

А. Н. Гулов¹, З. Н. Сайфутдинова², А. З. Брандорф¹

Биоразнообразие медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на территории России и пути его сохранения

Аннотация.

Биологическое разнообразие пчелиных – генетический ресурс России, который обеспечивает возможность поддержания гомеостаза экосистемы через опыление энтомофильных растений. Биоразнообразие пчелиных в жизни человека имеет экологическое, социальное, экономическое и эстетическое значение. Особый интерес в сохранении биоразнообразия представляют таксономически изолированные виды и популяции, непохожие на другие и потому уникальные по своей генетической конституции. Эти виды часто эндемичные, то есть ограниченные распространением одним районом. Их вымирание будет означать еще большую потерю биоразнообразия. Бесконтрольная интродукция пчел различных пород и популяций приводит к распространению заболеваний и скрытых генетических дефектов. В процессе массовой интродукции неадаптированных пород медоносных пчел происходит утрата породного разнообразия эндемичных популяций, сопровождающаяся сужением возможностей селекционной работы и сокращением опылителей. Использование современных методов мониторинга с применением ПЦР-анализа позволяет повысить эффективность изучения генофонда медоносных пчел. Биотехнологические методы искусственного осеменения пчелиных маток и криоконсервации спермы трутней в жидком азоте позволяют сохранить генофонд исчезающих аборигенных пород медоносных пчел. Использование этих методов дает возможность избежать полиандрии и проводить контролируемое спаривание в селекционно-генетических исследованиях. Получение культуры клеток медоносных пчел перспективно для более углубленного изучения взаимодействия с внутриклеточными инфекционными агентами, геномных и эпигеномных механизмов изменчивости этого уникального объекта.

Ключевые слова: медоносная пчела, искусственное осеменение, криоконсервация спермы, культура клеток.

Авторы:

Гулов Алексей Николаевич – кандидат сельскохозяйственных наук; e-mail: blee3@yandex.ru;

Сайфутдинова Зифа Низамовна – кандидат биологических наук; e-mail: zsaifutdin@yandex.ru;

Брандорф Анна Зиновьевна – доктор сельскохозяйственных наук; e-mail: apis mellifera-mellifera-l@yandex.ru.

¹ ФНЦ пчеловодства; 391110, Россия, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, 22;

² ФНЦ – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН; 109428 Россия, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1.

На долю медоносных пчел приходится 80-90% всех опыляемых энтомофильных растений, поэтому от их деятельности напрямую зависит разнообразие фито- и агроценозов, являющихся важными биотическими факторами в жизнедеятельности разных видов животных. Естественный ареал обитания медоносных пчел в России достигает 60° с.ш., вплоть до Урала. В Сибирь и на Дальний Восток медоносные пчелы попали в результате интродукции их человеком. Широкий ареал обитания медоносной пчелы обусловлен высокими адаптивными свойствами вида и благодаря внутривидовой дифференциации. В процессе эволюции у медоносных пчел, обитающих

в отличных природно-климатических и медосборных условиях, выработались адаптации, которые проявились в биологических и фенотипических признаках. Породное разнообразие с разными биологическими признаками позволяет выживать медоносным пчелам в эндемичных условиях [1].

Начиная с XIX века, ученые выявили ряд отличий у медоносных пчел в разных регионах, впоследствии данные группы были выделены в породы. На территории России аборигенными породами являются: среднерусская (*apis mellifera mellifera* L.), карпатская (*apis mellifera carpatica*), серая горная кавказская (*apis mellifera caucasica*), желтая кавказская (*apis mellifera rempies*), даль-

невосточные пчелы (*far-east black bees*) [1].

Каждая из пород характеризуется комплексом отличительных биологических признаков, высоким генетическим потенциалом продуктивных качеств и приспособленностью к определенному типу медосбора [2]. В середине прошлого столетия наибольший ареал обитания занимала среднерусская (темная европейская) пчела, как наиболее адаптированная к суровым климатическим условиям РФ [1]. Среднерусская порода пчел включает в себя бурзянскую, вологодскую, горно-алтайскую, красноярскую, татарскую, уральскую и другие популяции [2]. К настоящему времени в результате целенаправленной селекционной работы на основе отобранного исходного материала выведены на базе среднерусской породы новая порода «Башкирская» (*apis mellifera mellifera* L.), породные типы «Приокский», «Орловский», «Татарский», «Бурзянская бортевая», карпатской - породный тип «Майкопский», серой горной кавказской - «Краснополянский» [2].

В современных мировых условиях глобализации, интенсивного земледелия, массового распада колоний и гибели медоносных пчел, достигающих до 80 % в год, пчеловодство России имеет ряд преимуществ: обильную кормовую базу с высоким потенциалом обеспечения пчелиных семей полифлерным медосбором, разнообразием генофонда медоносных пчел, превалирующая часть которых представлена уникальной среднерусской породой [1]. В процессе коэволюции, протекавшей в суровых климатических условиях, у медоносных пчел среднерусской породы (*apis mellifera mellifera* L.) выработалась адаптация к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам. Среди которых можно выделить: изменения окислительно-восстановительных процессов в разные периоды жизнедеятельности, способность выживать в условиях длительного безоблетного периода (что обеспечивается благодаря низкому содержанию воды в организме), повышение концентрации углекислого газа в гнезде, способность к максимальной фильтрации меда от пыльцевых зерен [1]. Медоносные пчелы данной породы обладают высокой устойчивостью к заболеваниям (нозема-тозу, падевому токсикозу) и эффективно использовать период обильного короткого медосбора. В настоящее время отмечаются места локальных популяций пчел среднерусской породы, но племенные репродукторы составляют незначительное количество в обследованных регионах [3-6].

Такое разнообразие генетических ресурсов является источником для совершенствования существующих и создания новых пород, типов, линий пчел, сочетающих высокий генетический потенциал продуктивности с приспособленностью к

местным природно-климатическим условиям [2].

Но ареал среднерусской пчелы существенно сократился за последние два века. Массовая гибридизация с другими породами пчел индуцирует распространение новых болезней, разрушение адаптационных комплексов среднерусской пчелы, способствует снижению ее устойчивости и продуктивности. Сложные двойные, тройные и множественные гибриды пчел характеризуются несогласованностью работы генетических систем, и, прежде всего, систем, связанных с сезонной активностью [7]. Многолетний мониторинг морфометрических признаков медоносных пчел среднерусской породы [5,6,8-10] свидетельствует о продолжающемся и в настоящее время процессе метизации вследствие бесконтрольного завоза племенного материала (пчелиные пакеты и семьи, плодные матки) из других регионов.

Состояние генофонда медоносной пчелы является одной из основных причин современного кризиса в пчеловодстве. В связи с массовой гибридизацией и в целях сохранения генофонда аборигенных пород первостепенное значение приобретает генетическая паспортизация пород пчел [7]. Это актуальная задача не только селекции медоносной пчелы, но и всей современной селекции сельскохозяйственных животных.

Сохранение генетических ресурсов медоносных пчел России является актуальной проблемой и в связи с нарастающим экологическим кризисом [11, 12]. Знания о наследственности и изменчивости обеспечивают подходы к выработке оптимальной стратегии сохранения, разведения и воспроизводства пчел. К началу 21-го века ситуация в пчеловодстве резко ухудшилась и появилась настоятельная необходимость использования биотехнологических методов сохранения генофонда медоносных пчел. Главной причиной этого послужило повсеместное явление, названное коллапсом пчелиных семей, вызванное комплексом негативных, до конца пока невыясненных экологических факторов. Кроме того, в биологии развития медоносной пчелы имеются видовые особенности, осложняющие проведение селекционно-генетических работ в пчеловодстве и мероприятий по сохранению их генофонда. К основным проблемам в сохранении генетических ресурсов относятся биологические особенности репродукции медоносных пчел:

1. Невозможность контроля спаривания пчелиных маток, так как данный процесс происходит в полете на высоте свыше 10 м. За время брачного полета матка осеменяется примерно 10-30 трутнями (полиандрия) неизвестного происхождения.

2. Недостаточное количество половозрелых

трутней весной, когда необходимо получение ранних плодных пчелиных маток, к тому же срок их развития от яйца до стадии имаго продолжительнее на неделю по сравнению с маткой. А также гибель трутней после спаривания, т.е. их генетический материал в естественных условиях можно использовать только один раз, в отличие от сельскохозяйственных животных.

3. Необходимость в наличии надежного метода получения культур клеток медоносных пчел (для многих других насекомых и животных это является рутинной работой). Отсутствие постоянных иммортизированных линий клеток медоносных пчел является главным ограничивающим фактором многих исследований по физиологии, генетике, эпигенетике, инфекционным заболеваниям, что в результате отражается на сохранении генетических ресурсов этого вида.

Метод инструментального осеменения позволяет подбирать родительские пары и получать потомство с желаемым генотипом. Его применение позволило существенно увеличить разрешающую способность генетического анализа у медоносных пчел и сделать его более доступным [13, 14].

Криоконсервация спермы различных животных довольно широко применяется в практике их разведения, воспроизводства и сохранения. Однако этого нельзя сказать в отношении такого объекта как медоносная пчела.

Имеется немало работ, посвященных вопросам длительного хранения спермы трутней в жидком азоте. При этом каждый из авторов использует свою криопротективную среду. Применяемые авторами среды имеют в большинстве своем сугубо химическое происхождение, включающие в свой состав такие компоненты как: ЭДТА, тистин, соли триса, калия и натрия, фосфат и цитрат натрия, бикарбонат соды, аргинин, глицин, пролин, фермент каталаза, бычий сывороточный альбумин, культуральная среда Schneider's. Во избежание контаминации микроорганизмами в состав разбавителя добавляют пенициллин, стрептомицин, тилозин, канамицин. В качестве криопротектора широко используется диметилсульфоксид (ДМСО) [15]. Исследования, связанные с возможностью длительного сохранения спермы медоносной пчелы в жидком азоте, активно проводились в мире в конце прошлого столетия. Так, один из основоположников криоконсервации спермы трутней J. Harbo et al. [16], применив в качестве криопротектора 25 % ДМСО, получил 8 % пчелиного расплода от маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой. O. Kaftanoglu и Y. Peng [17], экспериментируя с концентрациями ДМСО и испытывая различные разбавители, провели осеменение 15 неплодных маток спермой,

хранившейся 305-359 сут. в жидком азоте. Тринадцать выживших маток дали 47 % расплода рабочих особей. Полученные авторами результаты исследований свидетельствуют о низкой оплодотворяющей способности сперматозоидов, о мощном воздействии на сперму трутней агрессивных условий среды. Следует отметить, что авторы в своих работах использовали программные замораживатели, обеспечивающие постепенное охлаждение образцов в режиме 3-4°C/мин. Следующие результаты по искусственному осеменению маток заморожено-оттаянной спермой были опубликованы уже спустя несколько десятилетий.

Американские ученые B. Hopkins и C. Hegg [18] посвятили свою работу изучению факторов, оказывающих влияние на заморожено-оттаянную сперму — тип и концентрацию криопротекторов, влияние холодового шока, скорости замораживания и общей температурной чувствительности сперматозоидов. При оценке криофилактической токсичности ДМСО авторы выявили жизнеспособность сперматозоидов 93 % в образце, разбавленного в ДМСО по истечении одного часа при комнатной температуре и 35 % жизнеспособных сперматозоидов в образце с глицерином. Установлен порог концентрации ДМСО (15 %) достоверно снижающий жизнеспособность сперматозоидов и вызывающий повреждение их генома через обрыв хроматиды.

Авторы рекомендуют избегать быстрого оттаивания спермы при температуре выше 40°C. Программируемое замораживание (медленное охлаждение в режиме 3°C/мин) обеспечивает наивысшую сохранность мембран сперматозоидов (92,94 %). B. Hopkins и C. Hegg положили начало использованию яичного желтка в составе разбавителя для криоконсервации спермы трутней. По итогам выполненной работы через два года B. Hopkins et al. [19] опубликовали результаты искусственного осеменения пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой. По данным авторов, из 5 осемененных маток только две дали потомство рабочих пчел более 50 %. У остальных маток наблюдали смешанный расплод или только трутневый (горбатый). При этом авторы не информируют читателей о сроке хранения спермы трутней в жидком азоте. По мнению S. Cobey et al. [15] современные методы криоконсервации демонстрируют саму возможность получения нескольких поколений пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой. Однако оплодотворяющей способности сперматозоидов оказывается недостаточной для широкомасштабного воспроизводства пчелиных семей.

J. Wegener et al. [20] в результате тестирования новых разбавителей, направленных на сни-

жение токсического воздействия криопротектора (ДМСО), выявили наилучшие показатели жизнеспособности сперматозоидов с применением буфера цитрата-HEPES, содержащего трегалозу. F. Dadkhah et al. [21] к основному составу разбавителя Harbo добавляли яичный желток и соевый лецитин в концентрациях 0,5 и 2 %. По итогам оценки заморожено-оттаянной спермы средняя подвижность сперматозоидов в среде с использованием яичного желтка составила $4,75 \pm 0,14$ балла, жизнеспособность $69,75 \pm 2,32$ %. В разбавителе с соевым лецитином 0,5 % отмечена подвижность сперматозоидов $4,12 \pm 0,12$ балла, жизнеспособность $38,5 \pm 2,32$ % и в концентрации 2 % - подвижность $4,5 \pm 0,2$ балла, жизнеспособность $45 \pm 2,32$ %. С применением соевого лецитина сперматозоиды обладали хорошей подвижностью, но при этом имели низкую оплодотворяющую способность.

A. Gul et al. [22] с целью снижения токсического воздействия ДМСО на качественные характеристики спермы использовали в качестве экстендеров глюкозу, семенную плазму спермы барана, семенную плазму спермы трутней медоносной пчелы и буфер (Harbo). По результатам искусственного осеменения пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой количество расплода рабочих пчел составило: $3,0 \pm 0,8$ %, $0,3 \pm 0,1$ %, $48,1 \pm 4,1$ % и $40,3 \pm 2,4$ %, соответственно. M. Paillard [23] обнаружил жизнеспособность сперматозоидов $76,0 \pm 5$ % в образце, хранившемся 330 сут. в жидком азоте, и полное отсутствие живых сперматозоидов в образце, хранившемся при 16°C . Причем после 90 сут. хранения в жидком азоте жизнеспособность сперматозоидов составляла $61,0 \pm 5$ % против $77,0 \pm 5$ % при 16°C . S. Alcau et al. [24] исследовали влияние маточного молочка в составе основного разбавителя, содержащего цитрат натрия, бикарбонат соды, хлорид калия, каталазу, амоксициллин и ДМСО, на сохранение жизненного ресурса спермы в процессе криоконсервации. Авторы выявили наилучшую подвижность сперматозоидов $59,0 \pm 4,3$ %, функциональную целостность их мембран $68,93 \pm 3,88$ % и акросом $82,33 \pm 2,99$ % в группе образцов с 1% маточным молочком. L. Henry et al. [25] изучали влияние нативного и центрифугированного яичного желтка в сочетании с ДМСО и глицерином в составе основного разбавителя Harbo на сохранение фертильности спермы. Авторами установлена подвижность сперматозоидов $2,13 \pm 0,17$ балла в образце с нативным яичным желтком в сочетании с глицерином (25 %). Однако более высокую сохранность мембран сперматозоидов $59,1 \pm 1,44$ % показал образец с центрифугированным желтком в сочетании с

ДМСО (25 %).

Первые успешные опыты по криоконсервации спермы трутней в гемолимфе медоносной пчелы были проведены в СССР [26]. И только в начале этого столетия вышел патент (№2173045 от 10.09.2001) на технологию криоконсервации спермы трутней с получением плодных маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой [27]. Криоконсервация спермы трутней была проведена по методике, разработанной Какпак-вым В.Т. с соавторами. По этой методике в криобанки Всероссийского института коневодства и Всероссийского института экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ), начиная с 1993 года, заложены образцы спермы трутней с пасек Рязанской, Тверской, Московской областей, Татарстана, Башкортостана, Башкирской опытной станции пчеловодства и с «Царской пасеки» Измайловского парка г. Москвы.

Метод криоконсервации усовершенствован в связи с необходимостью унификации отдельных этапов: отбора, хранения, оттаивания, оценки качества и введения спермы трутней в половые пути матки. Выявлены основные условия криохранения спермы трутней медоносной пчелы [28] - применение питательной среды С46 в качестве разбавителя, использование криопротектора ДМСО, замораживание со скоростью $1^\circ/\text{мин}$, оттаивание при температуре 40°C , отмывание заморожено-оттаянной спермы от криопротектора свежей питательной средой. Основное предназначение среды С46 — культивирование постоянных линий клеток беспозвоночных. К среде С46 удалось адаптировать линии клеток дрозофилы: 67j25D, Dh14, Dh15, Dh33, Dv3g, S#3, S#2, S#1, D1, D2; тутового шелкопряда *Bombyx mori* Bm и Bm N; комаров *Aedes aegypti* Mos 20 A, *Aedes albopictus* Aa (C/6); шинельной моли *Spodoptera frugiperda* Sf9 (IPRL-21) [29]. Среду С46 обогащают добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (2-10 %) [30]. По данным В. Какпакова с соавт. [31], наибольшая выживаемость (подвижность) сперматозоидов трутней (80-100 %) достигалась при замораживании спермы от 20 трутней с 0,15 мл среды С46, содержащей 15 % ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) и 10 % ДМСО. Авторы осеменили 23 неплодные пчелиные матки спермой, хранившейся в жидком азоте 760 сут. Оплодотворенные яйца откладывали 15 маток, 10 из которых были выбракованы при оценке репродуктивных показателей, так как площадь расплода рабочих пчел составила менее 150 см^2 . Оставшиеся пять маток, имевшие в среднем по 300 см^2 расплода, авторы оставили для полноценного разведения и содержания на экспериментальной пасеке НИИ пчеловодства.

Важным моментом является оценка влияния условий криохранения спермы на ее качественные характеристики. Так, сперма, хранившаяся в жидком азоте в течение 12 лет [32], имела следующую динамику: после 6 лет криохранения сперматозоиды не только не теряли своей активности и оплодотворяющей способности, но и проявляли тенденцию к улучшению данных показателей. Начиная с 7 года криохранения, отмечено некоторое снижение активности и переживаемости сперматозоидов, а с 9-го года хранения качество спермы вновь улучшалось. Более того, проведена оценка приема и яйценоскости пчелиных маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой после 25-ти лет хранения в жидком азоте [33].

Показано, что жизнеспособность спермы сохраняется на достаточно высоком уровне (93 %) и не зависит от длительности криохранения. Однако оплодотворяющая способность этих доз спермы оказалась низкой, количество печатного расплода рабочих пчел от маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой, составило менее 50 %. Дополнительно авторами было проведено ультрамикроскопическое исследование заморожено-оттаянной спермы, в ходе которого выявлены значительные повреждения органелл сперматозоидов [34]. В целом, результаты исследований, полученные при выполнении работ вышеперечисленными авторами, продемонстрировали саму возможность сохранения спермы трутней в жидком азоте в течение 25 лет. Это беспрецедентный случай в мировой практике пчеловодства, аналогов которому до сих пор не существует. Дальнейшие разработки по совершенствованию питательной среды С46, режима замораживания и оттаивания позволят усовершенствовать данную методику.

Во время длительного хранения в жидком азоте сперматозоиды подвергаются воздействию целого ряда факторов, вызывающих структурные и функциональные изменения клеток. Повреждения акросомы и изменения в конденсации хроматина, индуцируемые процессами замораживания и оттаивания гамет, отражаются должным образом на морфологии сперматозоидов и их морфометрических параметрах [34, 35]. Морфологические показатели сперматозоидов более тесно коррелируют со скоростью оплодотворения, чем концентрация сперматозоидов и их подвижность [36, 37]. Повреждения сперматозоидов, вызванные процессом криоконсервации, могут быть уменьшены путем оптимизации типов криопротекторов и разбавителей. И в этом отношении отдельного внимания заслуживает натуральный пчелиный мед как богатейший при-

родный источник простых и сложных сахаров.

Основным компонентом меда являются углеводы, растворенные в небольшом количестве воды: фруктоза 38,0 %, глюкоза 31,0 %, сахароза 1,0 %, вода 13,0-20,0%, другие сахара (мальтоза, мелицитоза) 9,0 %, зола 0,17%, прочее 3,38 %, а также в незначительных количествах витамины В1, В2, В6, Е, К, С, каротин (провитамин витамина А), фолиевая кислота.

Мед имеет подтвержденные противомикробные (антибактериальные, антимикотические, антимикобактериальные) свойства, интерес к которым в последнее время растет. Добавление пчелиного меда в состав разбавителей для криоконсервации значительно улучшает подвижность сперматозоидов после оттаивания, целостность их мембран и акросом, а также снижает количество аномалий в морфологии сперматозоидов [38].

Мед проявляет свойства криопротектора, сохраняя жизнеспособность сперматозоидов на уровне $37,2 \pm 0,5$ %, и обеспечивает достаточно высокую защиту жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы в сочетании с 10 % ДМСО - $79,6 \pm 1,2$ %. Из шести пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе 10 % медового разбавителя, две дали потомство рабочих пчел 96,5-99,1 % [39]. Повторные испытания позволили выявить сперматозоиды ($0,22-4,4$ млн/мкл) в семяприемнике 4 пчелиных маток из 10, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе 1 % медового разбавителя [40].

С целью решения различных проблем, связанных с сохранением биоразнообразия медоносной пчелы, требуется разработка геномного криобанка соматических клеток пчел. Получение культур клеток - современный метод клеточной биотехнологии, широко развиваемое направление исследований. Считается, что наличие культур клеток объекта определяет высокий уровень исследований биологии и генетики этого вида. Установленные линии клеток насекомых и методы первичной культуры многочисленны и часто используются в различных исследовательских программах. С тех пор как была создана первая линия клеток насекомых в 1962 году, были разработаны более 500 непрерывных линий насекомых, к сожалению, среди них нет культуры клеток пчел. В нашей стране начало отработки криобиологической технологии хранения культур клеток, а затем и репродуктивных клеток насекомых в жидком азоте было положено в 1967 году с целью сохранения и развития первой в мире линии эмбриональных клеток *Drosophila melanogaster* 67j25D.

Исследования по культивированию тканей

имаго рабочих пчёл был начаты в семидесятые годы прошлого столетия сотрудниками Всероссийского института экспериментальной ветеринарии - ВИЭВ [41]. Были предприняты попытки культивирования различных тканей имаго рабочих пчёл: слюнные железы, мышечная ткань, гемоциты, ткань средней кишки. В настоящее время эти работы по получению культур клеток продолжены, получена первичная культура клеток из яичников пчелиных маток [42] и непостоянные линии клеток из различных тканей рабочих пчел, которые перевивались до 4-го пассажа [43]. Монослой был представлен клетками различных размеров во всех клеточных культурах, что согласуется с сообщениями других авторов по первичным и непостоянным клеточным культурам медоносных пчел. Эти культуры сохраняли свою жизнеспособность в течение месяца. Впервые клетки имаго пчелы медоносной выжили в культуре в течение четырех пассажей.

Таким образом, опыт применения криоконсервации спермы трутней в целях сохранения генофонда и управления генетическими ресурсами среднерусской пчелы показал, что необходимо дальше вести работу в направлении совершен-

ствования методов и условий сбора, хранения, оттаивания, оценки качества половых гамет и дальнейшего их использования в искусственном осеменении пчелиных маток.

Неоценимый многолетний опыт ученых нашей страны, посвятивших свою жизнь вопросам сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы, нашел своих последователей и в настоящее время. Сегодня в рамках реализации проекта: «Создание и развитие сетевой биоресурсной коллекции сельскохозяйственных животных, птиц, рыб и насекомых» (грант Минобрнауки России) криобанк спермы медоносной пчелы пополняется новыми образцами спермы трутней основных пород пчел, разводимых на территории России.

Опыт получения первичных и долговременных клеточных культур особенно ценен в изучении болезней медоносной пчелы, а также для проведения исследований по генетике и для создания геномного криобанка соматических клеток этого уникального объекта.

Наступило время безотлагательного применения этих методов для сохранения генетических ресурсов медоносных пчел России.

Литература

1. Брандорф А. З. Популяционно-генетическая дифференциация медоносных пчёл Кировской области / А. З. Брандорф, М. М. Ивойлова и др. // Пчеловодство. — 2012. — № 7. — С.14-16.
2. Бородачев А. В. Генетические ресурсы медоносных пчел России / А. В. Бородачев, Л. Н. Савушкина, В. А. Бородачев // В сб. науч.- практ. конф. Киров: НИИСХ Северо-Востока. — 2017. — С. 25-32.
3. Скворцов А. И. Морфометрический анализ трутней Чувашии / А. И. Скворцов, В. Н. Саттаров, В. Г. Семенов, Н. Р. Газизова // Пчеловодство. — 2018. — №2. — С. 20-21.
4. Россейкина С. А. Морфометрическая характеристика среднерусских пчел пространственно изолированных пасек Сибири / С. А. Россейкина, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, Н. В. Островерхова // В сб. докладов науч.- практ. конф. Киров: НИИСХ Северо-Востока. — 2019. — С. 73-77.
5. Газизова Н. Р. Некоторые сведения о морфологии трутней *Apis mellifera* на территории Южного Урала / Н. Р. Газизова // В сб. науч.- практ. конф. Киров: НИИСХ Северо-Востока. — 2019. — С. 31-34.
6. Николенко А. Г. Генетико-селекционный проект «Алтын Солок» / А. Г. Николенко, М. Д. Каскинова, А. Р. Гатауллин, Е. С. Салтыкова // В сб. докладов науч.- практ. конф. Киров: НИИСХ Северо-Востока. — 2019. — С. 62-67.
7. Монахова Т. А. Пчела медоносная (*Apis Mellifera*) в генетическом поле. Эколого-генетические характеристики / Т. А. Монахова // Тов-во научных изданий КМК. М. — 2019. — 154 с.
8. Абакарова М. А. Особенности медоносных пчел Дагестана, меры охраны и их воспроизводство / М. А. Абакарова, А. Р. Гасанов // Научный журнал Вестник ДГУ. — 2014. — №1. — С. 156-158.
9. Симанков М. К. Из опыта морфологических исследований в Пермском крае / М. К. Симанков, А. В. Петухов, В. Л. Макаров, А. Ю. Лаврский, И. А. Лебединский // В сб. докладов науч.- практ. конф. Киров: НИИСХ Северо-Востока. — 2014. — С. 241-244.
10. Анисина О. С. Экстерьер пчел нерайонированных пород в республике Татарстан / О. С. Анисина // В сб. докладов науч.- практ. конф. Киров: НИИСХ Северо-Востока. — 2017. — С.15-19.
11. Саттаров В. Н. Аномалии глаз рабочих пчел на территории Башкортостана / В. Н. Саттаров, В. Р. Туктаров, Н. Ф. Мухаметова, Е. М. Иванцов // Пчеловодство. — 2014. — №5. — С. 18-19.
12. Чиндина С. Р. Влияние генотоксичности среды на возникновение морфологических аномалий пчел в Самарской области / С. Р. Чиндина, Р. Р. Валиуллина, Г. Ш. Ахтарьянова // В сб. докладов науч.- практ. конф. Грозный. — 2017. — С. 256-259.

13. Тряско В.В. Естественный партеногенез у медоносной пчелы / В. В. Тряско // XX юбилейный международный конгресс по пчеловодству. Москва. — 1969. — С. 356-361.
14. Бородачев А. В. Инструментальное осеменение пчелиных маток / А. В. Бородачев, В. Т. Бородачева // Пчеловодство. — 1990. — №9. — С.12-13.
15. Cobey S.W. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens / S. W. Cobey, D. R. Tarpy, J. Woyke // Journal of Apicultural Research. — 2013. — V. 52(4). — P. 1-18.
16. Harbo J. R. Survival of honey bee (*Hymenoptera, Apidae*) spermatozoa after 2 years in liquid-nitrogen (-196°C) / J. R. Harbo // Ann. Entomol. Soc. Am. — 1983. — V. 76. — P. 890-891.
17. Kaftanoglu O. Preservation of honey bee spermatozoa in liquid-nitrogen / O. Kaftanoglu, Y.S. Peng // J. Apic. Res. — 1984. — V. 23. — P. 157-163.
18. Hopkins B. K., Herr C. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa / B. K. Hopkins, C. Herr // Apidologie. — 2010. — V. 41. — P. 548-556.
19. 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.
20. Wegener J. New methods and media for the centrifugation of honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) drone semen / J. Wegener, T. May et. al. // Journal of Economic Entomology. — 2014. — V. 107. — P. 47-53.
21. Dadkhah F. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol / F. Dadkhah, G. Nehzati-Paghaleh, M. Zhandi, B.K. Hopkins // Journal of Apicultural Research. — 2016. — № 55(4). — P. 279-283.
22. Gul A. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility / A. Gul, S. Nuray et. al. // Theriogenology. — 2017. — V. 101. — P. 109-113.
23. Paillard M. Preservation of honey bee (*Apis mellifera* L.) Semen / M. Paillard // Universite Laval. — Québec, Canada. — 2016.
24. Alcay S. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders / S. Alcay, S. Cakmak et. al. // Cryobiology. — 2019. — V. 87. — P. 28-31.
25. Henry L. Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*) / L. Henry, D. R. Alvaro et. al. // Abanico Veterinario. — 2019. — V.9(1). — P. 1-11.
26. Мельниченко А. Н. Хранение трутневой спермы / А. Н. Мельниченко, Ю. Л. Вавилов, В. И. Макаров, А. П. Клепикова // Пчеловодство. — 1976. — №12. — С. 4-5.
27. Какпаков В. Т. Центр инструментального (искусственного) осеменения медоносной пчелы (ЦИОМП) / В. Т. Какпаков // Ветеринарная патология. — 2007. — №1(20). — С. 28-30.
28. Бородачев А. В. Технология длительного хранения спермы трутней в жидком азоте / А. В. Бородачев, О. В. Кабашова // ГНУ НИИП РАСХН. — 2007. — 26 с.
29. Пинаев Г. П. Методы культивирования клеток / под общ. ред. Г.П. Пинаева, М. С. Богдановой. — СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2008. — 278 с.
30. Какпаков В. Т. Получение и характеристика культур соматических клеток дрозофилы: дис. д-ра биол. наук: 06.02.07 / Какпаков Виталий Туякович. — М., 1989. — 341 с.
31. Какпаков В. Т. Криобанк спермы трутней медоносной пчелы / В. Т. Какпаков, О. В. Кабашова, А. В. Бородачев, Е. С. Какпакова // Пчеловодство. — 1993. — №8. — С.4-6.
32. Кабашова О. В. Репродукция пчелиных маток с использованием криоконсервированной спермы трутней *Apis mellifera* L. / О. В. Кабашова, А. В. Бородачев, В. Т. Какпаков // Сборник докладов научно-практической конференции. — Дивово: ГНУ НИИ коневодства, 2004. — 180 с.
33. Гулов А. Н. Проблемы сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы / А. Н. Гулов // Пчеловодство. — 2018. — №6. — С. 22-25.
34. Гулов А. Н. Cryopreservation effects on drone sperm *Apis mellifera* L. morphometric parameters and ultrastructure / А. Н. Гулов, Е. Е. Брагина // Ветеринария, зоотехния, биотехнология. — 2022. — №1. — С. 75-86.
35. Gravance C. G. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry / C. G. Gravance, R. Vishwanath, C. Pitt, D. L. Garner, P. J. Casey // J Androl. — 1998. — V. 19. — P. 704-709.
36. Hinting A. Value of sperm characteristics and the result of in vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction / A. Hinting, F. Comhaire et. al. // Int J Androl. — 1990. — V. 13. — P. 59-64.

37. Duncan W. W. Prediction of fertilization rates from semen variables / W. W. Duncan, M. J. Glew, X. Wang, S. P. Flaherty, C. D. Matthews // *Fertil Steril.* – 1993. – V.59. – P. 1233-1238.
38. 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. doi: 10.31043/2410-2733-2020-1-27-36.
39. Гулов А. Н. Медовый разбавитель для криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы / А. Н. Гулов, А. С. Ласкин // *Генетика и разведение животных.* – 2020. – №4. – С.27-36. doi: 10.31043/2410-2733-2020-3-106-113.
40. Гулов А. Н. Натуральный пчелиный мед и сохранение спермы трутней в жидком азоте / А. Н. Гулов, А. С. Ласкин // *Генетика и разведение животных.* – 2021. – № 4. – С.17-22.
41. Гробов О. Ф. Роль варроа в массовой гибели пчел / О. Ф. Гробов // *Труды ВИЭВ.* – 2010. – Т. 76. – С.260.
42. Васильев В. А. Разработка условий и метода получения культур клеток медоносных пчел / В. А. Васильев // *Труды ВИЭВ.* – 2015. – Т. 78. – С. 109-115.
43. Сайфутдинова З. Н., Гулюкин М. И. Криобиотехнологические методы в пчеловодстве / З. Н. Сайфутдинова, М. И. Гулюкин // В сб. докладов науч.- практ. Конф., Минск. – 2015. – С. 87-90.

Gulov A.¹, Sayfutdinova Z.², Brandorf A.¹

The honey bee *Apis mellifera* L. biodiversity in Russia and its preservation

Abstract.

Biological diversity of bee - the genetic resource in Russia, which enables maintaining homeostasis of ecosystems through pollination entomophilous plants. The biodiversity of bees in human life has ecological, social, economic and aesthetic significance. Of particular interest in the preservation of biodiversity are taxonomically isolated species and populations, not resemble others and therefore unique in their genetic constitution. These species are often endemic, that is limited to the dissemination of one area. Their extinction will mean the loss of biodiversity. Uncontrolled introduction of bees of different species breeds and populations leads to the spread of diseases and hidden genetic defects. In the process of mass introduction of not adapted breeds of honey bees there is a loss of breed diversity of endemic populations, accompanied by a narrowing of breeding opportunities and a reduction in pollinators. Using modern methods of monitoring with the use of microsatellite analysis to improve the efficiency study of the gene pool of honeybees. Biotechnological methods of artificial insemination of Queens and cryopreservation of drone sperm in liquid nitrogen allow preserving the gene pool of endangered native breeds of honeybees. The use of these methods makes it possible to avoid polyandry and conduct controlled mating in breeding and genetic studies. Obtaining a culture of honeybee cells is promising for a more in-depth study of the interaction with intracellular infectious agents, genomic and epigenetic mechanisms of variability of this unique object.

Keywords: honey bee, instrumental insemination, cryopreservation of drone sperm, cell culture.

Authors:

Gulov A. – PhD (Vet. Sci.); e-mail: e.kora@mail.ru;

Sayfutdinova Z. – leading researcher; e-mail: zsaifutdin@yandex.ru;

Brandorf A. – Dr. Habil (Agr. Sci.); e-mail: sashamoroz.shuramoroz@mail.ru.

¹ Federal Scientific Center for Beekeeping; 391110, Russia, Ryazan region, Rybnoye, st. Postal, 22;

² Federal Scientific Center-the All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named

after K. I. Skryabin and J. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences; 109428 Russia, Moscow, Ryazan Prospekt, 24, building 1.

References

1. Brandorf A. Z. Popular genetic differentiation of honey bees of the Kirov region / A. Z. Brandorf, M. M. Iovovolova and others // Beekeeping. — 2012. — № 7. — P. 14-16.
2. Borodachev A.V. Genetic resources of the honey bees of Russia / A. V. Borodachev, L. N. Savushkina, V. A. Borodachev // In Sat. reports scientific. - Pract. Conf. Kirov: NIISH North-East. — 2017. — P. 25-32.
3. Skvortsov A. I. Morphometric analysis of the drone of Chuvashia / A. I. Skvortsov, V. N. Sattarov, V. G. Semenov, N. R. Gazizova // Beekeeping. — 2018. — № 2. — P. 20-21.
4. Rosseikina S. A. The morphometric characteristic of the Central Russian bees of spatially isolated apiaries of Siberia / S. A. Rosseikin, O. L. Konusova, Yu. L. Pogorelov, N.V. Ostrokhova // in the collection. reports scientific. - Pract. Conf. Kirov: NIISH North-East. — 2019. — P. 73-77.
5. Gazizova N. R. Some information about the morphology of the drone *Apis Mellifera* in the territory of the Southern Urals / N. R. Gazizova // Pract. Conf. Kirov: NIISH North-East. — 2019. — P. 31-34.
6. Nikolenko A. G. Genetic-sequence project "Altyn Solok" / A. G. Nikolenko, M. D. Kaskinov, A. R. Gataullin, E. S. Saltykova // In Sat. reports scientific. - Pract. Conf. Kirov: NIISH North-East. — 2019. — P. 62-67.
7. Monakhova T. A. Medonna Bee (*Apis Mellifera*) in the genetic field. Ecological and genetic characteristics / T. A. Monakhova // Comrade Scientific publications of KMK. M. — 2019. — 154 p.
8. Abakarova M. A. Features of the honey bees of Dagestan, measures of protection and their reproduction / M. A. Abakarova, A. R. Gasanov // Scientific Journal of Bulletin of DSU. — 2014. — №1. — P. 156-158.
9. Simankov M.K. from the experience of morphological research in the Perm Territory / M. K. Simankov, A. V. Petukhov et. al. // In Sat. reports scientific. - Pract. Conf. Kirov: NIISH North-East. — 2014. — P. 241-244.
10. Anisina O. S. exterior of the bees of non -ional species in the Republic of Tatarstan / O. S. Anisina // in Sat. reports scientific. — Pract. Conf. Kirov: NIISH North-East. — 2017. — P. 15-19.
11. Sattarov V. N. Anomalies of the eyes of workers' bees in Bashkortostan / V. N. Sattarov, V. R. Tuktarov, N.F. Mukhametov, E. M. Ivantsov // Beeraseary. — 2014. — № 5. — P. 18-19.
12. Chindina S. R. The influence of the genotoxicity of the medium on the occurrence of morphological anomalies of bees in the Samara region / S. R. Chindina, R. R. Valiullina, G. Sh. Akhtaryanova // in Sat. reports scientific. - Pract. Conf. Terrible. — 2017. — P. 256-259.
13. Tlasko V. V. Natural parthenogenesis of a honey bee / V. V. Tlasko // XX Jubilee International Congress on Beekeeping. Moscow. — 1969. — P. 356-361.
14. Borodachev A.V. The instrumental insemination of bee uterus / A. V. Borodachev, V. T. Borodacheva // Beekeeping. — 1990. — № 9. — P. 12-13.
15. Cobey S.W. Standard methods for istrumental insemination of *Apis mellifera* queens / S. W. Cobey, D. R. Tarpy, J. Woyke // Journal of Apicultural Research. — 2013. — V. 52(4). — P. 1-18.
16. Harbo J. R. Survival of honey bee (*Hymenoptera, Apidae*) spermatozoa after 2 years in liquid-nitrogen (-196°C) / J. R. Harbo // Ann. Entomol. Soc. Am. — 1983. — V. 76. — P. 890-891.
17. Kaftanoglu O. Preservation of honey bee spermatozoa in liquid-nitrogen / O. Kaftanoglu, Y.S. Peng // J. Apic. Res. — 1984. — V. 23. — P. 157-163.
18. Hopkins B. K., Herr C. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa / B. K. Hopkins, C. Herr // Apidologie. — 2010. — V. 41. — P. 548-556.
19. 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.
20. Wegener J. New methods and mediafor the centrifugation of honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) drone semen / J. Wegener, T. May, G. Kamp., K. Bienefeld // Journal of Economic Entomology. — 2014. — V. 107. — P. 47-53.
21. Dadkhah F. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol / F. Dadkhah, G. Nehzati-Paghaleh, M. Zhandi, B.K. Hopkins // Journal of Apicultural Research. — 2016. — № 55(4). — P. 279-283. doi:

- 10.1080/00218839.2016.1243292.
22. Gul A. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility / A. Gul, S. Nuray, A. G. Onal, B. K. Hopkins, W. S. Sheppard // Theriogenology. – 2017. – V. 101. – P. 109-113.
 23. Paillard M. Preservation of honey bee (*Apis mellifera* L.) Semen / M. Paillard // Universite Laval. – Quйbec, Canada. – 2016.
 24. Alcaй S. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders / S. Alcaй, S. Cakmak, I. Cakmak, E. Mulkpınar, E. Gokce, B. Ustuner, H. Sen, Z. Nur // Cryobiology. – 2019. – V. 87. – P. 28-31. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.03.005.
 25. Henry L. Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*) / L. Henry, D. R. Alvaro et. al. // Abanico Veterinario. – 2019. – V.9(1). – P. 1-11.
 26. Melnichenko A. N. Storage of Trutnev's sperm / A. N. Melnichenko, Yu. L. Vavilov, V. I. Makarov, A.P. Klepikov // Beekeeping. – 1976. – № 12. – P. 4-5.
 27. Likepakov V. T. Center for the instrumental (artificial) insemination of the honey bee (TsiMP) / V.T. Sakopakov // Veterinary pathology. – 2007. – № 1 (20). – P. 28-30.
 28. Borodachev A.V. Technology of long-term storage of drip sperm in liquid nitrogen / A. V. Borodachev, O. V. Kabashova // GNU NIIP RASHN. – 2007. – 26 p.
 29. Pinaev G.P. Methods of cell cultivation / for general. Ed. G.P. Pinaeva, M. S. Bogdanova. - St. Petersburg: Publishing House of Polytechnic University, 2008. – 278 p.
 30. Likepakov V. T. Receiving and characteristic of crops of somatic cells of Drosophila: Dis. Dr. Biol. Sciences: 06.02.07 / Likepakov Vitaly Tuyakovich. – M., 1989. – 341 p.
 31. Likepakov V. T. Cryobank sperm of a drone honey bee / V. T. Sakopakov, O. V. Kabashova, A. V. Borodachev, E. S. Sakopakova // Beekeeping. – 1993. – № 8. – P. 4-6.
 32. Kabashova O. V. Reproduction of bee uterus using cryoconserved sperm of drone *Apis Mellifera* L. / O. V. Kabashova, A. V. Borodachev, V. T. Sakopakov // Collection of reports of a scientific and practical conference. - Divovo: GNU of the Research Institute of Horse Breeding. – 2004. – 180 p.
 33. Gulov A. N. Problems of preserving the genetic resources of the honey bee / A. N. Gulov // Beekeeping. – 2018. – № 6. – P. 22-25.
 34. Gulov A. N. Cryopreservation Effects on Drone Sperm *Apis Mellifera* L. Morphometric Parameters and Ultrastructure / A. N. Gulov, E. E. Bragina // Veterinary medicine, Zootechnia, Biotechnology. – 2022. – № 1. – P. 75-86.
 35. Gravance C. G. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry / C. G. Gravance, R. Vishwanath, C. Pitt, D. L. Garner, P. J. Casey // J Androl. – 1998. – V. 19. – P. 704-709.
 36. Hinting A. Value of sperm characteristics and the result of in vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction / A. Hinting, F. Comhaire, L. Vermeulen, M. Dhorth, A. Vermeulen, D. Vanderberhove // Int J Androl. – 1990. – V. 13. – P. 59-64.
 37. Duncan W. W. Prediction of fertilization rates from semen variables / W. W. Duncan, M. J. Glew, X. Wang, S. P. Flaherty, C. D. Matthews // Fertil Steril. – 1993. – V.59. – P. 1233-1238.
 38. Gulov A. N. The influence of synthetic environments, egg yolks and bee honey on the cryo-resistance of the sperm of the drone / A. N. Gulov, Z. N. Saifutdinova, D. V. Mitrofanov, I. A. Languages // Genetics and breeding of animals. – 2020. – 1. – P. 27-36. doi: 10.31043/2410-2733-2020-1-27-36.
 39. Gulov A. N. Honey Dlower for Cryoconsurial of Sperm of Drown Honey Bee / A. N. Gulov, A. S. Laskin // Genetics and breeding of animals. – 2020. – № 4. – P. 27-36. doi: 10.31043/2410-2733-2020-3-106-113.
 40. Gulov A. N. Natural bee honey and the preservation of drip sperm in liquid nitrogen / A. N. Gulov, A. S. Laskin // Genetics and breeding of animals. – 2021. – № 4. – P. 17-22. doi: 10.31043/2410-2733-2021-4-17-22.
 41. Globos O.F. The role of Varroa in the mass death of bees / O. F. Grobov // Proceedings of VIEV. – 2010. – Vol. 76. – P.260.
 42. Vasiliev V. A. Development of the conditions and the method of obtaining cultures of cells of honey bees / V. A. Vasiliev // Proceedings of VIEV. – 2015. – Vol. 78. – P. 109-115.
 43. Saifutdinova Z. N., Gulukin M. I. Cryobiotechnological methods in beekeeping / Z. N. Saifutdinova,