

А. Н. Гулов, А. С. Ласкин

Натуральный пчелиный мед и сохранение спермы трутней в жидком азоте

Аннотация.

Цель: проведение испытания медового разбавителя для криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы.

Материалы и методы. Материалом для исследований служила сперма половозрелых трутней «Приокского» породного типа среднерусской породы пчел. Отбор спермы проводили в июне-июле 2021 г. методом искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса у половозрелых трутней в возрасте 25–30 сут. породного типа «Приокский» среднерусской породы пчел. До замораживания сперма хранилась в стеклянных капиллярах в охлажденном состоянии при 3°C в течение 2 мес. Испытывали следующий состав разбавителя — 10% мед, лактоза, сахароза, яичный желток и диметилсульфоксид.

Результаты. Исследования показали жизнеспособность сперматозоидов на уровне $64,0 \pm 1,8\%$ (41,5–83,7), а общую подвижность $2,2 \pm 0,6\%$ (0–11,5). Для оценки оплодотворяющей способности сперматозоидов, провели искусственное осеменение 10 пчелиных маток. У 4-х осемененных пчелиных маток выявлено наличие спермы в семяприемнике с концентрацией сперматозоидов от 0,22–4,4 млн/мкл. В парных яйцеводах трех других осемененных маток зафиксировано наличие спермы и полное отсутствие сперматозоидов в семяприемнике.

Заключение. Испытания медового разбавителя для глубокого замораживания спермы трутней медоносных пчел в жидком азоте подтвердили его криофилактические свойства.

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

Авторы:

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

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

ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства»; 391110, Россия, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, 22.

Введение. Медоносные пчелы — важный элемент экологической системы. На их долю приходится 80–90% опыляемых энтомофильных растений. Сложившееся на сегодняшний день состояние генофонда медоносной пчелы, является одной из основных причин современного кризиса в пчеловодстве. Сохранение генетических ресурсов медоносных пчел России, является актуальной проблемой в связи с экспансией зарубежных пород и нарастающим экологическим кризисом. Появилась настоятельная необходимость использования биотехнологических методов сохранения генофонда медоносных пчел: инструментальное осеменение пчелиных маток, консервация спермы трутней. Сохранение спермы трутней медоносных пчел в сочетании с инструментальным осеменением является эффективной стратегией для сохранения видов и их генетического разнообразия. На сегодняшний день существует два способа консервации спермы трутней — это сохранение спермы трутней в жидком азоте и в охлажденном состоянии при плюсовых температурах. Методы низкотемпературного хранения спермы для медонос-

ной пчелы находятся на стадии экспериментальной разработки. Несмотря на имеющиеся успехи в замораживании спермы трутней [1–3], все еще имеются значительные препятствия из-за большой чувствительности сперматозоидов к холодовому шоку.

В 2020 г. в лаборатории селекции и молекулярно-генетических исследований медоносных пчел ФНЦ пчеловодства было проведено предварительное испытание медового разбавителя П. П. Печникова и П. Н. Скаткина для криоконсервации спермы трутней [2]. Натуральный пчелиный мед с акации белой проявил свойства криопротектора. В сочетании с яичным желтком и ДМСО позволил получить расплод рабочих пчел более 50%. Из шести искусственно осемененных пчелиных маток, две дали потомство рабочих пчел 99,14% и 96,55% [2]. При этом срок криоконсервации спермы трутней не превышал одни сутки.

Цель исследования — проведение испытания медового разбавителя для криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы.

Материалы и методы. Работа проводилась на экспериментальной пасеке и в лаборатории селекции и молекулярно-генетических исследований медоносных пчел ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства». Отбор спермы проводили в июне-июле 2021 г. методом искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса у половозрелых трутней в возрасте 25–30 сут породного типа «Приокский» среднерусской породы пчел [4]. Свежеотобранные (неразбавленные) образцы спермы закладывали на хранение в стеклянные капилляры без средств против бактериальной контаминации по методике [5] при 3°C. Таким образом, было заготовлено три образца консервированной спермы по 50 мкл каждый. Кримоконсервацию заготовленных образцов спермы осуществляли через 2 мес. после хранения в охлажденном состоянии.

Испытывали следующий вариант разбавителя: 10% мед — 50 мл, лактоза — 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток — 2,5 мл, ДМСО — 5 мл (10% от объема меда). 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 акации белой (Краснодарский край, урожай 2021 г). Мед предварительно разогревали на водяной бане 40–45°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 разбавителя, затем 10 мкл охлажденной спермы (на 1 часть спермы : 8 частей разбавителя) из стеклянных капилляров и все перемешивали. Приготовленные таким образом образцы в количестве 15 шт. 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 1 ч при 3°C для эквilibрации. Замораживание образцов осуществляли по методике [6]. Срок криохранения составил 4 сут.

Оттаивание образцов проводили на водяной бане при 37°C в течение 30 сек. 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 искусственного осеменения (ио) маток набирали сперму со дна криопробирки.

Искусственное осеменение пчелиных маток осуществляли на оборудовании SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz, Espelkamp Deutsch-

land). Применяли однократное осеменение объемом вводимой спермы 10–12 мкл. Для осеменения использовали неплодных маток в возрасте 7–8 сут. Оценка репродуктивных показателей ио маток была заменена на оценку их физиологических показателей — концентрация сперматозоидов в семяприемнике и наличие остатков спермы в парных яйцеводах [7].

Маток препарировали под световым микроскопом МБС-10. Визуально фиксировали наличие или отсутствие остатков спермы в парных яйцеводах матки. Семяприемник освобождали от ткани и помещали в стерильную пробирку Eppendorf (1,5 мл), содержащую 250 мкл 10% медового разбавителя. Затем, прокалывали его иглой, выпуская содержимое в разбавитель. После тщательного пипетирования, брали каплю суспензии и заправляли счетную камеру Горяева. Подсчет сперматозоидов и определение их концентрации проводили по методике [4], принимая во внимание, что объем семяприемника матки составляет 1 мкл [8].

Качество заморожено-оттаянной и неразбавленной (свежеотобранной, контроль) спермы оценивали по показателям — подвижности и жизнеспособности сперматозоидов. Для оценки качества свежеотобранной спермы было задействовано 120 трутней.

Общую подвижность сперматозоидов (прямолинейно-поступательное движение, маневренное и вибрация) и их жизнеспособность оценивали в 10 полях зрения биологического светового микроскопа Leica при увеличении 400×. Для определения общей подвижности (ОП_с) использовали следующую формулу: $ОП_с (\%) = (ОК_с - Н_с / ОК_с) \times 100$, где ОК_с — общее количество сперматозоидов, Н_с — неподвижные сперматозоиды.

Жизнеспособность сперматозоидов оценивали методом суправитального окрашивания 1% раствором эозина. На 100 мкл суспензии спермы использовали 10 мкл 1% раствора эозина. Суспензию спермы для анализа готовили по методике [9] на 10% медовом разбавителе с акации белой, протитрованным 6М NaOH до pH 8-9.

Результаты и обсуждение. В ходе испытаний жизнеспособность сперматозоидов (целостность мембран) опытных образцов снизилась на 20,3% в сравнении с контролем (табл. 1).

Общая подвижность сперматозоидов опытных образцов сократилась в 25 раз в сравнении с контролем. С целью выявления оплодотворяющей способности заморожено-оттаянной спермы провели искусственное осеменение 10 неплодных пчелиных маток. В ходе оценки физиологических показателей ио маток, выявлено наличие спермы в семяприемнике 4 маток из 10 осемененных (табл. 2).

Важным физиологическим показателем пчелиной матки, определяющим ее воспроизводительные способности, является концентрация сперматозоидов в семяприемнике [10–12]. J. Wegener et al. (2012), A. Gul et al. (2017) выявили положительную корреляцию между концентрацией сперматозоидов в семяприемнике маток и количеством оплодотворенных яиц, откладываемых маткой ($r=0,54$ и $r=0,91$).

Концентрация сперматозоидов в семяприемнике искусственно осемененных маток варьируется от 1,8 млн/мкл [13, 14] до 6 млн/мкл [15], а у маток естественного спаривания от 4 до 7 млн/мкл [12]. При этом, сперма в семяприемнике маток естественного спаривания может храниться в течение нескольких лет. Таким образом, репродуктивный период пчелиной матки будет зависеть от того количества сперматозоидов, которое поступило в ее семяприемник. Очевидно, что осемененные нами пчелиные матки № 1 и № 3 будут иметь более продолжительный репродуктивный период (срок яйцекладки), чем матки № 2 и № 4. И все эти четыре пчелиные матки дадут потомство рабочих пчел более 50%.

При успешном осеменении сперма впрыскивается через непарный яйцевод в парные яйцеводы пчелиной матки. Парные яйцеводы — широко растяжимые мешки, которые могут вместить около

20 мкл спермы [8]. После осеменения они заполняются оба, но разными объемами. Проникновение спермы из парных яйцеводов в семяприемник матки происходит без вмешательства осеменатора. Этот процесс одинаково происходит как после естественного, так и после искусственного осеменения. Сперматозоиды, активируемые секретом придаточной железы, проникают в семяприемник через семяпровод за счет прямолинейно-поступательного движения, или продвигаются благодаря сокращению и расслаблению мускулатуры брюшка матки и деятельности «семенного насоса» [8]. Если поступившая сперма не удаляется из парных яйцеводов за 24–48 ч, то она погибает и в виде коричневатого комочка закрывает генитальные каналы матки.

Препятствовать передвижению сперматозоидов может развитие таких заболеваний, как паралич (черная болезнь пчел) и септицемия, которая вызывает распад пчел [8]. В случае септицемии отмечаются в качестве типичных органических изменений — черные пятна на внутренних органах (на железе с ядом, яичниках, мальпигиевых сосудах). Паралич убивает не так быстро, как септицемия. Пчелиные матки в таком состоянии могут жить несколько дней на сотах или на дне улья, а некоторые из них способны отложить несколько яиц до появления явных признаков.

Таблица 1. Основные показатели качества спермы трутней до и после 4 сут криохранения ($p<0,05$)

Исследуемые показатели	Образец спермы					
	Заморожено-оттаянная $n=27$			Контроль неразбавленная (свежеотобранная) $n=100$		
	$M \pm m$	σ	$Cv, \%$	$M \pm m$	σ	$Cv, \%$
Общая подвижность, %	$2,2 \pm 0,6$ (0–11,5)	3,1	141,04	$55,0 \pm 2,6$ (0–99,8)	26,5	48,3
Жизнеспособность, %	$64,0 \pm 1,8$ (41,5–83,7)	9,6	14,87	$84,3 \pm 1,2$ (40–99,9)	12,2	14,5

Таблица 2. Физиологические показатели пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой

Номер ИО пчелиной матки	Исследуемые показатели			
	Концентрация сперматозоидов в семяприемнике матки, млн/мкл $M \pm m$	σ	$Cv, \%$	Наличие спермы в парных яйцеводах
1	$2,4 \pm 0,25$ (2,2–2,7)	0,35	14,4	Нет
2	$0,9 \pm 0,3$ (0,6–1,2)	0,4	47,1	Нет
3	$4,4 \pm 0,3$ (4,1–4,7)	0,4	9,6	Нет
4	$0,22 \pm 0,02$ (0,2–0,25)	0,03	15,7	следы спермы
5	0	—	—	большое количество
6	0	—	—	большое количество
7	0	—	—	большое количество
8	0	—	—	Нет
9	0	—	—	Нет
10	0	—	—	Нет

Искусственно осемененные пчелиные матки, в парных яйцеводах которых нами зафиксировано наличие спермы в большом количестве, не имели при этом признаков септицемии. В пчелиных семьях, в которых выращивались опытные матки (семьи-воспитательницы) и трутни (отцовские семьи) не было отмечено пчел с признаками паралича. Возможно, продвижению сперматозоидов из парных яйцеводов в семяприемник пчелиной матки препятствовало развитие другого вирусного заболевания. Так или иначе, на текущий момент истинные причины этого явления для нас остаются невыясненными. Требуется проведение дополнительных исследований.

В текущем исследовании мы вновь столкнулись с проблемой полного удаления супернатанта из образца после центрифугирования. При заборе спермы со дна пробирки в шприц для ио маток остатки разбавителя часто подменяли саму

сперму. Требуется совершенствование этого технологического этапа при подготовке образца с заморожено-оттаянной спермой к искусственному осеменению пчелиной матки.

Заключение. Повторные испытания медового разбавителя для глубокого замораживания спермы трутней медоносных пчел в жидком азоте вновь подтвердили его криофилактические свойства. Жизнеспособность сперматозоидов сохраняется на уровне $64,0 \pm 1,8\%$ ($41,5-83,7$), а общая подвижность $2,2 \pm 0,6\%$ ($0-11,5$). При оценке оплодотворяющей способности сперматозоидов, выявлено их наличие в семяприемнике 4 из 10 искусственно осемененных пчелиных маток с концентрацией сперматозоидов от $0,25-4,7$ млн/мкл. При этом, в парных яйцеводах трех других осемененных маток зафиксировано наличие спермы и полное отсутствие сперматозоидов в семяприемнике.

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 [Электронный ресурс] // Генетика и разведение животных. — 2020. — № 1. — С. 27–36 Режим доступа: <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2019-4-3-8>.
2. Гулов А. Н. Медовый разбавитель для криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы / А. Н. Гулов, А. С. Ласкин [Электронный ресурс] // Генетика и разведение животных. — 2020. — № 4. — С. 50–55. Режим доступа: <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2020-4-48-53>.
3. 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.
4. Гулов А. Н. Проблемы сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы / А. Н. Гулов // Пчеловодство. — 2018. — № 6. — С. 22–25.
5. Гулов, А.Н. Перспективы краткосрочного хранения спермы трутней медоносной пчелы / А. Н. Гулов, Е. О. Ларькина // Генетика и разведение животных. — 2018. — № 4. — С. 61–66.
6. Пинаев Г.П. Методы культивирования клеток / Г.П. Пинаев, М.С. Богданова // Изд-во Политехн. ун-та, СПб., 2008. — 278 с.
7. Bieńkowska, M. Influence of the age of honey bee queens and dose of semen on condition of instrumentally inseminated queens kept in cages with 25 worker bees in the colonies [Электронный ресурс] / M. Bieńkowska, P. Węgrzynowicz, B. Panasiuk, K. Loc // *Journal of Apicultural Science*. — 2008. — V. 52. — № 2. — P. 23–33. — Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/258841458>.
8. Руттнер, Ф. Инструментальное осеменение пчелиных маток / Ф. Руттнер. — Бухарест: Апимондия, 1975. — 127 с.
9. Rhodes J. W. Semen production in drone honeybees. RIRDC Pub. / J. W. Rhodes // 2008. — No. 08/130. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/08-130>
10. Вассилиади Г. К. Сперматека — показатель качества пчелиных маток / Г.К. Вассилиади // Сельскохозяйственная биология (Серия Биология Животных). — 1991. — № 6. — С. 76–81.
11. Броварский В. Д. Миграция спермы и развитие яичников пчелиной матки / В. Д. Броварский // Пчеловодство. — 2005. — № 6. — С. 22–25.
12. Cobey S. W. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance [Электронный ресурс] // *Apidologie*. — 2007. — V. 38. — P. 390–410. — Режим доступа: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00892280/document>.
13. Woyke J. Influence of the number of attendant workers on the results of instrumental insemination of honey bee queens kept at room temperature [Электронный ресурс] / J. Woyke, Z. Jasinski // *Apidologie*. — 1980. — V. 11. — P. 173–179. — Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.

14. Woyke, J. Influence of the number of attendant workers on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated queens kept outdoors in mating nuclei [Электронный ресурс] / J. Woyke, Z. Jasinski // J. Apicultural Science, 1982. — V. 21. — P. 129–133. — Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/239521776>.
15. Маннапов А. Г. Оценка технологий инструментального осеменения / А. Г. Маннапов, В. В. Ляхов, В. Д. Броварский // Пчеловодство. — 2013. — № 6. — С.21.

Gulov A., Laskin A.

Thyroid blood profile in high-yielding dairy cows with different ovarian reactions to superovulatory treatment

Abstract.

Purpose: Conducting a honey diluent test for creeples of sperm of a drone honey bee.

Materials and methods. The material for the research served a sperm of the milled drone drums of the «Prioksky» type of the Midway breed of bees. The selection of sperm was carried out in June–July 2020 g by the method of artificial stimulation of the turning of the endofallosa in half-armed drones aged 25–30 days. The rock type «Prioksky» of the middle Russian breed of bees. Before freezing, the sperm was stored in glass capillaries in the cooled state at 3°C for 2 months. The following composition of the diluent was tested — 10% honey, lactose, sucrose, egg yolk and dimethyl sulfoxide.

Results. Studies have shown the viability of sperm at $64.0 \pm 1.8\%$ (41.5–83.7), and a total mobility of $2.2 \pm 0.6\%$ (0–11.5). To evaluate the fertilizing ability of sperm, carried out artificial insemination of 10 bee modules. In 4 seeded bees dykens, the presence of sperm in a seed-hearter with a concentration of sperm from 0.22–4.4 million / μl is revealed. In paired eggs of three other seeded matters, the presence of sperm and the complete absence of spermatozoa in the seed-receptionist are recorded.

Conclusion. Tests of the honey diluent for deep freezing sperm of the drone honey bees in liquid nitrogen confirmed its cryophylactic properties.

Keywords: drones sperm, cryopreservation, honey, instrumental 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 bees honey on the cryptorecency of sperm drutones / A. N. Gulov, Z. N. Saifutdinova, D. V. Mitrofanov, I. A. Languages [Electronic resource] // Genetics and Breeding animals. — 2020. — № 1. — P. 27–36 Access mode: <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2019-4-3-8>
2. Gulov A. N. Honey Diluent for the cryopreservation of sperm of the drone honey bee / A. N. Gulov, A. S. Laskin [Electronic resource] // Genetics and breeding of animals. — 2020. — № 4. — P. 50–55. Access mode: <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2020-4-48-53>
3. 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.

4. Gulov A. N. Problems of maintaining genetic resources of a honeybee / A. N. Gulov // Beekeeping. — 2018. — № 6. — P. 22–25.
5. Gulov, A. N. Prospects for short-term storage of sperm drone honey bees / A. N. Gulov, E. O. Lagkina // Genetics and breeding of animals. — 2018. — № 4. — P. 61–66.
6. Pinaev G. P. Methods of cell cultivation / G. P. Pinaev, M. S. Bogdanova // Polytechnic Publishing House. University, St. Petersburg, 2008. — 278 p.
7. Bieńkowska, M. Influence of the age of honey bee queens and dose of semen on condition of instrumentally inseminated queens kept in cages with 25 worker bees in the colonies [Электронный ресурс] / M. Bieńkowska, P. Węgrzynowicz, B. Panasiuk, K. Loc // Journal of Apicultural Science. — 2008. — V. 52. — № 2. — P. 23–33. — Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/258841458>.
8. Ruttner, F. Instrumental insemination of bee modules / F. Ruttner. — Bucharest: Apimonland, 1975. — 127 p.
9. Rhodes J. W. Semen production in drone honeybees. RIRDC Pub. / J. W. Rhodes // 2008. — No. 08/130. [Electronic resource].
10. Vasiliadi G. K. Srimathek — indicator of the quality of bee modules / G. K. Vasiliadi // Agricultural biology (animal biology series). — 1991. — № 6. — P. 76–81.
11. Brovarsky V. D. Migration of sperm and the development of ovaries of bee uterus / V. D. Brovarsky // Beekeeping. — 2005. — № 6. — P. 22–25.
12. Cobey S. W. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance [Electronic resource] // Apidologie. — 2007. — V. 38. — P. 390–410. — Режим доступа: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00892280/document>.
13. Woyke J. Influence of the number of attendant workers on the results of instrumental insemination of honey bee queens kept at room temperature [Электронный ресурс] / J. Woyke, Z. Jasinski // Apidologie. — 1980. — V. 11. — P. 173–179. — Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.
14. Woyke, J. Influence of the number of attendant workers on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated queens kept outdoors in mating nuclei [Электронный ресурс] / J. Woyke, Z. Jasinski // J. Apicultural Science, 1982. — V. 21. — P. 129–133.
15. Mannapov A. G. Assessment of technologies of instrumental insemination / A. G. Mannapov, V. V. Lyakhov, V. D. Brovarsky // Beekeeping. — 2013. — № 6. — p. 21.