Вестник аграрной науки, 2(83), Апрель 2020
DOI: 10.17238/issn2587-666X.2020.2.165

УДК / UDC 636.082.453.53''403'':638.145.43

КРАТКОСРОЧНОЕ ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ ТРУТНЕЙ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ ДЛЯ НАСЕКОМЫХ

SHORT-TERM STORAGE OF HONEYBEE DRONE SEMEN FOR INSECT MEDIUM

Ларькина Е.О., соискатель, младший научный сотрудник
Larkina E.O., Applicant, Junior Researcher
E-mail: elena.72larkina@gmail.com
Галицкая Д.В., аспирант, младший научный сотрудник
Galitskaya D.V., Postgraduate Student, Junior Researcher
E-mail: daryagalitskaya@yandex.ru
Гулов А.Н., соискатель, научный сотрудник
Gulov A.N., Applicant, Researcher
E-mail: blee3@yandex.ru
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пчеловодства», Рязанская область, Россия
Federal State Budgetary Scientific Institution
"Federal Beekeeping Research Centre", Ryazan Region, Russia

Многолетний мониторинг морфометрических признаков медоносных пчел основных пород, разводимых на территории Российской Федерации, свидетельствует о продолжающемся процессе метизации и массовой гибридизации пчел. Для оперативного решения наметившихся проблем, возникает потребность в разработке биотехнологического метода краткосрочной (30-90 суток) консервации спермы трутней медоносных пчел. Исследования по сохранению спермы вне организма пчелиной матки находятся в стадии экспериментальной разработки, так как механизм консервации в семяприемнике матки до конца не изучен. Осуществлен анализ по краткосрочному хранению при 3°С свежеотобранной спермы в разбавленном и неразбавленном виде. Проведена сравнительная оценка синтетических питательных сред, отличных по химическому составу и реакции среды. В качестве разбавителей использовали питательные среды для культур клеток насекомых – Lonza Insect-XPRESS™, Schneider's Drosophila Medium с L глутамином, Grace's Insect Medium (2x) и C46. Качество спермы оценивали по показателям концентрации, подвижности и жизнеспособности сперматозоидов. Жизнеспособность сперматозоидов исследовали методом флуоресцентной микроскопии с использованием флюорохромов SYBR-14, PI. Сперма из контрольных образцов наиболее стабильно сохраняла свой потенциал на протяжении всего периода консервации (60 суток). Опытные образцы, несмотря на высокий показатель жизнеспособности (67,8-70,1%), обладали низкой оплодотворяющей способностью. В семяприемнике маток, искусственно осемененных разбавленной спермой, обнаружено 0,04-0,54 млн/мкл сперматозоидов, а в контрольной группе 0,04-2,78 млн/мкл ($p<0,05$). Таким образом, при организации краткосрочного хранения в течение 30-60 сут. при 3°С следует использовать свежеотобранную сперму в неразбавленном виде. В случае необходимости разбавления спермы можно применять полноценные питательные среды для культур клеток насекомых с pH 6,1-7,2 и режимом хранения не более 30 сут. при 3°С.
Ключевые слова: трутни, жизнеспособность сперматозоидов, искусственное осеменение.

Long-term monitoring of morphometric features of honeybees of the main breeds propagated in the Russian Federation indicates that the process of cross-breeding and mass hybridization of bees is ongoing. In order to solve the emerging problems, there is a need to develop a biotechnological method for short-term (30-90 days) sperm preservation of honeybee drones. The studies on preservation of honeybee sperm outside the body of the queen bee are under experimental

development as the mechanism of preservation in the queen bee spermatheca has not been fully studied. The analysis on short-term storage at 3°C of freshly collected sperm in the diluted and undiluted state is carried out. A comparative assessment of synthetic nutrient media that differ in chemical composition and reaction of the medium was carried out. As diluents we used nutrient media for insect cell cultures – Lonza Insect XPRESSTM, Schneider's Drosophila Medium with L-glutamine, Grace's Insect Medium (2x) and C46. Sperm quality was assessed by parameters of concentration, motility and sperm viability. Sperm viability was studied by fluorescence microscopy using fluorochromes SYBR-14 and PI. The sperm from the control samples maintained its potential most consistently throughout the entire conservation period (60 days). Despite the high viability rate (67.8-70.1%), experimental samples had a low fertilizing capacity. In the queen bees' spermatheca artificially inseminated with diluted sperm, 0.04-0.54 million/μl of sperm were found, and in the control group 0.04-2.78 million/μl ($p<0.05$). Thus, when arranging short-term storage within 30-60 days at 3°C it is necessary to use freshly selected sperm in the undiluted form. If it is necessary to dilute the sperm, it is recommended to use complete nutrient media for insect cell cultures with a pH 6.1-7.2 and a storage regime of not more than 30 days at 3°C.
Key words: drone bees, sperm viability, artificial insemination.

Введение. Главная цель консервирования спермы – это сделать возможным использование ее для искусственного осеменения пчелиных маток с сохранением воспроизводительной способности на уровне осемененных свежеотобранной спермой или полученных в условиях естественного спаривания [3]. При решении этой задачи необходимо вести систематический контроль состояния спермы в процессе хранения и осуществлять поиск оптимальных разбавителей.

Принципиально новые возможности в вопросе сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы возникли с применением питательных сред для культивирования клеток насекомых дрозофил [4]. Разработанные на постоянных линиях клеток дрозофилы криобиотехнологическая технология и среда С46 (среда Какпакова В.Т.) позволили создать криобанк спермы трутней медоносной пчелы *Apis mellifera L.* [3], криобанк эмбрионов дрозофилы и аквариумной рыбы Danio rerio [8].

В ходе исследований [1] установлено, что краткосрочное хранение спермы трутней, разбавленной в полусинтетической среде в температурном диапазоне 24-26ºС, усиливает обменные процессы сперматозоидов.

Высокая температура, возможно, способствует развитию гнилостных микроорганизмов, и консервация спермы в данных условиях возможна в сочетании с противомикробными препаратами.

На снижение качественных показателей образцов спермы трутней, разбавленных в синтетических средах, вероятно, оказывает влияние концентрация ионов водорода в растворе (pH) [1]. Как известно, реакция среды оказывает значительное влияние на жизненный ресурс семени [6]. Так, сочетание кислой реакции с пониженной температурой среды создает условия для торможения подвижности спермиев, замедляя метаболизм в них, способствует наиболее долгой их сохранности.

Более энергичное нарушение обмена кислыми продуктами происходит в семени и по причине его высокой концентрации [6]. Сперма трутней медоносных пчел, в сравнении с семенем сельскохозяйственных животных, обладает очень высокими показателями концентрации сперматозоидов [2].

Цель исследований – провести сравнительную оценку различных синтетических питательных сред для краткосрочного хранения спермы трутней при 3°С. В задачу исследований входило изучение динамики показателей жизнеспособности (целостности мембран) сперматозоидов во время краткосрочного хранения.

Условия, материалы и методы. Отбор спермы проводили методом искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса у половозрелых трутней в возрасте 25-30 суток [11]. Качество спермы оценивали по следующим показателям: концентрации [5], подвижности [12], жизнеспособности сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии [10]. Оплодотворяющую способность сперматозоидов оценивали по концентрации сперматозоидов в семяприемнике искусственно осемененных маток [1].

При оценке жизнеспособности сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии применяли набор по определению жизнеспособности LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit L 7011 (Life Technologies Limited, Scotland) по методике [11]. Набор состоит из двух компонентов – SYBR-14 (компонент А), 100 мкл / 1 мМ растворения в ДМСО и PI (компонент В), 5 мкл / 2,4 мМ растворения в дистиллированной воде. Исследование проводили на биологическом световом микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (ООО «Альтами», Россия) при увеличении 400×. Всего подсчитывали 400 сперматозоидов.

Для хранения спермы в разбавленном виде использовались следующие питательные среды: Lonza Insect-XPRESS™ (Sartorius Stedim, Belgium) pH 6,1 осмотическое давление 371 mOsm/kg; Schneider's Drosophila Medium с L глутамином (кат. но. 217 200 24, Thermo Fisher, USA) pH 4,6, 278 mOsm/kg; Grace's Insect Medium (2x) (кат. но. 116 670 37, Thermo Fisher, USA) pH 6,3, 715 mOsm/kg. Среда Grace's для насекомых была первоначально разработана с целью культивирования клеток австралийской императорской камедевой моли *Antherea eucalypti*. В состав среды входит 21 аминокислота, 6 неорганических солей, 10 витаминов, а также кислоты – кетоглутаровая, фумаровая, яблочная и янтарная [13]. Среда Grace's самая богатая по содержанию углеводов, из числа испытываемых. В ее составе содержится фруктоза, глюкоза и в очень высокой концентрации сахароза (53360 mg/L). В настоящее время широко используется для роста клеток *Spodeptera frugiperda*, Sf9 и Sf21. Среда Schneider's содержит уникальные компоненты, необходимые для культивирования клеток S2, включая яблочную кислоту, фумаровую, альфа-кетоглутаровую, янтарную кислоты и трегалозу [13]. В состав среды входит 20 аминокислот, 7 неорганических солей и отсутствуют витамины. Среда Lonza разработана для поддержания роста линий клеток *Spodoptera frugiperda* (Sf9 и Sf21) и *Drosophila melangaster* (S2) [14]. По химическому составу, близкая к среде Grace's [15]. Добавлять антибиотики в состав указанных питательных сред производители не рекомендуют.

Для хранения в неразбавленном виде использовали гель стоматологический Метрогил Дента (G.I.D.C. Industrial Area, India) с действующим веществом метронидазол + хлоргексидин [1].

Свежеотобранную сперму дозами по 15 мкл смешивали с разбавителями в соотношении 1:1. Подготовленные образцы разбавленной спермы закладывали на хранение по методике [9] в стерильные стеклянные капилляры [4]. С целью оценки качественных показателей контрольных образцов (неразбавленная сперма без средств бактериальной контаминации) использовали трис буфер pH 8,8 [12]. Оценку проводили через 30 и 60 сут. хранения.

Искусственное осеменение пчелиных маток осуществляли на оборудовании SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz, Espelkamp Deutschland) [1].

Результаты и обсуждение. Заготовка опытных и контрольных образцов свежеотобранной спермы проводилась нами в филиалах ФНЦ пчеловодства «Краснополянская опытная станция пчеловодства (КОСП)» (Краснодарский край, г. Сочи, пос. Молдовка) и ППХ «Майкопское» (Респ. Адыгея, г. Майкоп).

Весна 2019 г на черноморском побережье России отмечена резким похолоданием, частым возвратным похолоданием, сопровождающимся холодным ветром и снегом в предгорьях г. Сочи и Адлера.

Сложившиеся погодные условия не лучшим образом сказались на развитии пчелиных семей и, соответственно, качестве трутней. Отсутствие стабильного поступления свежей пыльцы и нектара в гнезда пчелиных семей оказало влияние на количество выращиваемого трутневого расплода и качественные показатели спермы половозрелых трутней. Сперма отличалась светло-кремовым цветом, малым объемом эякулята и низкой концентрацией сперматозоидов (табл.).

Таблица – Показатели качества разбавленной спермы до консервации

Разбавители	Показатели		
	Жизнеспособность, %	Концентрация сперматозоидов, млн/мкл	Подвижность, балл
	M±m	M±m	M±m
Lonza	98,8±0,5	1,0±0,3	4±0
Schneider's	71,0±0,4	1,3±0,4	4±0
Grace's	87,0±3,1	1,0±0,4	4±0
Контроль	97,0±3,0	4,8±1,1	4±0

При этом все исследуемые образцы обладали достаточно хорошей подвижностью. Сперматозоиды осуществляли преимущественно манежное движение.

Дальнейшие исследования проводили в лаборатории селекции и молекулярно-генетического анализа медоносных пчел ФНЦ пчеловодства (г. Рыбное, Рязанской обл.). Транспортировку образцов в лабораторию осуществляли железнодорожным транспортом в контейнере из пенопласта (толщина стенки 50 мм) с использованием хладагентов, поддерживающих температуру в контейнере от 2 до 8ºС.

По истечении 30 и 60 сут. хранения провели очередную оценку заложенных образцов спермы с последующим искусственным осеменением пчелиных маток. Незначительное снижение показателя целостности мембран сперматозоидов во время хранения свидетельствует об уравновешивании концентрационных градиентов в системе «клетка-среда» и сохраняющемся жизненном ресурсе спермы исследуемых образцов (рис. 1).

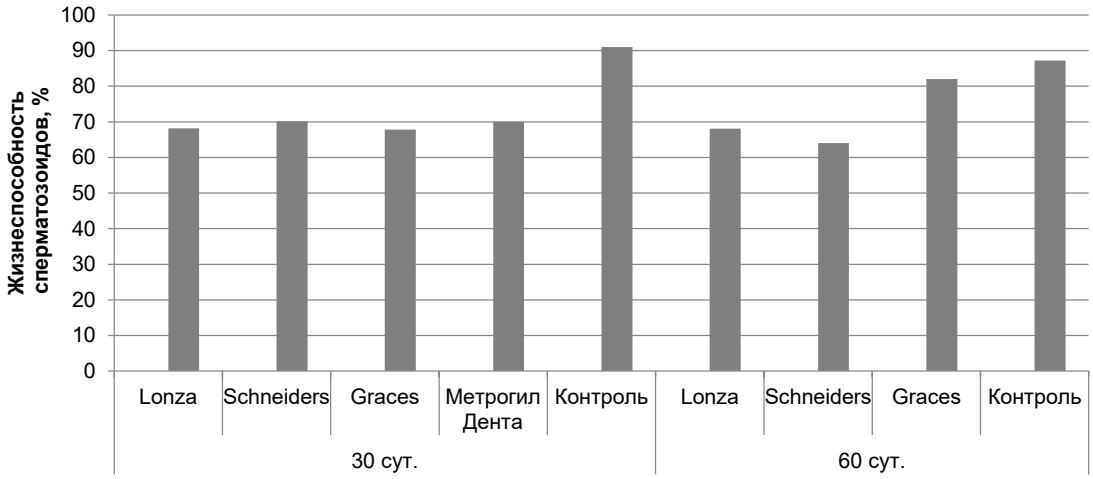

Рисунок 1 – Показатели качества разбавленной спермы после краткосрочной консервации при 3°С

Сперма из контрольных образцов наиболее стабильно сохраняла свой потенциал на протяжении всего периода консервации.

В ходе проводимых исследований нами зафиксированы различные аномалии в морфологии сперматозоидов – деформации головок и расслоения жгутиков (рис. 2).

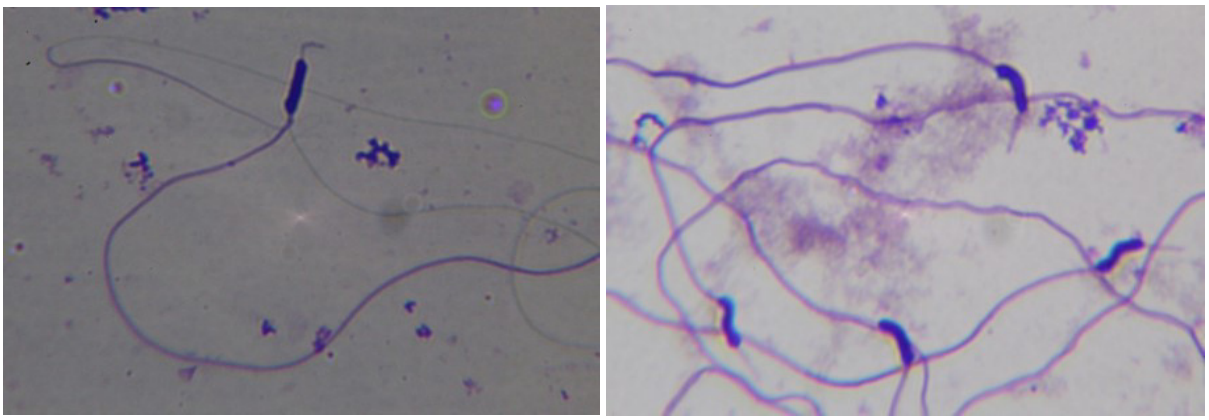

Рисунок 2 – Расслоения жгутиков (слева) и деформации головок (справа) сперматозоидов, разбавленных в питательных средах

Как известно, проницаемость цитоплазматической мембраны носит избирательный характер, который присущ только живым и находящимся в активном состоянии клеткам [15]. Вероятно, индивидуальные особенности мембран сперматозоидов трутней и послужили возникновению таких аномалий в морфологии после разбавления их в питательной среде. Данные явления могут служить причиной температурного шока сперматозоидов или являться его следствием.

При оценке оплодотворяющей способности спермы, нами установлена низкая концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, искусственно осемененных спермой из опытных образцов (рис. 3).

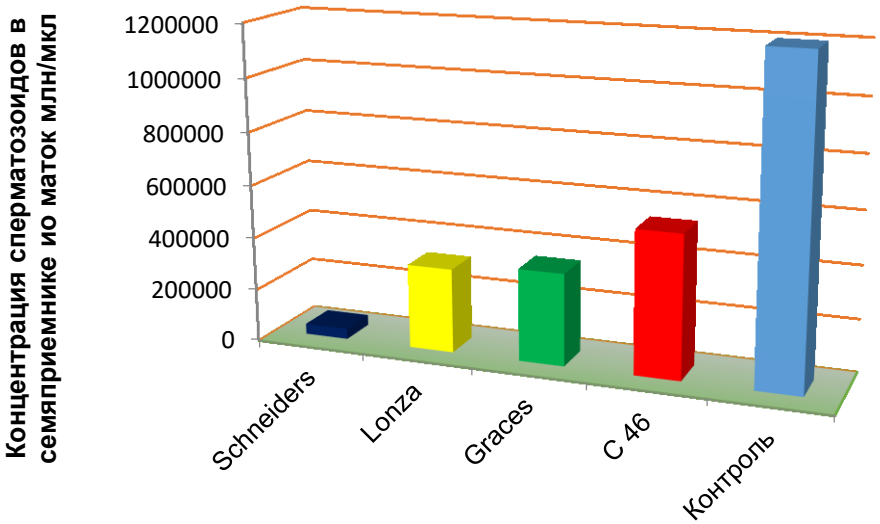

Рисунок 3 – Физиологические показатели пчелиных маток, искусственно осемененных спермой, после консервации в течение 30 сут. при 3°С ($p<0,05$)

В частности, после осеменения спермой из образца с противомикробным препаратом Метрогил Дента в семяприемнике маток сперматозоидов обнаружить не удалось. Несмотря на высокий показатель целостности мембран, оплодотворяющая способность данного образца оказалась предельно низкой.

В очень кислой среде Schneider's с pH 4,6 сперматозоиды практически теряют свою жизнеспособность. В свою очередь, слабокислая среда с pH 6,1и 6,3 (Lonza, Graces) может способствовать сохранению небольшого жизненного потенциала спермы при краткосрочном хранении, если в этом есть необходимость.

Испытываемая нами ранее питательная среда С46 с pH 7,2 (среда Какпакова В.Т.) [4], более близкая к сперме трутней по концентрации ионов водорода (pH 6,8-7,0), также недостаточно обеспечивает сохранность жизненного ресурса спермы.

По результатам осеменения пчелиных маток спермой, разбавленной питательными средами Lonza и Schneider's после 60 сут. хранения при 3ºС, сперматозоидов в семяприемнике маток обнаружить не удалось. Искусственное осеменение спермой из образца, разбавленного средой Graces, осуществить не удалось по причине отсутствия неплодных маток.

Выводы. Таким образом, при организации краткосрочного хранения в течение 30-60 сут. при 3ºС следует использовать свежеотобранную сперму в неразбавленном виде без средств бактериальной контаминации. В случае необходимости разбавления рекомендуется применять полноценные питательные среды для культур клеток насекомых с pH 6,1-7,2 (Lonza, Graces, С46) и режимом хранения не более 30 сут. при 3ºС. Выявленные в ходе исследований аномалии в морфологии сперматозоидов требуют дальнейшего изучения. Структурные повреждения органоидов сперматозоида (аномалии), вызванные ионным составом синтетических питательных сред, могут служить одной из причин низкой оплодотворяющей способности спермиев.

Благодарности. Выражаем благодарность специалисту отдела продаж оборудования для биопроцессов ООО «Сарториус Стедим РУС» – Татьяне Нейман за питательную среду Lonza Insect-XPRESS™.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Гулов А.Н., Ларькина Е.О. Перспективы краткосрочного хранения спермы трутней медоносной пчелы // Генетика и разведение животных. 2018. № 4. С. 61-66.
2. Гулов А.Н., Бородачев А.В., Березин А.С. Возраст трутней и качество спермы // Пчеловодство. 2015. № 9. С. 24.
3. Криобанк спермы трутней медоносной пчелы / В.Т. Какпаков, О.В. Кабашова, А.В. Бородачев, Е.С. Какпакова // Пчеловодство. 1993. № 8. С. 4-6.
4. Какпаков В.Т. Получение и характеристика культур соматических клеток дрозофилы: дис. … док-ра биол. наук. М., 1989. 341 с.
5. Лазарева Л.Н. Влияние биодобавок на хранение спермы трутней при положительных температурах // Сборник НИИР по пчеловодству. Киров: НИИСХ Северо-востока, 2014. 276 с.
6. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. М., 1962. 696 с.
7. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. К.: «Урожай», 1978. 256 с.
8. Пинаев Г.П., Богданова М.С. Методы культивирования клеток. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. 278 с.

9. Hopkins B.K., Herr C., Sheppard W.S. Sequential generations of honey bee (Apis mellifera) queens produced using cryopreserved semen // Reproduction, Fertility and Development. 2012. Vol. 24. P. 1079-1083.
10. Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability / R. Johuson, L. Dahlgren, B. Siegfied, M. Ellis // Journal of Apicultural Research. 2013. Vol. 52 (2). P. 88-95. DOI 10.3896/IBRA.1.52.2.18.
11. Paillard M. Preservation of Honey bee (Apis mellifera L.) Semen. Canada: Universitet Laval. Quebec, 2016. 79 p.
12. Rhodes J.W. Semen production in drone honeybees // Publication No 08/130. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, Australia. 2008. URL: https://rirdc.infoservices.com.au/items/08-130 (дата обращения: 03.05.2018).
13. ThermosFisher Scientific // URL: https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/order.html?CID=fl-order (дата обращения: 03.10.2019).
14. Sartorius // URL: https://www.sartorius.ru (дата обращения: 03.10.2019).
15. Lonza // URL: https://www.lonza.com (дата обращения: 03.10.2019).

REFERENCES

1. Gulov A.N., Larkina Ye.O. Perspektivy kratkosrochnogo khraneniya spermy trutney medonosnoy pchely // Genetika i razvedenie zhivotnykh. 2018. № 4. S. 61-66.
2. Gulov A.N., Borodachev A.V., Berezin A.S. Vozrast trutney i kachestvo spermy // Pchelovodstvo. 2015. № 9. S. 24.
3. Kriobank spermy trutney medonosnoy pchely / V.T. Kakpakov, O.V. Kabashova, A.V. Borodachev, Ye.S. Kakpakova // Pchelovodstvo. 1993. № 8. S. 4-6.
4. Kakpakov V.T. Poluchenie i kharakteristika kultur somaticheskikh kletok drozofily: dis. … dok-ra biol. nauk. M., 1989. 341 s.
5. Lazareva L.N. Vliyanie biodobavok na khranenie spermy trutney pri polozhitelnykh temperaturakh // Sbornik NIIR po pchelovodstvu. Kirov: NIISKh Severo-vostoka, 2014. 276 s.
6. Milovanov V.K. Biologiya vosproizvedeniya i iskusstvennoe osemenenie zhivotnykh. M., 1962. 696 s.
7. Ostashko F.I. Glubokoe zamorazhivanie i dlitelnoe khranenie spermy proizvoditeley. K.: «Urozhay», 1978. 256 s.
8. Pinaev G.P., Bogdanova M.S. Metody kultivirovaniya kletok. SPb.: Izd-vo Politekhn. un-ta, 2008. 278 s.
9. Hopkins B.K., Herr C., Sheppard W.S. Sequential generations of honey bee (Apis mellifera) queens produced using cryopreserved semen // Reproduction, Fertility and Development. 2012. Vol. 24. P. 1079-1083.
10. Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability / R. Johuson, L. Dahlgren, B. Siegfied, M. Ellis // Journal of Apicultural Research. 2013. Vol. 52 (2). R. 88-95. DOI 10.3896/IBRA.1.52.2.18.
11. Paillard M. Preservation of Honey bee (Apis mellifera L.) Semen. Canada: Universitet Laval. Quebec, 2016. 79 p.
12. Rhodes J.W. Semen production in drone honeybees // Publication No 08/130. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, Australia. 2008. URL: https://rirdc.infoservices.com.au/items/08-130 (data obrashcheniya: 03.05.2018).
13. ThermosFisher Scientific // URL: https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/order.html?CID=fl-order (data obrashcheniya: 03.10.2019).
14. Sartorius // URL: https://www.sartorius.ru (data obrashcheniya: 03.10.2019).
15. Lonza // URL: https://www.lonza.com (data obrashcheniya: 03.10.2019).