

**Гулов Алексей Николаевич**

**«РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ТРУТНЕЙ  
ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА *APIS MELLIFERA L.*»**

06.02.10 – Частная зоотехния, технология производства  
продуктов животноводства

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Дивово – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пчеловодства»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
**Багиров Вугар Алиевич**

Официальные оппоненты:

**Саттаров Венер Нуруллович,**

доктор биологических наук, профессор кафедры биоэкологии и биологического образования ФГБОУ ВО «Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы»

**Воробьева Светлана Леонидовна,**

доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры кормления и разведения сельскохозяйственных животных ФГБОУ ВО «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия»

Ведущая организация: **ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет».**

Защита состоится «\_1\_»\_марта\_\_2022 года в \_\_часов на заседании диссертационного совета Д 006.018.01 на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» по адресу 391105, Рязанская область, Рыбновский район, п. Дивово. Тел./факс (4912) 24-02-65

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» и на сайте института:  
<http://www.ruhorses.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Зайцев А.М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** 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 (В. Сагтаров, с соавт., 2014; С. Чиндина, с соавт., 2017). Появилась настоятельная необходимость использования биотехнологических методов сохранения генофонда медоносных пчел: инструментальное осеменение пчелиных маток, консервация спермы трутней. Инструментальное осеменение пчелиных маток спермой специально подобранных трутней - надежный способ контроля передачи генетической информации потомству, необходимый в селекционно-племенной работе (А. Бородачев, В. Бородачева, 1982). Сохранение спермы трутней медоносных пчел в сочетании с инструментальным осеменением является эффективной стратегией для сохранения видов и их генетического разнообразия.

Первой стратегической задачей для выполнения данной диссертационной работы является создание биоресурсной коллекции с целью сохранения генетического биоразнообразия основных пород пчел, разводимых на территории России: среднерусская (*Apis mellifera mellifera* L.), карпатская (*Apis mellifera carpatica*), серая горная кавказская (*Apis mellifera caucasica*), дальневосточная (*Apis mellifera far-eastern*) и башкирская.

Второй наиважнейший стратегический момент для выполнения работы – это мульти тиражирование ценных пород и типов медоносных пчел на территории нашей страны.

**Степень разработанности темы исследования.** Первые успешные опыты по криоконсервации спермы трутней в гемолимфе медоносной пчелы были проведены в СССР (А. Мельниченко, с соавт., 1976). В 1999 г. НИИ пчеловодства получен патент на технологию криоконсервации спермы трутней с получением плодных маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой (В. Какпаков, с соавт., 1999, В. Какпаков, 2007). В. Какпаков с соавт. (1994) осеменили 23 неплодные матки спермой, хранившейся в жидком азоте 760 сут. В результате, 5 маток дали потомство рабочих пчел площадью 300 см<sup>2</sup>. В. Hopkins et al. (2012) осеменили заморожено-оттаянной спермой 5 неплодных маток, из которых 2 дали 100% потомство рабочих пчел. Затем, авторы осеменили заморожено-оттаянной спермой 6 маток-дочерей F1 и от двух из них получили потомство рабочих пчел 93,1% - 95,6%. J. Wegener et al. (2014) осеменили заморожено-оттаянной спермой 25 неплодных маток, из

которых 22 дали потомство рабочих пчел от 47,5% до 79,4%. При этом каждый из авторов использовал свою криопротективную среду.

Отсутствуют опубликованные данные об изменениях, происходящих со сперматозоидами после длительного хранения в жидком азоте (5, 7, 25 лет криохранения).

Связь работы с научными программами Российской Федерации. Результаты, представленные в работе, были получены в рамках:

- в рамках выполнения задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации ГЗ № АААА-А18-118062590027-1 (Роль автора - исполнитель);
- грант РФФИ 18-44-620001 «Криобанк спермы трутней медоносной пчелы» (Роль автора – руководитель, исполнитель).

**Цель исследования.** Целью проводимых исследований является разработка методов консервации спермы трутней для сохранения генетических ресурсов *Apis mellifera L.* на территории России.

**Задачи исследования:**

- сравнить различные среды для замораживания спермы трутней и разработать метод криоконсервации спермы трутней на основе медового разбавителя.
- разработать метод хранения спермы трутней в охлажденном состоянии при плюсовых температурах (3 °С).
- оценить качество спермы трутней, замороженной в среде С46 после длительного хранения в жидком азоте.
- изучить функциональные показатели половозрелых трутней и выявить оптимальные условия их воспроизводства.
- испытать способ одновременного выращивания в пчелиных семьях-воспитательницах трутней и неплодных маток.

**Научная новизна.** Разработан способ криоконсервации спермы трутней на основе 10% медового разбавителя с акации белой.

Разработан способ консервации спермы трутней в охлажденном состоянии при плюсовых температурах.

Проведена сравнительная оценка качества спермы трутней 5, 7 и 25 летней консервации в жидком азоте на основе полусинтетической среды С46 с использованием современной методики определения жизнеспособности сперматозоидов.

**Теоретическая и практическая значимость.** Необходимость сохранения генетического биоразнообразия позволит вести селекцию медоносных пчел. Криоконсервация спермы трутней позволяет провести первую селективную работу медоносных пчел, так как во время

криоконсервации погибают, в первую очередь, именно слабые нежизнеспособные сперматозоиды. Селекция медоносной пчелы решит задачу по генетической паспортизации аборигенных пород пчел с целью сохранения генофонда.

**Методология и методы исследований.** Исследования проводили с 2013 – 2020 гг. в лаборатории селекции и молекулярно-генетических исследований медоносных пчел ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства»; лабораториях по инструментальному осеменению пчелиных маток «Краснополянской опытной станции пчеловодства, КОСП» и «ППХ Майкопское» (филиалы «ФНЦ пчеловодства»). В исследованиях использована сперма трутней породы пчел карника, серой горной кавказской и породного типа «Приокский» среднерусской породы пчел. Отбор спермы у трутней и инструментальное осеменение пчелиных маток осуществляли на оборудовании *SCHLEY-System* модель 1.04 (*A&G Wachholz, Espelkamp Deutschland*). Дифференциацию живых и мертвых сперматозоидов проводили методом флуоресцентной микроскопии на биологическом световом микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (ООО «Альтами», Россия), исследование морфологических параметров с использованием дифференциального окрашивания набором *Diff Quick* (НПФ «АБРИС+», Россия).

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Сравнительная оценка биологических показателей спермы трутней разного возраста.
2. Сравнительная оценка качества спермы трутней разного срока криохранения.
3. Репродуктивные показатели пчелиных маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой.
4. Метод криоконсервации спермы трутней на основе пчелиного меда.
5. Способ хранения спермы трутней в охлажденном состоянии при плюсовых температурах.
6. Методы оценки оплодотворяющей способности спермы трутней после хранения в различных условиях.

**Степень достоверности и апробации работы.** Результаты, полученные при проведении опытов достоверны, что подтверждается необходимым объемом выборки, реальностью полученных данных, их биометрической обработкой с использованием программного обеспечения *Statistica* для *Windows* версия 13 (*StatSoft Russia*, Россия).

Основные положения диссертационной работы доложены и одобрены:

- на Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития пчеловодства России» РГАТУ им. П.А. Костычева (Рязань, 2014);
- на Научно-практической конференции «Современное пчеловодство. Проблемы разведения и селекции, посвященная 85-летию «НИИ пчеловодства», 90-летию со дня рождения Г.Д. Билаш и 70-летию со дня рождения Н.И. Кривцова» ФГБНУ «НИИ пчеловодства» (Рыбное, 2015);
- на Научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития современного пчеловодства и апитерпии» ФГБНУ «НИИ пчеловодства» (Рыбное, 2016);
- на Научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития современного пчеловодства и апитерпии» ФГБНУ «НИИ пчеловодства» (Рыбное, 2017),
- на XXII Международном конгрессе «Апиславия» (Москва, 2018);
- на Международной научно-практической конференции по проблемам пчеловодства «Пчела и человек» (Москва, 2019);
- на Международной научной конференции «Современные достижения и проблемы генетики и биотехнологии в животноводстве», посвященной 90-летию академика Л.К. Эрнста и 90-летию ФНЦЖ-ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста (Московская обл., г.о. Подольск, 2019);
- на Международной научно-практической конференции «Перспективы развития пчеловодства в условиях индустриализации АПК» (Краснодар, 2020);
- на Научно-практической конференции «Генетика, селекция и биотехнология животных: на пути к совершенству», приуроченной к 80-летию ВНИИГРЖ (Санкт-Петербург, Тярлево, 2020).

**Публикации результатов исследований.** Материалы диссертации изложены в 20 научных публикациях, в том числе 11 статей опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 158 страницах, иллюстрирована 28 таблицами, 30 рисунками. Список используемой литературы включает 216 источников, в том числе 132 на иностранном языке.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность: д.б.н., профессору, член-корр. В.А. Багирову, д.с.-х.н., профессору В.И. Лебедеву, к.б.н. Л.А. Бурмистровой, к.б.н. З.Н. Сайфутдиновой, к.б.н. В.А. Науменковой, к.б.н. М.М. Атрощенко, к.с.-х.н. С.В. Свистунову, к.б.н. М.М. Ивойловой,

специалисту ООО «Сарториус Стедим Рус» Т. Нейман.

## 2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 2.1 Материалы и методы исследования

Исследования по теме диссертационной работы выполняли с 2013 по 2020 гг. Общая схема исследований представлена на рисунке 1. Объекты исследований – трутни, пчелиные матки. Материалом исследований была сперма трутней серой горной кавказской породы, породного типа «Приокский» среднерусской породы и породы пчел карника. С 2013 по 2016 гг. в ФНЦ пчеловодства проводили исследования по выявлению оптимальных условий воспроизводства половозрелых трутней породного типа «Приокский» среднерусской породы пчел (способ одновременного выращивания трутней и неплодных маток в пчелиной семье-воспитательнице). Изучали функциональные показатели (концентрация, подвижность и активность ферментов сперматозоидов дегидрогеназ) половозрелых трутней разного возраста (17, 22 и 30 сут.). С 2017 по 2018 гг. анализировали качество спермы трутней после 5 летней консервации в жидком азоте, заложенной на криохранение в 2013 г., а также 7 и 25 летней консервации из криобанка ФНЦ пчеловодства («Приокский» породный тип).



Рисунок 1 – Общая схема проведения исследований

С 2018 по 2019 гг. изучали способы хранения спермы трутней серой горной кавказской (КОСП, г. Сочи) и породы пчел карника («ППХ Майкопское», г. Майкоп) без криоконсервации (в течение 30, 60 сут. при 3 °С; 24 – 26 °С). Также, исследовали репродуктивные показатели пчелиных маток после инструментального осеменения спермой разных способов ее сохранения. С 2019 по 2020 гг. в ФНЦ пчеловодства проводили испытание различных разбавителей и криопротекторов для длительного хранения спермы трутней в жидком азоте (серая горная кавказская и порода пчел карника, «Приокский» породный тип).

**Криоустойчивость спермы трутней в средах и пчелином меде.** В период активного сезона 2019 г. проводили испытание следующих сред для криоконсервации спермы трутней: группа 1 (контроль) – среда С46 рН 7,2 (ФГБНУ «ФНЦ – ВНИИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН); группа 2 - *Lonza Insect-XPRESS<sup>TM</sup>* рН 6,1 (*Sartorius Stedim, Belgium*); группа 3 - *Schneider's Drosophila Medium* с L-глутамином рН 4,6 (*Thermo Fisher, USA*); группа 4 - *Grace's Insect Medium (2x)* рН 6,3 (*Thermo Fisher, USA*); группа 5 - *JPL-41 Insect Medium* с хлоридом кальция, бикарбонатом натрия и без L-глутамин рН 5,9 - 6,5 (ФГБНУ «ФНЦ – ВНИИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»). В качестве криопротектора использовали 10% ДМСО. По рекомендациям производителей сред, антибиотики для обработки против бактериальной контаминации не применяли. Свежеотобранную сперму смешивали со средой в соотношении 5 : 3 (25 мкл спермы : 15 мкл среды) по методике *Hopkins B.K.* (2012). Было подготовлено 25 образцов по 40 мкл разбавленной спермы в стерильных криопробирках *Nunc* (1,0 мл.). Эквilibрацию подготовленных образцов проводили при температуре 3 °С в бытовом холодильнике *LG* в течение 1 ч. После эквilibрации осуществляли криоконсервацию образцов по методике Какпакова В.Т. (Г. Пинаев, М. Богданова, 2008).

С целью изучения криоустойчивости спермы в натуральном пчелином меде использовали мед с акации белой (г. Майкоп, Респ. Адыгея, урожай 2018 г.). В 100 г меда с белой акации содержится 78% углеводов (фруктоза, глюкоза, сахароза). Мед имеет рН 6,0. Он долго не кристаллизуется, богат флавоноидами, обладающими антиоксидантными свойствами. Этот мед содержит соединения необходимые для производства и медленного выделения небольшого количества перекиси водорода.

Мед испытывали в концентрированном виде (90% - 100%) и в разбавленном (10%) по методике П.П. Печникова и П.Н. Скаткина (1949). Для исследований криоустойчивости в конц. меде использовали неразбавленную сперму после длительного охлаждения в течение 3 мес. при



температуре 3 °С в бытовом холодильнике *LG*. Было подготовлено 15 образцов по 90 мкл разбавленной спермы (10 мкл охлажденной спермы : 80 мкл разбавителя). В случае применения концентрированного меда испытывали следующий вариант разбавителя – 100% мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток 2,5 мл (опытная группа М). Медовый разбавитель испытывали в разных комбинациях: с метанолом 10% (6 мл 250 мкл) - группа ММ, этанолом 10% (6 мл 250 мкл) - группа МЭ, ДМСО 10% (5,0 мл) - группа МД и глицерином 3% (6 мл 250 мкл) - группа МГ. Концентрацию ионов водорода в готовом разбавителе доводили *6M NaOH* до значений рН 8 - 9. Подготовленные образцы разбавленной спермы размещали в сосуде объемом 2 л, наполненным водой комнатной температуры (24 - 25 °С). Затем сосуд помещали в холодильник на 2 ч для эквilibрации при 3 °С. Крiоконсервацию осуществляли по выше указанной методике.

В период активного сезона 2020 г. испытывали модифицированный медовый разбавитель по П.П. Печникову и П.Н. Скаткину (1949). Было подготовлено 15 образцов по 90 мкл разбавленной спермы (10 мкл свежеотобранной спермы : 80 мкл разбавителя). Состав: мед 10% - 50 мл, лактоза – 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток – 2,5 мл. Разбавитель испытывали в комбинациях с глицерином 3% (6 мл 250 мкл) - группа МГ и ДМСО 10% (5 мл) - группа МД. Рабочий раствор 10% меда готовили на деионизированной воде. Концентрацию ионов водорода в готовом разбавителе доводили *6M NaOH* до значений рН 8 - 9. Эквilibрацию и крiоконсервацию осуществляли по выше указанной методике.

Оттаивание образцов спермы, замороженных в средах проводили на водяной бане при 34 °С в течение 10 с; образцов, замороженных в пчелином меде при 37 °С в течение 20 – 30 с.

**Консервация спермы трутней в охлажденном состоянии.** Для хранения спермы в разбавленном состоянии использовали следующие среды: С46 - группа 2, *Lonza Insect-XPRESS<sup>TM</sup>* - группа 3, *Grace's Insect Medium (2x)* - группа 4 и *Schneider's Drosophila Medium* с *L*-глутамином – группа 5. Было заготовлено 12 образцов разбавленной спермы по 30 мкл (15 мкл свежеотобранной спермы : 15 мкл среды) и 3 образца неразбавленной спермы по 15 мкл (контроль охлажденная – группа 1). Подготовленные образцы разбавленной спермы закладывали на хранение по методике В. Норкинс (2010) в стерильные стеклянные капилляры  $L = 75 \pm 1,0$  мм,  $d = 1,8 \pm 0,2$  мм (ООО «МиниМед», Россия). Исследования проводили в двух температурных режимах: при 3 °С в бытовом холодильнике *LG* и комнатной температуре 24 - 26 °С.

**Качественные показатели пчелиных маток, инструментально осемененных спермой разных способов консервации.** Применяли однократное осеменение с объемом вводимой спермы: заморожено-оттаянной – 10 мкл, охлажденной 4 - 8 мкл. Репродуктивные показатели маток оценивали по срокам начала яйцекладки, количеству печатного расплода. Маток, инструментально осемененных охлажденной спермой, оценивали только по физиологическим показателям (M. Bieńkowska, et al., 2008): наличие спермы в парных яйцеводах матки по истечении 48 ч после осеменения и концентрации сперматозоидов в семяприемнике.

**Оценка качества заморожено-оттаянной и охлажденной спермы.** В период исследований с 2017 по 2018 гг. дифференциацию живых и мертвых сперматозоидов проводили методом флуоресцентной микроскопии по методике S. Locke, Y. Peng, (1990) с использованием флюорохромов *Hoechst 33258 (H3258)* и *PI*. В период исследований с 2019 по 2020 гг. жизнеспособность сперматозоидов оценивали методом флуоресцентной микроскопии по методике R. Johuson (2013) с использованием набора по определению жизнеспособности *LIVE/DEAD<sup>TM</sup> Sperm Viability Kit L 7011* (флюорохромы *SYBR-14* и *PI*). Подвижность заморожено-оттаянной и охлажденной спермы оценивали по методике O. Kaftanoglu u Y. Peng (1984) в пяти полях зрения при увеличении 400× на биологическом световом микроскопе *Leica* и Альтами-ЛЮМ 1 *LED*. Бальная оценка от 0 – 5: 0 – подвижность отсутствует, 1 – 20 % подвижных спермиев, 2 – 40 %, 3 – 60 %, 4 – 80 %, 5 -  $\geq$  95 %. Для изучения морфологических параметров сперматозоидов использовали набор дифференциального окрашивания *Diff Quick* (НПФ «АБРИС+», Россия).

**Изучение качественных показателей половозрелости трутней.** Для получения трутней определенного происхождения и возраста в отцовские пчелиные семьи ставили трутневый сот в рамочном изоляторе из разделительной решетки. После выхода из ячеек их метили перманентным маркером фирмы «*POSCA*». По достижении трутнями возраста 17, 22 и 30 сут. осуществляли отбор спермы в соответствии с технологией инструментального осеменения пчелиных маток путем искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса (А. Бородачев, В. Бородачева, 1989). Сперму трутней оценивали по показателям концентрации (J. Rhodes, 2008) в счетной камере Горяева, подвижности (S. Locke, Y. Peng, 1993) и активности дегидрогеназ по Н. Шергину (В. Милованов, 1962).

**Оценка способа воспроизводства трутней.** Исследования по одновременному выращиванию трутней и неплодных маток в пчелиных семьях-воспитательницах проводили в соответствии с «Методическими

указаниями к постановке эксперимента в пчеловодстве» (РАСХН, 2000) и «Методами проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве» (НИИП, 2002). Метод оценивали по показателям массы суточных трутней и массы суточных неплодных маток. Массу определяли на электронных лабораторных весах GR-200 с пределом взвешивания от 0,01 - 210 г.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**3.1 Влияние сред, яичного желтка и пчелиного меда на криоустойчивость спермы трутней.** Для увеличения сроков переживаемости сперматозоидов и сохранения их оплодотворяющей способности, требуется снижение метаболических процессов сперматозоидов во время их хранения. С этой целью испытывали протективные среды с рН 4,6 – 7,2, предохраняющих сперматозоиды от преждевременного повреждения внешними силами или разрушения их в ходе расточительного обмена веществ. В ходе предварительной оценки испытываемых сред выявилось их положительное действие, на физиологическое состояние сперматозоидов. Электролитный состав, рН, осмотическое давление сред и др. оказались удовлетворительными для сперматозоидов трутней на начальном этапе исследований. Было отмечено, что в образцах с ДМСО, сперматозоиды чаще совершали прямолинейное поступательное движение. После эквilibрации разбавленной спермы произошло незначительное снижение ее жизнеспособности, за исключением опытных образцов группы 4 (Таблица 1).

Таблица 1 - Показатели качества разбавленной спермы после эквilibрации

Разбавитель	Показатели качества		
	Жизнеспособность, %	Подвижность, балл	Сперматозоиды с аномальной морфологией (дефекты головок), %
	с ДМСО	с ДМСО	с ДМСО
	М ± m		М ± m
группа 1 (контроль)	67,4 ± 5,1 <sup>b</sup>	4,5	20,1 ± 4,2 <sup>b</sup>
группа 2	64,6 ± 7,3	4,0	25,8 ± 5,4 <sup>a</sup>
группа 3	73,2 ± 0,3	4,0	40,1 ± 7,3 <sup>cad</sup>
группа 4	89,8 ± 0,6 <sup>eb</sup>	4,0	36,7 ± 2,1
группа 5	81,7 ± 0,6	4,0	28,4 ± 6,3 <sup>d</sup>

<sup>ad</sup> - достоверные различия при  $p < 0,01$ , <sup>cad</sup> -  $p < 0,001$ , <sup>eb</sup> -  $p \leq 0,05$

Возможно, для образцов группы 4 требовалось дополнительное время

для уравнивания концентрационных градиентов. После непродолжительного хранения разбавленной спермы в жидком азоте, физиологические показатели сперматозоидов кардинально изменились (Таблица 2).

Таблица 2 - Показатели качества заморожено-оттаянной спермы после 7 сут. криохранения

Разбавитель	Показатели качества		
	Жизнеспособность, %	Подвижность, балл	Сперматозоиды с аномальной морфологией (дефекты головок), %
	с ДМСО	с ДМСО	с ДМСО
	М ± m		М ± m
группа 1 (контроль)	<b>55,1 ± 2,5<sup>b</sup></b>	<b>4,0</b>	23,8 ± 1,5 <sup>b</sup>
группа 2	39,9 ± 0,3 <sup>ab</sup>	2,0	36,0 ± 1,7
группа 3	36,5 ± 1,8 <sup>db</sup>	2,0	44,3 ± 2,4 <sup>db</sup>
группа 4	38,2 ± 0,7 <sup>cb</sup>	3,5	38,4 ± 2,7
группа 5	38,4 ± 0,8 <sup>cb</sup>	4,0	36,2 ± 3,1

<sup>acde</sup> - достоверные различия при  $p < 0,01$

Плазматическая мембрана сперматозоидов, разбавленных в средах с pH 4,6 – 6,5 подверглась наибольшему воздействию условий криохранения. Контрольные образцы, разбавленные в среде с pH 7,2 (С46) достоверно надежно были защищены от агрессивных условий хранения в жидком азоте.

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 у лошадей, быков, буйволов, коз, баранов, крыс и мышей, рыб и человека. В диапазоне температур - 42 до - 51 °С мед превращается в твердое аморфное вещество без кристаллов льда (Kantor Z., et al., 1999). Мед способствует связыванию свободных вод в сперматозоидах во время замораживания.

Использование в собственных исследованиях метанола, этанола и глицерина в составе разбавителя для замораживания спермы трутней связано с экспериментальным поиском альтернативы ДМСО. Криоконсервация на основе метанола способствует значительному улучшению подвижности сперматозоидов рыб после замораживания-оттаивания (J. Herranz-Jusdado et al., 2019). Использование этилового спирта в составе среды для замораживания спермы хряка увеличивает абсолютный показатель

живучести сперматозоидов на 34 - 41% (Т. Епишина, 2011).

Результаты исследований криоустойчивости спермы трутней в натуральном пчелином меде выявили его криопротективные свойства (Таблица 3).

Таблица 3 - Показатели качества спермы до и после криоконсервации в течение 7 сут. в конц. пчелином меде

Разбавитель	Показатели качества					
	Жизнеспособность, %			Подвижность, балл		
	до крио	После оттаивания		до крио	После оттаивания	
		соломина	пробирка		соломина	пробирка
М ± m	М ± m	М ± m				
группа М	45,3 ± 1,6	25,5 ± 3,4	37,2 ± 0,5 <sup>cab</sup>	0,5	1,0	3,0
группа МГ	51,5 ± 2,1	41,2 ± 2,3	<b>78,0 ± 1,4<sup>b</sup></b>	0,5	2,0	<b>4,0</b>
группа МД	40,5 ± 4,5	26,5 ± 1,8	<b>79,6 ± 1,2<sup>a</sup></b>	0,5	1,0	<b>4,0</b>
группа МЭ	42,5 ± 3,8	26,9 ± 2,0	28,5 ± 0,9 <sup>dab</sup>	0,5	1,0	1,0
группа ММ	45,0 ± 2,5	-*	27,7 ± 0,6 <sup>cab</sup>	0,5	-*	2,0

\* - потеря образца; <sup>cdeab</sup> - достоверность различий при  $p < 0,01$

Мед в сочетании с глицерином 3% или ДМСО 10% обеспечил самую высокую защиту жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы в сравнении с синтетическими средами. Слабая подвижность сперматозоидов до замораживания связана, по всей видимости, с общим состоянием спермы, находившейся до момента исследований в мезабиозе, то есть состоянии глубокого охлаждения в течение 3 мес.

Инструментальное осеменение маток не привело к ожидаемому результату. Из 10 осемененных пчелиных маток выжила только одна, которая дала потомство рабочих пчел менее 50%. Причиной могло послужить наличие большого количества примесей, содержащихся в концентрированном меде. Возможно, эти примеси оказали негативное влияние на физиологическое состояние пчелиных маток после осеменения.

Применение же 10% медового разбавителя, напротив, привело исследования к положительному результату. Жизнеспособность сперматозоидов в ходе испытаний оставалась на достаточно высоком уровне, особенно в образцах с глицерином. Однако подвижность спермиев заметно снижалась во время криоконсервации (Таблица 4).

Испытания глицерина, в качестве криопротектора для спермы трутней медоносных пчел, проводились ранее отечественными и зарубежными

исследователями.

Таблица 4 - Основные показатели качества спермы трутней до и после криохранения в 10% медовом разбавителе

Исследуемые показатели	Наименование разбавителя							
	группа МД				группа МГ			
	до эквил	после 15 мин. при -40-50 °С	после 20 мин. при -196 °С	через сут. после крио	до эквил	после 15 мин. при -40-50 °С	после 20 мин. при -196 °С	через сут. после крио
	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
Общая подвижность, %	> 90	46,5 ±0,7	28,4 ±6,7	20,4 ±1,9	> 90	51,3 ±7,75	отсутствует	отсутствует
Активная подвижность, %	> 50	22,7 ±1,3	46,2	18,7 ±1,4	> 50	58,5 ±0,9	отсутствует	отсутствует
Жизнеспособность, %	94,0 ±0,3	97,65 ±0,55	72,7 ±1,3	70,6 ±6,2	97,2 ±0,2	95,15 ±1,95	83,9 ±0,8	86,8 ±9,3

Какпаков В.Т. с соавт. (1993) в среде С46 с 10% глицерина в сходных условиях замораживания обнаружили очень низкую подвижность сперматозоидов. *Hopkins B.K. et al.* (2010), испытывая глицерин в концентрации от 8 - 11,8%, также установили низкую жизнеспособность (35%) сперматозоидов еще до замораживания. По этой причине нами исходно была определена концентрация глицерина 3% для собственных исследований. ДМСО в концентрации менее 10% не проявляет криофилактических свойств, а в концентрации 15% уже значительно снижает жизнеспособность сперматозоидов (*B. Hopkins, C. Herr, 2010*).

По результатам проведенного анализа, было принято решение об инструментальном осеменении пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой из образцов с ДМСО.

**3.1.1 Качественные показатели пчелиных маток, инструментально осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе 10% медового разбавителя.** Осеменили маток в количестве 6 шт. Применяли однократное осеменение с объемом вводимой спермы 10 мкл. Прием маток пчелиными семьями составил 100%. В ходе эксперимента одна матка погибла, а две из пяти оставшихся, дали потомство рабочих пчел более 50% (Таблица 5).

В пчелиной семье с маткой №4 выявлен каннибализм. Причиной послужило недостаточное количество рабочих пчел в семье, способных своевременно пополнить кормовые запасы гнезда свежим углеводным и

белковым кормом.

Таблица 5 - Репродуктивные показатели маток, инструментально осемененных заморожено-оттаянной спермой в составе 10% медового разбавителя

№ матки	Количество ячеек печатного расплода рабочих пчел, шт.	Количество ячеек печатного расплода трутней, шт.	%, печатного расплода рабочих пчел	Примечание
1	42	90	31,8	-
2	1847	16	99,14	-
3	476	17	96,55	-
4	отдельные яйца и открытый расплод			наблюдался каннибализм пчел
5	2	10	16,6	небольшая масса пчел в микронуклеусе
6	нет данных	нет данных	-	погибла через 48 ч после осеменения

**3.2 Жизнеспособность сперматозоидов, замороженных в среде С46 после длительного хранения в жидком азоте.** С целью выполнения поставленной задачи в период активного сезона 2013 г. нами было заготовлено пять образцов криоконсервированной спермы в криосоломинах с объемом разбавленной спермы по 30 мкл каждая. Для оценки качества спермы после 7 и 25 лет криохранения использовали два образца 2011 г. и два образца 1993 г. закладки на хранение из криобанка НИИ пчеловодства. Сперма хранилась в криопробирках Nunc (1,8 мл) с объемом разбавленной спермы 750 мкл каждый образец.

Оттаивание образцов проводили в водяной бане при температуре 34 °С в течение 10 с. По истечении 10 с пребывания в водяной бане, полное оттаивание спермы произошло только в образце 2013 г. В остальных пробах лед полностью растаял не через 5 мин., как было установлено ранее (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007), а лишь спустя 10 мин. с момента оттаивания. При этом все исследуемые образцы, обладали достаточно высокой жизнеспособностью сперматозоидов (Рисунок 2).

Более высокие показатели жизнеспособности 93% были в пробе спермы, наиболее длительно хранившейся в жидком азоте (25 лет), это свидетельствует о том, что длительность криохранения не влияет на этот

показатель.

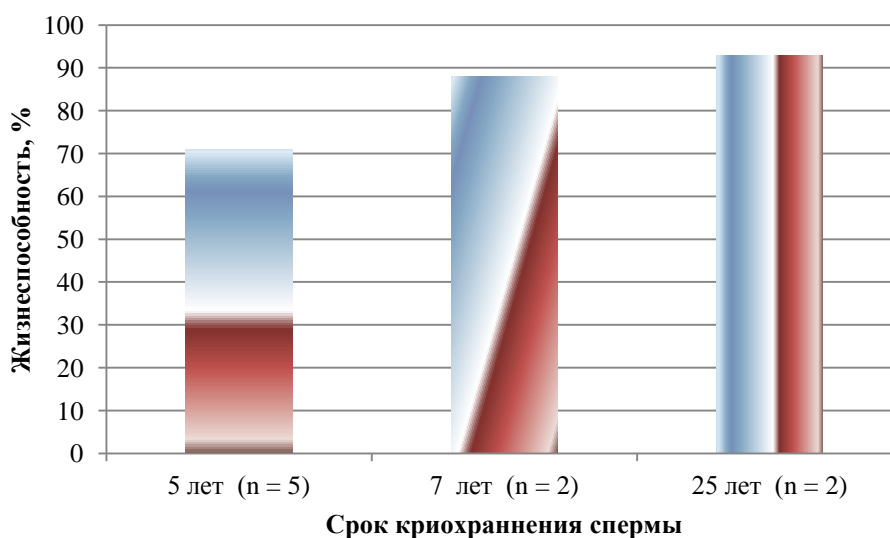


Рисунок 2 – Зависимость жизнеспособности сперматозоидов от сроков хранения в жидком азоте ( $p < 0,05$ )

**3.2.1 Качественные показатели пчелиных маток, инструментально осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе среды С46.** Применяли однократное осеменение с объемом вводимой спермы 8 мкл. Результаты инструментального осеменения маток представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Результаты инструментального осеменения пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой разных сроков криохранения

Год криоконсервации пробы спермы	Дата осеменения	Выживаемость маток после осеменения, %	Прием маток после осеменения, %	Начало яйцекладки после осеменения, сут.
2011 г.	7.06 (n = 9)	100	89	8 – 10
1993 г.	15.06 (n = 10)	100	90	14 – 17
Свежеотобранная сперма (контроль)	22.06 - 13.07 (n = 22)	100	83	5 – 14

По результатам оценки репродуктивных показателей осемененных маток, количество печатного расплода рабочих пчел составило менее 50%, что говорит о низкой оплодотворяющей способности спермы. Более продолжительный временной интервал от осеменения до начала яйцекладки имели пчелиные матки, осемененные спермой образца 1993 г. Данное



обстоятельство свидетельствует о массовых морфофункциональных изменениях в структуре сперматозоидов, вследствие длительного хранения в жидком азоте, а также об индивидуальных физиологических особенностях инструментально осемененных пчелиных маток.

В целом, результаты исследований продемонстрировали саму возможность сохранения спермы трутней в жидком азоте в течение 25 лет. Дальнейшие разработки по совершенствованию среды С46, режима замораживания и оттаивания позволят усовершенствовать данную методику.

### **3.3 Сохранение спермы трутней в охлажденном состоянии.**

Анализ состояния работ отечественных и зарубежных исследователей указывает на возможности сохранения спермы трутней при положительных температурах. Одно из перспективных направлений – это поиск разбавителя для сперматозоидов и оптимального температурного режима хранения. На сегодняшний день, известны результаты хранения спермы при 4 °С (Л. Лазарева, 2014), 10 – 15 °С (А. Бородачев, В. Бородачева, 1977), 14 °С (В. Hopkins, et al., 2017), 16 °С и 22 °С (W. Skowronek, J. Szymula, 1998), 12 °С и 25 °С (А. Collins, 2000). Сохранение спермы в охлажденном состоянии позволяет значительно снизить финансовые затраты во время селекционной работы, вызванные использованием дорогостоящего оборудования для криоконсервации и одновременно с этим получать более качественный племенной материал.

В ходе собственных исследований нами установлен оптимальный режим хранения неразбавленной спермы в охлажденном состоянии при 3 °С. Результаты исследований представлены в таблице 7.

Между концентрацией сперматозоидов в семяприемнике маток и количеством оплодотворенных яиц, откладываемых ею, существует положительная связь (J. Wegener, et al., 2012; A. Gul, et al., 2017). Концентрация сперматозоидов в семяприемнике инструментально осемененных маток варьируется от 1,8 млн/мкл (J. Woyke, Z. Jasinski, 1980, 1982) до 6 млн/мкл (А. Маннапов с соавт., 2013), а у маток естественного спаривания от 4 до 7 млн/мкл (S. Cobey, 2007). В то же время, эффективность миграции сперматозоидов из яйцеводов в семяприемник матки, объем которого составляет 1 мкл (Ф. Руттнер, 1976), зависит от объема вводимой спермы и условий приема маток после инструментального осеменения. В парных яйцеводах матки может вместиться до 20 мкл спермы (Ф. Руттнер, 1976). Ранее была установлена тесная связь между количеством рабочих пчел в свите осемененной матки и концентрацией сперматозоидов в ее семяприемнике (J. Woyke, Z. Jasinski, 1980). Вероятно, данные факторы

нашли отражение на результатах контрольной группы в собственных исследованиях, так как матки после осеменения помещались в пчелиную семью-воспитательницу в изолированном виде (в клеточке Титова).

Таблица 7 - Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, искусственно осемененных охлажденной (3 °С) разбавленной спермой, после 30 сут. хранения ( $p < 0,05$ )

Показатели	Группа 1 (контроль)	Разбавитель			
		Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Жизнеспособность сперматозоидов, %, $M \pm m$	91,0 ± 2,6	79,0 ± 0,0	98,2 ± 5,3	67,8 ± 6,3	70,1 ± 2,7
Количество осемененных маток, шт.	5	8	11	9	9
Выживаемость маток, %	80	100	54,5	77,8	66,7
Количество маток с семяприемником, содержащим сперму, шт. (%)	5 (100)	5 (62,5%)	11 (100)	9 (100)	6 (66,7)
Количество маток с пустым семяприемником, шт. (%)	0 (0)	3 (37,5%)	0 (0)	0 (0)	3 (33,3)
Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, млн/мкл $M \pm m$ (Lim)	1,2 ± 0,55 <sup>a</sup> (0,04 – 2,78)	0,54 ± 0,15 <sup>ba</sup> (0,12 - 0,88)	0,32 ± 0,07 <sup>ca</sup> (0,07 – 0,73)	0,35 ± 0,03 <sup>da</sup> (0,17 – 0,45)	0,04 ± 0,01 <sup>ea</sup> (0 – 0,11)

После инструментального осеменения и естественного спаривания у маток наблюдается снижение жизнеспособности сперматозоидов в их половых путях (*H. Gencer, et al., 2014*). Следовательно, в семяприемник матки мигрируют только фертильные сперматозоиды.

Полученные результаты собственных исследований свидетельствуют о негативном влиянии некоторых сред, из числа испытываемых, на жизненный ресурс спермы трутней во время хранения в охлажденном состоянии.

Таким образом, для сохранения спермы трутней медоносной пчелы без криоконсервации в течение 30 сут. ее необходимо хранить в неразбавленном виде при 3 °С, как показано на рисунке 3.

Концы капилляров закрыты с обеих сторон стерильной медицинской ватой и заварены пчелиным воском. Во избежание пересыхания спермы, в капилляре также должен содержаться физиологический раствор 0,9% по обе стороны от спермы, отделенный от нее воздушными пробками с обеих сторон.

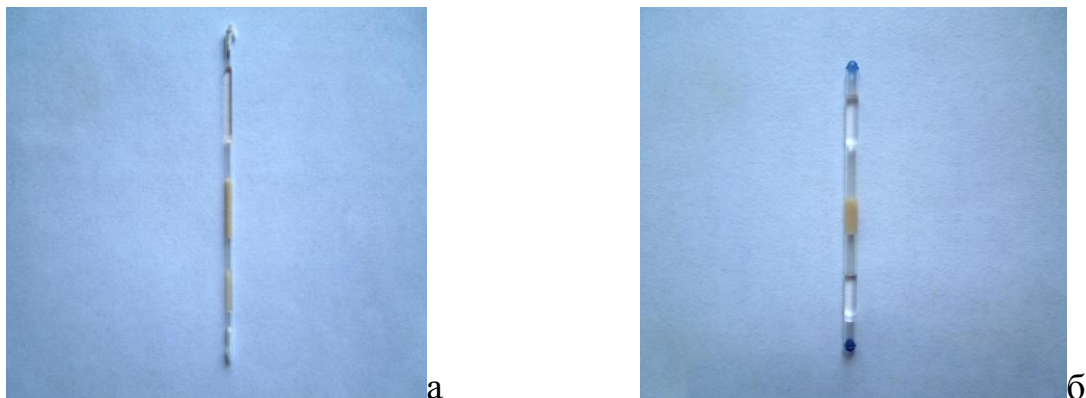


Рисунок 3 – Образцы спермы для хранения в охлажденном состоянии: а – в стеклянном капилляре, б – в криосоломине

**3.4 Качественные показатели половозрелости трутней.** В мировой практике инструментального осеменения существует два способа отбора спермы у трутней: из семенных пузырьков и методом искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса. Общепризнанным является второй способ. Методом искусственной стимуляции удастся отобрать у трутня от 1 – 1,5 мкл спермы из общего объема 1,7 мкл (А. Бородачев, В. Бородачева, 1989). Наличие спермы на конце эндофаллоса, ее объем, цвет и характеристики неразрывно связаны с возрастом половозрелых трутней (S. Cobey, 2007). В отечественной и зарубежной литературе существуют противоречивые данные относительно возраста полового созревания трутней, который варьируется от 14 до 30 сут. В ходе собственных исследований выявленное относительное количество трутней, имевших на конце эндофаллоса сперму, в возрасте 17 сут. оказалось на 6% меньше аналогичных трутней в возрасте 30 сут. Дальнейшие исследования подтвердили наличие лучшей половой потенции у трутней старшего возраста (Таблица 8).

Анализ данных, представленных в таблице, позволяет отметить, что наилучшими показателями качества отличалась сперма у трутней в возрасте 30 сут., как по концентрации сперматозоидов, так и по активности ферментов спермы дегидрогеназ. Между концентрацией сперматозоидов и активностью дегидрогеназ («дыханием» спермы) была установлена обратная тесная связь  $r_{xy} = -0,75$ .

Таблица 8 - Качество спермы разновозрастных половозрелых трутней

Возраст трутней, сут.	Концентрация сперматозоидов, млн/мкл (n = 10)		Активность дегидрогеназ, с (n = 10)	
	M ± m	Lim	M ± m	Lim
17 (контроль)	3,06 ± 0,3 <sup>abc</sup>	2,6 - 3,6	80,3 ± 26 <sup>abc</sup>	52 - 132
22	4,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,9 - 7,2	24,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	23 - 25
30	5,9 ± 0,4 <sup>c</sup>	5,1 - 6,6	28,0 ± 1,2 <sup>c</sup>	25 - 30

<sup>abc</sup> – достоверные различия при p < 0,05

**3.5 Влияние одновременного выращивания трутней и неплодных пчелиных маток на их массу в пчелиных семьях-воспитательницах.** Полноценное питание трутней в личиночной стадии является залогом высоких репродуктивных качеств имаго (M. Sturup, et al., 2013). Дефицит питания трутней в личиночной стадии отражается на снижении массы тела и основных морфометрических параметрах имаго. Исследованиями отечественных и зарубежных авторов подтверждена положительная корреляция между размерами тела трутней и их концентрацией сперматозоидов (H. Schlüns, et al., 2003; S. Shoukry Rasha, A. Khataby, 2013).

Испытанием способа одновременного выращивания трутней и неплодных пчелиных маток предполагалось решить задачу получения полноценных трутней для отбора спермы с целью ее дальнейшей консервации. Достоверные результаты по испытанию этого способа удалось получить только в активном сезоне 2014 г. (Таблица 9).

Таблица 9 - Масса трутней и неплодных маток в зависимости от способа выращивания, мг

Год	Масса			
	Суточные трутни (n = 30)		Суточные неплодные матки (n = 30)	
	опыт	контроль	Опыт	Контроль
	M ± m	M ± m	M ± m	M ± m
2014	258,3 ± 6,1 <sup>a</sup>	244,5 ± 1,5 <sup>ba</sup>	189,7 ± 5,9	194,0 ± 2,0
2015	268,5 ± 8,5	266,0 ± 11,0	188,5 ± 8,5	195,2 ± 7,8
2016	268,4 ± 2,0	269,0 ± 6,6	181,0 ± 6,4	188,4 ± 2,8

<sup>ab</sup> – достоверные различия при p < 0,05

Дальнейшие исследования подтвердили эту тенденцию в отношении массы неплодных маток, в то время как трутни практически не отличались по этому признаку независимо от способа выращивания. Таким образом, можно констатировать, что одновременное выращивание трутней и неплодных маток не оказывает существенного влияния на их массу, по сравнению с отдельным выращиванием.

#### 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан способ криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы в медовом разбавителе с акации белой. Предложенный метод криоконсервации позволил сохранить жизнеспособность спермы на высоком уровне. В оттаянных образцах, замороженных в концентрированном (90%) меде в сочетании с 10% ДМСО, жизнеспособность составила  $79,6 \pm 1,2\%$ , с 3% глицерином  $78,0 \pm 1,4\%$ . Количество сперматозоидов с аномальной морфологией головки составило в образцах с ДМСО  $6,9 \pm 1,8\%$ , с глицерином  $6,3 \pm 1,4\%$ . Сперматозоидов с аномальной морфологией жгутика в образцах с глицерином не установлено, а с ДМСО составило  $2,9 \pm 1,2\%$ . В образцах на основе 10% медового разбавителя с акации белой жизнеспособность спермы в сочетании с 10% ДМСО составила  $70,6 \pm 6,2\%$ , а с 3% глицерином  $86,8 \pm 9,3\%$ . Две пчелиные матки из шести осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе 10% медового разбавителя в сочетании с 10% ДМСО дали потомство рабочих пчел 96,5 – 99,1%.

2. Разработан способ хранения неразбавленной спермы в охлажденном состоянии без обработки от бактериальной контаминации в течение 30 сут. при  $3^{\circ}\text{C}$ . Предложенный метод консервации спермы позволил сохранить жизнеспособность сперматозоидов на уровне  $91,0 \pm 2,6\%$ . Показатель концентрации сперматозоидов в семяприемнике маток, инструментально осемененных неразбавленной охлажденной спермой, достоверно ( $p < 0,05$ ) превысил данные показатели опытных образцов, разбавленных в средах и составил  $1,2 \pm 0,5$  млн/мкл (0,04 – 2,78). Указанного количества сперматозоидов достаточно для полноценного воспроизводства пчелиной семьи.

3. Во время длительного хранения в жидком азоте (25 лет), сперма трутней медоносной пчелы, замороженная в среде С46, сохраняет свою жизнеспособность на достаточно высоком уровне 71 – 93%. При этом наблюдается снижение оплодотворяющей способности.

4. Функциональные показатели половозрелых трутней – концентрация сперматозоидов их подвижность и активность дегидрогеназ имеют

тенденцию к увеличению с возрастом трутней. Наиболее высокие функциональные показатели половозрелости выявлены у трутней в возрасте 22 - 30 сут. ( $p < 0,05$ ). Концентрация сперматозоидов у 22 сут. трутней составила  $4,9 \pm 0,7$  млн/мкл (1,9 – 7,2), 30 сут. –  $5,9 \pm 0,4$  млн/мкл (5,1 – 6,6). Активность ферментов спермы дегидрогеназ у 22 сут. составила  $24,0 \pm 0,6$  с (23 – 25), 30 сут. –  $28,0 \pm 1,2$  с (25 – 30). Дегидрогеназы спермы тем активнее, чем выше концентрация сперматозоидов. Была установлена обратная тесная связь  $r = -0,75$  между концентрацией сперматозоидов и активностью ферментов спермы.

5. Способ одновременного выращивания трутней и неплодных маток в пчелиных семьях-воспитательницах не оказывает существенного влияния на их качество. Достоверные различия показателей массы суточных трутней и неплодных маток, установленные в активный сезон 2014 г., при проведении повторных исследований не подтвердились.

**4.1 Практические рекомендации.** Протокол криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы в составе 10% медового разбавителя:

1. Сбор спермы с помощью оборудования для инструментального осеменения пчелиных маток.
2. Оценка спермы по основным параметрам качества: концентрация, подвижность, жизнеспособность, морфологические и морфометрические параметры головки сперматозоидов.
3. Разбавление спермы экспериментальным разбавителем: мед 10% (акация белая) – 50 мл, лактоза – 10 мг, яичный желток – 2,5 мл, ДМСО 10% - 5 мл.
4. Титрование готового разбавителя  $6M NaOH$  до pH 8 – 9.
5. Расфасовка в криопробирки *Nunc* 1,8 мл.
6. Эквилибрация криопробирок при 3 °C в течение 120 мин.
7. Замораживание криопробирок со спермой, размещенных на криотростине в течение 50 мин. со скоростью 1 °C/мин.
8. Помещение криотростин в жидкий азот для хранения.

Протокол консервации спермы трутней в охлажденном состоянии при 3 °C:

1. Сбор спермы объемом 50 – 100 мкл в стерильные стеклянные капилляры  $L = 75 \pm 1,0$  мм,  $d = 1,8 \pm 0,2$  мм с помощью оборудования для инструментального осеменения пчелиных маток. Во избежание пересыхания спермы, в капилляре с обеих сторон от нее также должен содержаться физиологический раствор 0,9%, отделенный с обеих

- сторон от спермы воздушными пробками.
2. Оценка спермы по основным параметрам качества: концентрация, подвижность, жизнеспособность, морфологические и морфометрические параметры головки сперматозоидов.
  3. Консервация спермы. Концы стеклянного капилляра закрываются с обеих сторон стерильной медицинской ватой и завариваются пчелиным воском.
  4. Помещение стеклянных капилляров в холодильное устройство в условия полной темноты при 3 °С.

**4.2 Перспективы дальнейшей разработки темы.** Перспективным является дальнейшее развитие и совершенствование протокола метода криоконсервации спермы трутней на основе натурального пчелиного меда в сочетании с ДМСО и глицерином. Дальнейшая апробация пчелиного меда в качестве разбавителя позволит значительно упростить и удешевить процедуру замораживания спермы трутней, сделать ее доступной для племенных пчелоразведенческих хозяйств России.

## **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Публикации в журналах ВАК Минобрнауки РФ и работы к ним  
приравненные:**

1. Гулов, А.Н. Возраст трутней и качество спермы / А.Н. Гулов, А.В. Бородачев, А.С. Березин // Пчеловодство. - 2015. - №9. – С. 24.
2. Гулов, А.Н. Качество спермы в оценке отцовских семей / А.Н. Гулов, А.В. Бородачев // Пчеловодство. – 2016. - №10. – С. 25.
3. Гулов, А.Н. Выращивание трутней для инструментального осеменения / А.Н. Гулов, А.В. Бородачев // Пчеловодство. – 2017. - №1. – С. 16-17.
4. Гулов, А.Н. Инструментальное осеменение пчелиных маток / А.Н. Гулов // Научная жизнь. – 2018. - №2. – С. 80-88.
5. Гулов, А.Н. Воспроизводительные способности инструментально осемененных маток / А.Н. Гулов // Пчеловодство. – 2018. - №4. – С. 13-15.
6. Гулов, А.Н. Проблемы сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы / А.Н. Гулов // Пчеловодство. – 2018. - №6. – С. 22-25.
7. 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.
8. Гулов, А.Н. Анализ криоконсервированной спермы трутней / А.Н. Гулов, З.Н. Сайфутдинова, Е.О. Ларькина // Пчеловодство. – 2019. - №2. - С. 16-18.

9. 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.
10. Гулов, А.Н. Краткосрочное хранение спермы трутней медоносной пчелы в культуральной среде для насекомых / Е.О. Ларькина, Д.В. Галицкая, А.Н. Гулов // Вестник аграрной науки. – 2020. - №2(83). – С.165-171.
11. 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.

#### В других изданиях

12. Гулов, А.Н. Перспективы развития инструментального осеменения пчелиных маток в России / А.Н. Гулов // В сборнике «Научное сопровождение инновационного развития агропромышленного комплекса: Теория, практика, перспективы», Рязань, 2014. – С.76-79. Часть III.
13. Гулов, А.Н. Выращивание и сохранение трутней для инструментального осеменения / А.Н. Гулов, А.С. Березин // В сборнике научно-исследовательских работ по пчеловодству, Рыбное, 2015. – С. 98-102.
14. Гулов, А.Н. Качество спермы у трутней разного возраста / А.Н. Гулов, А.В. Бородачев // В сборнике научно-исследовательских работ по пчеловодству, Рыбное, 2016. – С. 67-71.
15. Гулов, А.Н. Гигиеническое поведение пчел по отношению к убитому иглой расплоду / А.С. Березин, А.Н. Гулов // В сборнике научно-исследовательских работ по пчеловодству, Рыбное, 2017. – С. 21-26.
16. Gulov, A.N. *The system organization of practical activities in biotechnology of honeybees (Apis mellifera)* / Z.N. Saifutdinova, A.N. Gulov, I.I. Kaspranov, A.S. Berezin, V.A. Vasiliev // *45<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress*. – Turkey. – 2017. – P. 38.
17. Гулов, А.Н. Сохранение генетических ресурсов медоносной пчелы / Е.О. Ларькина, Д.В. Галицкая, А.Н. Гулов // Новости науки в АПК. Выпуск по материалам VII межд. конференции «Инновационные разработки молодых ученых - развитию агропромышленного комплекса», Ставрополь, 2019. – №3(12). - С. 102-106.
18. Гулов, А.Н. Сохранение спермы трутней без криоконсервации / А.Н. Гулов, Е.О. Ларькина, З.Н. Сайфутдинова // В сборнике научных трудов КНЦЗВ по материалам Юбилейной межд. науч.- практич. конференции «Научные основы повышения продуктивности и здоровья с/х животных», посвященная 50-летию со дня основания, Краснодар, 2019. – Т.8. - №1. - С. 246-250.



19. Гулов, А.Н. Криобанк спермы трутней медоносной пчелы / А.Н. Гулов, З.Н. Сайфутдинова, Е.О. Ларькина // Монография под общ. ред. А.З. Брандорф, М.М. Ивойловой, Киров; ФАНЦ Северо-Востока, 2019. – С. 45-51.
20. Гулов, А.Н. Кривоустойчивость спермы трутней в электролитной и неэлектролитной среде / А.Н. Гулов, З.Н. Сайфутдинова, Д.В. Митрофанов, И.А. Языков // В сборнике научных трудов КНЦЗВ по материалам междунауч.- практич. конференции «Научные основы повышения продуктивности и здоровья с/х животных», Краснодар, 2020. - Т.9. - №1. - С. 96-98.
21. Гулов, А.Н. Медовые разбавители П.Н. Печникова и П.Н. Скаткина для криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы / А.Н. Гулов, А.С. Ласкин // В сборнике по материалам междунауч.-практич. конференции «Перспективы развития пчеловодства в условиях индустриализации АПК», ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» - Краснодар, 2020. – С. 219-225.

Подписано в печать:  
Объем: 1,0 усл.п.л.  
Тираж: 80 экз. Заказ №  
Отпечатано в типографии