РАЗДЕЛ III. БИОТЕХНОЛОГИИ

Свищук Д.В., Ларькина Е.О.

Консервация спермы трутней, как современный биотехнологический способ воспроизводства медоносных пчел

ФГБНУ «Федеральный научный центр пчеловодства»
(Россия, Рыбное)

doi: 10.18411/sr-10-02-2021-13

idsp: sciencerussia-10-02-2021-13

Аннотация

В данной статье приводятся результаты исследований по физиологическим показателям инструментально осемененных маток, с использованием консервированной спермы трутней, разбавленной в различных питательных средах и хранившейся при температуре 3 °С в течении 30 и 60 суток. В ходе исследований оценивали концентрацию сперматозоидов в семяприемнике маток.

Ключевые слова: инструментальное осеменение пчелиных маток, отбор спермы трутней, питательная среда, краткосрочное хранение спермы, качество спермы.

Медоносные пчелы (*Apis mellifera mellifera* L.) – насекомые, которые являются важнейшими опылителями и играют огромную роль для сельского хозяйства и человека. В последние годы произошли большие изменения в численности пчелиных семей. Развитие инструментального осеменения маток медоносных пчел дает возможность контролировать численность и генетику трутней, участвующих в спаривании [6].

Разработка практического средства для хранения спермы трутней повысит способность пчеловодов для поддержания численности медоносных пчел. Криоконсервирование спермы трутней в течение длительного времени позволило бы пчеловодам и ученым восстановить и распространить ценные генетические признаки, которые теряются, судя по тревожным показателям смертности пчелиных семей во многих странах мира [6].

Работы по сохранению спермы вне организма пчелиной матки выполняются в экспериментальных условиях, так как механизм консервации в семяприемнике матки до конца не изучен [2].

Инструментальное осеменение пчелосемей позволяет повысить их качество и сохранить чистоту породы.

Использование инструментального осеменения в практике пчеловодства позволяет получать значительные преимущества: исключение потери матки при облете, обеспечение гарантии воспроизводства маток с определенной наследственностью, а также осеменение маток может производиться при любых погодных условиях и в оптимальные сроки за счет возможности краткосрочного и длительного хранения спермы трутня [2].

Развитие протоколов консервации для спермы трутней является мультимногофакторной задачей, связанной с оптимизацией скорости охлаждения, скорости замораживания/оттаивания, характера и концентрации криопротекторов, а также составов экстендеров [6].

При положительных температурах хранения спермы, обменные процессы лишь замедляются. Поэтому из-за накопления вредных продуктов распада в сперме, происходит процесс разрушения акросомы, которая выполняет важную роль в оплодотворении яйцеклеток [11].

Анализ состояния работ [1, 4, 6, 7, 8, 12] указывает на возможности сохранения спермы трутней при положительных температурах. Одновременно ведется поиск возможностей по сохранению свежееотобранной спермы без разбавления [8]. Задача по разработке технологии краткосрочного хранения спермы без криоконсервации сохраняет свою актуальность.

Цель данных исследований – проведение сравнительной оценки хранения спермы трутней в различных питательных средах при 3 °С.

Материалы и методы исследований. Исследования были проведены в одном температурном режиме – при 3 °С. Для хранения спермы в неразбавленном виде использовались стерильные пропиленовые соломинки для криохранения $L=100\pm1,0$ мм, $d=2,5\pm0,2$ мм. Качество спермы оценивали по показателям – концентрации [5], подвижности [13] и жизнеспособности сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии [10]. При оценке жизнеспособности сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии применяли флюорохромы Hoechst и PI. Рабочие растворы флюорохромов готовили в трис буфере pH 8,8 [13] с конечной концентрацией Hoechst – 5 мкг/мл и PI – 10 мкг/мл [10]. Суспензию из образца спермы готовили в трис буфере pH 8,8 в соотношении 1:400. Исследование проводили на биологическом световом микроскопе при увеличении 400×. Всего подсчитывали 200 сперматозоидов.

Для хранения спермы в разбавленном состоянии были использованы следующие экстендеры – питательные среды Lonsa Insect-XPRESS^{TM} (далее L) (Sartorius Stedim, Belgium), Schneiders Drosophila Medium с L-глутамином (кат. но. 217 200 24, Thermo Fisher, USA) (далее Sch), Grace's Insect Medium (2x) (кат. но. 116 670 37, Thermo Fisher, USA) (далее G). Свежееотобранную 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 $L=75\pm1,0$ мм, $d=1,8\pm0,2$ мм. Затем, концы капилляров запаивали при помощи стерильной ваты и воска.

Также испытанию подвергался стоматологический гель Метрогил Дента (G.I.D.C. Industrial Area, India) (далее МД) с действующим веществом метронидазол + хлоргексидин. На 50 мм соломинки использовали 17-20 мг противомикробного средства.

В приготовленную таким образом соломинку, с помощью шприца от станка по инструментальному осеменению пчелиных маток вводили 10 мкл свежееотобранной спермы. Дальнейшую консервацию образца проводили по методике [12]. Опытные образцы хранили в аналогичных условиях. Контрольную группу составляли образцы свежееотобранной спермы объемом по 10 мкл без разбавления и применения противомикробных средств.

Оценку проводили через 30 и 60 суток хранения, по физиологическим показателям инструментально осемененных маток и жизнеспособности сперматозоидов [7, 10].

Инструментальное осеменение пчелиных маток осуществлялось однократно, объем вводимой спермы составил 8-10 мкл. Для осеменения использовали неплодных маток в возрасте 7-8 суток с массой $199,7\pm2,8$ мг. Через 48 часов после осеменения маток препарировали под световым микроскопом МБС-10. Семяприемник освобождали от ткани и помещали в стерильную пробирку Eppendorf (1,5 мл), содержащую 500 мкл трис буфера pH 8,8. Концентрацию сперматозоидов определяли по методике [5].

Результаты исследований. По истечению срока хранения заложенных образцов спермы, разбавленной в ранее указанных питательных средах, было произведено инструментальное осеменение пчелиных маток (таблица 2, рисунок 1), а также проведен анализ качественных показателей, данных образцов спермы (таблица 1).

Таблица 1.

Показатели качества спермы, разбавленной в различных питательных средах после 30 и 60 суток хранения при 3 °С

Показатели	30 суток				60 суток		
	L	Sch	G	МД	L	Sch	G
Жизнеспособность, %, из них:	100	100	100	100	100	100	100
живые	73,50	68,1	70,8	73,9	68,1	64,0	82,0
мертвые	26,6	31,9	29,2	26,1	31,9	36,0	18,0
Подвижность, балл	2	3	3	3	3	1	5
Изменения формы головок сперматозоидов, %, из них:	200	200	200	200	200	200	200
нормальные	98,5	96,5	59,1	80,9	63,2	55,0	40,2
деформации	1,5	3,5	40,9	19,1	36,8	45,0	59,8

Наименьшее значение деформаций головок сперматозоидов наблюдалось, при разбавлении спермы питательной средой Lonza Insect-XPRESS™, в то время как при разбавлении спермы питательной средой Grace's Insect Medium этот показатель увеличился на 39,4 %.

После 60 суток хранения при 3 °С наименьшее значение деформаций головок сперматозоидов наблюдалось, при разбавлении спермы питательной средой Lonza Insect-XPRESS™, а наибольшее значение при разбавлении питательной средой Grace's Insect Medium.

Таким образом, по полученным данным, показатель жизнеспособности сперматозоидов после 30 суток хранения при 3 °С по каждой питательной среде колеблется в пределах 70-74 %, тем временем, наибольший показатель жизнеспособности после 60 суток хранения при 3 °С наблюдался в образце спермы разбавленной питательной средой Grace's Insect Medium.

Таблица 2.

Качественные показатели пчелиных маток, искусственно осемененных разбавленной спермой в различных питательных средах после 30 и 60 суток хранения при 3 °С

Показатели	30 суток				60 суток		Контроль
	L	G	Sch	МД	L	Sch	
Количество осемененных маток, шт.	11	9	9	8	6	5	5
Выживаемость, %	54,5	77,8	66,7	75	66,7	60	80
Количество маток с семяприемником со спермой, шт. (%)	11 (100)	9 (100)	6 (66,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100)
Количество маток с пустым семяприемником, шт. (%)	0 (0)	0 (0)	3 (33,3)	8 (100)	6 (100)	5 (100)	0 (0)
Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, млн/мкл,							
Lim	0,07 – 0,73	0,17 – 0,45	0 – 0,11	0	0	0	0,04 – 2,78
M±m	0,32 ± 0,07	0,35 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0	0	0	1,2 ± 0,55
td	*1,6	*1,5	*2,1	0	0	0	–

Примечание – достоверные показатели концентрации сперматозоидов в семяприемнике маток относительно контроля *– при $p < 0,05$.

Анализ показателей инструментального осеменения пчелиных маток спермой после 30 суток хранения при 3 °С, представленных в таблице 2, показал, что свежееотобранную сперму в разбавленном виде можно хранить при вышеуказанных условиях с использованием питательной среды Lonza Insect-XPRESS™ и Grace's Insect Medium. При осеменении пчелиных маток спермой после 60 суток хранения при 3 °С разбавленной питательной средой Lonza Insect-XPRESS™ и Schneiders Drosophila Medium с L-глутамином сперматозоидов в семяприемнике маток не обнаружено.

Отсутствие результатов исследований по инструментальному осеменению пчелиных маток спермой после 60 суток хранения при 3 °С разбавленной питательной средой Grace's Insect Medium связано с поздними сроками закладывания образцов (середина августа), в этот период семьи-воспитательницы прекратили прием суточных личинок на воспитание.

Исходя из результатов, полученных после искусственного осеменения маток неразбавленной спермой с использованием стоматологического геля Метрогил Дента после 30 суток хранения при 3 °С, было принято решение о нецелесообразности проведения опыта с использованием данного геля после 60 суток хранения при 3 °С.

Таким образом, по результатам исследований все испытываемые питательные среды: Lonza Insect-XPRESS™, Schneiders Drosophila Medium с L-глутамином, Grace's Insect Medium оказывают влияние на деформацию головок сперматозоидов как в свежееотобранном виде, так и в процессе хранения.

Свежееотобранная сперма в разбавленном виде сохраняется в течение 30 суток при 3 °С с использованием питательной среды Lonza Insect-XPRESS™ и Grace's Insect Medium, данные недостоверны при уровне значимости $p < 0,05$.

***

1. Бородачев А. В. Сохранение спермы трутней медоносной пчелы в различных разбавителях / А. В. Бородачев, В. Т. Бородачева // Сборник научных трудов. Вып. 2, Рязань: НИИ пчеловодства. – 1977. – 163 с.
2. 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.
3. Лазарева Л. Н. Влияние биодобавок на хранение спермы трутней при положительных температурах / Л. Н. Лазарева // Сборник НИИР по пчеловодству. – Киров: НИИСХ Северо-востока. – 2014. – 276 с.
4. Ларькина Е. О., Галицкая Д. В., Гулов А. Н. Краткосрочное хранение спермы трутней медоносной пчелы в культуральной среде для насекомых // Вестник аграрной науки – 2020. №2(83). – с. 165-171. DOI:10.17238/issn2587-666X.2020.2.165.
5. Митрошина Е. В. Определение жизнеспособности клеточных культур: Учебно-методическое пособие / Е. В. Митрошина, Т. А. Мищенко, М. В. Ведунова // Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского, 2015. – 21 с.
6. Alcaay S. Effects of Various cryoprotective Agents on Post – Thaw Drone semen Quality / S. Alcaay, B. Ustuner, I.Cakmak, S.Cakmak, Z. Nur // Kafkas Univ Vet Fak Derg. – 2014. – doi: 10.9775/kvfd.2014.11515.
7. Collins A. M. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above freezing temperatures / A. M. Collins // Journal of Economic Entomology. – 2000a. – Vol. 93 (3). – P. 568–571.
8. Hopkins B. K. Gel-coated tubes extends above-freezing storage of honey bee (Apis mellifera) semen to 439 days with production of fertilized offspring / B. K. Hopkins, S. W. Cobey, C. Herr, W. S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. – 2017. – Vol. 29(10). – P. 1944-1949.
9. Hopkins B. K. Sequential generations of honey bee (Apis mellifera) queens produced using cryopreserved semen / B. K. Hopkins, C. Herr, W. S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. – 2012. – Vol. 24. – P. 1079-1083.
10. Locke S. J. A supravital staining technique for honey bee spermatozoa / S. J. Locke, Y. S. Peng, N. L. Cross // Physiological Entomology. – 1990. – Vol. 15. – P. 187-192.
11. Nur Z. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity / Z. Nur, B. Zik, B. Ustuner, H. Sagirkaya, C.G. Ozguden // Theriogenology. – 2009. – doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.12.007.
12. Paillard M. Preservation of Honey bee (Apis mellifera L.) Semen / M. Paillard // Universitet Laval. Quebec, Canada – 2016. – 79 p.
13. Rhodes J. W. Semen production in drone honeybees. RIRDC Pub. / J. W. Rhodes // 2008, No. 08/130. [Электронный ресурс] <https://rirds.infoservices.com.au/downloads/08-130>.