

А. Н. Гулов, А. С. Ласкин

Медовый разбавитель для криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы

Аннотация. Проведено предварительное испытание двух вариантов медового разбавителя П. П. Печникова и П. Н. Скаткина для криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы. Первый вариант: мед 10% — 50 мл, лактоза — 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток — 2,5 мл, глицерин 3% — 6 мл 250 мкл. Во втором варианте глицерин заменен на ДМСО 10% в объеме 5 мл. 10%-ый рабочий раствор меда готовили на деионизированной воде по методике П. П. Печникова и П. Н. Скаткина на основе меда с белой акации. В криопробирку Nunc объемом 1,8 мл добавляли 80 мкл свежеприготовленного разбавителя, затем 10 мкл спермы и все перемешивали. Приготовленные таким образом образцы помещали в визотубы, которые, в свою очередь, опускали в сосуд с водой комнатной температуры (24–26°C). После чего этот сосуд размещали в холодильнике на 2 ч при 3°C для эквilibрации. Срок криохранения составил одни сутки.

Оттаивание образцов проводили на водяной бане при 37°C в течение 1 мин. После оттаивания в образец добавляли 1 мл разбавителя, нагретого до 37°C, тщательно пипетировали и оставляли на 5–10 мин. Затем проводили однократное центрифугирование в течение 3 мин при 3000 об. После центрифугирования снимали супернатант и с помощью капилляра блока-шприца для ио маток набирали сперму со дна криопробирки.

Результаты анализа показали, что наиболее оптимальным вариантом для искусственного осеменения пчелиных маток является вариант с ДМСО. Применяли однократное осеменение объемом вводимой спермы 8–10 мкл. Для осеменения использовали неплодных маток в возрасте 7–8 сут. Учет печатного расплода проводили посредством прямого подсчета количества пчелиных и трутневых ячеек.

Установлено, что натуральный пчелиный мед с акации белой проявил свойства криопротектора, что в сочетании с яичным желтком и ДМСО позволило получить расплод рабочих пчел более 50%.

Ключевые слова: сперма трутней, криоконсервация, мед, искусственное осеменение.

Авторы:

Гулов Алексей Николаевич — научный сотрудник, соискатель; e-mail: blee3@yandex.ru;

Ласкин Александр Сергеевич — младший научный сотрудник, магистрант; e-mail: laskinsania@yandex.ru.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пчеловодства», 391110, Россия, г. Рыбное, Рязанская обл., ул. Почтовая, 22.

Введение. Методы низкотемпературного хранения спермы для медоносной пчелы находятся на стадии экспериментальной разработки. Несмотря на имеющиеся успехи в охлаждении и замораживании спермы трутней [1, 2] все еще имеются значительные препятствия из-за большой чувствительности сперматозоидов к холодовому шоку. Одним из ключевых аспектов успешного криохранения является разработка экстендера, обеспечивающего сохранность оплодотворяющей способности сперматозоидов и предотвращающего появление неблагоприятных эффектов, вызванных холодовым шоком.

Хороший разбавитель должен включать в себя буферные соли, сахара, антибиотики, криопротекторы и вещества, способные защитить сперматозоиды от повреждения их мембран вследствие действия низких температур [3]. Единственным в своем

роде криопротектором, чаще всего используемым в процессе замораживания — является глицерин. Доза добавления глицерина в некоторые разбавители разная и зависит, в частности, от вида животного. Для крупного рогатого скота рекомендуется использование глицерина в концентрации 6–8% [4]. Но даже в концентрациях 3%, 5% и 7% глицерин все еще может защитить сперматозоиды КРС во время криохранения.

Используемые дозировки глицерина дают возможность для его частичной замены другим видом криопротектора, например, медом [4]. При -20°C в меде замедляются процессы естественной кристаллизации глюкозы, и он становится очень вязким [5]. В диапазоне температур от -42°C до -50°C мед приобретает стекловидную структуру, превращаясь в твердое аморфное вещество без кристаллов льда [6]. Благодаря своим физико-хими-

ческим свойствам пчелиный мед без использования дополнительных криопротекторов (глицерин, ДМСО) способствует сохранению жизнеспособности (целостности мембран) сперматозоидов на уровне $37,2 \pm 0,5\%$. В сочетании с глицерином 3% — $78,0 \pm 1,4\%$ и с ДМСО 10% — $79,6 \pm 1,2\%$, соответственно [1]. Таким образом, мед проявляет себя в качестве криопротектора и обеспечивает высокую защиту жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы в сравнении с синтетическими средами.

Цель исследований — получение потомства рабочих пчел от маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе разбавителя из натурального пчелиного меда.

Материалы и методы исследований. Отбор спермы проводили по методике [7]. Качество спермы оценивали по подвижности [7] и целостности мембран методом световой микроскопии с использованием 1% раствора эозина. Исследования проводили на биологическом световом микроскопе Альтами ЛЮМ-1 LED (ООО «Альтами», Россия) при увеличении $400\times$. Всего подсчитывали 300 сперматозоидов. Искусственное осеменение пчелиных маток осуществляли 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 целью оценки репродуктивных показателей ио маток сформировали 4-х местные микронуклеусы на $\frac{1}{4}$ стандартной гнездовой рамки (рис.1).

Учет печатного расплода проводили посредством прямого подсчета количества пчелиных и трутневых ячеек. Для предотвращения вылета ио маток на доспаривание летки закрывали ганемановской решеткой.

Испытывали два варианта разбавителя. Первый вариант: мед 10% — 50 мл, лактоза — 10 мг, сахара 10 мг, яичный желток — 2,5 мл, глицерин 3% — 6 мл 250 мкл. Во втором варианте глицерин заменен на ДМСО 10% в объеме 5 мл. 10%-ый рабочий раствор меда готовили на деионизированной воде (ООО «Пан-Эко», Россия) по методике П. П. Печникова и П. Н. Скаткина (1949) на основе меда с белой акации (г. Майкоп, Респ. Адыгея, урожай 2018 г). Глицерин 3% концентрации предварительно готовили на деионизированной воде. В состав разбавителя добавляли из соотношения 1 часть глицерина 3%: 8 частей 10% рабочего раствора меда. Мед предварительно разогревали на водяной бане $40\text{--}45^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Концентрацию ионов водорода в готовом разбавителе доводили 6М NaOH до значений pH 8–9.

Далее в криопробирку Nunc объемом 1,8 мл добавляли 80 мкл свежеприготовленного разба-



Рис. 1. Микронуклеус 4-х местный

вителя, затем 10 мкл спермы и все перемешивали. Приготовленные таким образом образцы помещали в визотубы, которые, в свою очередь, опускали в сосуд с водой комнатной температуры (24–26°C). После чего этот сосуд размещали в бытовом холодильнике LG на 2 ч при 3°C для эквilibрации. Замораживание образцов осуществляли по методике [8]. Срок криохранения составил одни сутки.

Оттаивание образцов проводили на водяной бане при 37°C в течение 1 мин. После оттаивания в образец добавляли 1 мл разбавителя нагретого до 37°C, тщательно пипетировали и оставляли на 5–10 мин. Затем проводили однократное центрифугирование на Mini Spin (Germany) в течение 3 мин при 3000 об. После центрифугирования снимали супернатант и с помощью капилляра блока-шприца для ио маток набирали сперму со дна криопробирки.

Результаты и обсуждение. Жизнеспособность сперматозоидов (целостность мембран) в ходе испытаний оставалась на достаточно высоком уровне, особенно в образцах с глицерином (табл. 1).

Однако подвижность спермиев заметно снижалась во время замораживания. Так, в диапазоне температур от -40 до -50°C сперматозоиды практически в два раза сократили свою подвижность. После 20 мин нахождения образцов в 1 см над зеркалом жидкого азота (-100–196°C) подвижность еще снизилась на 18%, а в образцах с глицерином она и вовсе уже отсутствовала. При оценке подвижности установили, что в образцах с глицерином сперматозоиды вытягивались во всю свою длину, тогда как в образцах с ДМСО они частично сохраняли форму полуколец и в большинстве случаев приобретали спиралевидную форму. Через сутки после криохранения почти на 30% упала активная подвижность (поступательное и маневренное движение) сперматозоидов, то есть в большинстве случаев они просто вибрировали. В образцах с глицерином картина не изменилась, несмотря на достаточно высокий уровень целостности мем-

бран в сравнении с ДМСО. Ранее было отмечено, что неподвижные спермии могут оставаться жизнеспособными ввиду сохранности их плазматических мембран [9].

По результатам проведенного анализа было принято решение провести искусственное осеменение пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой из образцов с ДМСО.

В результате осеменили шесть пчелиных маток. Рабочие пчелы в микронуклеусах приняли их на 100%. Следует отметить, что рабочие пчелы гораздо лучше восприняли маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе разбавителя из натурального пчелиного меда, в сравнении с синтетическими питательными средами для культур клеток насекомых, по опыту ранее проводимых исследований.

В ходе эксперимента одна матка погибла на 4 сут после подсадки в микронуклеус, а две из пяти оставшихся дали потомство рабочих пчел более 50% (табл. 2; рис. 2).

В микронуклеусе с ио маткой № 4 наблюдался каннибализм у пчел. Отсутствие необходимого количества рабочих пчел, способных обеспечить себя свежей пылью и нектаром, спровоцировали их в итоге на поедание яиц, отложенных ио маткой.

Закключение. Получены предварительные результаты по испытанию медового разбавителя П. П. Печникова и П. Н. Скаткина с добавлением яичного желтка и ДМСО для криохранения спермы трутней. Установлено, что натуральный пчелиный мед с акации белой проявил свойства криопротектора, что в сочетании с яичным желтком и ДМСО позволило получить расплод рабочих пчел более 50%.

Хорошая сохранность сперматозоидов в разбавителях, приготовленных из естественных продуктов — молоко, сыворотка крови, яичный желток, мед, маточное молочко и т.п. объясняется

Таблица 1. Основные показатели качества спермы трутней до и после криохранения

Исследуемые показатели	Наименование разбавителя							
	Мед + ДМСО + желток				Мед + глицерин + желток			
	До эквilibрации	После 15 мин при -40–50°C	После 20 мин при -100–196°C	Через сутки после криохранения	До эквilibрации	После 15 мин при -40–50°C	После 20 мин при -100–196°C	Через сутки после криохранения
Общая подвижность, %	>90	46,5±0,7	28,4±6,7	20,4±1,9	>90	51,3±7,75	0	0
Активная подвижность, %	>50	22,7±1,3	46,2	18,7±1,4	>50	58,5±0,9	0	0
Жизнеспособность, %	94,0±0,3	97,65±0,5	72,7±1,3	70,6±6,2	97,2±0,2	95,15±1,95	83,9±0,8	86,8±9,3

сходством ионных составов конечного разбавителя и протоплазмы сперматозоидов.

Количество осемененных маток, дающих потомство рабочих пчел более 50% можно увеличить за счет доработки процедуры пробоподготовки образца к криохранению. Пчелиный мед содержит много примесей, осаждающихся на дне криобирки после центрифугирования. Объем осадка

в итоге получается больше того объема спермы, который закладывался на криохранение. В результате, в капилляр для ио маток вбирается помимо спермы много примеси, а некоторых случаях только одна примесь.

Работа по испытанию глицерина в качестве альтернативы ДМСО требует дальнейшего продолжения.

Таблица 2. Репродуктивные показатели ио маток заморожено-оттаянной спермой в составе разбавителя мед + ДМСО + желток

№ ио матки	Количество ячеек печатного расплода рабочих пчел, шт.	Количество ячеек печатного расплода трутней, шт.	%, печатного расплода рабочих пчел	Примечание
1	42	90	31,8	—
2	1847	16	99,14	—
3	476	17	96,55	—
4	Отдельные яйца и личинки			Наблюдался каннибализм у пчел
5	2	10	16,6	Небольшая масса пчел в микронуклеусе
6	Нет данных	Нет данных	—	Погибла через 96 ч после ио



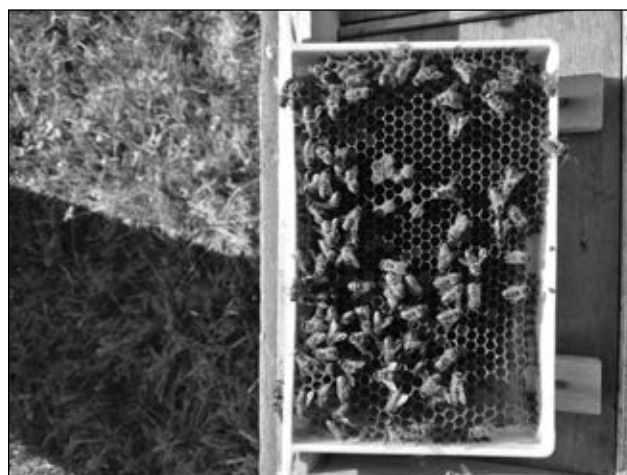
а — матка № 1



б — матка № 2



в — матка № 3



г — матка № 5

Рис. 2. Печатный расплод маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой

Литература

1. Гулов А. Н. Влияние синтетических сред, яичного желтка и пчелиного меда на криоустойчивость спермы трутней / А. Н. Гулов, З. Н. Сайфутдинова, Д. В. Митрофанов, И. А. Языков // Генетика и разведение животных. — 2020. — №1. — С. 27-36.
2. 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. — V. 24. — P. 1079-1083.
3. Jerez-Ebensperger R. The combined use of honey, garlic (*Allium Sativum* L.) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen / R. Jerez-Ebensperger, L. Gil, N. Gonzalez, I. De Blas // CryoLetters. — 2015. — V. 36(4). — P. 243-251.
4. Malik A., Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali / A. Malik, R. Fauzi, M. I. Zakir // Acta veterinaria indonesiana. — 2017. — V. 5(2). — P. 98-104.
5. Kedzierska-Matysek M. Effect of freezing and room temperatures storage for 18 months on quality of raw rapeseed honey (*Brassica napus*) / M. Kedzierska-Matysek, M. Florek et al. // J. Food Sci Technol. — 2016. — V. 53(8). — P. 3349-3355.
6. Kantor Z. Glass Transition Temperature of Honey as a Function of Water Content As Determined by Differential Scanning Calorimetry / Z. Kantor et al. // J. Agric. Food Chem. — 1999. — V. 47. — P. 2327-2330.
7. Гулов А. Н. Проблемы сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы / А. Н. Гулов // Пчеловодство. — 2018. — № 6. — С. 22-25.
8. Пинаев Г. П. Методы культивирования клеток / Г. П. Пинаев, М. С. Богданова // Изд-во Политехн. ун-та, СПб., 2008. — 278 с.
9. Науменкова В. А. Сравнительная оценка определения целостности мембран спермиев жеребцов различными методами / В. А. Науменкова, М. М. Атрощенко, А. Н. Гулов, О. В. Широкова, Н. А. Фролова // Российская с/х наука. — 2020. — № 3. — С. 45-48.

Gulov A., Laskin A.

Honey thinners for cryopreservation of honey bee drones semen

Abstract. A preliminary test of two variants of the honey diluent, PP Pechnikov and PN Skatkin, for cryopreservation of the sperm of honey bee drones was carried out. The first option: honey 10% — 50 ml, lactose — 10 mg, sucrose 10 mg, egg yolk — 2.5 ml, glycerin 3% — 6 ml 250 µl. In the second variant, glycerin is replaced by DMSO 10% in a volume of 5 ml. A 10% working solution of honey was prepared in deionized water according to the method of P. P. Pechnikov and P. N. Skatkin on the basis of honey from white acacia. In a 1.8 ml Nunc cryotube, 80 µl of freshly prepared diluent was added, then 10 µl of semen, and everything was mixed. The samples prepared in this way were placed in visotubes, which, in turn, were immersed in a vessel with water at room temperature (24–26°C). After that, this vessel was placed in a refrigerator for 2 h at 3°C for equilibration. The cryostorage period was one day.

The samples were thawed in a water bath at 37°C for 1 min. After thawing, 1 ml of a diluent heated to 37°C was added to the sample, carefully pipetted and left for 5–10 min. Then, a single centrifugation was carried out for 3 min at 3000 rpm. After centrifugation, the supernatant was removed and sperm was collected from the bottom of the cryovial using the capillary of the syringe block for uterus.

The results of the analysis showed that the most optimal option for artificial insemination of queen bees is the option with DMSO. A single insemination with a volume of injected semen of 8–10 µL was used. For insemination, we used infertile queens aged 7–8 days. The printed brood was counted by direct counting of the number of bee and drone cells.

It was found that natural bee honey from white acacia showed the properties of a cryoprotectant, which in combination with egg yolk and DMSO made it possible to obtain brood of working bees over 50%.

Key words: drone sperm, cryopreservation, honey, artificial insemination.

Authors.

Gulov A. — researcher; e-mail: blee3@yandex.ru;

Laskin A. — junior researcher; e-mail: laskinsania@yandex.ru.

Federal state budgetary scientific institution «Federal beekeeping research centre»; 391110, Russian Federation, Ryazan region, Rybnoe, Pochtovaya st., 22.

References

1. Gulov A. N. Influence of synthetic media, egg yolk and bee honey on the cryo-resistance of drone sperm / A. N. Gulov, Z. N. Sayfutdinova, D. V. Mitrofanov, I. A. Yazykov // Genetics and animal breeding. — 2020. — №. 1. — P. 27–36.
2. 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. — V. 24. — P. 1079–1083.
3. Jerez-Ebensperger R. The combined use of honey, garlic (*Allium Sativum* L.) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen / R. Jerez-Ebensperger, L. Gil, N. Gonzalez, I. De Blas // CryoLetters. — 2015. — V. 36(4). — P. 243–251.
4. Malik A., Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali / A. Malik, R. Fauzi, M. I. Zakir // Acta veterinaria indonesiana. — 2017. — V. 5(2). — P. 98–104.
5. Kedzierska-Matysek M. Effect of freezing and room temperatures storage for 18 months on quality of raw rapeseed honey (*Brassica napus*) / M. Kedzierska-Matysek, M. Florek et al. // J. Food Sci Technol. — 2016. — V. 53(8). — P. 3349–3355.
6. Kantor Z. Glass Transition Temperature of Honey as a Function of Water Content As Determined by Differential Scanning Calorimetry / Z. Kantor et al. // J. Agric. Food Chem. — 1999. — V. 47. — P. 2327–2330.
7. Gulov A. N. Problems of preservation of genetic resources of honeybees / A. N. Gulov // Beekeeping. — 2018. — № 6. — P. 22–25.
8. Pinaev G. P. Methods of cell cultivation / G. P. Pinaev, M. S. Bogdanova // Izd-vo Polytechnic. University, St. Petersburg, 2008. — 278 p.
9. Naumenkova V. A. Comparative assessment of the determination of the membrane integrity of stallion sperm by various methods / V. A. Naumenkova, M. M. Atroshchenko, A. N. Gulov, O. V. Shirokova, N. A. Frolova // Russian Agr. Science. — 2020. — № 3. — P. 45–48.