. В ходе исследования оценивали: концентрацию сперматозоидов в семяприемнике маток с помощью счетной камеры Горяева, жизнеспособность сперматозоидов методами суправитального окрашивания трипановой синью и флуоресцентной микроскопии с использованием ДНК-красителей Hoechst, PI. По результатам исследований 73% жизнеспособных сперматозоидов обнаружено в образце с препаратом Метрогил Дента после 60 сут хранения при 24–26°C. Образцы с нативной спермой обладали жизнеспособностью 95% после охлаждения при 3°C в течение 60 сут без средств бактериальной контаминации. Определена возможность сохранения спермы трутней в течение 2 мес в безбелковой среде Insect-XPRESSTM (pH 6, 1).*

**Ключевые слова:** хранение спермы, инструментальное осеменение, жизнеспособность сперматозоидов.

**Авторы:**

**Гулов Алексей Николаевич** — научный сотрудник направления селекции и разведения медоносных пчел, соискатель; e-mail: blee3@yandex.ru;

**Ларькина Елена Олеговна** — старший лаборант-исследователь направления селекции и разведения медоносных пчел, студент; e-mail: alenaelena98@yandex.ru.

<sup>1</sup> ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства»; 391110, Россия, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, 22;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Рязанский государственный университет им. С. А. Есенина»; 390000, Россия, Рязанская обл., г. Рязань, ул. Свободы, д. 46.

**Введение.** Работы по сохранению спермы вне организма пчелиной матки выполняются в экспериментальных условиях, так как механизм консервации в семяприемнике матки до конца не изучен [1]. Анализ состояния работ [1; 2; 3; 4; 5] указывает на возможности сохранения спермы трутней при положительных температурах. Задача по разработке технологии краткосрочного хранения спермы без криоконсервации сохраняет свою актуальность. Одно из перспективных направлений — поиск питательной среды для спермы и оптимального температурного режима хранения.

Первые работы отечественных исследователей [2] по краткосрочному хранению спермы трутней

при положительных температурах проводились на основе экстендеров для производителей с/х животных. Лучшими свойствами для сохранения качественных показателей спермы трутней в течение 50 сут при 10–15°C обладали: бикарбонатно-фосфатная среда, глюкозно-цитратная по С. П. Белякову [2] и глюкозно-фосфатная среда в течение 11 мес при 4°C [1]. Среди зарубежных исследователей широкую популярность приобрел модифицированный киев-буфер [6], а также разбавители на основе солей трис [6; 7; 8; 9]. В киев-буфере сперматозоиды сохраняют свою жизнеспособность на уровне 42,2% в течение 52 недель при 12°C [4]. В трис буферах, в зависимости от состава, 77% в течение 90 сут при 16 °C [8].

Неотъемлемую часть в составе экстендеров занимают антибиотики. С введением в состав разбавителей сывороток КРС, помимо традиционных препаратов все чаще применяются дополнительные лекарственные средства. В частности, канамицин и тилозин [7].

Принципиально новые возможности в вопросе сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы возникли с применением питательной среды С46 для культивирования клеток насекомых дрозофил [3]. Состав среды насчитывает более двадцати наименований компонентов, включая аминокислоты, витамины, ЭТС. Но среды, содержащие сыворотки животного происхождения, могут являться источником инфекций (<https://www.sartorius.ru>). Мы провели испытание безбелковой питательной среды Lonza Insect-XPRESS™ (Sartorius Stedim, Belgium). Это универсальная среда для культивирования в шейкере стационарных культур SF9, SF21, High Fire™ и клеток дрозофилы (<https://www.sartorius.ru>).

Одновременно ведется поиск возможностей по сохранению свежееотобранной спермы без разбавления. Особого внимания заслуживает работа американских исследователей [5]. Применяв противомикробное средство в виде геля, авторы достигли более 70% жизнеспособности сперматозоидов в течение 439 сут хранения при 14 °C.

Таким образом, целью работы стало проведение сравнительной оценки способов хранения спермы трутней при положительных температурах. В задачу входило определение динамики показателей качества спермы при хранении ее в разбавленном состоянии и неразбавленном с использованием противомикробных средств в виде мазей и геля.

**Материалы и методы исследований.** Отбор спермы проводили методом искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса у половозрелых трутней в возрасте 25–30 сут, с массой 218±7,2 мг [10]. Качество спермы оценивали по показателям — концентрации [11], подвижности [12] и жизнеспособности сперматозоидов методами окрашивания трипановым синим [13] (НПП «Пан-Эко», Россия) и флуоресцентной микроскопии [14]. При оценке жизнеспособности сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии применяли флюорохромы Hoechst 33258 (НПП «Пан-Эко», Россия) и PI (Sigma-Aldrich, USA). Рабочие

растворы флюорохромов готовили в трис буфере pH 8,8 [12] с конечной концентрацией Hoechst 33258 — 5 мкг/мл и PI — 10 мкг/мл [14]. Суспензию из образца спермы готовили в трис буфере pH 8,8 в соотношении 1:400. Исследование проводили на биологическом световом микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (ООО «Альтами», Россия) при увеличении 400×. Всего подсчитывали 200 сперматозоидов.

Для хранения спермы в разбавленном состоянии использовали следующие экстендеры — трис буфер pH 7,2 [10], трис буфер pH 8,8 [12], киев буфер pH 8,3 [7], среда С46 + 10% ЭТС pH 7,2 [4], среда Insect-XPRESS™ pH 6,1 (Sartorius Stedim, Belgium). С целью профилактики бактериальной контаминации применяли рабочий раствор (10 мл/л) пенициллина-стрептомицина лиофилизированного 100× (НПП «Пан-Эко», Россия). Среда С46 предоставлена ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН». Свежееотобранную нативную сперму дозами по 10 мкл смешивали с разбавителями в соотношении 1:1. Подготовленные образцы разбавленной спермы закладывали на хранение по методике [7] в стерильные стеклянные капилляры L=75±1,0 мм, d=1,8±0,2 мм (ООО «МиниМед», Россия). Затем, концы капилляров затыкали стерильной медицинской ватой и обваривали воском (рис. 1а). Исследования проводили в двух температурных режимах — при комнатной температуре 24–26°C и 3°C в бытовом холодильнике LG. Для хранения спермы в неразбавленном виде использовали стерильные пропиленовые соломинки для криохранения L=100±1,0 мм, d=2,5±0,2 мм. Учитывая малый объем спермы, закладываемой на хранение, мы использовали только ½ длины соломинки, порезав ее на части. На 50 мм соломинки использовали 17–20 мг противомикробного средства. Испытывали следующие препараты — гель стоматологический Метрогил Дента (G.I.D.C. Industrial Area, India) с действующим веществом метронидазол + хлоргексидин, мазь глазная 1% Тетрациклин (ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия) с действующим веществом тетрациклин (антибиотик), линимент Синтомицин (ОАО «Нижфарм», Россия) с действующим веществом хлорамфеникол (антибиотик). В приготовленную таким образом соломинку, с помощью шприца от станка по инструментальному осеменению пчелиных маток вводили 10 мкл свежееотобранной нативной спермы. Дальнейшую консервацию образца про-

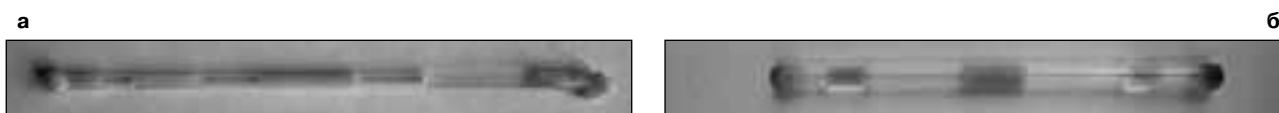


Рис. 1. Образцы спермы, подготовленные для хранения

водили по методике [8] (рис. 16). Опытные образцы хранили в аналогичных условиях. Контрольную группу составили образцы свежееотобранной нативной спермы объемом по 10 мкл без разбавления и применения противомикробных средств.

Оценку проводили через 30 и 60 сут хранения по физиологическим показателям инструментально осемененных (ио) маток и жизнеспособности сперматозоидов [13; 14]. В ряде случаев, физиологические показатели ио маток отсутствуют. Так как, некоторые опытные и контрольные образцы исследовали в конце активного сезона (август-сентябрь). В этот период семьи-воспитательницы прекратили прием суточных личинок на воспитание. Таким образом, нам не удалось провести искусственное осеменение по причине отсутствия неплодных маток. В частности, питательная среда Lonza поступила к нам в обращение от производителя лишь в конце августа 2018 г.

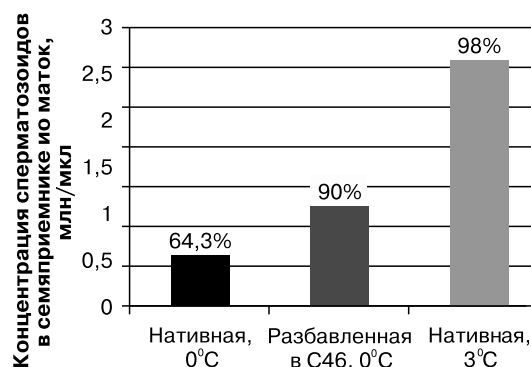
Инструментальное осеменение пчелиных маток проводили на оборудовании SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz, Espelkamp Deutschland). Применяли однократное осеменение объемом вводимой спермы 8–10 мкл. Для осеменения использовали неплодных маток в возрасте 7–8 сут с массой  $199,7 \pm 2,8$  мг. Через 48 ч после осеменения маток препарировали под световым микроскопом МБС-10. Семяприемник освобождали от ткани и помещали в стерильную пробирку Ерпендорф (1,5 мл), содержащую 500 мкл трис буфера pH 8,8. Концентрацию сперматозоидов определяли по методике [11].

**Результаты и обсуждение.** Работа с пчелиными семьями носит исключительно сезонный характер. В условиях Рязанской области появление половозрелых трутней, пригодных для отбора качественной спермы, приходится на конец июня — июль месяц. В связи с чем, стартовой площадкой для начала исследований была выбрана «Краснополянская опытная станция пчеловодства (КОСП)» (Краснодарский край, г. Сочи, пос. Молдовка), филиал ФНЦ пчеловодства. Короткий зимний период (2 мес) и бурное весеннее развитие благоприятствуют ведению племенной работы в более

ранние сроки по сравнению с нечерноземной зоной России.

Таким образом, в период с 28 мая по 1 июня 2018 г были заготовлены образцы свежееотобранной нативной спермы объемом по 20 мкл от половозрелых трутней серой горной кавказской породы пчел (пасека № 27). Через 48 часов транспортировки проводили повторную оценку качества спермы в лаборатории инструментального осеменения маток ФНЦ пчеловодства. Транспортировку образцов осуществляли в бытовых металлических термосах емкостью по 0,5 л. Капилляры помещали в полиэтиленовый пакет для бытовой заморозки, далее, обворачивали слоем ваты 3 см и вновь помещали в полиэтиленовый пакет. Полученные свертки обвязывали и помещали в термосы с водопроводной водой 20°C, со льдом и без наполнителя. Во время транспортировки, по результатам оценки, произошло значительное снижение жизнеспособности сперматозоидов на 13–44% (табл. 1). В значительной мере это отразилось на образцах в термосе со льдом, перешедшим в состояние воды.

Отсутствие стабильных температурных условий транспортировки отрицательно сказывается на качественных показателях спермы. Мы провели повторные исследования в лабораторных условиях с последующим искусственным осеменением маток. Жизненные ресурсы свежееотобранной спермы подвержены резкому сокращению при холодовом ударе от температуры тела до 0°C (рис. 2).



**Рис. 2.** Физиологические показатели ио маток и жизнеспособность сперматозоидов (%) после 2 сут хранения при 0 и 3°C ( $P < 0,05$ )

**Таблица 1.** Показатели нативной спермы трутней до и после транспортировки

| Показатели                                      | Способ транспортировки |                   |                        |
|-------------------------------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
|                                                 | Термос (вода 20–24°C)  | Термос (лед/вода) | Термос без наполнителя |
| Концентрация, млн/мкл, $M \pm m$                | $8,25 \pm 1,15$        | $4,0 \pm 0,17$    | $4,4 \pm 1,28$         |
| Подвижность, балл                               | 4                      | 4                 | 4                      |
| Жизнеспособность, %, свежееотобранная           | 90                     | 92                | 90                     |
| Жизнеспособность, %, после 48 ч транспортировки | 53                     | 48                | 77                     |

Транспортировка в таких условиях возможна в разбавленном состоянии с использованием полноценной питательной среды ( $P=0,05$ ). С другой стороны, кратковременное воздействие холодового шока от температуры тела до стабильного показателя  $3^{\circ}\text{C}$ , незначительно отражается на качестве спермы ( $P<0,05$ ).

Дальнейшие исследования подтверждают ценность питательной среды в качестве энергетического резервуара для сперматозоидов, при нахождении их в стрессовых условиях. Лучшие физиологические показатели ио маток и качества спермы отмечены в образцах с С46 ( $P<0,05$ ) (рис. 3).

Полученные результаты, позволили нам исключить буферные растворы из дальнейших исследований.

Последующие наблюдения после 30 сут при  $3^{\circ}\text{C}$  выявили равный потенциал между контрольными и опытными образцами в среде Lonza. Однако, через 60 сут хранения показатель жизнеспособ-

ности сперматозоидов контрольных образцов превысил опытные на 7–22%. Отмечено незначительное снижение качественных показателей образцов с С46 при  $24\text{--}26^{\circ}\text{C}$  (рис. 4).

Однако, по итогам ио маток качество спермы контрольных образцов достоверно превысило опытные с С46 ( $P<0,05$ ) (рис. 5).

По истечении 60 сут хранения при  $24\text{--}26^{\circ}\text{C}$  опытные образцы сохранили за собой лидерство.

Использование противомикробных средств с антибиотиками в значительной мере снижает жизненный ресурс спермы во время ее хранения (рис. 6).

**Заключение.** Хранение спермы при комнатной температуре ( $24\text{--}26^{\circ}\text{C}$ ) негативно сказалось на ее качественных показателях. Высокая температура, возможно, способствовала развитию гнилостных микроорганизмов в контрольной группе. В опытных образцах с питательной средой, вероятной причиной низких показателей может служить плотность (рН) растворов. Консервация спермы в данных условиях возможна в сочетании с противомикробным препаратом Метрогил Дента. Охлаждение спермы в течение 60 сут при  $3^{\circ}\text{C}$  оказало положительное действие на контрольную группу образцов.

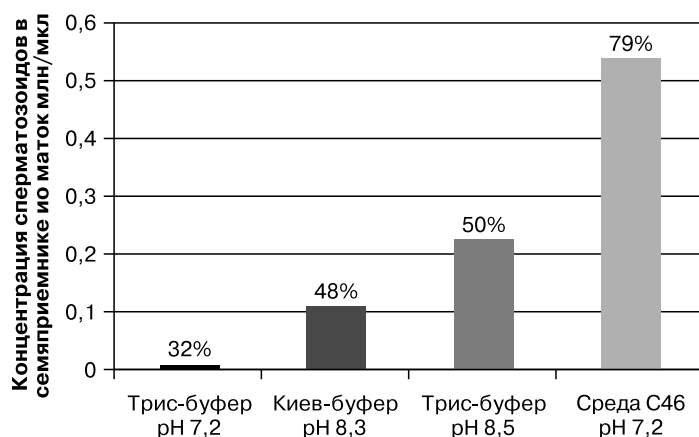


Рис. 3. Физиологические показатели ио маток и жизнеспособность сперматозоидов (%) после 30 сут хранения при  $3^{\circ}\text{C}$  ( $P<0,05$ )

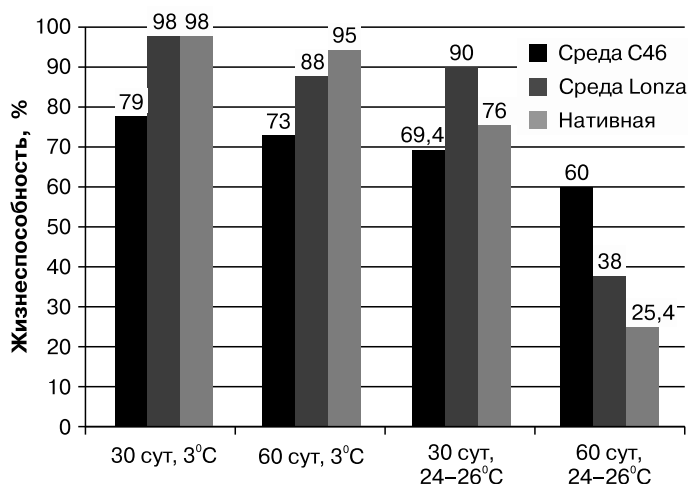


Рис. 4. Динамика показателей качества нативной спермы и разбавленной в питательной среде в процессе хранения

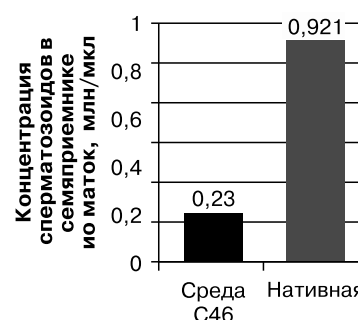


Рис. 5. Физиологические показатели ио маток разбавленной и нативной спермой после 30 сут хранения при  $24\text{--}26^{\circ}\text{C}$  ( $P<0,05$ )

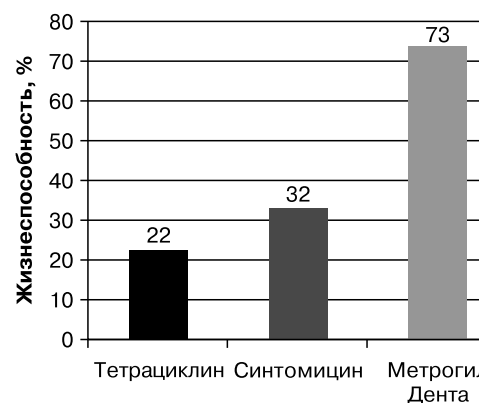


Рис. 6. Качество спермы в противомикробных средствах после 60 сут хранения при  $24\text{--}26^{\circ}\text{C}$

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-44-620001)*

## Литература

1. Лазарева Л. Н. Влияние биодобавок на хранение спермы трутней при положительных температурах / Л. Н. Лазарева // Сборник НИИР по пчеловодству. — Киров: НИИСХ Северо-востока. — 2014. — 276 с.
2. Бородачев А. В. Сохранение спермы трутней медоносной пчелы в различных разбавителях / А. В. Бородачев, В. Т. Бородачева // Сборник научных трудов. Вып. 2, Рязань: НИИ пчеловодства. — 1977. — 163 с.
3. Какпаков В. Т. Получение и характеристика культур соматических клеток дрозофилы / В. Т. Какпаков // Дисс. докт. биол. наук. М. 1989. 341 с.
4. Collins A. M. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above freezing temperatures / A. M. Collins // Journal of Economic Entomology. — 2000a. — Vol. 93 (3). — P. 568–571.
5. Hopkins B. K. Gel-coated tubes extends above-freezing storage of honey bee (*Apis mellifera*) semen to 439 days with production of fertilised offspring / B. K. Hopkins, S. W. Cobey, C. Herr, W. S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. — 2017. — Vol. 29(10). — P. 1944–1949.
6. Kaftanoglu O. Preservation of honey bee spermatozoa in liquid-nitrogen / O. Kaftanoglu, Y. S. Peng // J. Apic. Res. — 1984. — Vol. 23. — P. 157–163.
7. Hopkins B. K. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen / B.K. Hopkins, C. Herr, W.S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. — 2012. — Vol. 24. — P. 1079–1083.
8. Paillard M. Preservation of Honey Bee (*Apis mellifera* L.)Semen / M. Paillard // Universite Laval. Québec, Canada — 2016. — 79 p.
9. Бородачев А. В. Технология инструментального осеменения пчелиных маток / А. В. Бородачев, В. Т. Бородачева // Рыбное: НИИ пчеловодства. — 1989. — 33 с.
10. Locke S. J. A supravital staining technique for honey bee spermatozoa / S. J. Locke, Y. S. Peng, N. L. Cross // Physiological Entomology. — 1990. — Vol. 15. — P. 187–192.
11. Гулов А. Н. Качество спермы в оценке отцовских семей / А. Н. Гулов, А. В. Бородачев // Пчеловодство. — 2016. — № 10. — с. 25.
12. Rhodes J. W. Semen production in drone honeybees. RIRDC Pub. / J.W. Rhodes //2008, No. 08/130. [Электронный документ] // [веб-сайт] <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/08-130> [доступно 09.05.2013].
13. Митрошина Е. В. Определение жизнеспособности клеточных культур: Учебно-методическое пособие / Е. В. Митрошина, Т. А. Мищенко, М. В. Ведунова // Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского, 2015. — 21 с.

Gulov A.<sup>1</sup>, Larkina E.<sup>2</sup>

## Prospects for short-term sperm storage of honeybee drones

**Abstract.** Preserving the sperm of honeybee drones in combination with instrumental insemination of queen bees is an effective strategy for the conservation of species and their genetic diversity. The method of low-temperature freezing of sperm drones solves the problem of preserving the genetic resources of honeybee and is necessary for selection and genetic research. In practical beekeeping, there is a need to develop a technology for the drone semen of preserving at positive temperatures without cryopreservation, with the aim of year-round artificial insemination of queen bees. But today, honeybee is the only object for which these methods are at the stage of experimental development. This article presents the results of studies on the short-term storage at positive temperatures of honeybee drones of the sperm. A comparative assessment of diluted sperm in nutrient medium and undiluted using antimicrobial agents is given of the methods of storage. Control and experimental samples of the sperm were examined after 30 and 60 days of storage using methods for assessing the

*drone semen quality and physiological parameters of artificially inseminated honeybee queens. The study evaluated: the number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee by counting the Goryaev camera, the viability of spermatozoa by the methods of supravital staining of trypan blue and fluorescence microscopy using DNA dyes Hoechst, PI. According to the results of studies, in the sample with Metrogyl dent after 60 days of storage at 24–26 °C were found 73% of viable spermatozoa. After cooling at 3 °C for 60 days, the native spermatozoa samples without a means of bacterial contamination had a viability of 95%. The drones semen saving for 2 months in a protein-free environment Insect-XPRESSTM (pH 6.1) of the possibility.*

**Keywords:** sperm storage, instrumental insemination, sperm viability.

**Authors:**

**A. Gulov** — researcher directions of selection and breeding of honey bees; e-mail: blee3@yandex.ru;

**E. Larkina** — senior research laboratory assistant by directions of selection and breeding of honey bees, student; e-mail: alenaelena98@yandex.ru.

<sup>1</sup> Federal state budgetary scientific institution «Federal beekeeping research centre»; 391110, Russian Federation, Ryazan region, c. Rybnoe, Pochtovaya st., 22;

<sup>2</sup> «Ryazan State University named for S. Yesenin»; 391110, Russian Federation, Ryazan region, Rjazan', Svobody st. 46.

## References

1. Borodachev A. V. The preservation of semen of drones of honey bees in various solvents / A. V. Borodachev, V.T. Borodacheva // Collection of scientific works. Vol. 2, Ryazan: RI beekeeping, 1977. 163 p.
2. Borodachev A.V. The instrumental insemination of honeybee queens technology / A. V. Borodachev, V. T. Borodacheva // Rybnoe: RI beekeeping, 1989. 33 p.
3. Gulov A. N., Borodachev A. V. Semen quality in the evaluation of the paternal families / A. N. Gulov, A. V. Borodachev // Beekeeping. — 2016. — № 10. — P. 25.
4. Kakpakov V. T. Production and characterization of cultures of Drosophila somatic cells / V. T. Kakpakov // Diss. Dr. biol. sciences. M. 1989. 341 p.
5. Lazareva L. N. The effect of dietary supplements on storage of sperm of the drones at positive temperatures / L. N. Lazareva // Collection of research works on beekeeping. — Kirov: RIA North-East. — 2014. — 276 p.
6. Mitroshina E. V. Determination of cell cultures viability: Educational and methodical manual / E. V. Mitroshina, T.A. Mishchenko, M. V. Vedunova // Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod state University n. N. I. Lobachevsky, 2015. — 21 p.
7. Collins A. M. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above freezing temperatures / A. M. Collins // Journal of Economic Entomology. — 2000a. — Vol. 93(3). — P. 568–571.
8. Hopkins B. K. Sequential generations of honey bee (Apis mellifera) queens produced using cryopreserved semen / B. K. Hopkins, C. Herr, W.S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. — 2012. — Vol. 24. — P. 1079–1083.
9. Hopkins B. K. Gel-coated tubes extends above-freezing storage of honey bee (Apis mellifera) semen to 439 days with production of fertilised offspring / B. K. Hopkins, S. W. Cobey, C. Herr, W. S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. — 2017. — Vol. 29(10). — P. 1944–1949.
10. Kaftanoglu O. Preservation of honey bee spermatozoa in liquid-nitrogen / O. Kaftanoglu, Y. S. Peng // J. Apic. Res. — 1984. — Vol. 23. — P. 157–163.
11. Locke S. J. A supravital staining technique for honey bee spermatozoa / S. J. Locke, Y. S. Peng, N. L. Cross // Physiological Entomology. — 1990. — Vol. 15. — P. 187–192.
12. Paillard M. Preservation of Honey Bee (Apis mellifera L.)Semen / M. Paillard // Universite Laval. — Québec, Canada — 2016. — 79 p.
13. Rhodes J. W. Semen production in drone honeybees. RIRDC Pub. / J.W. Rhodes // 2008. — No. 08/130. [Электронный документ] // [веб-сайт] <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/08-130> [доступно 09.05.2013].