

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПЧЕЛОВОДСТВА
(ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства»)

На правах рукописи

ГУЛОВ АЛЕКСЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

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

06.02.10 – частная зоотехния, технология производства
продуктов животноводства

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
сельскохозяйственных наук

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

1 ВВЕДЕНИЕ.....	4
2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	13
2.1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1.1 Биологические показатели спермы трутней после длительного хранения в жидком азоте и охлажденном состоянии.....	15
2.1.2 Качественные показатели пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной и охлажденной спермой.....	25
2.1.3 Изучение функциональных показателей половозрелых трутней и оптимальных условий их воспроизводства	30
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	52
3.1 Определение жизнеспособности сперматозоидов после длительного хранения в жидком азоте и охлажденном состоянии.....	56
3.2 Оценка качественных показателей пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной и охлажденной спермой.....	61
3.3 Методика оценки половозрелости трутней.....	63
3.4 Методика оценки способа воспроизводства трутней и неплодных маток для искусственного осеменения.....	67
3.5 Статистическая обработка результатов исследований.....	68
4 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	70
4.1 Влияние сред, яичного желтка и пчелиного меда на криоустойчивость спермы трутней	70
4.1.1 Качественные показатели пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе пчелиного меда.....	86
4.2 Жизнеспособность сперматозоидов, замороженных в среде С46 после длительного хранения в жидком азоте.....	89
4.2.1 Качественные показатели пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе полусинтетической среды С46.....	96

4.3	Влияние криоконсервации на морфометрические параметры сперматозоидов трутней медоносной пчелы.....	102
4.4	Сохранение спермы трутней в охлажденном состоянии.....	104
4.5	Качественные показатели половозрелости трутней.....	115
4.6	Влияние одновременного выращивания трутней и неплодных пчелиных маток на их массу в пчелиных семьях-воспитательницах.....	119
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
5.1	ВЫВОДЫ.....	128
5.2	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	130
5.2.1	Протокол криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы в составе 10% медового разбавителя.....	130
5.2.2	Протокол консервации спермы трутней медоносной пчелы в охлажденном состоянии при 3 °С.....	130
5.2.3	Рекомендации по транспортировке неразбавленной спермы трутней медоносной пчелы.....	131
5.3	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	131
6	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133
7	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	159
7.1	Приложение 1 – Акт внедрения научно-исследовательской работы....	159

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Медоносные пчелы - важный элемент экологической системы. На их долю приходится 80 - 90% опыляемых энтомофильных растений. Широкий ареал обитания медоносной пчелы на территории России обусловлен высокими адаптивными свойствами данного вида. На территории России рекомендованы для разведения следующие породы: среднерусская (*Apis mellifera mellifera* L.), карпатская (*Apis mellifera carpatica*), серая горная кавказская (*Apis mellifera caucasica*), дальневосточная (*Apis mellifera far-estern*) и башкирская (А. Брандорф, с соавт., 2012). Каждая из пород характеризуется комплексом отличительных биологических признаков, высоким генетическим потенциалом продуктивных качеств и приспособленностью к определенному типу медосбора (А. Бородачев, с соавт., 2017).

Но, 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 бесконтрольной интродукцией различных пород и нарастающим экологическим кризисом (В. Саттаров, с соавт., 2014; С. Чиндина, с соавт., 2017). Появилась настоятельная необходимость использования биотехнологических методов сохранения генофонда медоносных пчел: искусственное осеменение пчелиных маток, консервация спермы трутней.

Первой стратегической задачей для выполнения данной диссертационной работы является создание биоресурсной коллекции с целью сохранения генетического биоразнообразия основных пород пчел, разводимых на территории России. Второй наиважнейший стратегический момент для выполнения работы – это мульти тиражирование ценных пород и типов медоносных пчел на территории нашей страны.

Искусственное осеменение пчелиных маток - один из первых и наиболее развитых биотехнологических методов в пчеловодстве, без которого невозможны

генетические исследования медоносных пчел. Искусственное осеменение пчелиных маток спермой специально подобранных трутней - надежный способ контроля передачи генетической информации потомству, необходимый в селекционно-племенной работе (А. Бородачев, В. Бородачева, 1982; В. Тодерич, 2014). Криоконсервация спермы различных животных довольно широко применяется в практике их разведения, воспроизводства и длительного сохранения. Однако этого нельзя сказать в отношении медоносной пчелы. Важными аспектами являются оценка качества спермы специально подобранных трутней и влияние условий криохранения на качественные показатели спермы. В современном представлении селекционеров-пчеловодов наследственность трутней, также как и маток, влияет на качество потомства. На формирование трутней как полноценных половозрелых особей существенное влияние оказывает ряд ключевых факторов, одними из которых являются условия вывода и способы содержания. Степень передачи генетической информации от трутня потомству будет тем более успешно, чем выше качество его спермы (Ф. Руттнер, 1975). В связи с чем, требуется комплексная оценка качества трутней, так как «полноценное осеменение», по Ф. Руттнеру (1975), зависит, в том числе и от показателей половой потенции трутней.

Для искусственного осеменения пчелиных маток используется качественная сперма с высокими показателями концентрации сперматозоидов и их подвижности. Особые требования предъявляются к заморожено-оттаянной сперме после длительного хранения в жидком азоте. Показатели подвижности и количества живых сперматозоидов не являются достаточно надежным критерием оценки качества спермы, так как они не всегда коррелируют с оплодотворяющей способностью сперматозоидов (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007; N. Koeniger, 1970 a, b; S. Locke, et al., 1990). По мнению А. Бородачева и О. Кабашовой (2007), важным является показатель абсолютной переживаемости сперматозоидов, выраженный в часах. Так как период миграции спермы из яйцеводов в семяприемник после искусственного осеменения составляет 24 - 48 ч (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007). Зарубежные исследователи J. Wegener (2014) и A. Gul (2017) выявили тесную

связь между оплодотворяющей способностью сперматозоидов и их концентрацией в семяприемнике осемененных маток.

С практическим применением метода низкотемпературного замораживания спермы трутней, большое значение приобретает разработка надежных методов определения ее качества после оттаивания. Впервые применен способ оценки жизнеспособности сперматозоидов методом флуоресцентной микроскопии с использованием флюорохромов Hoechst 33258 и PI (S. Locke, Y. Peng, 1990); SYBR-14 и PI (D. Garner, L. Johnson, 1995).

Для нужд практического пчеловодства, с целью круглогодичного искусственного осеменения пчелиных маток, существует потребность в разработке технологии консервации спермы трутней в охлажденном состоянии (H. Poole, S. Taber, 1970; А. Бородачев, В. Бородачева, 1977; V. Vesely, D. Titera, 1987; В. Какпаков, с соавт., 1993; W. Skowronek, J. Szymula, 1998; A. Collins, 2000a; Л. Лазарева, 2014; M. Paillard, 2016). По результатам проведенных исследований определена возможность сохранения неразбавленной спермы трутней без противомикробных средств и в разбавленном виде в составе культуральных сред (Lonza Insect-XPRESSTM и Graces) в течение 30 сут. при 3 °С.

Степень разработанности темы. В пчеловодстве разработка метода низкотемпературного замораживания спермы трутней находится в стадии экспериментальной. Это можно объяснить несколькими причинами:

- механизм консервации спермы в семяприемнике пчелиной матки до конца не изучен;
- имеется сравнительно мало исследований, касающихся влияния оттаивания спермы на биологические показатели сперматозоидов;
- отсутствие единого протокола криоконсервации, способствующего гарантированному сохранению оплодотворяющей способности заморожено-оттаянной спермы.

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 спер-

мы 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 см². 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 свой тип разбавителя и криопротектора.

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).

Целью исследований явилось – разработка методов консервации спермы трутней для сохранения генетических ресурсов *Apis mellifera* L. на территории Российской Федерации.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи исследования:

1. Сравнить различные среды для замораживания спермы трутней и разработать метод криоконсервации спермы трутней на основе медового разбавителя.
2. Разработать метод хранения спермы трутней в охлажденном состоянии при плюсовых температурах (3 °С).
3. Оценить качество спермы трутней, замороженной в среде С46 после дли-

тельного хранения в жидком азоте.

4. Изучить функциональные показатели половозрелых трутней и выявить оптимальные условия их воспроизводства.

5. 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. Длительное хранение спермы трутней в жидком азоте не оказывает существенного влияния на сохранность плазматических мембран сперматозоидов. В свою очередь, высокие показатели жизнеспособности сопровождаются многочисленными аномалиями в морфологии заморожено-оттаянных сперматозоидов и заметным снижением их оплодотворяющей способности. В данной работе впервые проведен анализ морфологических и морфометрических параметров сперматозоидов после длительного криохранения. Оценка морфологических и морфометрических параметров спермы после консервации является неотъемлемым элементом прогнозирования ее оплодотворяющей способности.

Теоретическая и практическая значимость исследований. 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.

Устранение последствий бесконтрольной интродукции разных пород медоносных пчел на территории России немислимо без искусственного осеменения

пчелиных маток и консервации спермы трутней. Получены необходимые сведения по глубокому замораживанию спермы трутней медоносных пчел, которые способствуют повышению эффективности искусственного осеменения пчелиных маток, и представляет интерес для специалистов в области генетики и селекции медоносных пчел. Полученные результаты исследований позволят модернизировать существующую технологию криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы, разработанную НИИ пчеловодства. Дальнейшая апробация натурального пчелиного меда в качестве разбавителя позволит значительно упростить и удешевить процедуру криоконсервации спермы трутней, сделать ее доступной для племенных пчелоразведенческих хозяйств России. Результаты исследований по хранению спермы в охлажденном состоянии применимы на практике уже сегодня в виде реализации спермадоз от чистопородных трутней основных пород пчел, разводимых на территории РФ с гарантией сохранения оплодотворяющей способности в течение 2 - 3 мес. в температурном диапазоне от 2 до 8 °С.

Методология и методы исследований. Исследования по теме диссертационной работы выполняли с 2013 по 2020 гг. в условиях научно-экспериментальной пасеки и лаборатории селекции и молекулярно-генетических исследований медоносных пчел ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства», насчитывающей более 100 пчелиных семей породного типа «Приокский» среднерусской породы; научно-экспериментальной пасеки и лаборатории инструментального осеменения пчелиных маток ФГБНУ «Краснополянская опытная станция пчеловодства», насчитывающей более 2 тыс. пчелиных семей серой горной кавказской породы пчел; лаборатории инструментального осеменения пчелиных маток ФГБНУ «ППХ Майкопское», насчитывающей более 2 тыс. пчелиных семей карпатской породы пчел и породы карника.

Организуемые работы проводили в соответствии с «Методическими указаниями к постановке эксперимента в пчеловодстве» (РАСХН, 2000) и «Методами проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве» (НИИП, 2002).

С 2013 по 2016 гг. проводили исследования по выявлению оптимальных условий воспроизводства половозрелых трутней (способ одновременного выращи-

вания трутней и неплодных маток в пчелиной семье-воспитательнице). Изучали функциональные показатели (концентрация, подвижность и жизнеспособность сперматозоидов) половозрелых трутней разного возраста (17, 22 и 30 сут.).

С 2017 по 2018 гг. анализировали качество спермы трутней после 5, 7 и 25 летней консервации в жидком азоте. Изучали способы хранения спермы трутней без криоконсервации (в течение 30, 60 сут. при 3 °С; 24 – 26 °С). Исследовали репродуктивные показатели пчелиных маток после искусственного осеменения спермой разных способов ее сохранения.

С 2019 по 2020 гг. проводили испытание различных разбавителей (культуральные среды, натуральный пчелиный мед) и криопротекторов (глицерин, метанол, этанол) для длительного хранения спермы трутней в жидком азоте.

Искусственное 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) с использованием флюорохромов Hoechst 33258, SYBR-14, PI.

Для визуализации аномалий в морфологии сперматозоидов и изучения морфометрических параметров их головок использовали набор дифференциального окрашивания Diff Quick (НПФ «АБРИС+», Россия). Морфометрические параметры сперматозоидов оценивали с использованием программного обеспечения Altami Studio версия 3.5 (ООО «Альтами», 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 апробация результатов исследований. 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).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и практических предложений. Работа изложена на 158 страницах, иллюстрирована 28 таблицами, 30 рисунками.

Список используемой литературы включает 216 источников, в том числе 132 на иностранном языке.

2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Медоносные пчелы (*Apis mellifera* L.), являющиеся основными насекомыми - опылителями, играют важную роль в сельском хозяйстве для производства продуктов питания. Однако в последние десятилетия произошли существенные потери пчелиных семей во всем мире (M. Paillard, 2016). Пчеловодами мира сообщается о высоких темпах потерь пчелиных семей – 35 - 75% в год (B. Hopkins, 2012). Сельскохозяйственная и продовольственная организация Объединенных наций (FAO) разработала декларацию и глобальный план по сохранению генетических ресурсов сельскохозяйственных животных посредством создания криобанков спермы (B. Hopkins, 2012; FAO, 2007). Но медоносная пчела с ее генетическим разнообразием не отмечена в планах FAO (B. Hopkins, 2012; FAO, 2007). Сохранение спермы трутней медоносных пчел в сочетании с инструментальным осеменением пчелиных маток является эффективной стратегией для сохранения видов и их генетического разнообразия (З. Сайфутдинова, 2014; M. Paillard, 2016).

Россия является колыбелью искусственного осеменения во всех областях животноводства и птицеводства. Всероссийскому институту животноводства принадлежит приоритет открытия сделанного выдающимися учеными - академиком В.К. Миловановым и профессором И.И. Соколовской, И.В. Смирновым диплом №103, с приоритетом 1947 г. о возможности глубокого замораживания спермы животных и плодотворного осеменения самок оттаянным семенем (цитировано по Н. Решетниковой, с соавт., 2008). Медоносная пчела единственный объект, для которого эти методы находятся на стадии экспериментальной разработки (B. Какпаков, О. Кабашова, 2004).

Первые успешные опыты по сохранению спермы трутней медоносной пчелы в жидком азоте были проведены в нашей стране (А. Мельниченко, с соавт., 1976). Длительное хранение спермы трутней имеет значение при проведении ге-

нетических исследований. Использование такой спермы обеспечивает ветеринарную и эпидемиологическую безопасность в пчеловодстве, связанную с переносом микро- и макропаразитов (В. Какпаков, с соавт., 1993). Выведение генетически однородного потомства пчелы достигается получением потомства от трутней одной и той же отцовской семьи, что возможно только при условии длительного сохранения жизнеспособной спермы в глубокой заморозке в течение двух и более лет (цитировано по В. Какпакову, с соавт., 1994).

Начиная с 1990 г. в совместной работе Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН и НИИ пчеловодства по криоконсервации спермы трутней были получены положительные результаты по итогам 6,9 и 12 лет криохранения (О. Кабашова, 2005). Разработана технология криоконсервации спермы трутней и получения плодных маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой с приоритетом от 1999 г. (В. Какпаков, с соавт., 1999; В. Какпаков, 2007). Проблема контроля происхождения пчелиных маток, трутней и их потомства остается одним из последствий массовой и бесконтрольной метизации медоносных пчел в последние десятилетия. Решение данной проблемы возможно с внедрением в производство современных методов определения породной принадлежности через ДНК-анализ, обеспечивая чистоту генетического материала, репродукцией пчелиных маток на основе лабораторий инструментального осеменения с использованием генетического материала криобанков спермы трутней (А. Маннапов, О. Ларионова, 2008; Г. Сингина, с соавт., 2014; Z. Saifutdinova, et al., 2017).

2.1.1 Биологические показатели спермы трутней после длительного хранения в жидком азоте и охлажденном состоянии

Глубокое замораживание в жидком азоте – наиболее перспективный способ консервации генома. Оно стало возможным благодаря успехам криобиологии, изучающей изменения, происходящие в организмах при замораживании, и механизмы устойчивости к действию низких температур. Благодаря этим исследованиям, разработаны режимы замораживания живых объектов и среды, в которых производится замораживание (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007).

Криоконсервация сперматозоидов – одна из наиболее разработанных областей криобиологии. Наибольшее практическое применение метод имеет при разведении крупного рогатого скота, что позволяет эффективно и продолжительное время использовать выдающихся производителей. Разработка приемов и технических средств, с целью длительного сохранения жизнеспособной спермы трутней, имеет исключительное значение для селекционной работы в пчеловодстве. Выявлены основные условия криохранения спермы трутней медоносной пчелы (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007):

- применение питательной среды С46 в качестве разбавителя (Г... Пинаев, М. Богданова, 2008),
- использование криопротектора ДМСО,
- замораживание со скоростью 1 °/мин.,
- оттаивание при температуре 40 °С,
- отмывание 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) (Г.. Пинаев, М. Бо-

гданова, 2008). Среду С46 обогащают добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (2 - 10%) (В. Какпаков, 1989).

Диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин являются классическими криозащитными соединениями, быстро проникающими в клетки и наиболее прочно связывающими воду внутри и вне ее (Л. Дьяконов, В. Ситькова, 2000). Механизмы защитного действия криофилактических веществ основаны на их способности создавать прочные связи с молекулами воды, более прочные, чем связи молекул воды между собой, что препятствует формированию правильной кристаллической решетки льда и замедляет рост кристаллов (Л. Дьяконов, В. Ситькова, 2000). По данным В. Какпакова с соавт. (1993), наибольшая выживаемость 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. В среде с 10% глицерина в сходных условиях замораживания (1 °С/мин., -196 °С, в течение 10 мес.) выживаемость сперматозоидов (подвижность) была низкой (В. Какпаков, с соавт., 1993). Однако, при хранении без криоконсервации в течение 48 ч при температуре 4 и 25 °С высокая подвижность сперматозоидов (4 - 5 баллов) отмечена в среде с 10% глицерина, а присутствие 10% ДМСО резко снижало этот показатель (1 - 1,2 балла) (В. Какпаков, с соавт., 1993; J. Wegener, K. Bienefeld, 2012). В. Hopkins и С. Herr (2010) при оценке криопротекторной токсичности на качество спермы обнаружили жизнеспособность сперматозоидов 93% в образце, находившемся в ДМСО в течении часа при комнатной температуре и 35% жизнеспособных сперматозоидов в глицерине. Установлено, что использование 15% ДМСО уменьшает жизнеспособность сперматозоидов и может повреждать их геном через обрыв хроматиды (В. Hopkins, С. Herr, 2010).

Но, метод криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы до конца не оптимизирован. Проведено сравнительно мало исследований, касающихся влияния оттаивания спермы на биологические показатели сперматозоидов (M. Paillard, 2016). Показатели температуры при оттаивании спермы трутней варьируют в пределах 25 - 40 °С, а времени – менее 1 мин., в основном несколько секунд (В. Hopkins, С. Herr, 2010; J. Wegener, K. Bienefeld, 2012) или более 1 мин. (О. Каба-

шова, с соавт., 2004). Для сперматозоидов трутней медоносных пчел следует избегать быстрого оттаивания при температуре выше 40 °С (В. Hopkins, С. Herr, 2010). Незначительные повреждения мембран клетки вызывает центрифугирование спермы (А. Collins, et al., 2004) . Следовательно, только небольшое количество сперматозоидов достигает семяприемника матки, вызывая низкую оплодотворяющую способность. М. Paillard (2016), J. Wegener et al. (2014) не выявили существенной разницы в показателях жизнеспособности сперматозоидов до и после центрифугирования. Таким образом, на сегодняшний день до конца не выяснено, насколько центрифугирование эффективно влияет на удаление криопротектора из спермы.

J. Wegener et al. (2014), в результате тестирования новых разбавителей, снижающих токсическое действие криопротектора, выявили наилучшие показатели жизнеспособности сперматозоидов с применением буфера цитрата-HEPES, содержащего трегалозу. F. Dadkhah et al. (2016) к основному составу буфера добавляли также яичный желток и соевый лецитин в концентрациях 0,5 и 2%. По итогам оттаивания средняя подвижность сперматозоидов в среде с использованием яичного желтка составила $4,75 \pm 0,14$ балла, жизнеспособность $69,75 \pm 2,32\%$ (F. Dadkhah, et al., 2016). 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.

Метаболизм яичного желтка в репродуктивных органах пчелиной матки не изучен. Тем самым, создается определенный риск для контаминации спермы микроорганизмами.

Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН совместно с Научно-исследовательским институтом пчеловодства разработана технология криоконсервации спермы трутней и получения плодных маток (В. Какпаков, с соавт., 1999). Сперма, хранившаяся в жидком азоте в течение 12 лет, имела следующую динамику: после 6 лет хранения сперматозоиды не только не теряли своей актив-

ности и оплодотворяющей способности, но и проявляли тенденцию к улучшению данных показателей (Рисунок 1, 2). Начиная с 7 года хранения, отмечено некоторое снижение активности и переживаемости сперматозоидов, а с 9-го года хранения качество спермы вновь улучшалось (О. Кабашова, с соавт., 2005).

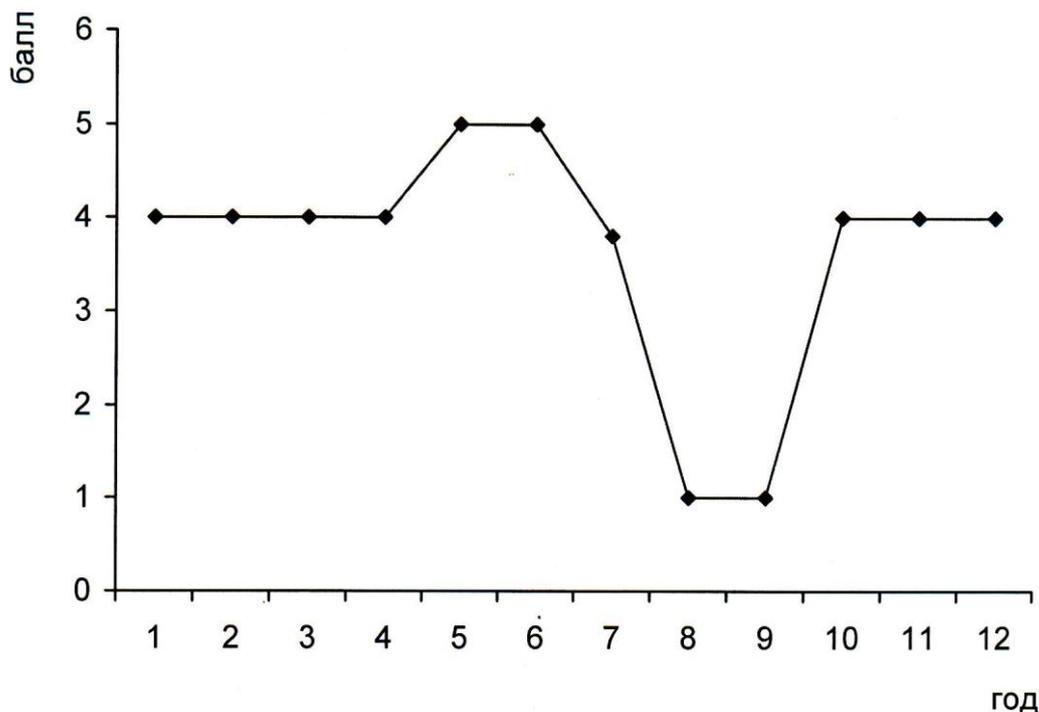


Рисунок 1 - Максимальная активность спермы трутней в зависимости от срока криохранения

В. Какпаков с соавт. (1994) осеменили 23 неплодные матки спермой, хранившейся в жидком азоте 760 сут. Оплодотворенные яйца откладывали 15 маток. В дальнейшем, при оценке развития семей выбраковали 10 маток, так как площадь расплода оказалась менее 150 см^2 (В. Какпаков, с соавт., 1994). Остальные 5 маток, имевшие в среднем по 300 см^2 расплода, авторы оставили в зиму.

Ј. Harbo (1979, 1983) применив в качестве криопротектора 25% ДМСО, получил 8% пчелиного расплода от маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой. О. Kaftanoglu и Y. Peng (1984) провели осеменение 15 неплодных маток спермой, хранившейся 305 - 359 сут. в жидком азоте. Тринадцать выживших маток дали 47% расплода рабочих особей (О. Kaftanoglu, Y. Peng, 1984).

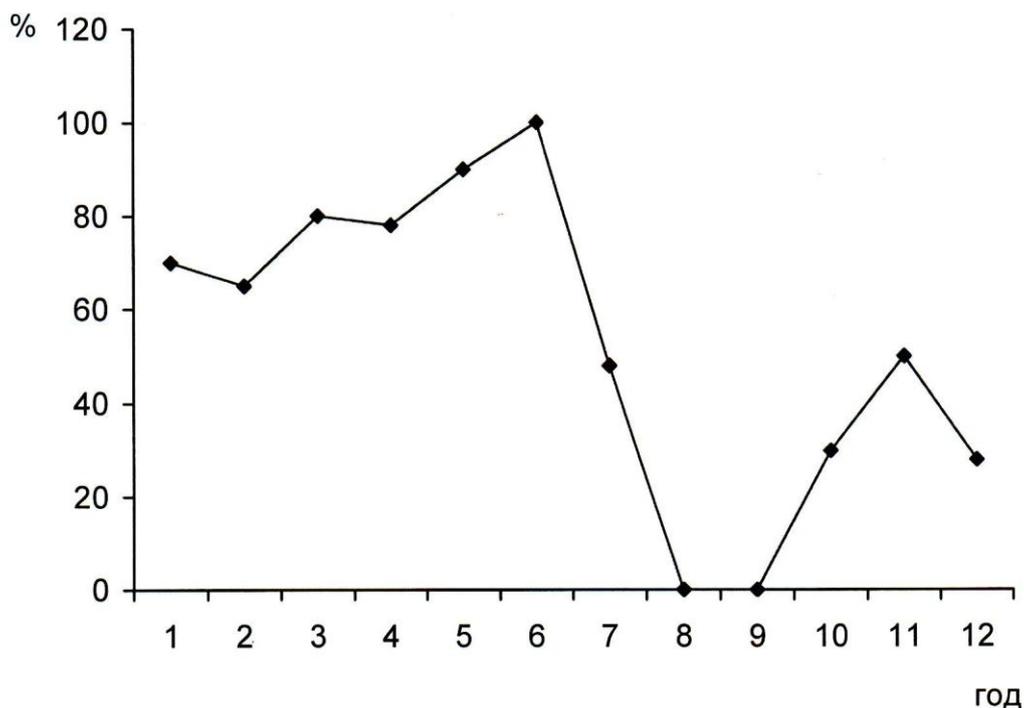


Рисунок 2 - Оплодотворяющая способность спермы в зависимости от срока криохранения

Следующие результаты по искусственному осеменению маток дефростированной спермой представил В. Норкин et al. (2012). По данным автора, из 5 осемененных маток только две дали потомство рабочих пчел более 50%, у остальных маток наблюдали смешанный расплод или только трутневый. При этом у В. Норкин et al. (2012) отсутствует информация о сроке хранения спермы трутней в жидком азоте.

А. Gul et al. (2017), с целью снижения токсического воздействия ДМСО на качество спермы, использовали в качестве экстендеров глюкозу, семенную плазму спермы барана, семенную плазму спермы трутней медоносной пчелы и буфер. По результатам искусственного осеменения пчелиных маток 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 (А. Gul, et al., 2017).

М. Paillard (2016) обнаружил жизнеспособность сперматозоидов $76,0 \pm 5\%$ в образце, хранившемся 330 сут. 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 (M. Paillard, 2016).

Во время длительного хранения в жидком азоте сперматозоиды подвергаются воздействию целого ряда факторов, вызывающих структурные и функциональные изменения клеток. Данные процессы могут быть сгенерированы тем или иным видом криофилактика, используемым в составе экстендера. Недавние исследования показывают, что токсичность ДМСО может выражаться эпигенетическими изменениями в структуре ДНК сперматозоидов угрей. В связи с чем, были разработаны протоколы замораживания спермы рыб на основе метанола (J. Herranz-Jusdado et al., 2019; K. Nomura et al., 2018). Криоконсервация на основе метанола с добавлением яичного желтка способствовала значительному улучшению подвижности сперматозоидов после замораживания-оттаивания (J. Herranz-Jusdado et al., 2019).

Использование этилового спирта в составе среды для замораживания спермы хряка увеличило абсолютный показатель живучести сперматозоидов на 34 - 41% больше по сравнению с контролем (Т. Епишина, 2011). Введение этилового спирта в оптимальном количестве в состав среды для хранения спермы в охлажденном состоянии позволяет снизить активацию процесса перекисного окисления липидов.

Повреждение сперматозоидов в процессе длительного хранения в жидком азоте может быть уменьшено путем оптимизации типов криопротекторов, реакции среды разбавителя (рН). По мнению отечественных исследователей (В. Милованов, 1962) реакция среды оказывает значительное влияние на жизненный ресурс семени. Так, например, сочетание кислой реакции с пониженной температурой среды создает условия для торможения подвижности спермиев, замедляя метаболизм в них, способствует наиболее долгой их сохранности.

Использование изотонических сред на основе сахаридов с пониженным содержанием катионов оказалось наиболее эффективным для гипотермического хранения спермы человека и лабораторной мыши (J. Riel, et al., 2011), осетровых рыб (Д. Исаев, с соавт., 2016; K. Golshahia, et al., 2018), криоконсервации спермы

быков (R. Sitaula, et al., 2010).

Отдельного внимания заслуживает натуральный пчелиный мед, как богатейший природный 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), фолиевую кислоту (URL: <https://ru.wikipedia.org/wik>). 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 у лошадей (R.I. El-Sheshtawy, D.A. El-Badry, 2016), быков (A. Malik, et al., 2017; R.I. El-Sheshtawy, El- W.S. Nattat, et al., 2014), буйволов (M.M.M. Kandiel, A.R.M. El-Khawagah, et al., 2019), коз (M. Shikh Maidina, M.H. Padlana, et al., 2018), баранов (A.A. Zaghoul 2017; R. Jerez-Ebensperger, L. Gil, et al., 2015), крыс и мышей (N.S. Syazana, N.H. Hashida, et al., 2011; K.M.A. Zoheir, G.I. Harisa, et al., 2015), рыб (N.A. Fanni, M.B. Santanumurti, et al., 2018; F. Ogretmen, B.E. İnanan 2014; A. Sunarma, et al., 2010), человека (M-R., M-B. Fakhrildin, 2014).

Повреждения акросомы и изменения в конденсации хроматина, индуцируемые процессами замораживания и оттаивания клетки (C. Gravance, et al., 1998), отражаются должным образом на морфологии сперматозоидов и их морфометрических параметрах. Предыдущие исследования показали влияние глубокого замораживания на морфометрию головки сперматозоидов быка (C. Gravance, et al., 1998), человека (L. Thomson, et al., 1994), жеребца (R. Arruda, et al., 2002), собаки (T. Rijsselaere, et al., 2004), благородного оленя (M. Estes, et al., 2005). Этими работами выявлено уменьшение головок сперматозоидов из заморожено-оттаянных образцов в сравнении со свежееотобранными. Морфологические и морфометрические показатели сперматозоидов более тесно коррелируют со скоростью оплодо-

творения, чем концентрация сперматозоидов и их подвижность (A. Hinting, et al., 1990; W. Duncan, et al., 1993).

Длительное хранение спермы требует наличия дорогостоящего низкотемпературного оборудования, хладагентов, криопротекторов и многое другое. Анализ состояния работ (А. Бородачев, В. Бородачева, 1977; В. Какпаков, с соавт., 1993; Л. Лазарева, 2014; Н. Poole, S. Taber. 1970; A. Collins, 2000; В. Hopkins, et al., 2017) показывает, что возможности сохранения спермы трутней при положительных температурах далеко не исчерпаны и задача по разработке технологии хранения без криоконсервации сохраняет актуальность. Одно из перспективных направлений – это поиск питательной среды для сперматозоидов и оптимального температурного режима хранения. А. Бородачев, В. Бородачева (1977) обнаружили от 50 - 100% подвижных сперматозоидов в образце спермы, хранившемся в течение пяти месяцев при температуре 10, 15 °С в бикарбонатно-фосфатной среде для быков и среде для спермы барана (по С.П. Белякову). Л. Лазарева (2014) показала возможность хранения сперматозоидов при 4 °С в течение одиннадцати месяцев с использованием глюкозно-фосфатного буфера с пузырьками луковиц трутней и антибиотиками. W. Skowronek, Z. Koprascka (1983), A. Collins (2000) исследовали возможность хранения разбавленной спермы при температуре 12, 25 °С в запаянных ампулах в течение года. По данным А. Collins (2000) образец спермы, хранившийся при 12 °С (в холодильнике), по истечении 9 недель хранения имел показатель жизнеспособности 62,2%, а к 52 неделям 42,2%. У образца, хранившегося при 25 °С, к 52 неделям показатель жизнеспособности сперматозоидов снизился до 18,9% (А. Collins, 2000).

Аналогичные результаты были получены ранее W. Skowronek, Z. Koprascka (1983). При осеменении маток спермой, хранившейся три недели при 12 °С и шесть недель при 13 °С, приступивших к яйцекладке было 83 и 86,4%, а в контрольной группе (осеменение свежей спермой) 87% (W. Skowronek, Z. Koprascka, 1983; Z. Koprascka, 1987). Начало яйцекладки наблюдали через 10,5, 12 и 8,9 сут. после осеменения, а концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток составила 2,99, 3,15 млн/мкл и 4,77 млн/мкл в контрольной группе (W. Skowronek, Z.

Конораска, 1983; Z. Конораска, 1987).

W. Skowronek, J. Szymula (1998) сохранив образцы спермы при 12 °С и комнатной температуре (16, 22 °С) в течение 48 ч, провели искусственное осеменение маток, предварительно разбавив хранившиеся образцы 1 : 1 с раствором Нуса (Ф. Рутнер, 1975). Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, осемененных образцом, хранившемся при 12 °С, составила 3,2 млн/мкл, против 2,4 млн/мкл образца хранения при комнатной температуре и 3,0 млн/мкл свежееотобранной спермы с разведением (контроль) (W. Skowronek, J. Szymula, 1998).

Одновременно ведется поиск возможностей по сохранению спермы без разбавления. Особого внимания заслуживает работа американских исследователей (В. Норкин, et al., 2017). Применяв противомикробное средство в виде геля, авторы достигли более 70% жизнеспособности сперматозоидов в течение 439 сут. хранения при 14 °С.

Работы по сохранению спермы вне организма пчелиной матки выполняются в экспериментальных условиях, так как механизм консервации в семяприемнике матки до конца не изучен (Л. Лазарева, 2014).

Анализ литературы свидетельствует о том, что для оценки качества спермы после длительного хранения в жидком азоте следует применять наиболее важные функциональные показатели, такие как: жизнеспособность сперматозоидов (методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии), подвижность, морфологические и морфометрические параметры сперматозоидов.

По итогам обзора литературы выявлены следующие противоречия:

- разные данные по температуре и времени оттаивания спермы после длительного хранения в жидком азоте;
- отсутствие достоверной информации о влиянии центрифугирования на жизнеспособность сперматозоидов;
- о сохранении сперматозоидами оплодотворяющей способности после длительного хранения в жидком азоте;
- о возможности длительного (более года) сохранения неразбавленной спермы при положительных температурах;

- специалистами мира в области криобиологии медоносной пчелы ведется активный поиск криофилантика альтернативного ДМСО. По мнению ряда ученых диметилсульфоксид может оказывать токсическое воздействие на сперматозоиды трутней.

2.1.2 Качественные показатели пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной и охлажденной спермой

Оплодотворяющая способность консервированной спермы оценивается по количеству оплодотворенных яиц, откладываемых искусственно осемененной маткой и дальнейшему качеству печатного расплода (А. Бородачев, В. Бородачева, 1977; В. Hopkins, et al., 2012). Однако хорошие показатели подвижности сперматозоидов после хранения часто сопровождаются последующим снижением их оплодотворяющей способности (N. Koeniger, 1970 a, 1970 b; S. Locke, et al., 1990).

В животноводстве оценку потенциала воспроизводительной способности самцов разделяют на лабораторную оценку качества спермы и по результатам осеменения (В. Багиров, с соавт., 2015). Оценка по результатам осеменения, по мнению авторов, является наиболее точной. Но, в случае обладания производителем спермой низкого качества, могут ухудшиться экономические показатели исследований (В. Багиров, с соавт., 2015). По мнению авторов, лабораторный анализ качества спермы по одному важному критерию, не дает объективной информации о биологической полноценности сперматозоидов. Оплодотворение зависит от множества факторов, так как сперматозоид является сложным биологическим объектом. Лабораторная оценка качества спермы позволяет выявлять образцы, непригодные для искусственного осеменения (Б. Иолчиев, с соавт., 2011).

Важным физиологическим показателем пчелиной матки, определяющим ее воспроизводительные способности, является концентрация сперматозоидов в семяприемнике (Г. Василиади, 1991; В. Броварский, 2005 a; S. Cobey, 2007). J. Wegener et al. (2012), A. Gul et al. (2017) выявили положительную корреляцию между концентрацией сперматозоидов в семяприемнике маток и количеством оплодотворенных яиц, откладываемых маткой ($r = 0,54$ и $r = 0,91$).

Концентрация сперматозоидов менее 4 млн/мкл может приводить к преждевременной замене маток пчелами (J. Woyke, 1989, цитировано по S. Cobey, 2007).

Концентрация сперматозоидов в семяприемнике искусственно осемененных маток варьируется от 3 до 6 млн/мкл, а у маток естественного спаривания от 4 до 7 млн/мкл (J. Harbo, 1986, цитировано по S. Cobeу, 2007). J. Wilde (1994, цитировано по S. Cobeу, 2007) сообщил о диапазоне от 4,1 до 5,9 млн сперматозоидов для маток естественного спаривания и искусственно осемененных от 2,1 до 4,8 млн. D. Gerula et al. (2012) в своих исследованиях не выявили существенной разницы в концентрации сперматозоидов в семяприемнике между искусственно осемененными матками и естественно спарившимися (4,918 млн/мкл и 4,892 млн/мкл). Авторы указывают на большой лимит показателя концентрации сперматозоидов у маток естественного спаривания, в отличие от искусственно осемененных. Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток не оказывает существенного влияния на начало яйцекладки маток (D. Gerula, et al., 2012).

При искусственном осеменении пчелиных маток свежееотобранной спермой применяется стандартная доза 8 - 12 мкл спермы (S. Cobeу, 2007, 2013). Многократные осеменения малыми дозами до 8 мкл статистически не отличаются от однократного, но при этом требуют дополнительных затрат, подвергая риску заражения маток инфекцией и получению травм (S. Cobeу, 2007). M. Więńkowska et al. (2011) обнаружили 6,8 млн/мкл сперматозоидов в семяприемнике маток, осемененных четырехкратно дозой 2 мкл, 6 млн/мкл у маток, осемененных двукратно по 4, 2 и 3 мкл спермы. Трех и четырехкратное осеменение объемом 1 мкл определило концентрацию сперматозоидов в 5 млн/мкл. Осеменение однократными дозами 6 и 8 мкл спермы приводило к образованию около 4 млн сперматозоидов в семяприемнике маток (M. Więńkowska, et al., 2011). А. Маннапов с соавт. (2013), проводив сравнительное изучение технологий искусственного осеменения, показали концентрацию сперматозоидов $4,8 \pm 0,18$ млн/мкл при трехкратном осеменении дозой 4 мкл (3×4) по европейской технологии, $4,89 \pm 0,3$ млн/мкл при 3×4 мкл спермы по американской технологии и $6,4 \pm 0,27$ млн/мкл при 2×6 мкл спермы по технологии В. Броварского (В. Броварский, В. Стащенко, 1990; В. Броварский, 2002; А. Маннапов, с соавт., 2011; В. Ляхов, 2010). В. Броварский (1991, 2005) обнаружил наибольшую концентрацию сперматозоидов в семяприемнике

маток одно-, двух- и трехкратно искусственно осемененных общим объемом спермы 12 - 15 мкл. Аналогичные данные были получены W. Skowronek et al. (1995). Наибольшая концентрация сперматозоидов 5,0 млн/мкл обнаружена в семяприемнике маток, осемененных 2×8 мкл разбавленной спермы, 3,1 млн/мкл при 1×16 мкл и 3,48 млн/мкл при 1×8 мкл свежееотобранной спермой без разбавления (контроль) (W. Skowronek, et al., 1995). По данным J. Woyke (1983), рабочие пчелы охотнее проявляют интерес к маткам, осемененным объемом 4 и 8 мкл спермы.

Искусственное осеменение заморожено-оттаянной спермой имеет свои технологические особенности. В связи с чем, применяют следующие дозировки: 4 мкл (J. Harbo, J. Williams, 1987), 8 мкл (A. Collins, 2000; А. Бородачев, О. Кабашова, 2007), 5 мкл (B. Hopkins, et al., 2012), 8 - 10 мкл (M. Paillard, 2016).

Эффективность миграции сперматозоидов в семяприемник матки зависит от объема вводимой спермы (S. Cobey, 2007) и условий приема маток после искусственного осеменения (V. Vesely. 1970; J. Woyke, 1979, 1980, 1982, 1990; А. Маннапов, 2001). При введении небольших объемов от 1 до 2 мкл миграция сперматозоидов происходит в течение 4 - 8 ч, а при введении 4 - 8 мкл в течение 40 ч (J. Woyke, 1983). M. Bieńkowska et al. (2011) наблюдали полностью свободные от спермы яйцеводы маток после введения 1 - 2 мкл спермы и наличие остатков спермы при осеменении большими дозами. По данным V. Vesely (1970) наибольшее количество сперматозоидов мигрировало в семяприемник маток, осемененных 6 мкл спермы и подсаженным в семью после осеменения без предварительной изоляции. J. Woyke (1979) после искусственного осеменения 96 маток объемом спермы 8 мкл, обнаружил концентрацию сперматозоидов 5,3 млн/мкл в семяприемнике маток, имевших свободный доступ к пчелам и передвижению по гнезду, а у маток с предварительной изоляцией от пчел концентрация сперматозоидов составила 3 млн/мкл. У осемененных маток, подсаженных сразу после процедуры осеменения, J. Woyke (1989, цитировано по S. Cobey, 2007) определил концентрацию сперматозоидов 5,2 млн/мкл по сравнению с матками в изоляции (1,8 млн/мкл). Ухаживание рабочими пчелами за маткой непосредственно после

осеменения, может давать лучшие результаты, нежели использование повторного осеменения (J. Woyke, 1989, цитировано по S. Cobey, 2007; Г. Галкина, С. Кадора, 2015).

J. Woyke, Z. Jasinski (1980, 1982) констатировали увеличение концентрации сперматозоидов в семяприемнике маток от 1,8 млн/мкл до 4,1 млн/мкл после увеличения численности рабочих пчел в свите матки от 20 до 350 особей. Наличие в нуклеусе 20 - 40 рабочих пчел способствовало повышению температуры внутри гнезда нуклеуса на 2 - 3 °С. Тогда как в присутствии 250 или 350 рабочих пчел, температура повышалась на 12 - 14 °С, достигая в расплодной части гнезда нуклеуса 32,7 °С и 34,6 °С (J. Woyke, Z. Jasinski (1980, 1982). Авторы выявили сильную взаимосвязь между количеством рабочих пчел в гнезде нуклеуса, температурой и концентрацией сперматозоидов в семяприемнике маток. J. Woyke, Z. Jasinski (1990) установили взаимосвязь между численностью рабочих пчел нуклеуса и началом яйцекладки искусственно осемененных маток. Так, при наличии 150 особей матка начинала откладывать яйца по истечении 15 сут. после осеменения, в присутствии 350 и 750 особей – 13,5 и 11,5 сут., соответственно. При подсадке искусственно осемененных маток в пчелиные семьи с численностью 9 500 рабочих пчел яйцекладка начиналась в среднем на 7 сут. после осеменения (J. Woyke, Z. Jasinski, 1990).

Во время искусственного осеменения и естественного спаривания маток наблюдается снижение жизнеспособности сперматозоидов в их половых путях (H. Gençer, et al., 2014). Авторы обнаружили значительное снижение жизнеспособности сперматозоидов (10%) в парных яйцеводах маток, возвращающихся в гнездо после спаривания (88,7%), по сравнению с жизнеспособностью сперматозоидов в семенных пузырьках трутней (98,1%). Результаты авторов показали снижение жизнеспособности сперматозоидов во время искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса (3,3%) и после ввода спермы при инструментальном осеменении маток (6,1%) (H. Gençer, et al., 2014).

Анализ литературы свидетельствует о том, что для оценки качества маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой необходимо применять следующие

функциональные показатели: концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, наличие остатков спермы в парных яйцеводах через 48 ч после осеменения маток, качество печатного расплода (количество отложенных оплодотворенных яиц).

По итогам обзора литературы выявлено противоречие по объему вводимой спермы и кратности осеменения пчелиных маток.

2.1.3 Изучение функциональных показателей половозрелых трутней и оптимальных условий их воспроизводства

В каждой пчелиной семье поддерживается биологически обоснованное равновесие между соотношением особей. Количество трутней в семье регулируется пчелами, а фактором, влияющим на этот показатель, является феромон, выделяемый самими трутнями (Т. Seeley, R. Morse, 1976; В. Ваер, 2005; А. Скиркявичюс, 2000; Р. Риб, 2005; А. Бородачев, О. Кабашова, 2007). Поэтому селекционер должен повышать требования при выводе трутней к силе отцовских пчелиных семей, условиям кормления и содержания, температурному режиму и т.д.

Подготовка отцовских семей имеет решающее значение, обеспечивая к моменту отбора спермы на хранение возможность выращивать необходимое количество трутней и контролировать их качество.

Трутни, выращенные в здоровых, сильных семьях при хорошем кормлении в стадии личинки и в первые дни стадии имаго, более жизнеспособны, крупнее и обладают спермой высокого качества (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007).

Отцовские пчелиные семьи выделяют из числа наиболее продуктивных, зимостойких, здоровых и типичных для размножаемой породы и линии пчел (Я. Коперницки, Л. Кепеня, 1987; А. Бородачев, В. Бородачева, 1989; А. Бородачев, с соавт., 2012). При сборке гнезд на зиму в середину гнезда отцовских семей ставят трутневые соты, в которых наряду с пчелиными ячейками имеются и трутневые. В такие соты матки весной охотнее откладывают яйца. Чтобы ускорить начало выращивания трутневого расплода, отцовские семьи выставляют из зимовника для очистительного облета на две недели раньше обычного срока (Ф. Руттнер, 1975; А. Бородачев, В. Бородачева, 1989; А. Бородачев, О. Кабашова, 2007; А. Бородачев, с соавт., 2012).

С этой же целью отцовские семьи ставят в зимовку с матками-трутовками. Такие семьи выходят из зимовки с молодыми трутнями в гнезде. Чтобы получить матку-трутовку, от племенной матки выводят дочерей, которых трехкратно с су-

точным интервалом в течение 10 мин. обрабатывают углекислым газом. Обработанную матку выдерживают в клеточке 5 - 10 сут., а затем подсаживают в сильную, подготовленную для этих целей семью. Весной семье с маткой-трутовкой обязательно периодически ставят рамки со зрелым расплодом от других семей (Ф. Руттнер, 1975; А. Бородачев, В. Бородачева, 1989; А. Бородачев, О. Кабашова, 2007; А. Бородачев, с соавт., 2012).

И. Хруст и др. (1984) исследовали возможность получения трутней осенью в нормальных пчелиных семьях с целью их дальнейшего сохранения в зимний период в безматочных и семьях с неплодными матками. Осенние наблюдения показали, что при благоприятной погоде трутни совершали облет, но в течение зимовки все трутни погибли (И. Хруст, 1984).

Существует несколько способов получения трутней в любые сроки сезона:

1. Заключение матки на трутневом соте в рамочном изоляторе из разделительной решетки. Изолятор с маткой ставят между сотами с расплодом. Через трое суток сот с яйцами вынимают из изолятора и ставят в гнездо, а матке в изолятор ставят новый (Ф. Руттнер, 1975; А. Бородачев, В. Бородачева, 1989; А. Бородачев, О. Кабашова, 2007; А. Бородачев, с соавт., 2012).

2. Получение яиц от маток-трутовок. Плодную матку охлаждают весной при температуре 0 - 5 °С в течение 6 - 8 часов подряд. Во время обработки матка впадает в оцепенение, затем, при обычных температурах она приходит в нормальное состояние и в течение 10 сут. откладывает исключительно неоплодотворенные яйца (А. Бородачев, В. Бородачева, 1989; А. Бородачев, О. Кабашова, 2007; А. Бородачев, с соавт., 2012).

3. Побуждение пчел к откладыванию яиц. Формируют отводки из молодых пчел, которых стряхивают на трутневые соты. Пчел кормят белковым кормом, и у них начинают функционировать яичники. Примерно через 10 сут. пчелы начинают откладывать яйца. Соты с трутневым расплодом от таких семей представляют на воспитание сильным семьям с целью улучшения качества трутней (В. Шаскольский, 1985; А. Бородачев, В. Бородачева, 1989; А. Бородачев, О. Кабашова, 2007; А. Бородачев, с соавт., 2012; Н. Gencer, Y. Kahya, 2011).

Трутни, полученные от маток-трутовок и пчел-трутовок, при правильном воспитании по развитию и производству спермы отвечают необходимым требованиям и, безусловно, являются потомством племенной семьи. По данным В. Шаскольского (1985) трутни от пчел-трутовок содержат наследственность не только матки, но и всех трутней полиандрического скрещивания и не в произвольных количествах, а в тех долях, в которых она входила в суммарную наследственность рабочих пчел-дочерей (В. Шаскольский, 1985). Суммарная наследственность трутней от пчел-трутовок такая же, как у рабочих пчел семьи, создавших ее продуктивность.

По данным Н. Gencer, Y. Kahya (2011) объем эякулята трутней, полученных от пчел-трутовок (0,66 мкл) был меньше чем у трутней, полученных от плодных маток (1,01 мкл) на 53%. Концентрация сперматозоидов трутней от плодных маток составила $7,256 \times 10^6$ /мкл, трутней от пчел-трутовок $6,661 \times 10^6$ /мкл. При оценке жизнеспособности сперматозоидов и длины их тела никаких существенных различий не обнаружено (Н. Gencer, Y. Kahya, 2011).

Содержать отцовские семьи необходимо вблизи лаборатории, имея доступ для работы в любое время. Разработано несколько способов содержания племенных трутней (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007; А. Бородачев, с соавт., 2012):

- в инкубаторах вне улья;
- в различных клеточках из разделительной решетки, помещенных в отцовские семьи;
- в одном из корпусов, отделенном от дна улья решеткой. Трутни свободно перемещаются по сотам гнезда, но вылета на волю не имеют;
- с применением различных летковых заградителей;
- с применением облетников для трутней, изготовленных из марли или сетки, натянутых на каркас. Облетники можно устанавливать с другой стороны улья, чтобы не мешать лету пчел. В часы лета трутней открывают леток и перед ним устанавливают облетник, в который они вылетают. В таких облетниках наблюдают также за гибелью трутней.

В. Броварский (2015) предложил вариант, обеспечивающий продолжитель-

ную сохранность трутней на протяжении весенне-летнего периода. Трутней сохраняли в трехрамочном изоляторе с кормовыми рамками, размещая в гнезде отцовской семьи. При неблагоприятных погодных условиях затраты времени на отбор 50 половозрелых трутней для нужд искусственного осеменения сокращались в два раза в сравнении с обычной технологией содержания.

Интересен опыт получения ранних трутней при выводе ранних неплодных маток в условиях Южного Урала России (С. Циколенко, с соавт., 2011). Сформированные три группы экспериментальных отцовских семей размещались в теплице. В качестве побудительной подкормки семьи получали 50%-ный сахарный сироп, белковую подкормку (пыльца с медом), белковую подкормку с феромонной композицией кандисил (С. Циколенко, с соавт., 2004). Наибольшую массу, $261,1 \pm 3,09$ мг, имели трутни, выращенные в отцовских семьях со стимулирующей белковой подкормкой с кандисилом.

Ф. Abdelkader, G. Kairo (2013) сообщили о низкой концентрации сперматозоидов ($2,5 \pm 0,1 \times 10^6$ /мкл) трутней, содержащихся в инкубаторе при температуре 34°C и относительной влажности 70% в сравнении с трутнями, полученными в пчелиных семьях, расположенных в сетчатых изоляторах на воле ($3,4 \pm 0,4 \times 10^6$ /мкл). Концентрация сперматозоидов у трутней, выращенных в семьях на воле, составляла в среднем $2,2 \pm 0,6 \times 10^6$ /мкл. Трутней в этих семьях сосредоточивали в верхнем корпусе, отделенном от основного гнезда разделительной решеткой. Семьи, расположенные в сетчатом изоляторе на воле, подкармливали 50%-ным сахарным сиропом ежедневно с 9 - 12 часов. По истечении этого времени давали вволю воду и пыльцу. Наиболее жизнеспособной оказалась сперма трутней, выращенных в лабораторных условиях на 34 и 38% соответственно.

В. Панюков (1996), М. Wińkowska et al. (2011) указали на значительное влияние температурных условий содержания половозрелых трутней на качество спермы. Наибольшее количество мертвых сперматозоидов (40,3%) М. Wińkowska et al. (2011) обнаружила в семяприемнике искусственно осемененных маток спермой трутней, содержащихся при температуре свыше 40°C . Наименьшее количество мертвых сперматозоидов имела сперма от трутней, содержащихся при 30 - 35

°С. В. Панюков (1996) определил наибольший процент (до 86%) трутней с активной спермой, развивавшихся при оптимальной температуре 34 - 35 °С. Незначительное уменьшение (до 81%) отмечено с понижением температуры на 3 °С от нижнего предела температурного оптимума и резкое падение до 32% с повышением на 1 °С от верхнего предела (В. Панюков, 1996 а). Размещение печатного расплода трутней на десять часов в камеру с температурой 22 - 23 °С приводило к понижению концентрации сперматозоидов у суточных трутней на 7,3% в сравнении с контролем (В. Панюков, 1996 б).

Методы, предусматривающие содержание трутней с частичным облетом или без него, сокращают жизнь трутней и являются трудоемкими. Отбор спермы от таких трутней сопровождается их частыми испражнениями (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007; А. Бородачев, с соавт., 2012; Г. Галкина, С. Кадора, 2013). Лучшим, по мнению авторов, является метод, позволяющий трутням осуществлять свободный вылет из улья. Использование этого метода сопровождается обязательным мечением трутней, что позволяет контролировать их возраст.

S. Cobey (2007), также указывает о влиянии на качество трутней и их выживаемость, условий выращивания и сохранения до полового созревания. Использование акарицидов в лечении пчелиных семей от болезней и вредителей уменьшает количество выращиваемого расплода и продолжительность жизни трутней (R. Currie, 1987; T. Rinderer, et al., 1998; T. Haarman, et al., 2002).

Матки, получившие высококачественную сперму, способны создавать сильные пчелиные семьи. Что же определяет качество спермы?

Качество спермы неразрывно связано с возрастом половозрелых трутней (S. Cobey, 2007), временем выращивания и их генетическим происхождением (J. Woyke, Z. Jasinsky, 1978; S. Locke, Y. Peng, 1993; S. Zaitoun, et al., 2009). Еще в середине прошлого века имелись опытные данные относительно половой потенции трутней. Согласно этим результатам, наибольшее количество половозрелых трутней, энергично выбрасывающих совокупительный орган, извергающих семя и слизь, способных спариваться с маткой, бывает в возрасте старше 20 сут. (Н. Куренной, 1954). J. Woyke, Z. Jasinsky (1978), осеменявшие кавказских маток в тече-

ние трех сезонов подряд, установили взаимосвязь между возрастом трутней и концентрацией сперматозоидов в семяприемниках маток. Так, например, в третий сезон осеменений концентрация сперматозоидов от 14 сут. трутней составила 4,097 млн/мкл, а от 36 сут. - 3,175 млн/мкл. J. Harbo и J. Williams (1987) считали сперму, полученную от трутней в возрасте 10 - 21 сут., наиболее подходящей для искусственного осеменения пчелиных маток. A. Łangowska, et al., (2009) обнаружили более жизнеспособную сперму 91,8% у 14 сут. трутней, содержащихся в лабораторных условиях, в сравнении с 10 сут. В сравнении данных возрастных групп трутней по содержанию в обычных условиях (пчелиные семьи на воле) различия в показателях жизнеспособности оказались не достоверными (84,4% и 85,2%) (A. Łangowska, et al., 2009). J. Rhodes, S. Harden (2010), исследуя взаимосвязь между продуцированием спермы трутней, их возрастом, временем года и принадлежностью к определенной селекционной линии выявили наибольшую концентрацию сперматозоидов $3,76 \times 10^6$ /мкл у трутней в возрасте 21 сут. Трутни в возрасте 35 сут. имели концентрацию сперматозоидов $3,35 \times 10^6$ /мкл, у 14 сут. она составила $3,27 \times 10^6$ /мкл. A. Collins, J. Pettis (2001), исследуя влияние варрооза на качество спермы трутней, определили среднюю концентрацию сперматозоидов 12 сут. трутней в $8,6 \times 10^6$ /мкл. По данным D. Andersen (2004) трутни в возрасте 27 сут. из контрольных пчелиных семей без использования кормовых добавок имели концентрацию сперматозоидов $3,19 \times 10^6$ /мкл.

Имеющиеся данные по сперматогенезу трутней связаны с исследованиями сперматозоидов в семенных пузырьках трутней. По данным Н. Шмелевой (1975) наиболее активные и хорошо эякулирующие трутни наблюдаются в возрасте 13-15 сут. В семенных пузырьках таких трутней обнаружили максимальное накопление жизнеспособной спермы высокой концентрации. Высокую метаболическую активность сперматозоиды трутня приобретают с седьмых сут. после выхода имаго и становится максимальной на десятые сут. жизни трутня (А. Молодюк, 1978, 1979). Изучая поведение трутней в отцовских пчелиных семьях, В. Броварский (2006) отмечает начало продуцирования спермы и появление рожек луковицы ярко-желтого или розового цвета у трутней на 9 - 11 сут. Таким образом, по его

мнению, трутней в возрасте старше девяти сут. можно использовать для отбора спермы. По результатам исследований Т. Rinderer et al. (1999) концентрация сперматозоидов в препарированных семенных пузырьках трутней 12 сут. возраста составила $4,2 \times 10^6$ /мкл. В работе Р. Duay et al. (2002) 12 сут. трутни *Apis mellifera carnica* имели концентрацию сперматозоидов в среднем $7,5 \times 10^6$ /мкл. А. Rousseau et al. (2015) выявили наличие спермы на конце эндофаллоса, при искусственной стимуляции, в 87% случаев у трутней в возрасте 35 сут. и 64% случаев у 14 сут. трутней. J. Rhodes et al. (2010), А. Collins и J. Pettis (2001), D. Andersen (2004) обнаружили наличие спермы в 40,6% случаев у трутней в возрасте от 14 до 35 сут.. М. Phiancharoen et al. (2004) искусственно осеменяли пчелиных маток *Apis mellifera* спермой трутней 4 видов семейства *Apis*. Отбор трутней для сбора спермы из семенных пузырьков авторы проводили в период активного спаривания с матками. Средняя концентрация сперматозоидов трутней *Apis mellifera* составляла $7,6 \times 10^6$ /мкл (М. Phiancharoen, et al., 2004).

S. Locke и Y. Peng (1993) сообщали ранее о сокращении жизнеспособности спермы с 86% у 14 сут. трутней до 81% у трутней в возрасте 28 сут. К. Czekońska et al. (2013) обнаружили увеличение жизнеспособности сперматозоидов с 88% у 15 сут. трутней до 91% у трутней в возрасте 30 сут. По мнению К. Czekońska et al. (2013), увеличение жизнеспособности сперматозоидов связано с постепенным половым созреванием трутней. Низкая концентрация сперматозоидов у молодых трутней объясняется тем, что после искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса, большее количество спермы остается в их семенных пузырьках (J. Rhodes, 2008). J. Woyke (2008), анализируя технику искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса, предположил, что внутри частично вывернутого эндофаллоса образуется недостаточное давление для высвобождения спермы.

К. Czekońska et al. (2015) дальнейшими исследованиями установили причину отсутствия эякуляции спермы, связав ее с анатомическими изменениями и недостаточным развитием слизистых желез половой системы трутней. Функции слизистых желез активизируются с возрастом трутней и достигают полной зрелости.

сти между 9 - 12 сут. после появления в стадии имаго (С. Cruz-Landim, R. Dallacqua, 2005; L. Moors, et al., 2005). У К. Czekońska et al. (2015) не все трутни достигали своего полного развития в пределах этого временного диапазона. Очень часто трутни различаются в стадии развития слизистой оболочки даже через 15 сут. в стадии имаго (Н. Gençer, С. Firatli, 2005; А. Mazeed, К. Mohanny, 2010; К. Czekońska, et al., 2013). Секреция слизистых желез играет важную роль при передаче спермы трутнем в репродуктивные органы матки во время их спаривания (N. Colonello, К. Hartfelder, 2005; J. Woyke, 2008, 2010; G. Koeniger, et al., 2011). Генерация секреции слизистых желез заканчивается у трутней при их полном половом созревании (С. Cruz-Landim, R. Dallacqua, 2005).

Половая зрелость трутней сопровождается не только полным опорожнением семенных пузырьков, но и повышением жизнеспособности спермы (К. Czekońska, et al., 2013). Авторы считают, что трутни, обладающие высокими показателями жизнеспособности сперматозоидов, имеют более высокую выживаемость. Ю. Черевко (1998) отметил, что половое созревание трутней сопровождается их отходом в пределах 37 - 48%.

J. Rhodes (2008) выявил сезонное изменение показателей качества спермы трутней. Так, половозрелые трутни весенней генерации, обладая большим объемом спермы $1,1147 \pm 0,0418$ мкл, в сравнении с трутнями летней ($0,9752 \pm 0,0508$ мкл) и осенней генераций ($0,8728 \pm 0,0511$ мкл), имели меньшую концентрацию сперматозоидов $2,19 \pm 0,19$ млн/мкл ($3,48 \pm 0,23$ млн/мкл и $4,72 \pm 0,23$ млн/мкл соответственно). Наиболее высокая жизнеспособность сперматозоидов отмечена у трутней осенней генерации 85%, чем летней 78% и весенней 77%. Существенные различия обнаружены в жизнеспособности сперматозоидов трутней разных возрастов. Так, 14 сут. трутни имели самый низкий показатель 78%, самый высокий показатель жизнеспособности 82% отмечен у трутней 21 сут. (J. Rhodes, 2008). Высокий показатель жизнеспособности трутней осенней генерации автор связывает со способностью пчелиной семьи выживать в зимний период с молодой маткой, спарившейся с такими трутнями для активного развития в последующий весенний период.

М. Sturup et al. (2013) показали снижение качества спермы у трутней в возрасте 20 - 25 сут. Уменьшение жизнеспособности сперматозоидов происходило с увеличением возраста трутней, но только в 3 из 5 опытных пчелиных семей (М. Sturup, et al., 2013). Отсутствие свежей пыльцы, по результатам исследований авторов, не оказывает влияния на жизнеспособность сперматозоидов трутней в стадии имаго, так как сперматогенез и формирование семенных пузырьков заканчиваются в личиночной стадии.

Личинки трутней в первые 3 сут. личиночной стадии снабжаются молочком также обильно, как личинки рабочих пчел и маток. С 4-х сут. возраста пчелы-кормилицы начинают добавлять в корм пыльцу (В. Лебедев, Н. Билаш, 1991).

На всем протяжении личиночной стадии происходит развитие семенников. В возрасте 3 - 6 ч. личинки уже обнаруживаются зачатки двух семенников, которые расположены в спинной части седьмого-девятого сегментов. У 6 сут. личинки сформированы по 200 поперечных канальцев. К концу личиночной стадии семенники достигают полной величины. Стадия личинки у трутня продолжается 7 - 9 сут., стадия куколки 10 - 14 сут. В стадии куколки формируются придаточные железы, семяизвергательный канал и копулятивный орган. Половые органы к 5 сут. развития куколки заканчивают свое формирование (цитировано по В. Лебедеву, Н. Билаш, 1991).

В. Панюков (1996 б), Е. Еськов (1999) обнаружили взаимосвязь между перерывом в кормлении личинок трутней и их морфометрическими признаками в стадии имаго. Под влиянием ограничения кормления личинок, у взрослых особей существенно уменьшалась длина хоботка (от 4 - 10%), незначительно изменялись размеры крыльев (на 2,2%) и четвертого тергита (на 1,1%) (Е. Еськов, 1999). По данным В. Панюкова (1996 б) длина хоботка уменьшилась на 4,2%, длина и ширина переднего крыла на 4 и 2,7%, соответственно. Одновременно у этих трутней автор наблюдал уменьшение массы тела на 7,9%. Независимо от режима кормления личинок у трутней 14 сут. возраста гениталии имели сходное развитие, но при этом существенному изменению подвергалась масса придаточной железы (Е. Есь-

ков, 1999). Масса тела трутней от момента выхода имаго к среднему и старшему возрасту уменьшается в среднем на 18% (Е. Еськов, 1999).

Изменения основных показателей качества спермы в течение активного сезона А. Rousseau et al. (2015) связывает со способностью пчелиной семьи саморегулировать воспроизводство трутней в зависимости от условий окружающей среды. В качестве основных факторов авторы указывают силу пчелиной семьи и обеспеченность кормами (P. Lee, M. Winston, 1987; L. McNally, S. Schneider, 1994; K. Voes, 2010). А. Rousseau et al. (2015) столкнулись с определенными трудностями в получении трутней ранней весной и поздней осенью. Начало мая в Квебеке (Канада) сопровождается цветением одуванчика, являющегося основным источником поступления нектара и свежей пыльцы, а также небольшого количества дикорастущих кустарников и деревьев. Из 143 основных видов медоносных культур на май приходится цветение 32 из них, июнь 64 и июль 88 видов (А. Rousseau, et al., 2015). Поступление свежей пыльцы и нектара оказывает влияние на сперматогенез трутней в течение активного сезона. Из-за отсутствия необходимого количества свежей пыльцы в начале мая, А. Rousseau et al. (2015) наблюдали за проявлением каннибализма у рабочих пчел. Средний показатель жизнеспособности сперматозоидов за активный сезон составил $64,2 \pm 1,07\%$. По данным А. Collins (2000) матки, искусственно осемененные спермой с показателем жизнеспособности 42,5%, откладывают меньшее количество оплодотворенных яиц.

Последствия недостатка пыльцы в рационе пчелиных семей изучаются с точки зрения возможных изменений в поведении рабочих пчел, их физиологии и ветеринарного благополучия по основным заболеваниям (L. Willard, et al., 2011; R. Brodschneider, K. Crailsheim, 2010; K. Foley, et al., 2012; Z. Huang, 2012; G. Di Pasquale, et al., 2013). Гораздо меньше внимания уделяется взаимосвязи полноценного питания трутней и их репродуктивных качеств (M. Sturup, et al., 2013). Влияние дефицита пыльцы на развитие трутней в их личиночной стадии исследовали К. Czekońska et al. (2015), сравнивая качество спермы и способность к эякуляции трутней, выращенных с ограниченным доступом к пыльце и свободным доступом (вволю). Так, по результатам исследований авторов, трутни из группы с

ограниченным доступом к пыльце имели среднюю массу $254 \pm 20,3$ мг и эякулировали на 12% меньше, чем трутни из группы со свободным доступом к пыльце с массой $262 \pm 18,9$ мг. При оценке объема спермы, концентрации и жизнеспособности сперматозоидов трутней, сравниваемые группы существенно не различались друг от друга. У трутней с ограниченным доступом к пыльце средние показатели по объему спермы составили $0,9 \pm 0,27$ мкл, концентрации – $5,666 \pm 1,47$ млн/мкл, жизнеспособности – $97,9 \pm 13,9\%$, а у трутней со свободным доступом – $1,1 \pm 0,79$ мкл объем спермы, $5,456 \pm 1,01$ млн/мкл концентрация и $98,8 \pm 1,23\%$ жизнеспособность сперматозоидов (К. Czekońska, et al., 2015). Ограничение доступа пчелиных семей к пыльце за 10 сут. до появления открытого трутневого расплода не повлияло на качество спермы трутней в их половозрелом возрасте, но привело к уменьшению массы тела и грудной клетки. Отсутствие достоверности различий в показателях качества спермы трутней, сравниваемых групп, авторы объясняют коротким периодом ограничения пчелиных семей от употребления свежей пыльцы. Т. Schmickl и К. Crailsheim (2001) наблюдали первые признаки ограничения на выращиваемых личинках трутней, через 5 сут., но с началом подачи пыльцы изменения прекращались. На различия в показателях по эякуляции трутней, по мнению К. Czekońska et al. (2015), повлияли погодные условия и общее состояние пчелиных семей. Снижение массы тела и грудной клетки свидетельствует о неполноценном развитии трутней. Низкое пропорциональное соотношение массы грудной клетки к общей массе трутня указывает на недостаточное развитие мускулатуры грудной клетки и снижает летные качества трутня.

Н. Schlüns et al. (2003) обнаружили взаимосвязь между концентрацией сперматозоидов и показателями экстерьера трутней. По их данным, размер крыла трутней, выращенных в пчелиных ячейках, оказался на 13% меньше аналогичного показателя трутней, выращенных в трутневых ячейках. Эта разница оказалась существенно большей, чем в исследованиях S. Berg et al. (1997), сообщавших о разнице в 7% (Н. Schlüns, et al., 2003). Средняя концентрация сперматозоидов трутней, полученных из трутневых ячеек, составила $11,95 \times 10^6$ мкл, а трутней из пчелиных ячеек $7,5 \times 10^6$ мкл (Н. Schlüns, et al., 2003). Исследованиями авторов под-

тверждена положительная корреляция между размерами тела трутней и их концентрацией сперматозоидов, сообщенная ранее J. Jarolimek, G. Otis (2001). Более поздние исследования S. Shoukry Rasha, A. Khattaby (2013) также подтвердили наличие положительной корреляции между концентрацией сперматозоидов и размерами крыла.

Проблемы с эякуляцией половозрелых трутней могут возникать из-за некоторых инфекционных и инвазионных заболеваний (Г. Василиади, 1989, 1991; D. Cruz-Landim, et al., 2012; G. Retschnig, et al., 2014; Y. Peng, et al., 2015). Социальные насекомые являются носителями целого ряда паразитов, которые легко распространяются благодаря многочисленности своих семей (P. Schmid-Hempel, 1998, 2011). Болезни, передающиеся половым путем и их последствия на репродуктивные органы трутней и пчелиных маток, еще недостаточно изучены (R. Knell, M. Webberley, 2004; J. de Miranda, I. Fries, 2008; C. Yue, E. Genersch, 2005). Совсем недавно обнаружено присутствие спор *Nosema apis* в эякуляте трутней медоносных пчел. Научные исследования, связанные с применением искусственного осеменения, подтверждают вероятность передачи патогенной микрофлоры во время спаривания (K. Roberts, et al., 2015). Y. Peng et al. (2015) через серию экспериментов с *Nosema apis* сравнили выживаемость инфицированных и неинфицированных трутней и подтвердили наличие спор в репродуктивных органах разновозрастных трутней. Микроскопическое исследование эякулированной спермы позволило выявить наличие спор в сперме половозрелых трутней в возрасте 20 - 25 сут. и полное отсутствие их у трутней в возрасте 9, 13 и 15 сут. Наличие спор в сперме трутней, авторы объясняют повреждением стенок средней кишки, пораженной *Nosema apis*, в результате высвобождения эндофаллоса из брюшной полости. Инфицированные ткани, более подверженные повреждению и разрыву, высвобождают споры *Nosema apis* под давлением гемолимфы и загрязняют сперму трутней (Y. Peng, et al., 2015). Y. Peng et al. (2015) выявили значительное уменьшение жизнеспособности сперматозоидов и гибель инфицированных трутней после 16 сут. возраста. Так, доля инфицированных трутней в возрасте 24 - 25 сут. составила 20,7% от первоначальной численности группы, а кон-

трольной группы 54,7%. Морфологические и гистологические исследования не позволили авторам выявить явные признаки поражения репродуктивных органов спорами *Nosema apis*. Тогда как, методом ПЦР-анализа был установлен низкий уровень инфицированности придаточных желез трутней (Y. Peng, et al., 2015). Авторы выдвинули гипотезу о том, что трутни способны замедлить или предотвратить появление спор этого паразита в своих репродуктивных тканях, тем самым снижая риск передачи инфекции половым путем.

Nosema ceranae, в сравнении с *Nosema apis*, поражает трутней в стадии куколки (B. Traver, R. Fell, 2011). Способствует снижению массы тела, продолжительности жизни взрослых особей и приводит к физиологическим изменениям у рабочих пчел (C. Alaux, et al., 2011). G. Retschnig et al. (2014) установили среднее значение массы тела трутней 170,8 мг, пораженных *Nosema ceranae*, в сравнении с контрольной группой 202,4 мг. Гибель трутней в контрольной группе составила 62,5%, а в группе инфицированных *Nosema ceranae* 87,5%. К сравнению, отход рабочих пчел во время проведения исследований составил 12 - 16% (G. Retschnig, et al., 2014). Авторы подтвердили тот факт, что начало массовой гибели трутней происходит по истечении семи сут. с момента заражения спорами *Nosema ceranae*. Ранее, Q. Huang et al. (2012) установили порог гибели трутней с наличием в их организме менее 2 млн. спор *Nosema ceranae*.

P. Schneider и W. Drescher (1987), K. Schatton и W. Engels (1988), R. Omar (2017) обнаружили обратную связь между массой тела трутней и степенью поражения пчелиных семей варроозом. Масса суточных трутней контрольной группы пчелиных семей составила 259,62 мг, опытной группы 234,48 мг при степени поражения от 2 - 5% и 205,17 мг при степени < 30%. По достижении 21 сут. возраста трутни контрольной группы имели массу 198,34 мг, в опытной группе 172,07 мг (2 - 5%) и 154,87 мг (< 30%). У суточных трутней контрольной группы масса семенников составила 34,14 мг, в опытной группе 22,89 - 6,92 мг, соответственно. Только что вышедшие из ячейки трутни еще не зрелы в половом отношении. На восьмые сут. после выхода трутня его семенные пузырьки уже полностью заполнены сперматозоидами, а семенники сжимаются до одной четверти их первоначальной массы.

чальных размеров (Ф. Руттнер, 1975). С появлением трутня в стадии имаго свое качественное развитие начинают семенные пузырьки и придаточные железы (R. Omar, 2017). Так, по достижении трутнями 17 сут. возраста масса семенников трутней контрольной группы составила 1,95 мг, объем семенных пузырьков 3,21 мм³, объем придаточной железы 5,52 мм³. В опытной группе пчелиных семей со степенью поражения варроозом от 2 - 5% масса семенников 1,22 мг, объем семенных пузырьков 2,21 мм³ и объем придаточной железы 4,26 мм³; в группе < 30% - 0,4 мг, 1,01 мм³ и 2,93 мм³, соответственно (R. Omar, 2017).

R. Moritz (1986) для оценки репродуктивной способности трутней выделил следующие параметры – количество брачных полетов и их продолжительность, объем и концентрацию сперматозоидов. D. Vubalo et al. (2005) выявили очень низкую летную активность и короткую продолжительность жизни трутней, пораженных варроозом. Трутни из таких семей имели концентрацию сперматозоидов $3,6 \times 10^6$ /мкл, в сравнении с инбредными семьями $4,5 \times 10^6$ /мкл и семьями со слабой степенью поражения $6,7 \times 10^6$ /мкл (D. Vubalo, et al., 2005). A. Collins и J. Pettis (2001) не обнаружили снижения качества спермы у трутней, пораженных варроозом. Авторы наблюдали схожие показатели по объему, концентрации и жизнеспособности спермы в обеих исследуемых группах пчелиных семей. В целом, жизнеспособность сперматозоидов варьировала в пределах от 83 до 100% (A. Collins, J. Pettis, 2001). L. Burley et al. (2008) сообщила об аналогичных результатах 88,1 - 99,9% жизнеспособных сперматозоидов.

Varroa destructor является распространителем некоторых вирусных инфекций (D. Cruz-Landim, 2012). Например, вирус деформированного крыла (DWV) и вирус пчелиного типа Kashmir (KBV) также присутствуют у *Varroa destructor*. В своих исследованиях D. Cruz-Landim (2012) сообщил о наличии вирусных включений в семенных пузырьках и придаточных железах трутней медоносных пчел.

Для борьбы с *Varroa destructor* применяется целый комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий, включающий в себя использование акарицидов. Другим фактором, влияющим на качество спермы и ее оплодотворяющую способность, является использование данных препаратов. Лечение пчелиных семей пре-

паратами, содержащими флувалинат, приводило к уменьшению длины крыла трутней на 5,36% и до 2,31% у трутней, подвергшихся воздействию муравьиной кислоты (S. Shoukry Rasha, A. Khattaby, 2013). Кроме того, обработка флувалина- том, амитразом и щавелевой кислотой значительно уменьшила ширину крыла трутней, примерно на 4,57%, 2,27% и 4,52% соответственно, в сравнении с контролем. Применение муравьиной кислоты и тимола, напротив, не оказало существенного влияния на ширину крыла. Трутни, подвергшиеся воздействию флували- ната и амитраза, имели концентрацию сперматозоидов в семенных пузырьках $4,33 \pm 2,03 \times 10^6$ /мкл и $3,55 \pm 1,13 \times 10^6$ /мкл, в сравнении с контролем $5,39 \pm 1,37 \times 10^6$ /мкл (S. Shoukry Rasha, A. Khattaby, 2013). С применением муравьиной кислоты, щавелевой кислоты и тимола авторы не установили значительной разницы в кон- центрации сперматозоидов между сравниваемыми группами. L. Burley et al. (2008) сообщили ранее о снижении концентрации сперматозоидов на 20% у трутней по- сле применения тимола. По данным автора, использование флувалината не оказа- ло существенного влияния на концентрацию сперматозоидов в семенных пузырь- ках $5,33 \pm 0,21 \times 10^6$ /мкл, в сравнении с контролем $5,99 \pm 0,28 \times 10^6$ /мкл. Преды- дущие исследования R. Fell, K. Tignor (2001), T. Rinderer et al. (1999) показали уменьшение концентрации сперматозоидов в семенных пузырьках трутней под воздействием флувалината.

Учитывая изменчивость показателей качества спермы от периода активного сезона и породной принадлежности трутней (J. Rhodes, 2008; A. Rousseau, et al., 2015), встает необходимость ее оценки при искусственном осеменении и подго- товке к длительному хранению в жидком азоте. Сперму оценивают по основным показателям:

- концентрация,
- подвижность,
- жизнеспособность (количество живых и мертвых сперматозоидов).

Van Niem Nguyen (1995) изучая влияние белковых подкормок на качество спермы трутней, проводил отбор образцов спермы, используя метод искусствен- ной стимуляции выворачивания эндофаллоса. Собранный с помощью градуиро-

ванного шприца объем спермы, разбавляли в 1 мл Трис-буфера (L. Verma, 1978) и добавляли 9 мл дистиллированной воды. Для подсчета количества сперматозоидов использовали гемоцитометр Neubauer BS.748 (Van Niem Nguyen, 1995). Существуют различные типы гемоцитометров и расчеты, соответственно, могут различаться между типами (S. Cobey, et al., 2013) (Рисунок 1).

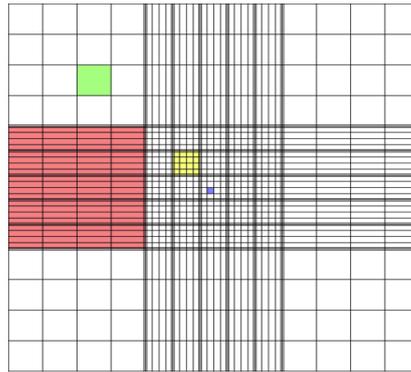


Рисунок 3 - Гемоцитометр Bright-Line (Hausser Scientific)
(S. Cobey, et al., 2013)

Количество сперматозоидов подсчитывали в 10 квадратах (каждый квадрат содержит 16 маленьких квадратов). Концентрацию сперматозоидов рассчитывали по формуле (Van Niem Nguyen, 1995):

$$\begin{aligned} & \text{Количество сперматозоидов, млн / трутень} = & (1) \\ & \text{количество сперматозоидов в 10 подсчитанных квадратах} \times 25 \times 10\,000, \end{aligned}$$

где:

25 = объем раствора спермы в 10 подсчитанных квадратах составляет $1/25 \text{ мм}^3$, поэтому один миллиметр умножается на 25;

10 000 = объем (в мм^3) 10 мл раствора спермы.

По данным автора, концентрация сперматозоидов трутней из пчелиных семей с ограниченным доступом к свежей пыльце составила 5,75 - 8,45 млн/мкл, а в группе с белковыми подкормками 6,75 - 9,5 млн/мкл. J. Rhodes (2008) модифици-

ровал методику определения концентрации сперматозоидов. Автор для отбора спермы использовал станок по инструментальному осеменению пчелиных маток с блоком-шприца Harbo (S. Cobey, et al., 2013). Калиброванный микрометрический шприц с делением 0,2 мкл позволял отбирать сперму с точностью до 0,1 мкл. Объем спермы 0,6 мкл, взятый с кончика эндофаллоса трутня, разбавляли предварительно в 0,5 мл Трис-буфера (L. Verma, 1978), затем, добавляли еще 1 мл Трис-буфера (J. Rhodes, 2008). Степень разбавления спермы рассчитывали следующим образом:

$$1,5 \times 10^{-3} / 0,6 \times 10^{-6} = 2500 \quad (2)$$

С целью уменьшения погрешности при получении результатов, количество сперматозоидов подсчитывали в 25 больших квадратах гемоцитометра Neubauer BS.748 с глубиной камеры 0,1 мм, площадью малого квадрата $1/400 \text{ мм}^2$. Формула для определения концентрации сперматозоидов выглядела так (J. Rhodes, 2008):

$$\begin{aligned} & \text{Количество сперматозоидов, млн / трутень} = \quad (3) \\ & \text{общее количество сперматозоидов в 25 квадратах} \times \text{объем спермы, мкл} \times 25000 \\ & \quad (\text{степень разбавления} \times 10) \end{aligned}$$

A. Rousseau et al. (2015) свежееотобранную сперму трутней делили на равные части по 0,2 мкл. Каждые 0,2 мкл спермы разбавляли в 1,5 мл Трис-буфера (L. Verma, 1978), то есть в 7 500 раз. Подсчет числа сперматозоидов авторы проводили в пяти больших квадратах ($0,1 \text{ мм}^3 = 0,1 \text{ мкл}$) улучшенного гемоцитометра BS.748 (Hawksley Technology, Lancing, United Kingdom, глубина 0,1мм, площадь малого квадрата $1/400 \text{ мм}^2$) с трехкратной повторяемостью для каждого из пяти трутней. Концентрацию сперматозоидов вычисляли по формуле:

$$\begin{aligned} & \text{Количество сперматозоидов, млн / трутень} = \quad (4) \\ & \text{общее количество сперматозоидов в 15 квадратах} \times \text{степень разбавления} 7500 \\ & \quad \times \text{объем спермы, мкл} \end{aligned}$$

J. Woyke (1979) для подсчета числа сперматозоидов из семяприемника маток использовал сетку Фукс-Розенталя глубиной 0,2 мм. Сперму из семяприемника предварительно разбавляли в 1 мл 0,9% NaCl, а затем, добавляли 9 мл дистиллированной воды. Объем полученного раствора составил $10 \text{ см}^3 = 10\,000 \text{ мм}^3$. Подсчет числа сперматозоидов проводили в десяти больших квадратах сетки, общий объем которых составил $2 \text{ мм}^3 (1 \times 1 \times 0,2 \times 10)$. Таким образом, степень разбавления составила $10\,000 / 2 = 5000$ раз. Концентрацию сперматозоидов вычисляли по формуле (J. Woyke, 1979):

$$\begin{aligned} \text{Количество сперматозоидов, млн / трутень} = & \quad (5) \\ \text{общее количество сперматозоидов в 10 квадратах} \times \text{степень разбавления} & \quad 5000 \\ \text{раз} & \end{aligned}$$

Немаловажным критерием оценки качества неразбавленной спермы является подвижность сперматозоидов. S. Locke и Y. Peng (1993) была предложена методика оценки сперматозоидов по характеру их подвижности. Образец свежееотобранной спермы объемом 10 мкл предварительно разбавляли в Трис-буфере. Разбавленную сперму помещали в гемоцитометр Neubauer BS.748 (с глубиной камеры 0,1 мм, площадью малого квадрата $1/400 \text{ мм}^2$) и исследовали подвижность в световом микроскопе под увеличением $400 \times$. S. Locke и Y. Peng (1993) сформировали 5-ти бальную систему оценки:

1. движение отсутствует;
2. $< 50\%$ сперматозоидов вибрирует;
3. $> 50\%$ сперматозоидов вибрирует, но не совершает манежного или поступательного движения;
4. $> 50\%$ сперматозоидов вибрирует, но меньше половины из них с манежным и поступательным движением;
5. $> 50\%$ сперматозоидов совершает манежное и поступательное движение.

J. Rhodes (2008) обнаружил наиболее подвижных сперматозоидов с оценкой 4 балла у трутней в возрасте 35 сут. Сперматозоиды 14 сут. трутней имели оценку 3,08 балла, 21 сут. 3,46 балла. По периодам сезона наиболее активной оказалась сперма трутней весенней генерации 3,66 балла. Летней генерации 3,62 и осенней 3,25 баллов, соответственно (J. Rhodes, 2008).

Для оценки заморожено-оттаянной спермы O. Kaftanoglu и Y. Peng (1984) предложили балльную оценку с градацией от 0 до 5. Каждый балл соответствует процентному выражению подвижности сперматозоидов:

- 0 – подвижность отсутствует;
- 1 – 20% подвижных сперматозоидов;
- 2 – 40%;
- 3 – 60%;
- 4 – 80%;
- 5 - $\geq 95\%$ подвижных сперматозоидов.

Сперма, оцененная только по подвижности и концентрации сперматозоидов, зачастую оказывается с недостаточным количеством морфологически и функционально полноценных сперматозоидов. Это не позволяет достичь высокой оплодотворяемости и результативности осеменения (Е. Никитина, с соавт., 2004). Отсутствие подвижности не является обязательным признаком гибели сперматозоидов (S. Locke, et al., 1990). Важнейшим критерием оплодотворяющей способности спермы трутней, как при естественном спаривании, так и при искусственном осеменении, является жизнеспособность сперматозоидов (H. Gençer, et al., 2014). Методы оценки жизнеспособности сперматозоидов основаны на факте нарушения целостности наружной мембраны у клетки вскоре после ее гибели. Одним из критериев оценки качества спермы является подсчет доли (в %) жизнеспособных сперматозоидов, клеточная мембрана которых непроницаема для витальных красителей, в частности для эозина (А. Бородачев, В. Бородачева, 1977; М. Плосконос, 2014) и трипановой сини (Л. Дьяконов, В. Ситькова, 2000). Суправитальная окраска эозином и трипановой синью используется для дифференциации живых и мертвых сперматозоидов (М. Плосконос, 2014; Л. Дьяконов, В. Ситькова, 2000).

Краситель, добавленный к сперматозоидам, проникает в клетки с поврежденной мембраной и окрашивает их, живые клетки не окрашиваются, затем производится подсчет окрашенных клеток в общей популяции сперматозоидов с помощью световой микроскопии. Оценка жизнеспособности может служить контролем точности оценки подвижности сперматозоидов, поскольку процент мертвых клеток не должен превышать процента неподвижных сперматозоидов (М. Плосконос, 2014). В норме эякулят должен содержать не менее 50% подвижных сперматозоидов, а также 50% и более живых сперматозоидов, то есть не окрашенных суправитальной окраской.

Для дифференциации живых и мертвых клеток также используют флуоресцентные красители, проникающие в клетки. Одним из подобных красителей является пропидиум йодида (PI). М. Плосконос (2014) обнаружила, что жизнеспособность сперматозоидов при повреждающем действии на мембрану клетки оксидативного стресса (4 час инкубация с 200 мкМ перекиси водорода H_2O_2) при окрашивании клеток PI выявляет более высокий процент поврежденных клеток, а эозин в этих случаях менее пригоден для выявления жизнеспособности сперматозоидов ($73,6 \pm 5,8\%$ против $51,7 \pm 6,4\%$). В случае определенных воздействий на сперматозоиды (например, оксидативный стресс) световая микроскопия недостаточно адекватно отражает степень повреждения мембран сперматозоидов, а при флуоресцентной микроскопии выявляется более высокий процент сперматозоидов с поврежденной мембраной (М. Плосконос, 2014).

Отдельного рассмотрения заслуживают работы, посвященные оценке жизнеспособности сперматозоидов при помощи комбинированной окраски ДНК-красителями Hoechst 33342 и PI (S. Locke, Y. Peng, 1990), SYBR-14 и PI (И. Кудрявцев, с соавт., 2012). Принцип определения апоптотических клеток основан на способности красителей Hoechst 33342, SYBR-14 проникать через неповрежденную мембрану клеток и взаимодействовать с ДНК. В результате такого взаимодействия Hoechst 33342 при облучении источником света с длиной волны 340 - 380 нм живые клетки флуоресцируют голубым цветом (S. Locke, Y. Peng, 1990), а SYBR-14 при облучении источником света с длиной волны 488 нм испускает

флюоресценцию в зеленой части спектра, что и позволяет идентифицировать нормальные не поврежденные клетки (И. Кудрявцев, с соавт., 2012).

Ранний этап нарушения целостности плазматической мембраны сопровождается проникновением в клетки PI, в результате чего они окрашиваются обоими красителями, причем интенсивность флюоресценции SYBR-14 снижается. В то время как клетки с полностью нарушенной мембраной окрашиваются только PI (Рисунок 4). Для окраски клеток используют концентрации Hoechst 33342 5 мкг/мл, SYBR-14 в пределах 20 - 60 нМ. Маточный раствор готовят из раствора SYBR-14 в ДМСО, Hoechst 33342 в NaCl (0,9%) после чего аликвотируют и хранят при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, при этом раствор остается стабильным не менее года. Метод двойного окрашивания SYBR-14 и PI успешно зарекомендовал себя не только при работе со сперматозоидами млекопитающих, но и с аналогами этих клеток у широкого круга морских беспозвоночных – моллюсков *Crassostrea virginica* и *Dreissena polymorpha*, морских ежей *Lytechinus variegatus* и т.д. (И. Кудрявцев, с соавт., 2012).

Для испытаний на сперме трутней медоносных пчел метод двойного окрашивания SYBR-14 и PI был впервые успешно применен А. Collins и А. Donoghue (1999). Данный метод оценки активно используется зарубежными исследователями и по настоящее время. С целью анализа жизнеспособности сперматозоидов трутней авторы применяют набор реагентов LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit L 7011, разработанный Duane Garner из университета Невады, Рено (D. Garner, L. Johnson, 1995; S. Cobey, et al., 2013) . Набор состоит из двух ДНК-красителей - SYBR-14 и PI. Комплект содержит достаточный материал для проведения от 200 до 1000 достоверных анализов, при использовании в рекомендуемых производителем объемах и разведении.

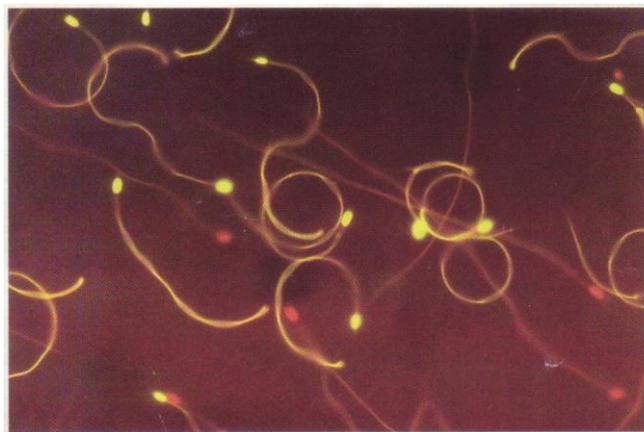


Рисунок 4 - Фото флуоресценции окрашенных сперматозоидов. Живые сперматозоиды, окрашенные SYBR-14, флуоресцируют зеленым цветом, мертвые, окрашенные PI, флуоресцируют красным цветом (A. Collins, J. Pettis, 2001)

С целью улучшения методики по оценке качества заморожено-оттаянной спермы, J. Wegener et al. (2012) предложили использовать новый тест, основанный на анализе утечки из поврежденных клеток гликолитического фермента глюкозо-фосфат-изомеразы (GPI).

Анализ литературы свидетельствует о том, что для оценки половозрелости трутней следует применять наиболее важные функциональные показатели, такие как: масса половозрелых трутней, концентрация спермы, подвижность сперматозоидов и их жизнеспособность (целостность мембран).

По итогам обзора литературы выявлено противоречие по возрасту полового созревания трутней.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по теме диссертационной работы выполняли с 2013 по 2020 гг. в условиях научно-экспериментальной пасеки, лаборатории селекции и молекулярно-генетических исследований медоносных пчел ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства», насчитывающей более 100 пчелиных семей породного типа «Приокский» среднерусской породы; научно-экспериментальной пасеки и лаборатории инструментального осеменения пчелиных маток ФГБНУ «Краснополянская опытная станция пчеловодства» и лаборатории инструментального осеменения пчелиных маток ФГБНУ «ППХ Майкопское».

С 2013 по 2016 гг. проводили исследования по выявлению оптимальных условий воспроизводства половозрелых трутней (способ одновременного выращивания трутней и неплодных маток в пчелиной семье-воспитательнице). Изучали функциональные показатели (концентрация, подвижность и жизнеспособность сперматозоидов) половозрелых трутней разного возраста (17, 22 и 30 сут.).

С 2017 по 2018 гг. анализировали качество спермы трутней после 5, 7 и 25 летней консервации в жидком азоте. Изучали способы хранения спермы трутней без криоконсервации (в течение 30, 60 сут. при 3 °С; 24 – 26 °С). Исследовали репродуктивные показатели пчелиных маток после искусственного осеменения спермой разных способов ее сохранения.

С 2019 по 2020 гг. проводили испытание различных разбавителей (культуральные среды, натуральный пчелиный мед) и криопротекторов (глицерин, метанол, этанол) для длительного хранения спермы трутней в жидком азоте.

Отбор и оценку пчелиных семей проводили в соответствии с «Методическими указаниями к постановке эксперимента в пчеловодстве» (РАСХН, 2000) и «Методами проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве» (НИИП, 2002). Общая схема исследования представлена на рисунке 5.



Рисунок 5 - Общая схема проведения исследований

Для постановки опыта по одновременному выращиванию трутней и неплодных маток формировали две группы пчелиных семей по методу пар-аналогов, по 4 семьи в каждой группе. В опытную группу вошли две семьи-воспитательницы без осиротения с одновременным выращиванием трутней и маток и две отцовские пчелиные семьи для изучения динамики показателей половозрелости трутней в зависимости от возраста. Контрольную группу составили две семьи-воспитательницы, занятые выращиванием только неплодных маток и две отцов-

ские семьи. Отделение воспитательницы ограничивали от отделения, в котором находилась матка, фанерной перегородкой с окошком из разделительной решетки (100 × 100 мм), позволяя свободно передвигаться пчелам, но препятствуя переходу матки из одного отделения в другое.

Всем семьям давали стимулирующие подкормки (медово-перговые смеси, сахарный сироп) в периоды отсутствия поступления свежей пыльцы и нектара с естественных источников в природе. А также все эти семьи подвергали плановой обработке от клеща варроа.

Каждой семье, за исключением семей-воспитательниц по выращиванию неплодных маток, на момент формирования по принципу пар-аналогов ставили в гнездо трутневый сот для вывода трутней. В течение сезона из всех семей отбирали пробы пчел на определение степени поражения варроозом.

В исследованиях использовали семьи, отличающиеся высокой продуктивностью, другими ценными хозяйственными признаками, хорошей родословной (А. Тимошинова, 1988). Отобранные отцовские семьи не состояли в родстве с материнскими семьями. При выделении отцовских семей соблюдали правила племенного подбора (разнородного и однородного). Все отцовские пчелиные семьи принадлежали породному типу среднерусской породы пчел «Приокский».

Для получения трутней определенного происхождения и возраста в отцовские семьи ставили трутневый сот в рамочном изоляторе из разделительной решетки (А. Гулов, с соавт., 2015; J. Rhodes, 2010; K, Czekonska, et al., 2013). После выхода из ячеек определяли массу трутней на электронных лабораторных весах GR-200 с пределом взвешивания от 0,01 - 210 г и метили перманентным маркером фирмы «POSCA» (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Мечение трутней

Дальнейшее использование отцовской пчелиной семьи определяли по значениям массы суточных трутней. Предпочтительными были семьи, в которых масса трутней достигала 260 - 320 мг. Отобранных трутней содержали в семьях со свободным вылетом из улья, так как это лучше влияло на их половую потенцию (А. Бородачев, В. Бородачева, 1989). Повторное взвешивание трутней проводили в стадии их половой зрелости в возрасте 22 - 30 сут. Наиболее качественные из них имели массу в пределах 211 - 228 мг, наибольшую концентрацию сперматозоидов от 5,9 - 7,6 млн/мкл и более, которые характеризовались хорошей подвижностью и активностью дегидрогеназ (А. Гулов, с соавт., 2015; J. Rhodes, 2010; K, Czekonska, et al., 2013).

Сперму половозрелых трутней оценивали по показателям концентрации, подвижности (S. Locke, Y. Peng, 1993) и активности дегидрогеназ. Отбор спермы у трутней проводили в соответствии с технологией инструментального осеменения пчелиных маток путем искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса (А. Бородачев, В. Бородачева, 1989). Для поддержания жизнеспособности трутней в лабораторных условиях, их содержали в деревянном садке размером 330 × 500 мм с выдвижной стенкой из оргстекла с одной стороны и капроновой сеткой для доступа воздуха с другой. Внутри садка монтировали медово-перговый сот для питания трутней. В лаборатории поддерживали температуру 25 - 28 °С, относительную влажность 80% (А. Бородачев, В. Бородачева, 1989).

3.1 Определение жизнеспособности сперматозоидов после длительного хранения в жидком азоте и охлажденном состоянии

В период исследований с 2017 по 2018 гг. дифференциацию живых и мертвых сперматозоидов проводили методом флуоресцентной микроскопии по методике S. Locke, Y. Peng, (1990). Применяли флюорохромы Hoechst 33258 (H3258) (каталожный но. O150; НПП «Пан-Эко», Россия) и PI (каталожный но. 25535-16-4; Sigma-Aldrich, USA).

Рабочие растворы ДНК-красителей готовили в трис буфере pH 8,8 (J. Rhodes, 2008) с конечной концентрацией H3258 - 5 мкг/мл и PI - 10 мкг/мл (S. Locke, Y. Peng, 1990). Суспензию из образца спермы готовили в трис буфере pH 8,8 в соотношении 1 : 100. Исследование проводили на биологическом световом микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (ООО «Альтами», Россия) при увеличении 400×. Всего подсчитывали 200 сперматозоидов. Диапазон возбуждения H3258 – 340 - 380 нм (блок UV), свечения - 430 нм. Диапазон возбуждения PI – 530 - 560 нм (блок G), свечения - 580 нм. Живые клетки флуоресцируют ярким светло-голубым цветом, переходящим в голубой, мертвые - ярко-красным цветом (Рисунок 7, 8, 9).

В период исследований с 2019 по 2020 гг. дифференциацию живых и мертвых сперматозоидов проводили методом флуоресцентной микроскопии по методике R. Johuson (2013) с использованием набора по определению жизнеспособности LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit L 7011 (Life Technologies Limited, Scotland). Набор состоит из двух компонентов:

- SYBR-14 (компонент А) объемом 100 мкл с концентрацией 1 мМ раствора в ДМСО;
- PI (компонент В) объемом 5 мл с концентрацией 2,4 мМ раствора в дистиллированной воде.

При использовании набора LIVE/DEAD™ первоначально, к 250 мкл приготовленной суспензии образца спермы добавляли с помощью микрошприца для хроматографии 1 мкл SYBR-14, тщательно перемешивали и затем инкубировали

суспензию в темноте при 28 °С в течение 10 мин. По истечении указанного времени, добавляли в суспензию 2 мкл PI и вновь инкубировали в течение 10 мин. Далее, 10 мкл окрашенной флюорохромами суспензии, наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом размером 18 × 18 или 22 × 22 мм. Исследование проводили на биологическом световом микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (ООО «Альтами», Россия) при увеличении 800×. Всего подсчитывали 200 сперматозоидов. Диапазон возбуждения SYBR-14 - 516 нм (блок В), свечения - 617 нм. Диапазон возбуждения PI – 530 - 560 нм (блок G), свечения - 580 нм. Интактные мембраны флуоресцируют ярким зеленым цветом, поврежденные - ярко-красным цветом (Рисунок 10).

Подвижность заморожено-оттаянной и охлажденной спермы оценивали по методике О. Kaftanoglu и Y. Peng (1984) в пяти полях зрения при увеличении 400× на биологическом световом микроскопе Leica и Альтами-ЛЮМ 1 LED.

Для изучения морфологических и морфометрических параметров сперматозоидов использовали набор дифференциального окрашивания Diff Quick (НПФ «АБРИС+», Россия). Приготовленные мазки образцов спермы окрашивали по методическим рекомендациям ФГБНУ «ФНЦЖ ВИЖ им. Л.К. Эрнста». Фиксация мазка в растворе №1 – 10 мин (по инструкции производителя 10 с), окрашивание в растворе №2 (эозин) – 15 мин (по инструкции 15 с), затем подсохший мазок окрашивали в растворе №3 (тиазин) – 10 мин (по инструкции 10 с). Микроскопирование осуществляли на биологическом световом микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (ООО «Альтами», Россия) с использованием масляной иммерсии при увеличении 2000×. С помощью цифровой камеры Canon 1300D (ООО «Альтами», Россия) делали снимки сперматозоидов в десяти полях зрения на каждом из окрашенных мазков. Морфометрические параметры сперматозоидов оценивали на полученных снимках с использованием программного обеспечения Altami Studio версия 3.5 (ООО «Альтами», Россия). Изучали следующие морфометрические параметры: длина ядра, периметр ядра, площадь ядра, длина акросомы. Исследовали по 300 сперматозоидов из каждого образца.

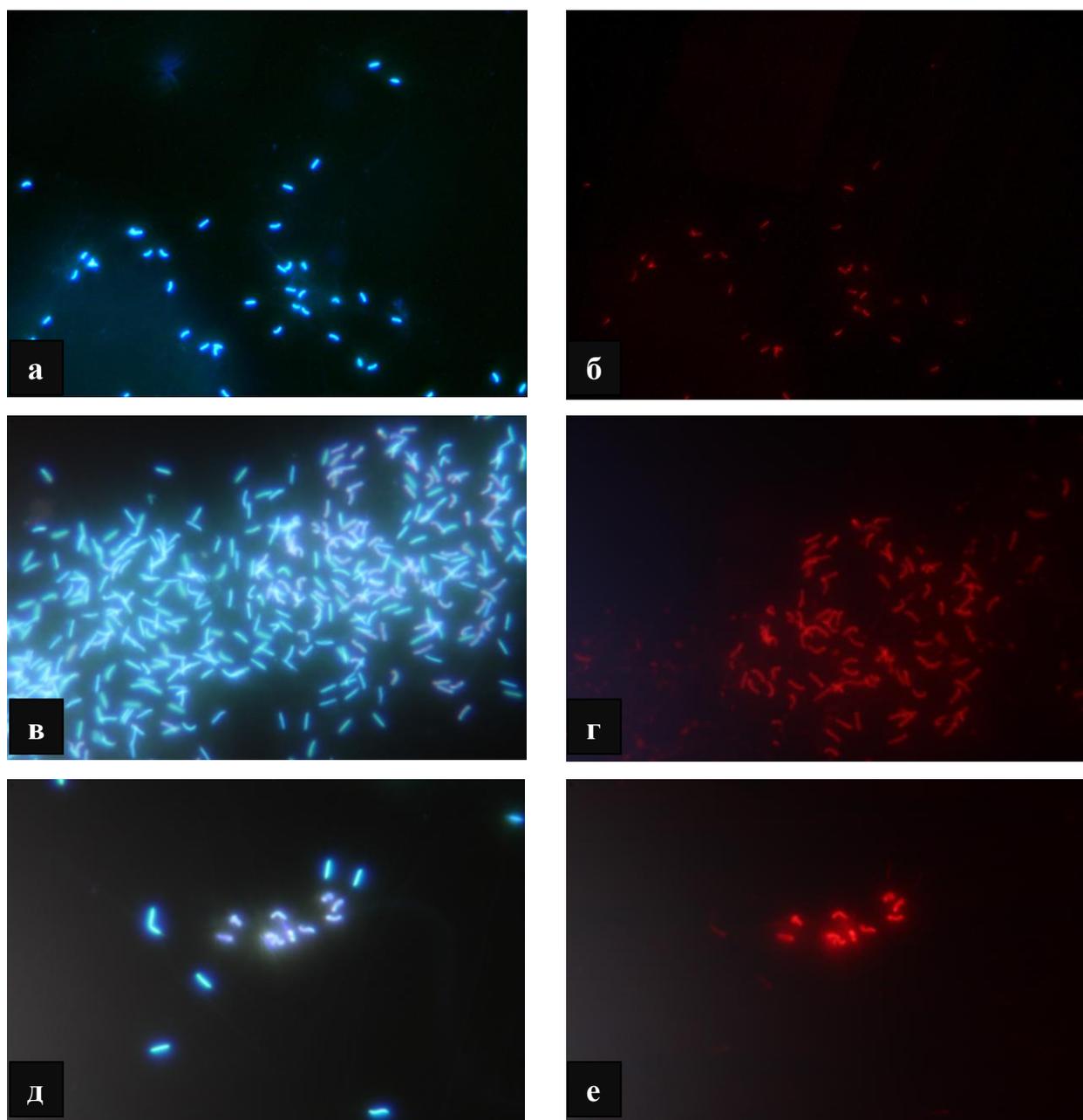


Рисунок 7 – Сперматозоиды, окрашенные флюорохромами Ноеchst 33258 и PI: (а - живые сперматозоиды и в стадии апоптоза после 60 сут. хранения при 3 °С в среде С46, б – сперматозоиды в стадии апоптоза; в - живые сперматозоиды и в стадии апоптоза после 60 сут. хранения при 24 - 26 °С в среде Lonza, г. - мертвые сперматозоиды; д - живые сперматозоиды и в стадии апоптоза после 90 сут. хранения при 3 °С в трис буфере рН 8,8, е - мертвые сперматозоиды)

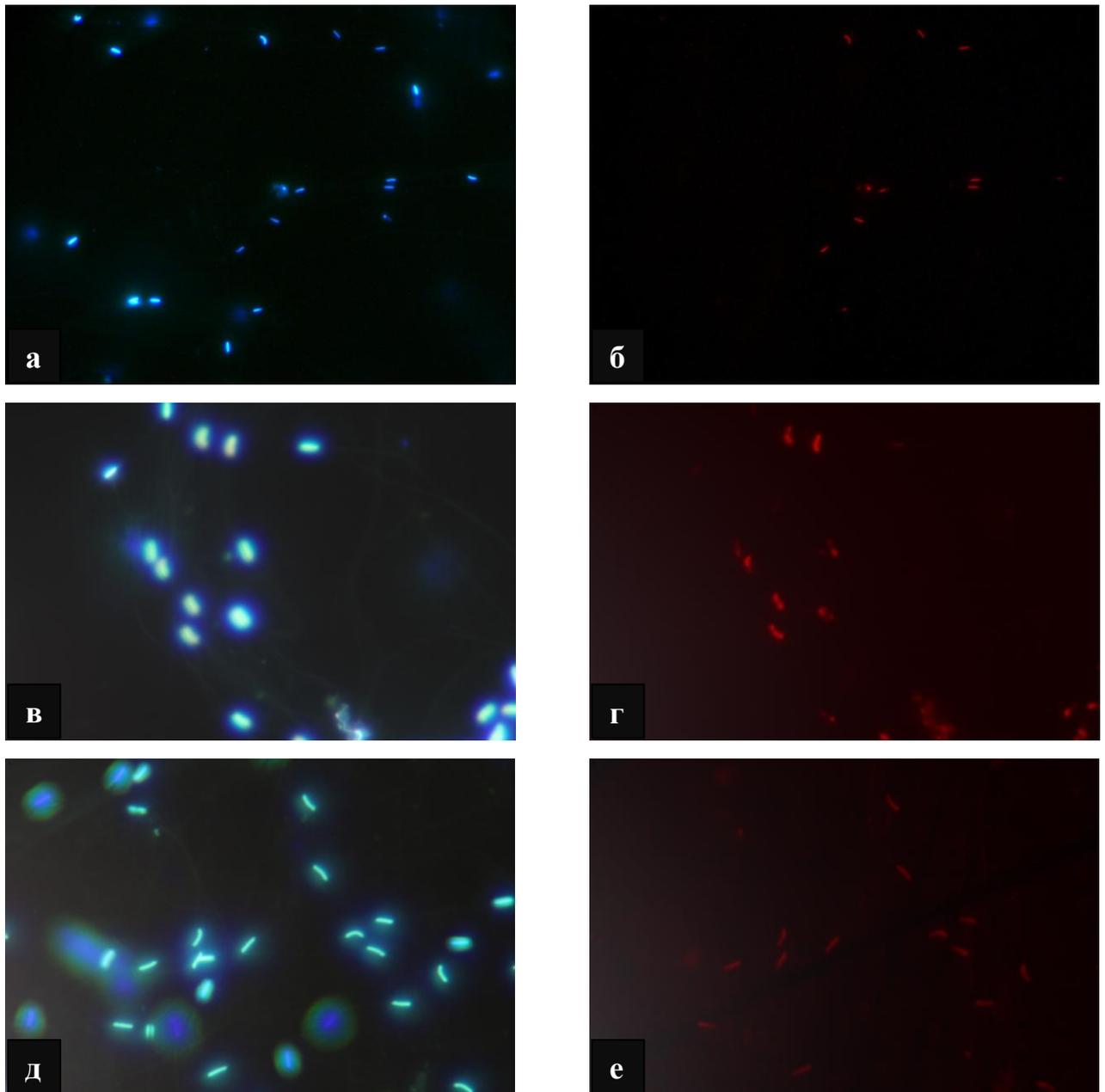


Рисунок 8 – Сперматозоиды, окрашенные флюорохромами Hoechst 33258 и PI: (а - живые сперматозоиды и в стадии апоптоза после 60 сут. хранения при 3 °С в среде С46, б – сперматозоиды в стадии апоптоза; в - живые сперматозоиды и в стадии апоптоза после 5 лет криохранения, г - мертвые сперматозоиды; д, е - сперматозоиды в ранней стадии апоптоза после 25 лет хранения)

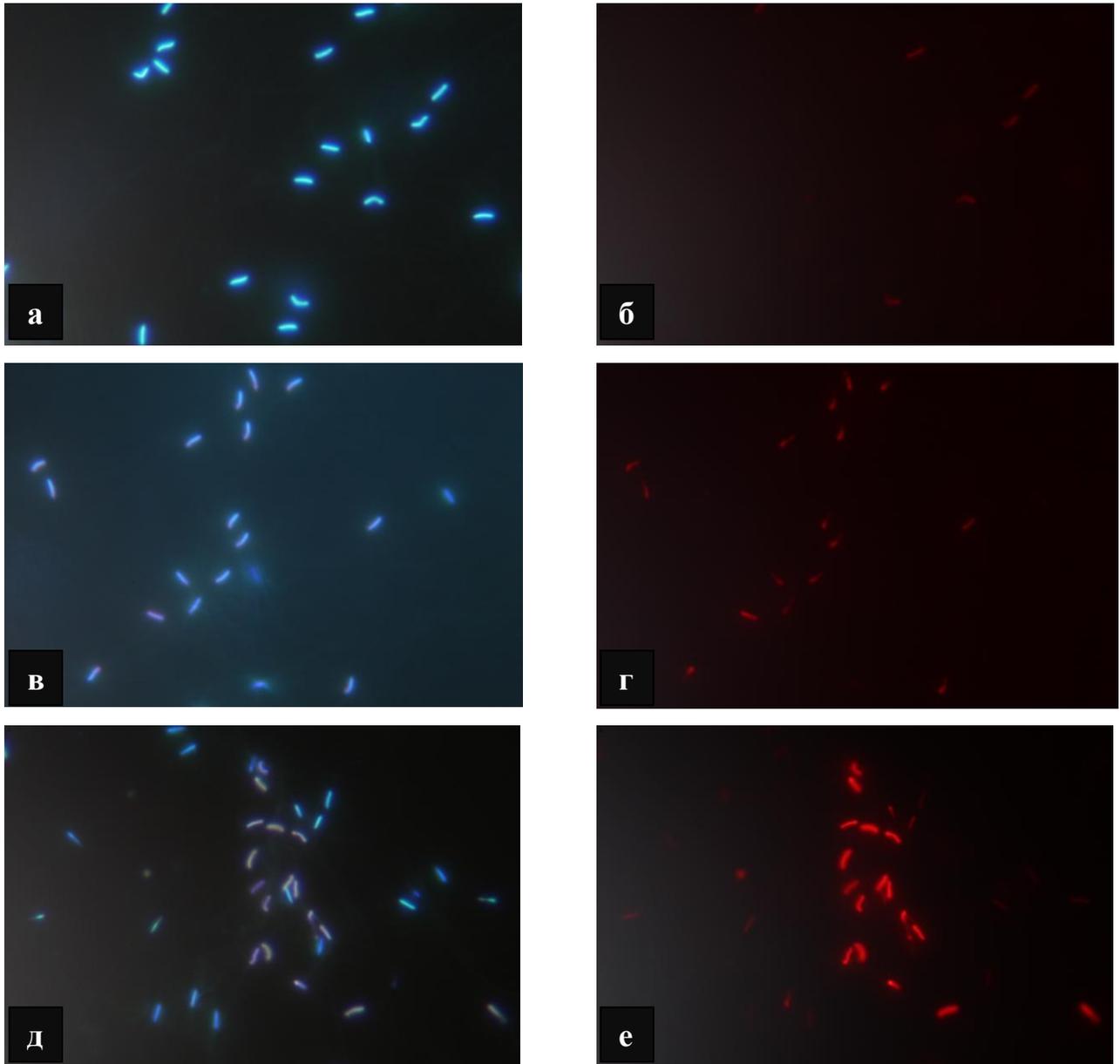


Рисунок 9 – Сперматозоиды, окрашенные флюорохромами Hoechst 33258 и PI: (а - живые сперматозоиды и в стадии апоптоза после 25 лет криохранения, б – сперматозоиды в стадии апоптоза; в, г - сперматозоиды в стадии апоптоза после 25 лет криохранения; д - живые сперматозоиды и мертвые после 90 сут. хранения при 3 °С в трис буфере рН 8,8, е - мертвые сперматозоиды)

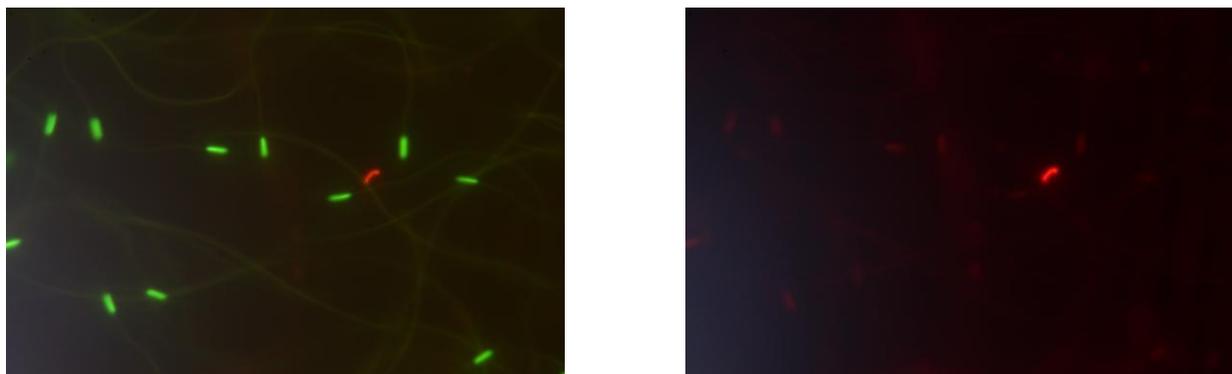


Рисунок 10 - Сперматозоиды, окрашенные флюорохромами SYBR-14 и PI

3.2 Оценка качественных показателей пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной и охлажденной спермой

За 2 - 3 сут. до искусственного осеменения пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой было подготовлено 15 пчелиных семей силой 8 - 9 улочек. Для осеменения использовали неплодных маток в возрасте 7 - 8 сут. с массой $196,0 \pm 2,6$ мг. Маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой, подсаживали в пчелиные семьи двумя способами:

- Вариант 1 – в клеточке Титова. Изоляция осемененной матки в течение 4 сут. до выпуска из клеточки. Летки на улье зарешечены разделительной решеткой.
- Вариант 2 – изоляция осемененной матки в рамочном сетчатом изоляторе на печатном расплоде на выходе до появления открытого расплода. Летки на улье не зарешечены.

В состав контроля вошли четыре группы пчелиных семей по пять семей в каждой с искусственно осемененными матками свежей спермой разных объемов – 4, 6 и 8 мкл, соответственно. Возраст маток 7 - 8 сут., масса $199,7 \pm 2,8$, а половозрелых трутней возраст более 20 сут. Подсадку пчелиных маток осуществляли описанными выше способами. В группе контрольных семей неплодные матки до

осеменения 4 мкл спермы имели возможность свободного перемещения в гнезде. При этом летки на улье зарешечивали разделительной решеткой. После искусственного осеменения их возвращали в пчелиную семью без предварительной изоляции.

Количество печатного расплода учитывали рамкой-сеткой с квадратами 5×5 см (25 см^2) (А. Бородачев, с соавт., 2012) (Рисунок 11).

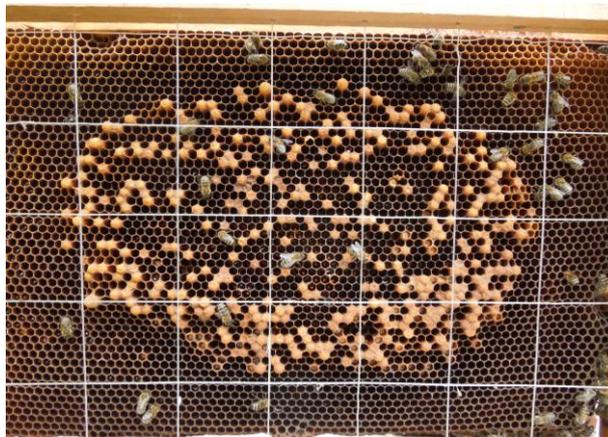


Рисунок 11 - Учет печатного расплода с использованием рамки-сетки

Маток, искусственно осемененных охлажденной спермой, оценивали только по физиологическим показателям (М. Bienkowska, et al., 2008):

- наличие спермы в парных яйцеводах матки по истечении 48 ч после осеменения;
- концентрации сперматозоидов в семяприемнике.

Маток препарировали общеизвестным методом под световым микроскопом МБС-10. Визуально фиксировали наличие или отсутствие остатков спермы в парных яйцеводах матки. Семяприемник освобождали от ткани и помещали в стерильную пробирку Eppendorf (1,5 мл), содержащую 500 мкл трис буфера pH 8,8. Затем, прокалывали его иглой, выпуская содержимое в буфер. После тщательного пипетирования, брали каплю суспензии и заправляли счетную камеру Горяева. Подсчет сперматозоидов и определение концентрации проводили по вышеописанной методике.

В ряде случаев, физиологические показатели искусственно осемененных маток отсутствуют. Так как, некоторые опытные и контрольные образцы исследовали в конце активного сезона (август - сентябрь). В этот период семьи-воспитательницы прекратили прием суточных личинок на воспитание. Таким образом, нам не удалось провести искусственное осеменение по причине отсутствия неплодных маток. В частности, питательная среда Lonza поступила к нам в обращение от производителя лишь в конце августа 2018 г.

3.3 Методика оценки половозрелости трутней

Половую потенцию разновозрастных половозрелых трутней учитывали по наличию спермы на конце их эндофаллоса при искусственной стимуляции. Для оценки набирали в садок от 30 - 60 особей от каждой опытной семьи. Из садка брали трутня, давали ему поработать крыльями, держа его за лапки. Вынужденный его «полет» увеличивает объем брюшка за счет нагнетания воздуха в воздушные мешки, что является благоприятным при сокращении брюшных мышц. Затем быстрым движением пальцев другой руки сдавливали ему грудку. Этот прием вызывает сокращение мышц и частичное выворачивание эндофаллоса (а иногда и полное с эякуляцией). Под давлением гемолимфы и воздуха, поступающего из воздушных мешков, конечная часть брюшка трутня выходит наружу, открывая отверстие эндофаллосу. Затем выталкивается основание эндофаллоса с волосками и рожками. Это первая стадия выворачивания, спермы в это время нет. Чтобы продолжить выворачивание эндофаллоса, необходимо создать в нем дополнительное давление. Сдавливание брюшка от передней части к задней, стимулирует сокращение брюшных мышц. За сокращением мышц следует рефлекторная эякуляция, луковица проскакивает через узкую шейку и на ее поверхности появляется сначала сперма кремового цвета, а затем мукус белого цвета (А. Бородачев, В. Бородачева, 1989).

Оценку качества спермы половозрелых трутней определяли по концентрации сперматозоидов, их подвижности и активности ферментов дегидрогеназ, используя метод обесцвечивания метиленовой сини по Н.П. Шергину (В. Милованов, 1962).

Первые данные по концентрации сперматозоидов были получены на основе собственных исследований с использованием раствора хлорида натрия 0,9% и дистиллированной воды. Экспериментальным путем определена минимальная степень разведения спермы не менее 800 раз: 100 - кратно раствором хлорида натрия 0,9%, 700 - кратно дистиллированной водой.

Дальнейшие исследования концентрации сперматозоидов и их подвижности проведены с использованием методики J. Rhodes (2008) с собственной модификацией.

Испытанию подвергали половозрелых трутней в возрасте 17, 22 и 30 сут. Для испытания набирали по 10 особей от каждой опытной семьи. Возраст трутней устанавливали, применяя мечение перманентным маркером.

Сперму отбирали с помощью блока-шприца аппарата для инструментального осеменения пчелиных маток SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz, Espekamp Deutschland). Для оценки использовали сперму кремового и темно-кремового цвета без мукуса, четко выделившуюся на луковице эндофаллоса. Объем спермы одного половозрелого трутня составляет в среднем 1,7 мкл, но отобрать удается при полноценном выворачивании эндофаллоса и отсутствии растекания спермы по поверхности луковицы 1 мкл (А. Бородачев, В. Бородачева, 1989; Z. Копораска, 1987). Показатель 1 мкл берется за основу при исчислении концентрации сперматозоидов (В. Милованов, 1962). В качестве разбавителя для спермы использовали трис буфер* (J. Rhodes, 2008). Степень разведения по J. Rhodes (2008) 2500 раз. Соответственно, к 1 мкл спермы на часовом стекле добавляли 2500 мкл трис буфера. Каплю готовой суспензии помещали в камеру Горяева под микроскоп Leika (Рисунок 12). Подсчет вели при увеличении 400× (объектив ×40, окуляр ×10). Концентрацию сперматозоидов – С, рассчитывали по формуле (В. Милованов, 1962):

$$C = \frac{h \cdot 2500 \cdot 400}{80 \cdot 0,1 \cdot 1000000}, \quad (6)$$

где C – искомое количество сперматозоидов – млн. шт. в 1 мкл спермы;

h – количество сперматозоидов в 80 малых квадратах;

2500 – степень разведения;

400 – площадь малого квадрата, мм²;

80 – число сосчитанных малых квадратов;

0,1 – глубина малого квадрата сетки, мм;

1 000 000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл.

*Трис буфер (состав):

Хлорид натрия (ЗАО «Вектон», Россия) - 11,0 г.

Глюкоза (ЗАО «Вектон», Россия) - 1,0 г.

L (+) Аргинин-HCl (Sigma Aldrich, Spain) – 0,1 г.

L (+) Лизин (Sigma Aldrich, Switzerland) - 0,1 г.

Трис (гидроксиметил аминометан) Базовый 7-9 (Sigma Aldrich, USA) - 4,9 г.

Трис (гидроксиметил аминометан)-HCl (Sigma Aldrich, USA) - 1,5 г.

В 1000 см³ дистиллированной воды (pH 8,75)



Рисунок 12 – Сперматозоиды в счетной камере Горяева

Для точности определения концентрации сперматозоидов заправляли обе сетки камеры Горяева и при подсчете брали средний показатель. Расхождение ре-

зультатов должно быть не более 10% (А. Абилов, с соавт., 2008).

Другой способ. Площадь малого квадрата составляет $1/400 \text{ мм}^2$, глубина его 0,1 мм, объем, таким образом, составит $1/4000 \text{ мм}^3$. Чтобы узнать число сперматозоидов в 1 мкл, необходимо среднее число сперматозоидов в одном малом квадрате умножить на 4000 и на 2500 (степень разведения). Для подсчета общего количества сперматозоидов необходимо их количество в 1 мкл умножить на объем спермы, выраженный в мкл.

Подвижность сперматозоидов оценивали в трис буфере по пятибалльной шкале S. Locke, Y.Peng (1993) в пяти полях зрения при увеличении $400\times$ на биологическом световом микроскопе Leica. В окуляре микроскопа наблюдали, как сперматозоиды осуществляли прямое поступательное движение или, приняв форму колец, совершали манежное движение, то есть круговые вращения, либо вокруг своей оси.

При оценке сперматозоидов по активности дегидрогеназ использовали методику Н. Шергина (В. Милованов, 1962). Для исследований отбирали сперму одновременно от десяти трутней в возрасте 22 - 30 сут., используя оборудование SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz, Espelkamp Deutschland). Объем спермы создает в стеклянном капилляре (с внутренним диаметром 1мм) блока-шприца необходимый для анализа столбик высотой около 2 см. Далее, сперму из капилляра выпускали на часовое стекло и смешивали с равным по величине объемом 0,01% раствора метиленовой сини (ООО «Промприбор», Россия), приготовленного на 0,9% - ном растворе хлористого натрия. После активного смешивания также быстро втягивали подготовленную суспензию в капилляр блока-шприца и отмечали время обесцвечивания голубого столбика (Рисунок 13). Наблюдения проводили при температуре 20°C . По концам столбика, мениски жидкости, соприкасаясь с воздухом, сохраняют голубую окраску (В. Милованов, 1962).

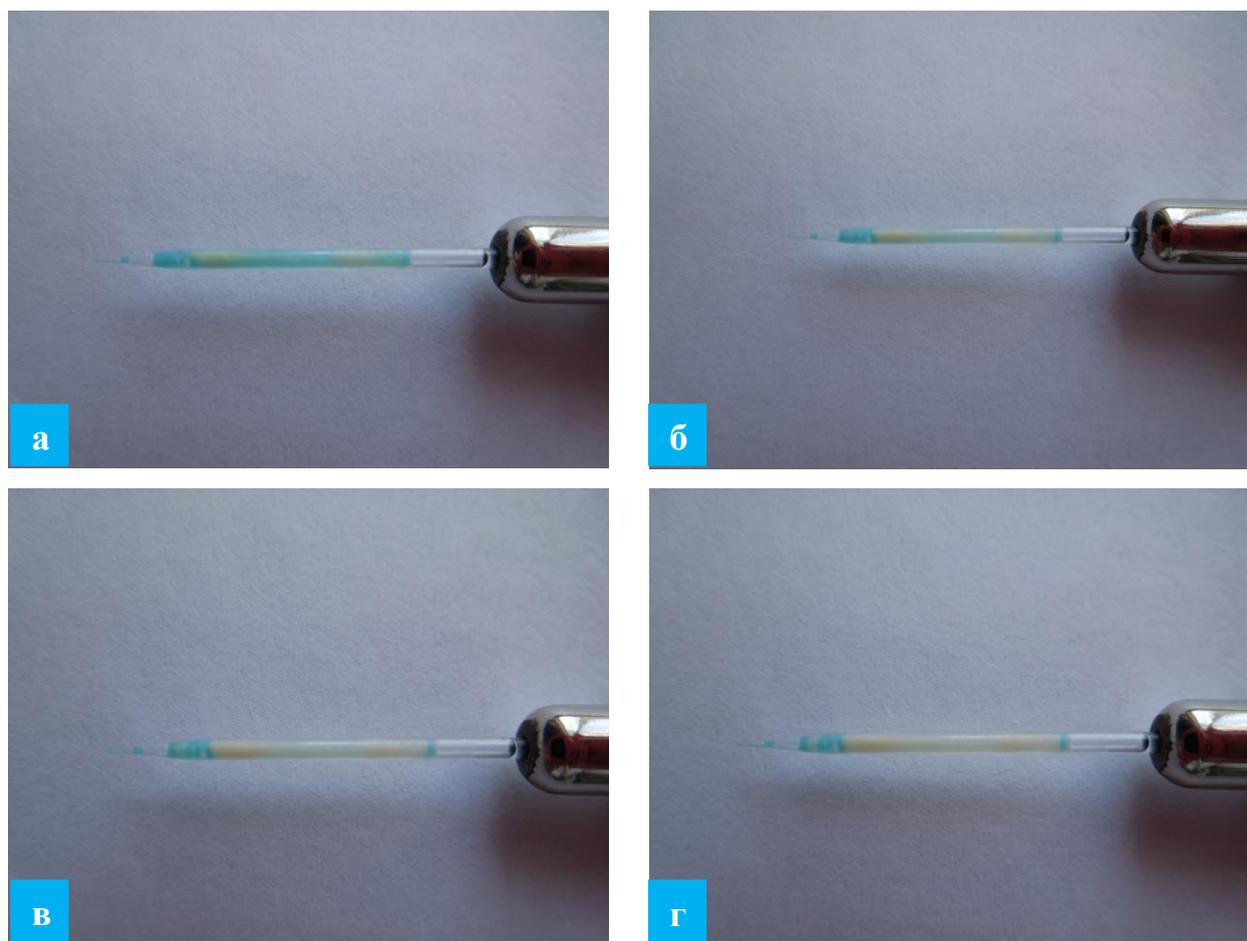


Рисунок 13 Обесцвечивание метиленовой сини ферментами спермы

Учитывая высокую концентрацию сперматозоидов у трутней медоносных пчел, обесцвечивание подготовленной суспензии происходит значительно быстрее, чем у сельскохозяйственных животных. Полученный результат по времени делили на 10. Таким образом, получали показатель активности дегидрогеназ одного трутня.

3.4 Методика оценки способа воспроизводства трутней и неплодных маток для искусственного осеменения

В первой серии опытов изучали влияние одновременного выращивания

трутней и неплодных маток на их массу в семьях-воспитательницах без осиротения. Оценку метода проводили по следующим показателям:

- масса суточных трутней;
- количество выращенных неплодных маток;
- масса суточных неплодных маток.

Для определения массы трутней в возрасте 1 - 2 сут. набирали по 30 особей от каждой опытной семьи; неплодных маток в возрасте 1 - 2 сут. - всех вышедших из маточников и взвешивали на электронных лабораторных весах GR200 с пределом взвешивания от 0,01 - 210 г. (Рисунок 14).

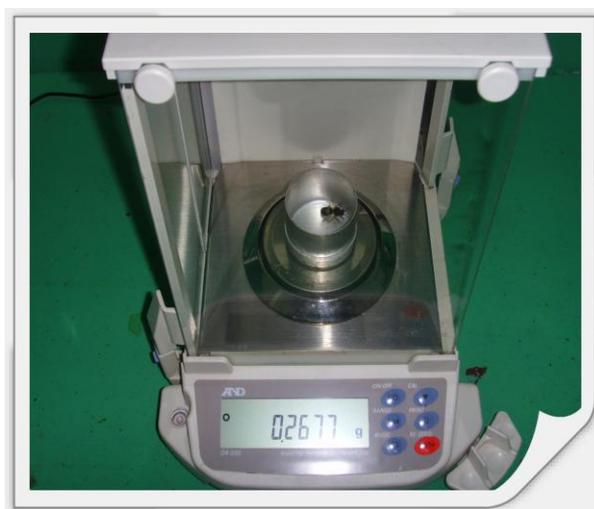


Рисунок 14 - Взвешивание трутней

3.5 Статистическая обработка результатов исследований

Биометрическую обработку результатов исследований проводили методами вариационной статистики. Достоверность результатов определялась по критерию t-Стьюдента и уровню значимости (p) с использованием программы Excell.

Статистический анализ результатов морфометрических исследований сперматозоидов проводили на программном обеспечении Statistica для Windows версия 13 (StatSoft Russia, Россия). Влияние длительного хранения в жидком азоте,

используемых разбавителей и криопротекторов на морфометрические размеры головок сперматозоидов сравнивали внутри и между исследуемых групп с помощью линейного дисперсионного анализа (ANOVA). Групповые различия сравнивались с помощью критерия наименьших достоверных различий Фишера. Влияние считалось значимым при $p < 0,05$. Различия между средними величинами сравнивали с помощью t-Стьюдента. Нормальность выборки определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Влияние сред, яичного желтка и пчелиного меда на криоустойчивость спермы трутней

Перед нами встает задача поиска оптимальных условий (реакция среды, осмотическое давление) для сохранения жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы. С целью увеличения сроков переживаемости сперматозоидов и сохранения их оплодотворяющей способности, требуется снижение метаболических процессов спермиев во время их хранения.

В период активного сезона 2019 г. проводили испытание следующих сред для криоконсервации спермы трутней:

а) полусинтетическая среда С46 (среда Какпакова В.Т.) рН 7,2 – группа 1 контроль. Среда С46 предоставлена ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (109428, Россия, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1).

б) среда Lonza Insect-XPRESS™ (Sartorius Stedim, Belgium) рН 6,1 осмолярность 371 мосмоль/кг – группа 2. Среда Lonza разработана для поддержания роста линий клеток *Spodoptera frugiperda* (Sf9 и Sf21) и *Drosophila melanogaster* (S2) (URL: <https://www.sartorius.ru>). По химическому составу она приближена к среде Grace's (URL: <https://www.lonza.com>).

в) Schneider's *Drosophila* Medium с L-глутамином (кат. но. 217 200 24, Thermo Fisher, USA) рН 4,6 осмолярность 278 мосмоль/кг – группа 3. Среда Schneider's содержит уникальные компоненты, необходимые для культивирования клеток S2, включая яблочную кислоту, фумаровую, альфа-кетоглутаровую, янтарную кислоты и трегалозу (URL: <https://www.thermofisher.com>). В состав среды входит 20 аминокислот, 7 неорганических солей и отсутствуют витамины.

d) Grace's Insect Medium (2x) (кат. но. 116 670 37, Thermo Fisher, USA) pH 6,3 осмолярность 715 мосмоль/кг – группа 4. 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 (URL: <https://www.thermofisher.com>). Из числа испытываемых, среда Grace's, самая богатая по содержанию углеводов. В ее составе содержится фруктоза, глюкоза и в очень высокой концентрации сахароза (53360 мг/л). В настоящее время широко используется для роста клеток *Spodoptera frugiperda*, Sf9 и Sf21. Среда Lonza предоставлена ООО «Сарториус Стедим РУС» (199178, г. Санкт-Петербург, 5-я линия, В.О., д.70).

e) JPL-41 Insect Medium с хлоридом кальция, бикарбонатом натрия и без L-глутамина, pH 5,9 - 6,5 осмолярность 330 - 370 мосмоль/кг – группа 5. JPL-41 является модификацией исходной формулировки IPL Гудвина. Она была разработана Вайссом и др. Департамента сельского хозяйства США (USDA), лаборатории патологии насекомых для крупномасштабного распространения клеточной линии, полученной из осенней совки, *Spodoptera frugiperda*. Вайсс дополнил основную среду фетальной бычьей сывороткой и триптоза фосфатным бульоном, и успешно вырастил непрерывно клеточные линии IPL-21 AE (III) в больших объемах в роллер-флаконах из полистирола. Среда JPL-41 предоставлена ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (109428, Россия, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1).

Подготовка спермы к криоконсервации.

В качестве криопротектора использовали 10% ДМСО. По рекомендациям производителей питательных сред, мы не применяли антибиотики для обработки против бактериальной контаминации. Свежеотобранную сперму смешивали с разбавителем в соотношении 5 : 3 (на 5 частей спермы использовали 3 части питательной среды) по методике (Hopkins В.К., 2012). Для подготовки одного образца брали 25 мкл спермы и 15 мкл питательной среды. Таким образом, было подго-

товлено 25 образцов по 40 мкл разбавленной спермы. С помощью микрошприца для хроматографии набирали необходимый объем разбавителя и сливали его в виде капли в стерильную чашку Петри Nunc диаметром 35 мм. В полученную каплю разбавителя, с помощью шприца оборудования для инструментального осеменения пчелиных маток, медленно добавляли сперму, распределяя ее по всему объему капли разбавителя. Принудительно сперму со средой не смешивали, так как принятое соотношение объемов (5 : 3), а также осмолярность питательных сред позволяли сперме равномерно распределяться по всей капле. Приготовленную суспензию вновь набирали в шприц для искусственного осеменения маток, таким образом, дополнительно перемешивая ее и сливали в стерильную криопробирку Nunc объемом 1,0 мл.

Эквилибрацию подготовленных образцов проводили при температуре 3 °С в бытовом холодильнике LG в течение 1 ч.

Криоконсервация.

По окончании эквилибрации осуществляли криоконсервацию образцов по методике Какпакова В.Т. (Г. Пинаев, М. Богданова, 2008). Криопробирки с образцами после эквилибрации устанавливали в криотростины, которые помещались в канистру от сосуда Дьюара. Замораживание образцов начинали над сосудом цилиндрической формы, заполненным жидким азотом на $\frac{1}{2}$ своего объема. Предварительно провели калибровку температуры в сосуде с помощью бытового термометра с пределом – 50 °С до 50 °С. После этого канистру с криотростинами подвешивали в течение 15 мин. над сосудом. Затем, канистру опускали в цилиндр вровень с его краем и оставляли на 15 мин. Далее канистру опускали до касания с жидким азотом и тут же поднимали на 1 см. В таком положении оставляли на 20 мин. По истечении указанного времени, вынимали криотростины из канистры и быстро погружали их в жидкий азот криохранилища «Харьков-34». Такой режим замораживания примерно соответствует скорости замораживания 1 °С/мин. (Г. Пинаев, М. Богданова, 2008).

Оттаивание. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре 34 °С в течение 10 с. Затем в криопробирку с образцом добавляли 1,0 мл свежей

питательной среды без ДМСО, предварительно нагретой до комнатной температуры (26 - 28 °С). Тщательно перемешивали и оставляли на 10 мин. После инкубации центрифугировали однократно в режиме 3000 об./мин. в течение 3 мин. После центрифугирования удаляли супернатантную жидкость, вновь добавляли 500 мкл среды и проводили оценку качества заморожено-оттаянной спермы.

Культуральные среды использовали в качестве защитных или протективных, предохраняющих сперматозоиды от преждевременного повреждения внешними силами или разрушения их в ходе расточительного обмена веществ.

В ходе предварительной оценки испытываемых синтетических сред выявилось их, весьма положительное действие, на физиологическое состояние сперматозоидов (Таблица 1).

Таблица 1 - Показатели качества разбавленной спермы до эквilibрации

Разбавитель	Показатели качества					
	Жизнеспособность, %		Подвижность, балл		Сперматозоиды с аномальной морфологией (дефекты головок), %	
	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО
Группа 1 (контроль)	85,5 ± 2,3	88,7 ± 2,2	4,0	4,5	12,0 ± 3,5	19,3 ± 3,8 ^b
Группа 2	69,5 ± 9,5	78,8 ± 0,65	4,0	5,0	29,6 ± 7,2	25,4 ± 6,3
Группа 3	94,6 ± 2,2	95,2 ± 2,8	4,0	5,0	21,0 ± 5,4	47,0 ± 4,2
Группа 4	86,7 ± 3,1	78,7 ± 6,4	4,0	5,0	35,3 ± 4,1	41,3 ± 4,6 ^{ab}
Группа 5	95,1 ± 0,4	91,2 ± 0,4	4,0	5,0	30,0 ± 4,7	23,0 ± 5,1

^{ab} - достоверные различия при $p < 0,01$

Электролитный состав, рН, осмотическое давление питательных сред и др. оказались удовлетворительными для сперматозоидов трутней на начальном этапе исследований. Было отмечено, что в образцах с ДМСО, сперматозоиды чаще со-

вершали прямолинейное поступательное движение. По всей видимости, добавление ДМСО, в исследуемые образцы, спровоцировало плазматическую мембрану сперматозоидов на использование части энергии из окружающей среды. Как известно, проницаемость цитоплазматической мембраны носит избирательный характер. Возможно, индивидуальные особенности мембран сперматозоидов трутней служат возникновению аномалий в морфологии спермиев (дефекты головок) после разбавления свежееотобранной спермы в питательной среде.

Охлаждение спермы до температуры 3 °С переводит сперматозоиды в неактивное состояние. При этом создаются условия, благодаря которым уравниваются существующие концентрационные градиенты соединений, растворенных в протоплазме сперматозоидов и в окружающей ее синтетической среде (Ф. Осташко, 1976). В связи с чем, после эквilibрации разбавленной спермы и произошло незначительное снижение показателя жизнеспособности (целостности мембран), за исключением образца с питательной средой Graces (Таблица 2).

Таблица 2 - Показатели качества разбавленной спермы после эквilibрации

Разбавитель	Показатели качества					
	Жизнеспособность, %		Подвижность, балл		Сперматозоиды с аномальной морфологией (дефекты головок), %	
	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО
группа 1 (контроль)	85,5 ± 2,3	67,4 ± 5,1 ^b	4,0	4,5	12,0 ± 3,5	20,1 ± 4,2 ^b
группа 2	69,5 ± 9,5	64,6 ± 7,3	4,0	4,0	29,6 ± 7,2	25,8 ± 5,4 ^a
группа 3	94,6 ± 2,2	73,2 ± 0,3	4,0	4,0	21,0 ± 5,4	40,1 ± 7,3 ^{cad}
группа 4	86,7 ± 3,1	89,8 ± 0,6 ^{eb}	4,0	4,0	35,3 ± 4,1	36,7 ± 2,1
группа 5	95,1 ± 0,4	81,7 ± 0,6	4,0	4,0	30,0 ± 4,7	28,4 ± 6,3 ^d

^{ad} - достоверные различия при $p < 0,01$, ^{cad} - $p < 0,001$, ^{eb} - $p \leq 0,05$

Возможно, для образца с Graces требовалось дополнительное время для уравнивания.

При неблагоприятных изменениях среды, в первую очередь, повреждаются акросома и цитоплазматическая мембрана сперматозоидов. После непродолжительного хранения разбавленной спермы в жидком азоте, физиологические показатели сперматозоидов кардинально изменились (Таблица 3).

Таблица 3 - Показатели качества заморожено-оттаянной спермы после 7 сут. криоохранения

Разбавитель	Показатели качества		
	Жизнеспособность, %	Подвижность, балл	Сперматозоиды с аномальной морфологией (дефекты головок), %
	с ДМСО	с ДМСО	с ДМСО
группа 1 (контроль)	55,1 ± 2,5^b	4,0	23,8 ± 1,5 ^b
группа 2	39,9 ± 0,3 ^{ab}	2,0	36,0 ± 1,7
группа 3	36,5 ± 1,8 ^{db}	2,0	44,3 ± 2,4 ^{db}
группа 4	38,2 ± 0,7 ^{cb}	3,5	38,4 ± 2,7
группа 5	38,4 ± 0,8 ^{eb}	4,0	36,2 ± 3,1

^{acde} - достоверные различия при $p < 0,01$

Плазматическая мембрана сперматозоидов, разбавленных в подкисленной синтетической среде, подверглась наибольшему воздействию условий криоохранения. Контрольные образцы, разбавленные в среде с pH 7,2 (С46) достоверно надежно были защищены от агрессивных условий хранения в жидком азоте.

Полученные результаты исследований способствовали изучению влияния больших объемов разбавителя и яичного желтка на криоустойчивость спермы. В качестве основного разбавителя использовали среду С46, а криопротектора - ДМСО. Испытывали следующие варианты разбавителя:

- a) 1 мл среды С46 + ДМСО 10%;
- b) 0,5 мл среды С46 + ДМСО 10% + 0,5 мл яичного желтка;
- c) 0,5 мл среды С46 без добавления ДМСО + 0,5 мл яичного желтка.

Объем свежесобранной спермы для каждого исследуемого образца составлял 15 мкл. Сперму дозами по 15 мкл добавляли сразу в предварительно заготовленные криопробирки Nunc (1,0 мл) с разбавителем с помощью шприца для станка по искусственному осеменению маток. Тщательно пипетировали и переносили в бытовой холодильник LG для эквilibрации. Для исследований было подготовлено 9 образцов.

Подготовка спермы к криоконсервации.

Эквilibрацию подготовленных образцов проводили по методике Hopkins В.К. (2012). После пипетирования исследуемые образцы в криопробирках размещали в сосуде объемом 2 л, наполненным водой комнатной температуры (26 - 28 °С). Сосуд с криопробирками помещали в холодильник на 2 ч при 3 °С. По истечении указанного времени, исследуемые образцы вынимали из сосуда и опускали в емкость с ледяной водой (0 - 1 °С). Далее замораживали по выше указанной методике,

Оттаивание.

Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре 34 °С в течение 10 мин. Перемешивали содержимое криопробирки и центрифугировали однократно в режиме 3000 об./мин. в течение 3 мин. После центрифугирования удаляли супернатантную жидкость, добавляли 500 мкл среды С46 и оставляли на 10 мин. По истечении указанного времени проводили оценку качества заморожено-оттаянной спермы. Применение яичного желтка, в ходе исследований, благотворно сказалось на сохранности плазматических мембран сперматозоидов трутней (Таблица 4).

Таблица 4 - Показатели качества заморожено-оттаянной спермы после 7 сут. криоохранения

Разбавитель	Показатели качества	
	Жизнеспособность, %	Подвижность, балл
С46 (1,0 мл) + ДМСО 10% (контроль)	$51,5 \pm 3,5^{ca}$	1,5
С46 (0,5 мл) + ДМСО 10% + 0,5 мл желток	$47,2 \pm 11,3^{ba}$	1,5
С46 (0,5 мл) (без ДМСО) + 0,5 мл желток	$2,7 \pm 0,7^a$	0,5

^{bc} - достоверные различия при $p < 0,05$

Однако подвижность сперматозоидов, как опытного, так и контрольного образцов, была предельно низкой на одном уровне. Увеличение степени разбавления спермы (в 67 раз) в синтетической среде и в среде с добавлением яичного желтка не приводит к быстрой гибели сперматозоидов. В свою очередь, отсутствие ДМСО в разбавителе способствует практически полной гибели сперматозоидов. Таким образом, сама по себе полусинтетическая среда С46, даже с добавлением яичного желтка, не обладает криопротекторными свойствами для защиты жизненного ресурса спермы трутней.

Следует отметить и тот факт, что использование яичного желтка в составе разбавителя позволило оттаять образцу в течение 1,5 - 2 мин. в сравнении с контрольным образцом, где на полное оттаивание затрачивается 10 мин. Следовательно, на процессы рекристаллизации в криоконсервированной сперме с яичным желтком затрачивается в 5 - 6,7 раз меньше времени, способствуя тем самым снижению количества повреждений сперматозоидов.

С целью изучения криоустойчивости спермы в неэлектролитной среде использовали мед пчелиный натуральный с акации белой (г. Майкоп, Респ. Адыгея, урожай 2018 г.). Мед испытывали как в концентрированном виде (90% - 100%), так и в разбавленном (10%) по методике П.П. Печникова и П.Н. Скаткина (1949).

В случае применения концентрированного меда испытывали следующие варианты разбавителя:

а) 100% Мед 50 мл, лактоза 10 мг (20% от объема меда), сахароза 10 мг (20% от объема меда), яичный желток 2,5 мл (5% от объема меда) – группа М;

б) 100% Мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток 2,5 мл, метанол 10% - 6 мл 250 мкл (из соотношения - 1 часть метанола 10% : 8 частей меда) – группа ММ; метанол 10%-ной концентрации готовили предварительно на деионизированной воде;

с) 100% Мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток 2,5 мл, этанол 10% - 6 мл 250 мкл (из соотношения - 1 часть этанола 10% : 8 частей меда) – группа МЭ; этанол 10%-ной концентрации готовили предварительно на деионизированной воде;

д) 100% Мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток 2,5 мл, ДМСО 5 мл (10% от объема меда) – группа МД. ДМСО был предоставлен ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (109428, Россия, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1);

е) 100% Мед 50 мл, лактоза 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток 2,5 мл, глицерин 3% - 6 мл 250 мкл (из соотношения – 1 часть глицерина 3% : 8 частей меда) – группа МГ; глицерин 3%-ной концентрации готовили предварительно на деионизированной воде.

Перед приготовлением разбавителя предварительно разогревали мед на водяной бане при температуре 40 - 45 °С в течение 30 мин. Концентрацию ионов водорода в разбавителе доводили 6М NaOH до значения pH 8,2. Исходный показатель pH меда 5,0 - 6,0.

Подготовка спермы к криоконсервации. Для исследований использовали неразбавленную сперму, хранившуюся в охлажденном состоянии в течение 3 мес. при температуре 3 °С в бытовом холодильнике LG. Перед использованием сперму предварительно нагревали на водяной бане при 34 °С в течение 10 с. Далее спер-

му смешивали с разбавителем, разогретым до 37 °С, в соотношении 1 : 8 (на 1 часть спермы : 8 частей разбавителя). Применяли дозу спермы объемом 10 мкл. Разбавителя, соответственно, затрачивали 80 мкл, предварительно разлитого в криопробирки Nunc объемом 1,8 мл. Таким образом, было подготовлено 15 образцов по 90 мкл разбавленной спермы. Далее, подготовленные образцы 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. Криоконсервацию проводили по выше указанной методике,

Оттаивание. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре 37 - 38 °С: в течение 20 - 30 с. Затем, в пробирку с образцом добавляли 250 мкл свежей среды С46 без ДМСО, предварительно нагретой до 37 °С. Тщательно перемешивали и проводили оценку качества заморожено-оттаянной спермы. Центрифугирование не применяли. Результаты исследований продемонстрировали натуральный пчелиный мед в качестве криопротектора (Таблица 5).

Таблица 5 - 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
группа М	45,3 ± 1,6	25,5 ± 3,4	37,2 ± 0,5 ^{cab}	0,5	1,0	3,0
группа МГ	51,5 ± 2,1	41,2 ± 2,3	78,0 ± 1,4^b	0,5	2,0	4,0
группа МД	40,5 ± 4,5	26,5 ± 1,8	79,6 ± 1,2^a	0,5	1,0	4,0
группа МЭ	42,5 ± 3,8	26,9 ± 2,0	28,5 ± 0,9 ^{dab}	0,5	1,0	1,0
группа ММ	45,0 ± 2,5	-*	27,7 ± 0,6 ^{cab}	0,5	-*	2,0

* - потеря образца;

^{cdeab} - достоверность различий при $p < 0,01$

Пчелиный мед, благодаря своим физико-химическим свойствам, даже без использования дополнительных криопротекторов, превысил показатель целостности мембран (жизнеспособность) на 35% в сравнении со средой С46 без криопротектора. А в сочетании с глицерином 3% или ДМСО 10% мед обеспечил самую высокую защиту жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы в сравнении с синтетическими средами и яичным желтком (Таблица 6).

Таблица 6 - Показатели качества спермы после криоконсервации в полусинтетической среде и 90% пчелином меде

Показатели	Разбавитель		
	С46 + ДМСО 10% (контроль)	группа МГ	группа МД
Жизнеспособность, %	55,1 ± 2,5 ^a	78,0 ± 1,4 ^{ba}	79,6 ± 1,2 ^{ca}
Подвижность, балл	4,0	4,0	4,0

^{abc} - достоверные различия при $p < 0,01$

Искусственное осеменение маток осуществить не удалось по случаю проведения исследований в конце активного сезона, когда уже отсутствовали неплодные матки. Таким образом, оценку оплодотворяющей способности проводили уже в 2020 г. Однократному осеменению подвергли неплодных маток в количестве 10 шт. с объемом вводимой спермы 10 мкл. Выживаемость маток составила 10%. По итогам искусственного осеменения матки потомство рабочих пчел составило 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.

В период активного сезона 2020 г. испытывали модифицированный медовый разбавитель по П.П. Печникову и П.Н. Скаткину (1949). Состав: мед 10% - 50 мл, лактоза – 10 мг, сахароза 10 мг, яичный желток – 2,5 мл, глицерин 3% - 6 мл 250 мкл (или ДМСО 10% - 5 мл). Рабочий раствор 10% меда готовили на деионизиро-

ванной воде по методике П.П. Печникова и П.Н. Скаткина (1949) на основе меда с белой акации (г. Майкоп, Респ. Адыгея) урожая 2018 г. Глицерин 3% концентрации предварительно готовили на деионизированной воде. В состав разбавителя добавляли из соотношения 1 часть глицерина 3% : 8 частей рабочего раствора меда 10%. Мед предварительно нагревали на водяной бане 40 - 45 °С в течение 30 мин. Концентрацию ионов водорода в готовом разбавителе доводили 6М NaOH до значений pH 8 - 9.

Криоконсервация и оттаивание.

В криопробирку Nunc объемом 1,8 мл добавляли 80 мкл свежеприготовленного разбавителя, затем 10 мкл спермы и все перемешивали. Таким образом, было подготовлено 15 образцов по 90 мкл разбавленной спермы. Далее приготовленные образцы помещали в визотубы, которые, в свою очередь, опускали в сосуд с водой комнатной температуры. После чего этот сосуд размещали в бытовом холодильнике LG на 2 ч при 3 °С для эквilibрации. Замораживание проводили по аналогии с предыдущими опытами. Срок криохранения составил одни сут. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при 37 °С в течение 1 мин. После оттаивания в образец добавляли 1 мл разбавителя нагретого до 37 °С, тщательно перемешивали, пипетировали и оставляли на 5 мин. Затем, однократно центрифугировали на Mini Spin (Germany) в течение 3 мин. при 3000 об. Далее, снимали супернатант и с помощью капилляра блока-шприца для искусственного осеменения маток набирали сперму со дна криопробирки.

Жизнеспособность сперматозоидов в ходе исследований оставалась на достаточно высоком уровне, особенно в образцах с глицерином (Таблица 7).

Таблица 7 - Основные показатели качества спермы трутней до и после криохранения в 10% медовом разбавителе

Исследуемые Показатели	Наименование разбавителя							
	группа МД				группа МГ			
	до эк-вил.	после 15 мин. при -40-50 °С	после 20 мин. при -196 °С	через сут. после крио	до эк-вил.	после 15 мин. при -40-50 °С	после 20 мин. при -196 °С	через сут. после крио
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

Однако подвижность спермиев заметно снижалась во время криоконсервации. Так, в диапазоне температур от -40 до -50 °С сперматозоиды практически в два раза сократили свою подвижность. После 20 мин. нахождения образцов над зеркалом жидкого азота (-196 °С) на расстоянии 1 см подвижность еще снизилась на 18%, а в образцах с глицерином она и вовсе уже отсутствовала. Через сут. после криохранения почти на 30% упала активная подвижность (поступательное и манежное движение) сперматозоидов, то есть в большинстве случаев они просто вибрировали. В образцах с глицерином картина не изменилась, несмотря на достаточно высокий уровень целостности мембран в сравнении с ДМСО. Ранее было отмечено, что неподвижные спермии могут оставаться жизнеспособными ввиду

сохранности их плазматических мембран (В. Науменкова, с соавт., 2020). По результатам проведенного анализа, было принято решение искусственно осеменить пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой из образцов с ДМСО.

Следует отметить и тот факт, что криоконсервация спермы в меде вызывает незначительные аномалии в морфологии сперматозоидов (Таблица 8). Отдельного внимания заслуживает аномалия в теле сперматозоида - расслоение жгутика. В ходе исследований нами зафиксированы различные варианты расслоений жгутиков, - от простых до сложных (Рисунок 15). Сложные формы расслоения жгутика мы наблюдали у сперматозоидов, разбавленных в синтетических средах для культур клеток насекомых и хранившихся как в жидком азоте, так и при положительных температурах. В результате хранения спермы в меде, зафиксирована простая форма расслоения жгутика в области шейки. По теории Е. Платова (1973) причиной температурного шока сперматозоидов является повреждение фибрилл жгутика, а также изменение конформации и конфигурации белковых и других макромолекул. Данные процессы могут возникать и как вторичные явления, то есть как следствия температурного шока (Ф. Осташко, 1976). При использовании меда в качестве криопротектора, необходимо учитывать и тот факт, что физико-химический состав меда зависит и от его ботанического происхождения. Данное обстоятельство может объяснить различные результаты, полученные другими исследователями при использовании меда в составе основного разбавителя. Так Malik A. et al. (2017), экспериментируя с замещением глицерина медом в концентрации 8%, выявили значительное увеличение аномалий в морфологии сперматозоидов ($8,35 \pm 0,16\%$), при этом жизнеспособность ($82,19 \pm 1,41\%$) и подвижность ($76,63 \pm 3,21\%$) достоверно не отличались от контроля. M. Shikh Maida et al. (2018), N.A. Fanni et al. (2018), напротив, не обнаружили серьезных изменений в морфологии спермиев, но отметили наиболее частые изменения в головке и хвосте жгутика. Другие авторы (A. Zaghloul, 2017) показали уменьшение процента мертвых и аномальных сперматозоидов. В любом случае структурные изменения в жгутике сперматозоидов следует рассматривать в тесной связи с функциональным состоянием митохондрий жгутика. Поэтому требуются дополнительные

фундаментальные исследования митохондриального статуса и экспрессии специфических митохондриальных белков (M. Shikh Maidina, M. Padlana, et al., 2018).

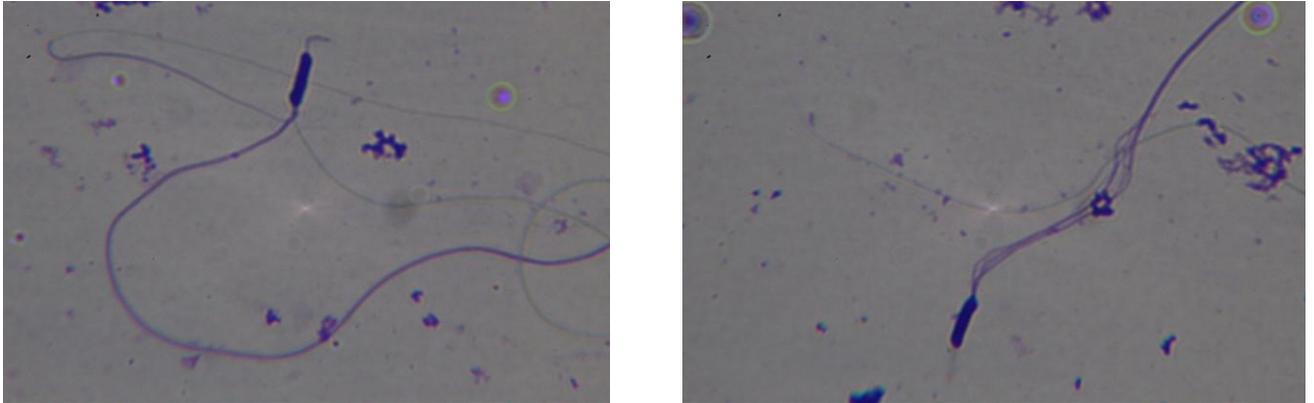


Рисунок 15 - Фото аномалий в морфологии сперматозоидов трутней
(увеличение 2000×)

Таблица 8 - Морфологические показатели сперматозоидов до и после криоконсервации в медовом разбавителе

Разбавитель	До криоконсервации			После оттаивания		
	Морфологически нормальных клеток, %	Сперматозоиды с аномальной морфологией		Морфологически нормальных клеток, %	Сперматозоиды с аномальной морфологией	
		дефекты головок, %	дефекты жгутиков (расслоение), %		дефекты головок, %	дефекты жгутиков (расслоение), %
группа М	71,2 ± 2,2	27,2 ± 2,0	0	87,1 ± 1,3	12,4 ± 2,5	0,5 ± 2,0
группа МГ	80,9 ± 1,7	19,1 ± 1,2	0	93,7 ± 2,0	6,3 ± 1,4	0
группа МД	37,8 ± 2,3	62,1 ± 2,0	0	90,4 ± 1,9	6,9 ± 1,8	2,9 ± 1,2
группа МЭ	Нет данных			87,5 ± 2,3	10,5 ± 3,2	2,0 ± 2,2
группа ММ	81,0 ± 1,4	18,9 ± 1,3	0	94,8 ± 1,1	4,9 ± 1,7	0

4.1.1 Качественные показатели пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе пчелиного меда

С целью оценки репродуктивных показателей искусственно осемененных маток были сформированы 4-х местные микронуклеусы на $\frac{1}{4}$ стандартной гнездовой рамки. Учет печатного расплода проводили посредством прямого подсчета количества пчелиных и трутневых ячеек. Для предотвращения вылета искусственно осемененных маток на доспаривание летки закрывали ганемановской решеткой.

Осеменили маток в количестве 6 шт. Применяли однократное осеменение с объемом вводимой спермы 10 мкл. Прием маток пчелиными семьями составил 100%. Следует отметить, что рабочие пчелы гораздо лучше воспринимали маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе разбавителя из натурального пчелиного меда, нежели из синтетических питательных сред для культур клеток насекомых, по опыту ранее проводимых исследований.

В ходе эксперимента одна матка погибла, а две из пяти оставшихся, дали потомство рабочих пчел более 50% (Таблица 9, Рисунок 16).

Таблица 9 - Репродуктивные показатели маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой в составе разбавителя 10% мед + ДМСО + желток

№ 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 микро-нуклеусе
6	нет данных	нет данных	-	погибла через 48 ч после осеменения



Рисунок 16 - Печатный расплод маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе 10% медового разбавителя: а – матка №1; б- матка №2; в – матка №3; г – матка №5

Количество осемененных маток, дающих потомство рабочих пчел более 50% можно увеличить за счет доработки процедуры пробподготовки образца к криохранению. Пчелиный мед содержит много примесей, осаждающихся на дне криопробирки после центрифугирования. Объем осадка в итоге получается больше того объема спермы, который закладывался на криохранение. В результате, в капилляр для осеменения маток вбирается помимо спермы много примеси. А подчас, только одна примесь.

Работа по испытанию глицерина в качестве альтернативы ДМСО требует дальнейшего продолжения.

4.2 Жизнеспособность сперматозоидов, замороженных в среде С46 после длительного хранения в жидком азоте

Исследование качественных показателей спермы после длительного хранения в жидком азоте проводили в два этапа в период с 2017 по 2018 гг. Задача первого этапа, заключалась в оценке оплодотворяющей способности сперматозоидов после 6 и 24 лет криохранения. В связи с чем, в период активного сезона 2017 г. осуществили искусственное осеменение пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой. Результаты исследований описаны ниже.

На втором этапе (2018 г.) планировалось выявить динамику показателей жизнеспособности сперматозоидов с момента оттаивания пробы до осеменения и установить влияние центрифугирования на качественные показатели спермы. С целью выполнения поставленной задачи в период активного сезона 2013 г. нами было заготовлено пять образцов криоконсервированной спермы в криосо-ломинах 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, а одну пробу 1993 г. при температуре 40 °С в течение 30 с (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007). После водяной бани, когда в пробирке Nunc полностью растаял лед, образец делили на две равные части и переносили в стерильные пробирки Eppendorf (1,5 мл). Затем, в каждую из них добавляли по 500 мкл свежей питательной среды С46 и тщательно перемешивали.

Первую половину образца готовили для осеменения методом однократного центрифугирования в режиме 20 мин./1100 об. (А. Collins, 2004). Вторую половину готовили по методике А. Бородачева и О. Кабашовой (2007). Образцы центрифугировали на MiniSpin Eppendorf в течение первых 3 мин. при 3000 об. По окончании центрифугирования отбирали супернатантную жидкость однора-

зовым шприцем. Затем, вновь добавляли в пробирку 500 мкл свежей среды С46, тщательно перемешивали и оставляли на 10 мин. По истечении указанного времени проводили повторное центрифугирование в режиме 3 мин./3000 об. По окончании вновь отбирали супернатантную жидкость. Пробы 2013 г. не подвергали центрифугированию по причине малого объема спермы.

Жизнеспособность сперматозоидов оценивали на следующих этапах подготовки проб – через 10 с (или 30 с) после оттаивания, через 5 мин., после первых 3 мин. центрифугирования, по истечении 10 мин. инкубации в свежей среде С46, по завершении повторного центрифугирования и однократного в режиме 20 мин./1100 об.

По истечении 10 с пребывания в водяной бане, полное оттаивание спермы произошло только в образце 2013 г. В остальных пробах, включая 1993 г. с режимом оттаивания 40 °С 30 с, 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 17).

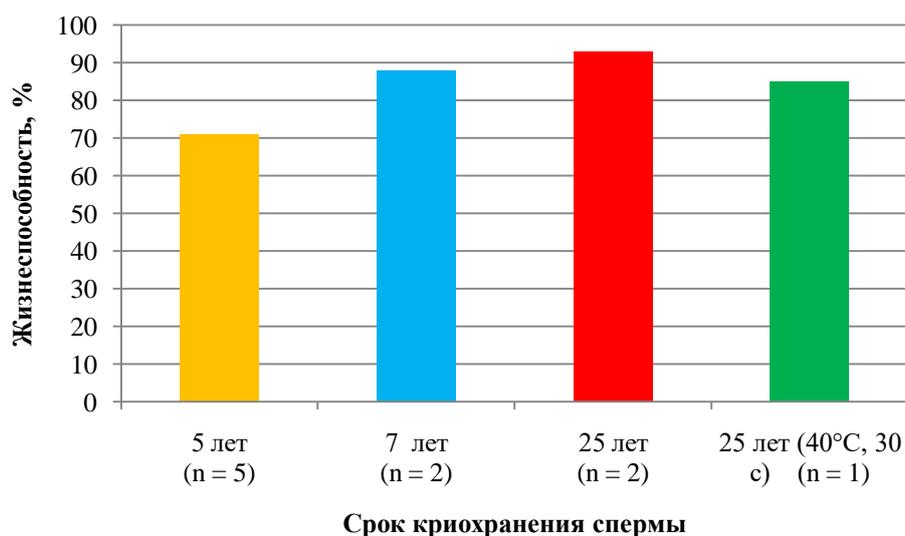


Рисунок 17 – Зависимость жизнеспособности сперматозоидов от сроков хранения в жидком азоте

Интересно отметить, что 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. При оценке интактных и поврежденных сперматозоидов выявлены массовые деформации их головок (Рисунок 18, 19 а, б). Наиболее низкий процент выживаемости (71%) и наиболее высокий процент по деформации головок (41%) был зафиксирован в пробе 2013 г.

В проводимых экспериментах было выявлено большое влияние на жизнеспособность сперматозоидов процессов замораживания и оттаивания. Отметим, что проба 2013 г. хранилась в криосоломинах, в отличие от проб 2011 и 1993 гг.

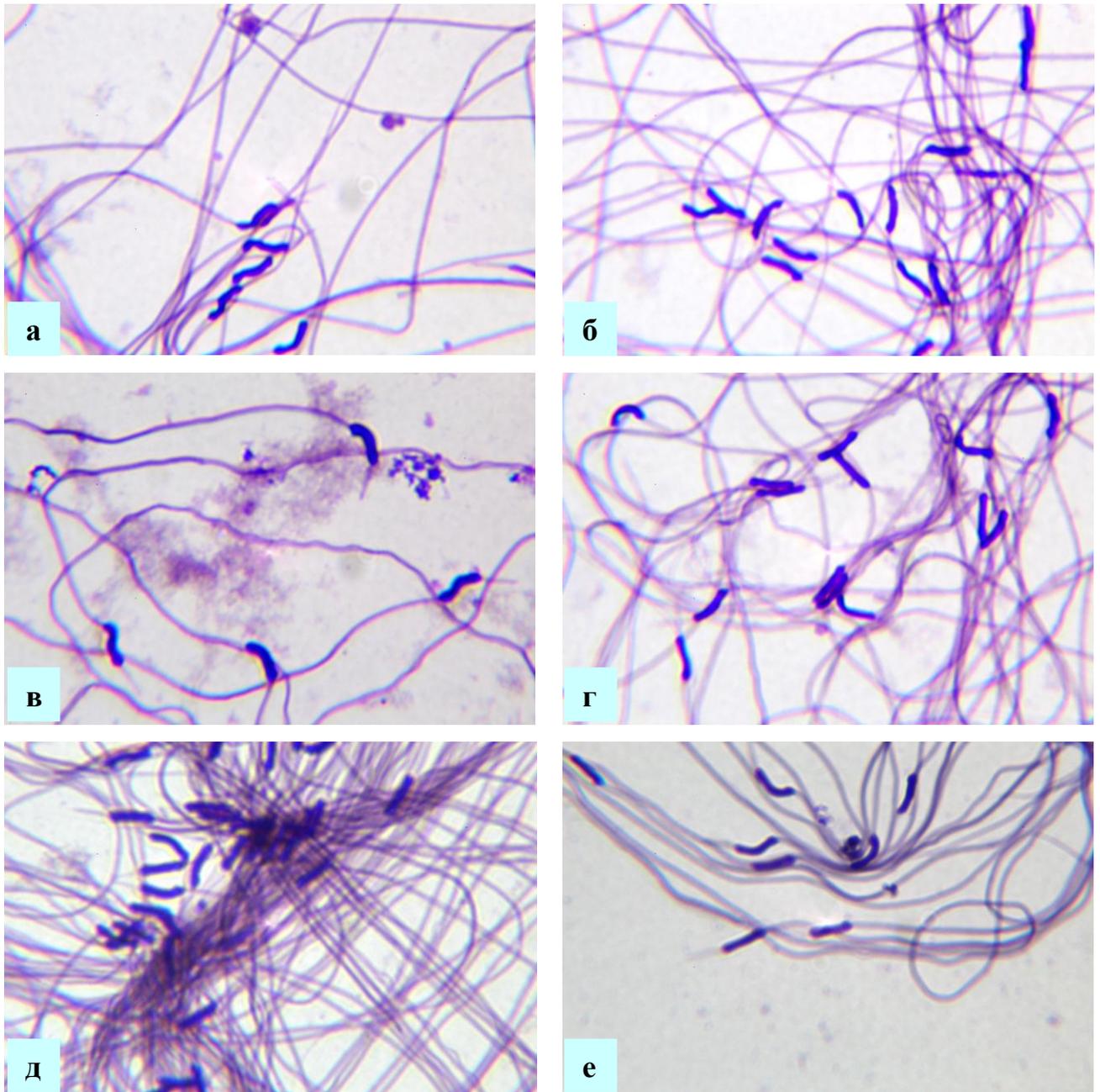


Рисунок 18 - Деформированные головки сперматозоидов (а, б, в, г - после 25 лет хранения в жидком азоте; д, е – после 5 лет криохранения)

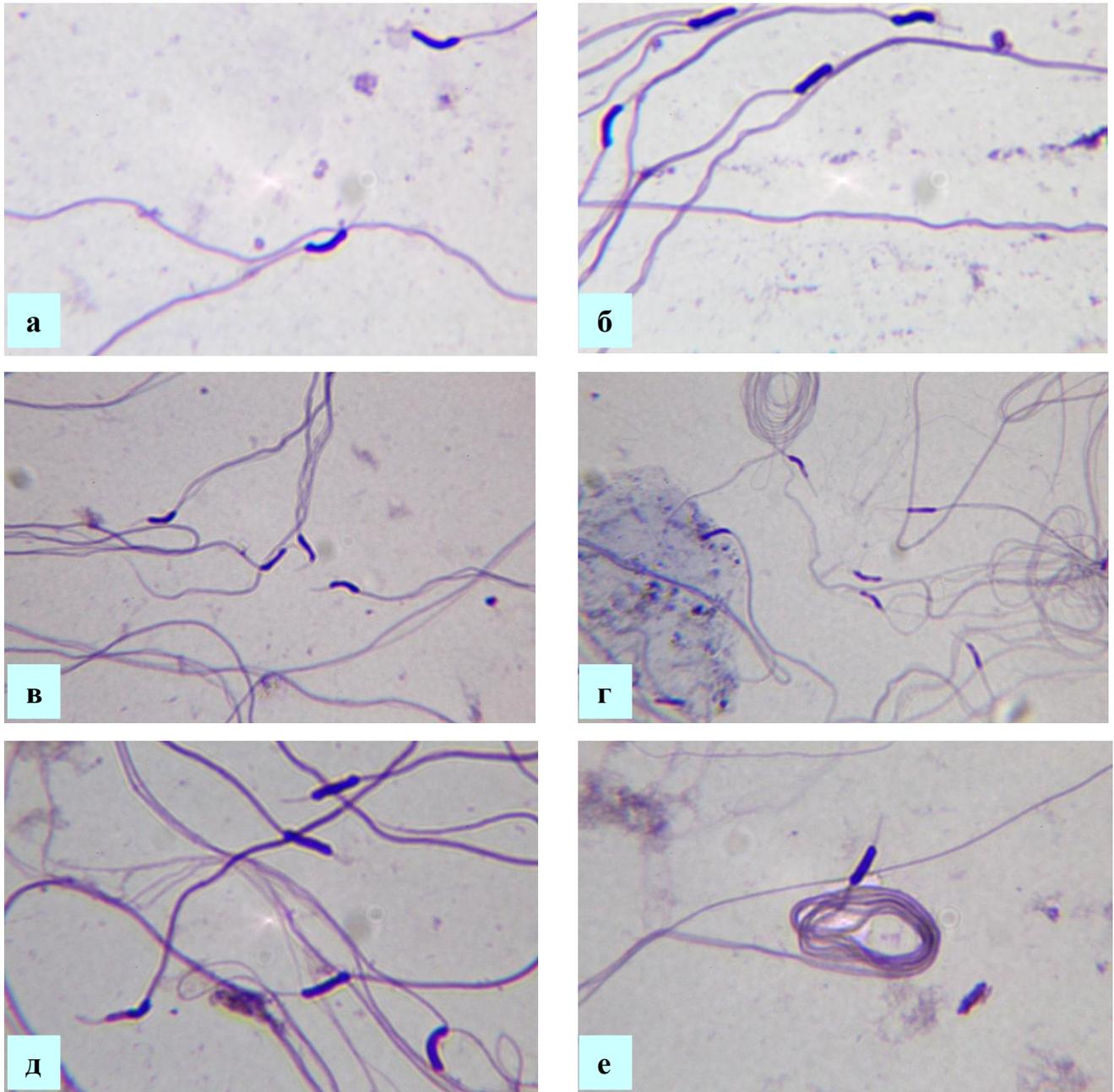


Рисунок 19 - Деформированные головки сперматозоидов (а, б – после 7 лет криохранения; в – через 60 сут. с тетрациклиновой мазью; г – через 60 сут. с синтомициновой мазью; д – в среде С46 через 60 сут. при 24 - 26 °С; е – нормальная форма головки после 30 сут. при 3 °С в среде Lonza)

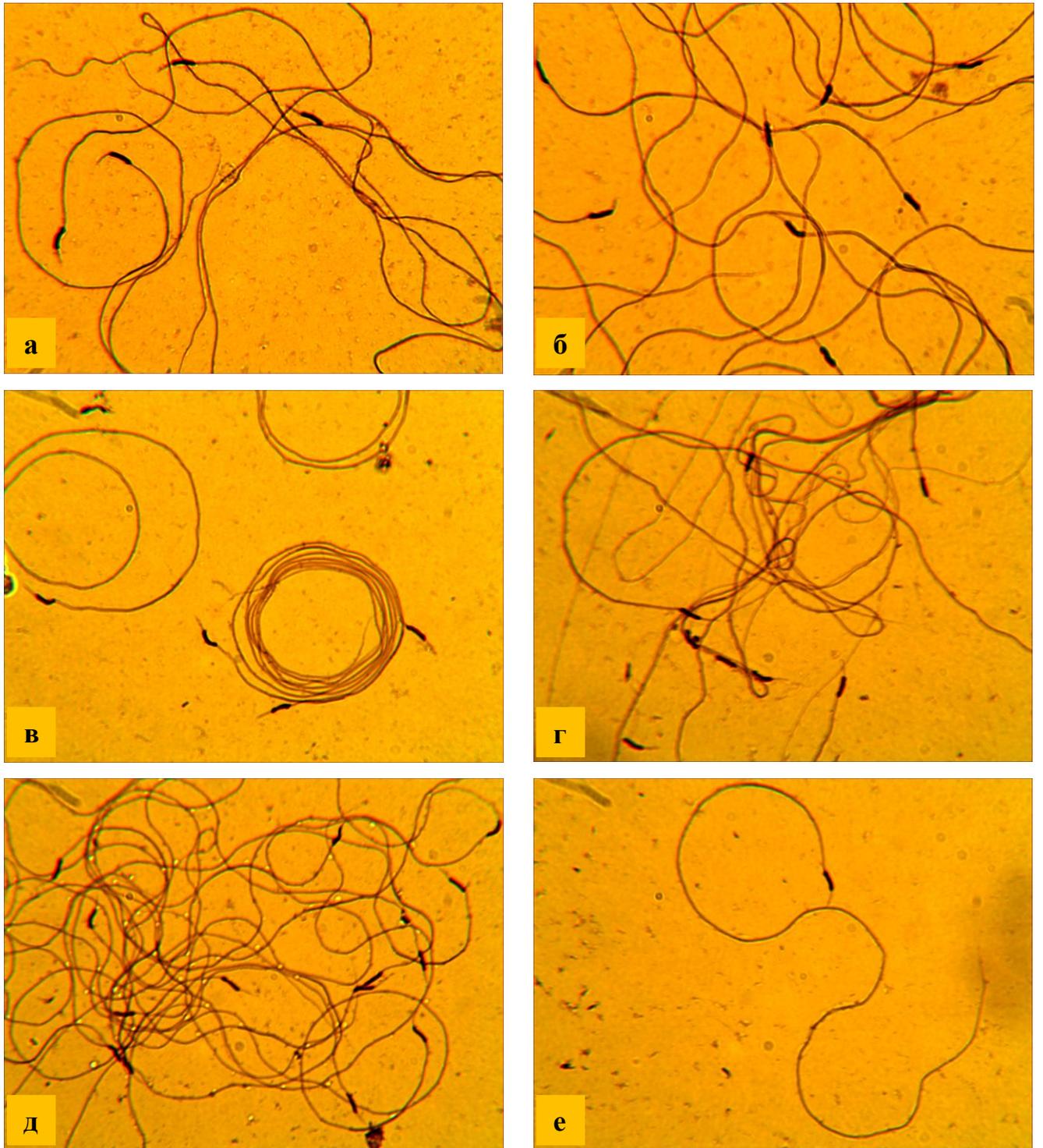


Рисунок 20 - Головки сперматозоидов свежесобранных образцов спермы

Снижение жизненного ресурса спермы на 9 - 10% произошло в образцах 1993 г. после первых 3 мин. центрифугирования (Рисунок 21).

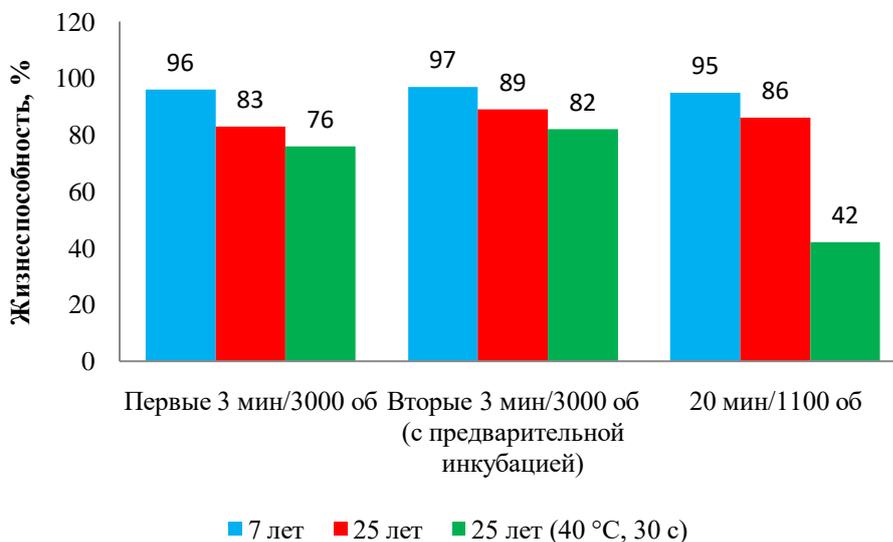


Рисунок 21 - Влияние центрифугирования на жизнеспособность заморожено-оттаянных сперматозоидов

Но, предварительная инкубация образцов в свежей среде С46 в течение 10 мин. позволила приблизить жизнеспособность сперматозоидов к исходным показателям (Рисунок 22, 23).

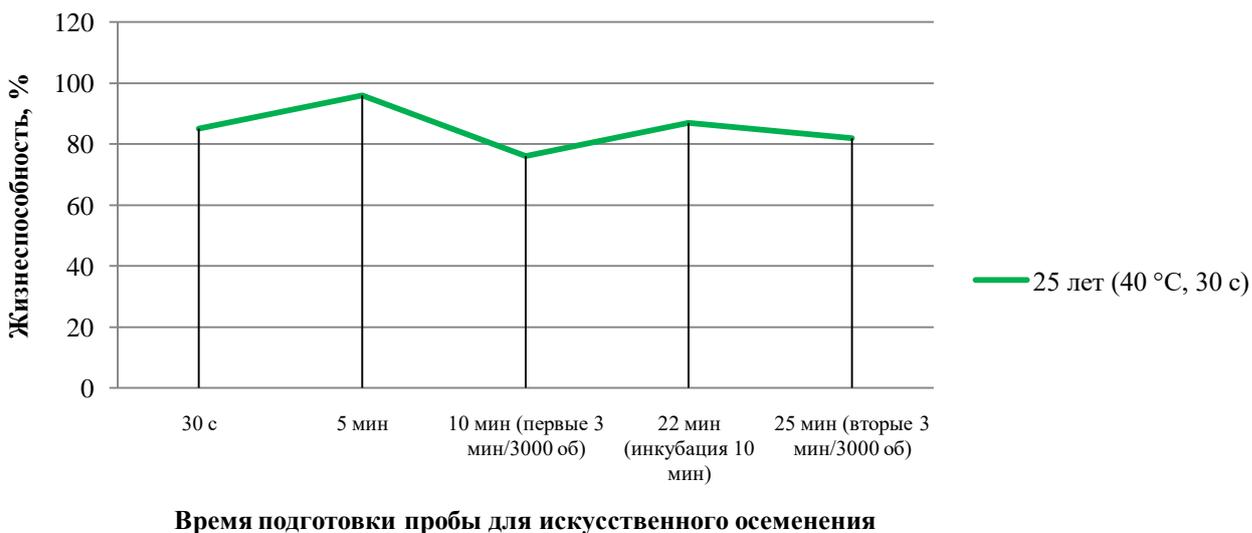


Рисунок 22 - Динамика показателя жизнеспособности сперматозоидов образца 25 летней криоконсервации (40 °C, 30 с) от оттаивания до осеменения



Рисунок 23 - Динамика показателя жизнеспособности сперматозоидов образца 25 летней криоконсервации от оттаивания до осеменения

4.2.1 Качественные показатели пчелиных маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе полусинтетической среды С46

Искусственное осеменение пчелиных маток заморожено-оттаянной спермой проводили в период активного сезона 2017 г. Для проведения исследований использовали пробы спермы 2011 и 1993 гг. закладки на криохранилище из криобанка спермы трутней НИИ пчеловодства. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре 34 - 35 °С в течение 10 мин. Дальнейшие действия по подготовке проб к осеменению осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями А. Бородачева и О. Кабашовой (2007). Небольшое отклонение от нормы по концентрации сперматозоидов (А. Бородачев, О. Кабашова, 2007) отмечено у образца спермы 2011 г. (Таблица 10).

Таблица 10 - Качественные показатели заморожено-оттаянной спермы трутней

Год криоконсервации пробы спермы	Концентрация сперматозоидов, млн/мкл	Подвижность сперматозоидов, балл
2011	4,6 ± 1,0	3,0
1993	6,5 ± 0,65	3,0

Для искусственного осеменения пчелиных маток, с целью получения потомства рабочих особей, используют сперму с оценкой не менее 3 баллов, содержащей более 50% подвижных сперматозоидов (J. Rhodes, 2008). Применяли однократное осеменение с объемом вводимой спермы 8 мкл. Результаты искусственного осеменения маток представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты искусственного 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

Более продолжительный временной интервал от осеменения до начала яйцекладки имели пчелиные матки, осемененные спермой образца 1993 г.

По результатам оценки репродуктивных показателей осемененных маток, количество печатного расплода рабочих пчел составило менее 50 %, что говорит о низкой оплодотворяющей способности спермы (Таблица 12; Рисунок 24).

Таблица 12 - Количество печатного расплода маток, искусственно осемененных заморожено-оттаянной спермой

Год криоконсервации пробы спермы	№ пчелиной семьи	Площадь печатного расплода трутней, см ²	Площадь печатного пчелиного расплода, см ²	%, пчелиного расплода
2011	1	18,75	0	0
	5	37,5	37,5	50
	8	275	37,5	12
	17	150	50	25
	18	275	50	15
	19	Матка убита пчелами после начала яйцекладки*		
	23	300	75	20
	55	106,25	18,75	15

* - из девяти искусственно осемененных маток заморожено-оттаянной спермой, одна убита пчелами, вторая улетела при посадке в рамочный сетчатый изолятор

Матки, искусственно осемененные заморожено-оттаянной спермой образца 1993 г. оценивали только по срокам начала яйцекладки. Учитывая сроки посадки экспериментальных маток (середина июня), большие временные промежутки от начала посадки маток до появления первых яиц (отсутствие воспроизводства в семье более 14 сут.), экспериментальные матки, осемененные спермой образца 1993 г. после появления первых яиц заменяли на неплодных маток для естественного спаривания и искусственного осеменения свежесобранной спермой.

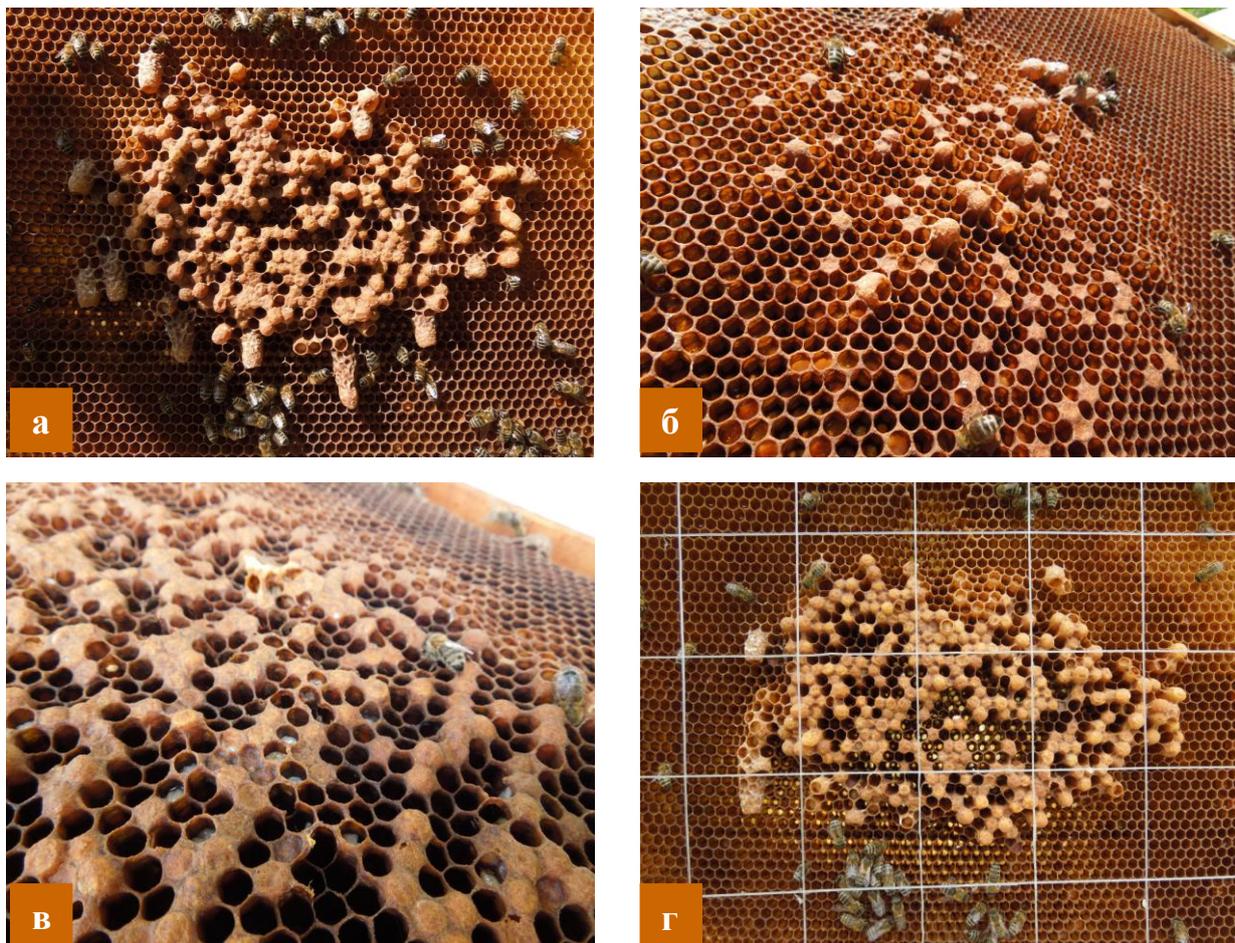


Рисунок 24 - Печатный расплод пчелиной матки, искусственно осемененной заморожено-оттаянной спермой

Наличие свищевых маточников свидетельствует о неудовлетворительном качестве искусственно осемененных маток для пчелиной семьи.

Весна и начало лета активного сезона 2017 г. сопровождались частыми возвратными похолоданиями и низкими ночными температурами, что затрудняло организацию и проведение работ по получению неплодных маток и ранних половозрелых трутней. Первые половозрелые трутни, пригодные для отбора спермы, появились в середине июня. Таким образом, контрольную группу пчелиных семей удалось сформировать лишь в конце июня.

Результаты искусственного осеменения пчелиных маток контрольной группы представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты искусственного осеменения пчелиных маток свежееотобранной спермой (контроль)

Объем вводимой спермы, мкл	Дата искусственного осеменения	Выживаемость маток после осеменения, %	Прием маток после осеменения, %	Начало яйцекладки после осеменения, сут.
4 (n = 6)	12 - 13.07	100	67	5 – 7
6 (n = 5)	23 - 27.06	100	83	6 – 15
8 (n = 4)	10 - 11.07	100	100	9 – 13

Лучше всего пчелы принимали искусственно осемененных маток 8 мкл спермы. В свою очередь, наиболее ранними сроками начала яйцекладки отличались матки, осемененные 4 мкл спермы.

Дальнейшее наблюдение за осемененными матками с 3 по 30 августа выявило наибольшую яйценоскость маток, осемененных 6 мкл спермы (Таблица 14).

Формирование контрольных групп пчелиных семей с матками, осемененными 4 и 8 мкл спермы, совпало с началом главного медосбора, вследствие чего произошло ограничение яйцекладки маток (Таблица 15). В начале августа показания контрольного улья варьировали в пределах 1 - 1,5 кг.

Заметное снижение темпов яйцекладки искусственно осемененных маток произошло во второй декаде августа. Наиболее плавное снижение темпов яйцекладки за период осеннего наращивания пчел отмечено у группы пчелиных семей с матками, осемененными 4 мкл спермы.

Таблица 14 - Максимальная яйценоскость пчелиных маток искусственно осемененных разными объемами свежей спермы за период осеннего наращивания пчел (контроль)

Статистические показатели	Объем вводимой спермы, мкл		
	4	6	8
	Яйценоскость, яиц		
M±m	1262,7 ± 130,7	1646,4 ± 190,5	1458,2 ± 293,1
Lim	842 - 1642	1058 - 2025	883 - 2242
Σ	320	426	586
Cv,%	25	26	40
Td	-	1,7	0,6

Таблица 15 - Темп яйцекладки пчелиных маток искусственно осемененных разными объемами свежей спермы, за период осеннего наращивания пчел

Учет яйцекладки после осеменения	Объем вводимой спермы, мкл		
	4	6	8
	Темп яйцекладки яиц/сутки		
3.08	480 (n = 6)	788 (n = 5)	625 (n = 4)
15.08	433 (n = 6)	620 (n = 5)	525 (n = 4)
30.08	349 (n = 5)	238 (n = 5)	308 (n = 4)
M±m	421,0 ± 38,3	549,0 ± 162,7	486,0 ± 93,6



Рисунок 25 - Печатный расплод пчелиной матки, искусственно осемененной свежесобранной спермой

4.3 Влияние криоконсервации на морфометрические параметры сперматозоидов трутней медоносной пчелы

В этом исследовании мы установили влияние криоконсервации на морфометрические параметры головки сперматозоидов трутней медоносной пчелы. Размеры головки сперматозоидов (длина акросомы, длина ядра, площадь ядра и периметр ядра) заморожено-оттаянных образцов были значительно ниже, чем у свежесобранных (Таблица 16).

Таблица 16 - Влияние криохранения в среде С46 на морфометрические параметры сперматозоидов

Параметр	Образец спермы						
	Контроль	1993	р	2011	р	2013	р
Акросома (длина), мкм	3,88	3,96	0,32	3,65	0,11	3,72	0,4
Ядро (длина), мкм	6,36	5,07	0,00	4,82	0,00	4,66	0,00
Площадь ядра, мкм ²	9,07	4,31	0,00	4,06	0,00	3,55	0,00
Периметр ядра, мкм	14,61	11,59	0,00	11,11	0,00	10,57	0,00

Таблица 17 - Морфометрические параметры сперматозоидов после 7 сут. криохранения в конц. пчелином меде

Параметр	Образец спермы								
	Контроль	группа М	р	группа МГ	р	группа МД	р	группа ММ	р
Акросома (длина), мкм	3,88	3,18	0,005	3,62	0,43	4,11	0,12	3,47	0,08
Ядро (длина), мкм	6,36	4,84	0,00	5,79	0,00	6,47	0,01	5,58	0,00
Площадь ядра, мкм ²	9,07	4,86	0,00	4,72	0,00	7,36	0,00	4,9	0,00
Периметр ядра, мкм	14,61	11,12	0,00	12,62	0,00	14,45	0,13	12,19	0,00

Уменьшение морфометрических параметров головки сперматозоидов после криоконсервации может быть следствием: прогрессирующей дегидратации сперматозоида при охлаждении и замораживании; большого содержания спермиев с

поврежденной акросомой (с последующей потерей акросомального содержимого); гиперконденсацией хроматина сперматозоида, которая ранее была связана с уменьшением поверхности головки сперматозоида у человека (Т. Rijsselaere et al., 2004). Например у коз (С. Gravance et al., 1997), криоконсервация не вызывает существенных различий в размерах головки сперматозоида. Эти противоречивые результаты могут быть обусловлены определенной видовой чувствительностью к процессу криоконсервации или разными протоколами криоконсервации (например, концентрация глицерина, скорость замораживания и оттаивания), что приводит к различному влиянию на характеристики сперматозоидов после оттаивания (С. Gravance, et al., 1997, 1998).

4.4 Сохранение спермы трутней в охлажденном состоянии

Работа с пчелиными семьями носит исключительно сезонный характер. В условиях Рязанской области появление половозрелых трутней, пригодных для отбора качественной спермы, приходится на конец июня - июля. В связи с чем, стартовой площадкой для начала исследований была выбрана «Краснополянская опытная станция пчеловодства (КОСП)» (Краснодарский край, г. Сочи, пос. Молдовка), филиал ФНЦ пчеловодства. Короткий зимний период (2 мес.) и бурное весеннее развитие благоприятствуют ведению племенной работы в более ранние сроки по сравнению с нечерноземной зоной России.

Таким образом, в период с 28 мая по 1 июня 2018 г. было заготовлено 12 образцов свежесобранной спермы объемом по 20 мкл от половозрелых трутней серой горной кавказской породы пчел (пасека № 27). Через 48 ч транспортировки проводили повторную оценку качества спермы в лаборатории инструментального осеменения маток ФНЦ пчеловодства. Транспортировку образцов осуществляли в бытовых металлических термосах емкостью по 0,5 л. Капилляры помещали в полиэтиленовый пакет для бытовой заморозки, далее, обворачивали слоем ваты 3 см

и вновь помещали в полиэтиленовый пакет. Полученные свертки обвязывали и помещали в термосы: с водопроводной водой 20 °С, со льдом и без наполнителя. Во время транспортировки произошло значительное снижение жизнеспособности сперматозоидов на 13 - 44% (Таблица 18). В значительной мере это отразилось на образцах в термосе со льдом, перешедшим в состояние воды.

Таблица 18 - Показатели свежеотобранной спермы трутней до и после транспортировки

Показатели	Способ транспортировки		
	Термос, (вода 20 - 24 °С) (n = 3)	Термос, (лед / вода) (n = 3)	Термос без наполнителя (n = 3)
Концентрация, млн/мкл M ± m	8,25 ± 1,15	4,0 ± 0,17	4,4 ± 1,28
Подвижность, балл	4,0	4,0	4,0
Жизнеспособность, % (свежеотобранная до помещения в термос)	90,0	92,0	90,0
Жизнеспособность, % после 48 ч транспортировки	53,0	48,0	77,0

Отсутствие стабильных температурных условий транспортировки отрицательно сказывается на качественных показателях спермы. Далее провели повторные исследования в лабораторных условиях с последующим искусственным осеменением маток с объемом вводимой спермы 4 – 8 мкл. Жизненные ресурсы свежеотобранной спермы подвержены резкому сокращению при холодовом ударе от температуры тела до 0 °С (Таблица 19). Транспортировка в таких условиях возможна в разбавленном состоянии с использованием полноценной питательной среды ($t_d = 1,7$; $p = 0,05$). С другой стороны, кратковременное воздействие холодового шока от температуры тела до стабильного показателя 3 °С, незначительно отражается на качестве спермы ($t_d = 2,3$ при $p < 0,05$) (Таблица 19).

Таблица 19 - Физиологические показатели пчелиных маток, искусственно осемененных неразбавленной спермой после 2 сут. хранения в различных температурных режимах

Показатели	Температура хранения, °С		
	0 °С		3 °С
	неразбавленная	разбавленная (среда С46)	
Жизнеспособность сперматозоидов, %	64,3	90	98
Количество осемененных маток, шт.	8	5	5
Выживаемость маток, %	100	100	100
Количество маток с пустым семяприемником, шт. (%)	4 (50%)	1 (20%)	0
Количество маток с семяприемником, содержащим сперму, шт. (%)	4 (50%)	4 (80%)	5 (100%)
Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, млн/мкл	Lim 0,163 - 1,1	Lim 0,350 - 1,8	Lim 0,288 - 5
M ± m	0,678 ± 0,19	1,3 ± 0,32	2,6 ± 0,82
Количество маток с наличием спермы в яйцеводах, шт.	0	0	0

Для хранения спермы в разбавленном состоянии использовали следующие разбавители: трис буфер pH 7,2 (L. Verma, 1978), трис буфер pH 8,8 (J. Rhodes, 2008), киев буфер pH 8,3 (A. Collins, 2000), среда С46 + 10% ЭТС + 0,1% пенициллина pH 7,2 (В. Какпаков, 1989), среда Lonza Insect-XPRESS™ pH 6,1 (Sartorius Stedim, Belgium). Буферы готовили на стерильной деионизированной воде

(НПП «Пан-Эко», Россия) и фильтровали через миллипорный фильтр GVS с диаметром пор 0,22 мкм (НПП «Пан-Эко», Россия). Для обработки против бактериальной контаминации применяли рабочий раствор (10 мл/л) пенициллина-стрептомицина лиофилизованного 100× (НПП «Пан-Эко», Россия). Среда С46 была предоставлена ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН». Свежеотобранную сперму дозами по 16 мкл смешивали с разбавителями в соотношении 1 : 1. Подготовленные образцы разбавленной спермы в количестве 15 шт. закладывали на хранение по методике В. Норкин (2010) в стерильные стеклянные капилляры $L = 75 \pm 1,0$ мм, $d = 1,8 \pm 0,2$ мм (ООО «МиниМед», Россия). Затем, концы капилляров затыкали стерильной медицинской ватой и обваривали воском (Рисунок 26 а, в). Исследования проводили в двух температурных режимах: при комнатной температуре 24 - 26 °С и 3 °С в бытовом холодильнике LG. Для хранения спермы в неразбавленном виде использовали стерильные пропиленовые соломинки для криохранения $L = 100 \pm 1,0$ мм, $d = 2,5 \pm 0,2$ мм (ANV, L'Aigle, France). Учитывая малый объем спермы, закладываемой на хранение, мы использовали только $\frac{1}{2}$ длины соломинки, порезав ее на части. На 50 мм соломинки использовали 17 - 20 мг противомикробного средства. Испытывали следующие препараты: гель стоматологический Метрогил Дента (G.I.D.C. Industrial Area, India) с действующим веществом метронидазол + хлоргексидин; мазь глазная 1% Тетрациклин (ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия) с действующим веществом тетрациклин (антибиотик); линимент Синтомицин (ОАО «Нижфарм», Россия) с действующим веществом хлорамфеникол (антибиотик). В приготовленную таким образом соломинку, с помощью шприца от станка по инструментальному осеменению пчелиных маток вводили 10 мкл свежеотобранной спермы. Дальнейшую консервацию образцов в количестве 12 шт. проводили по методике В. Норкин (2010) (Рисунок 26 б, г). Опытные образцы хранили в аналогичных условиях. Контрольную группу составили образцы свежеотобранной спермы в количестве 12 шт. объемом по 10 мкл без разбавления и применения противомикробных средств.

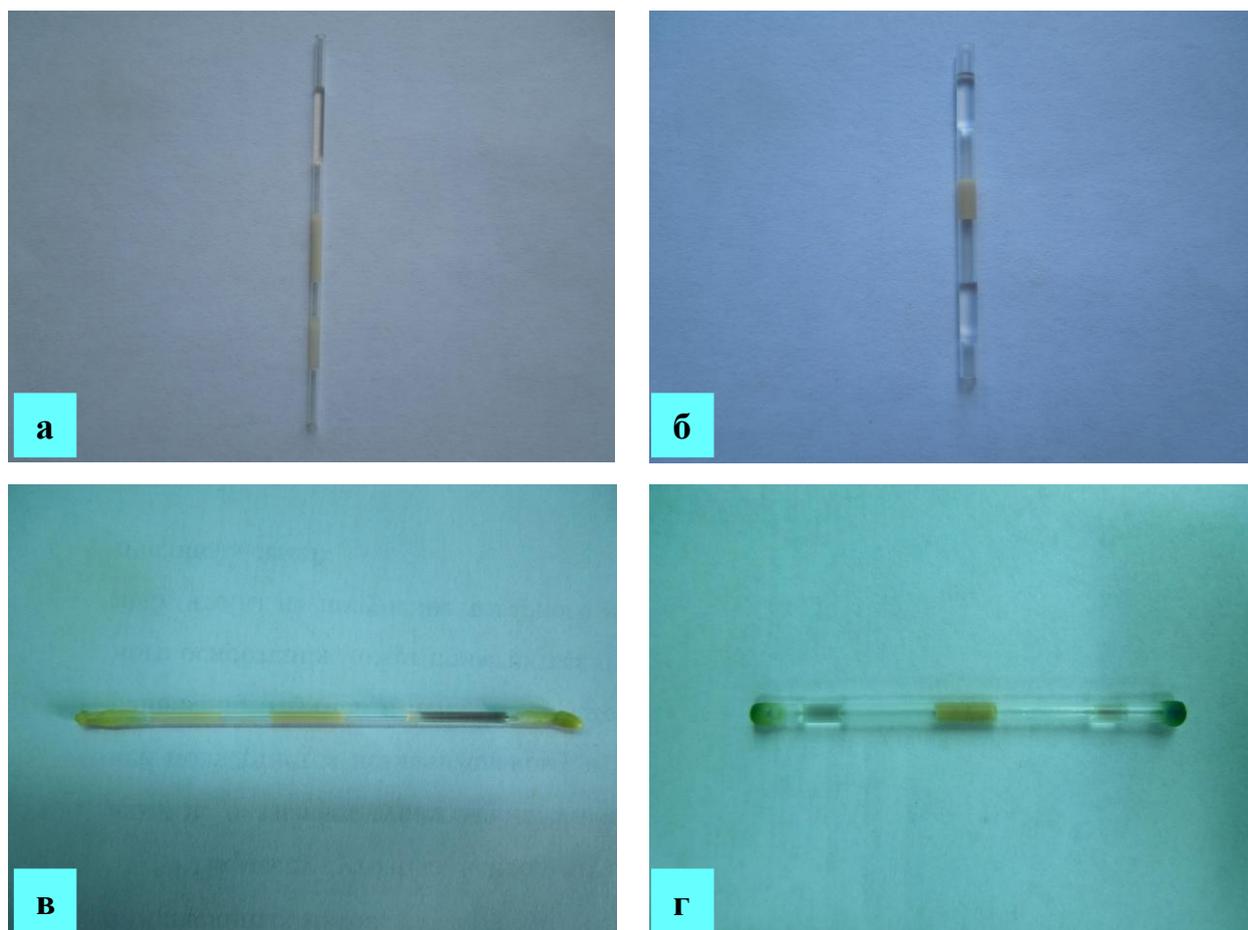


Рисунок 26 - Исследуемые образцы спермы, приготовленные на хранение (а - разбавленная сперма в стеклянном капилляре, б - неразбавленная сперма в пропиленовой соломинке с гелем). Структура капилляра (соломинки) слева-направо: разбавитель - воздушная пробка - разбавленная (неразбавленная) сперма – воздушная пробка - разбавитель.

Дальнейшие исследования подтверждают ценность питательной среды в качестве энергетического резервуара для сперматозоидов, при нахождении их в стрессовых условиях. Лучшие физиологические показатели искусственно осемененных маток и качества спермы отмечены в образцах с С46 ($t_d = 2,8$; $p < 0,05$) (Таблица 20, 21).

Таблица 20 - Показатели спермы, разбавленной различными разбавителями

Показатели	Разбавитель			
	Среда С46 рН 7,2	Трис-буфер рН 7,2	Трис-буфер рН 8,8	Киев- буфер рН 8,3
Концентрация, млн/мкл M±m	2,9 ± 0,1	4,5 ± 0,4	5,7 ± 0,3	3,4 ± 0,05
Подвижность, балл	5,0	4,0	4,0	4,0
Жизнеспособность, %	93,0	90,0	97,0	90,0

Таблица 21 - Физиологические показатели пчелиных маток, искусственно осемененных разбавленной спермой после 30 сут. хранения при 3 °С

Показатели	Разбавитель			
	Среда С46 рН 7,2 (контроль)	Трис-буфер рН 7,2	Трис-буфер рН 8,5	Киев-буфер рН 8,3
Жизнеспособность сперматозоидов, %	79	32	50	48
Количество осемененных маток, шт.	8	5	6	5
Выживаемость маток, %	100	100	100	100
Количество маток с пустым семяприемником, шт. (%)	3 (37,5%)	5 (100%)	1 (16,7%)	2 (40%)
Количество маток с семяприемником, содержащим сперму, шт. (%)	5 (62,5%)	0	5 (83,3%)	3 (60%)
Количество маток с наличием спермы в яйцеводах, шт.	0	0	0	0
Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, млн/мкл M ± m	Lim 0,12 - 0,875 0,54 ± 0,15	0	Lim 0,125 - 0,338 0,223 ± 0,04	Lim 0,05 - 0,175 0,108 ± 0,04

Полученные результаты, позволили нам исключить буферные растворы из дальнейших исследований.

По истечении 30 сут. хранения при 24 - 26 °С отмечено незначительное снижение качественных показателей образцов с С46. Для сравнительной оценки про-

вели искусственное осеменение маток неразбавленной спермой (контроль) и разбавленной в С46. Количество осемененных маток для каждой исследуемой группы 5 шт. с объемом вводимой спермы 4 – 8 мкл. По результатам оценки качество спермы контрольных образцов достоверно превысило опытные с С46 ($t_d = 2,6$ при $p < 0,05$) (Рисунок 27).

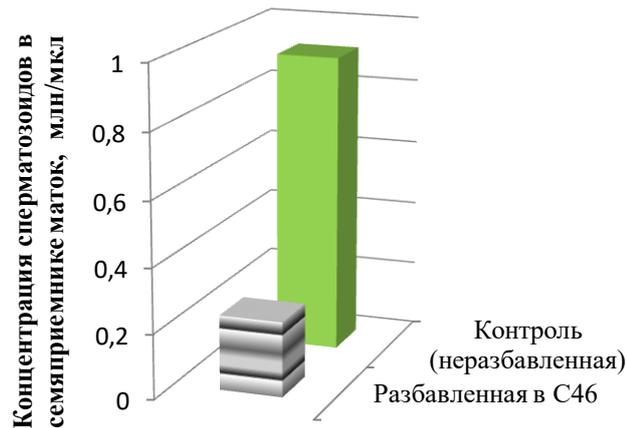


Рисунок 27 – Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, искусственно осемененных разбавленной спермой после 30 сут. хранения при 24 - 26 °С ($p < 0,05$)

По истечении 60 сут. хранения при 24 - 26 °С опытные образцы сохранили за собой приоритет в сравнительной оценке по показателю жизнеспособности сперматозоидов.

Использование противомикробных препаратов тетрациклина и синтомициновой мази, в значительной мере снижает жизненный ресурс спермы во время ее хранения (Рисунок 28).

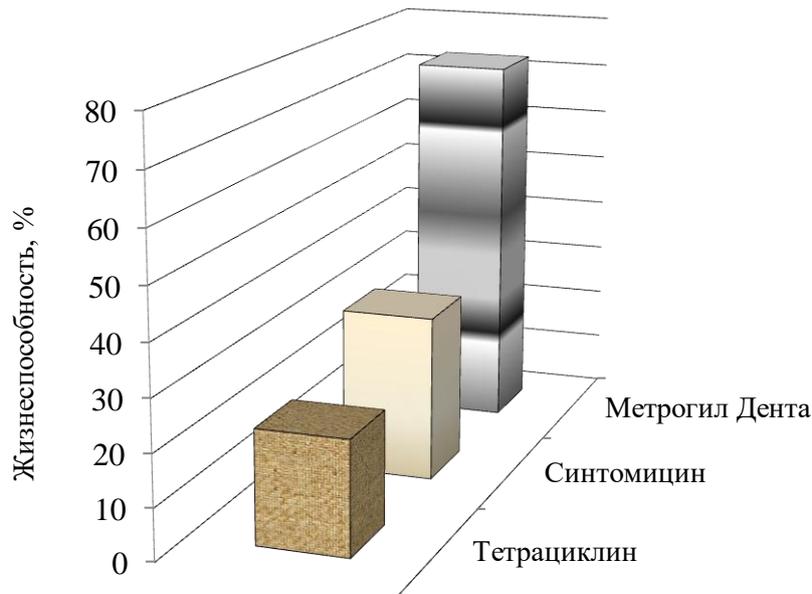


Рисунок 28 - Жизнеспособность неразбавленной спермы
в противомикробных средствах
после 60 сут. хранения при 24 - 26 °С

После исключения буферных растворов из дальнейших исследований по хранению спермы трутней в охлажденном состоянии при 3 °С провели сравнительную оценку различных сред. Заготовку опытных и контрольных образцов свежееотобранной спермы проводили в 2019 г. в лабораториях инструментального осеменения пчелиных маток ФГБНУ «Краснополянская опытная станция пчеловодства (КОСП)» (Краснодарский край, г. Сочи, пос. Молдовка) и ФГБНУ «ППХ Майкопское» (Респ. Адыгея, г. Майкоп). Было заготовлено 12 образцов разбавленной спермы по 30 мкл и 3 образца свежееотобранной спермы по 15 мкл (контроль, охлажденная). Результаты оценки качества разбавленной спермы представлены в таблице 22.

Таблица 22– Показатели качества разбавленной спермы до охлаждения

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

Последующие наблюдения после 30 сут. при 3 °С выявили равный потенциал между контрольными образцами и опытными в среде Lonza (Рисунок 29).

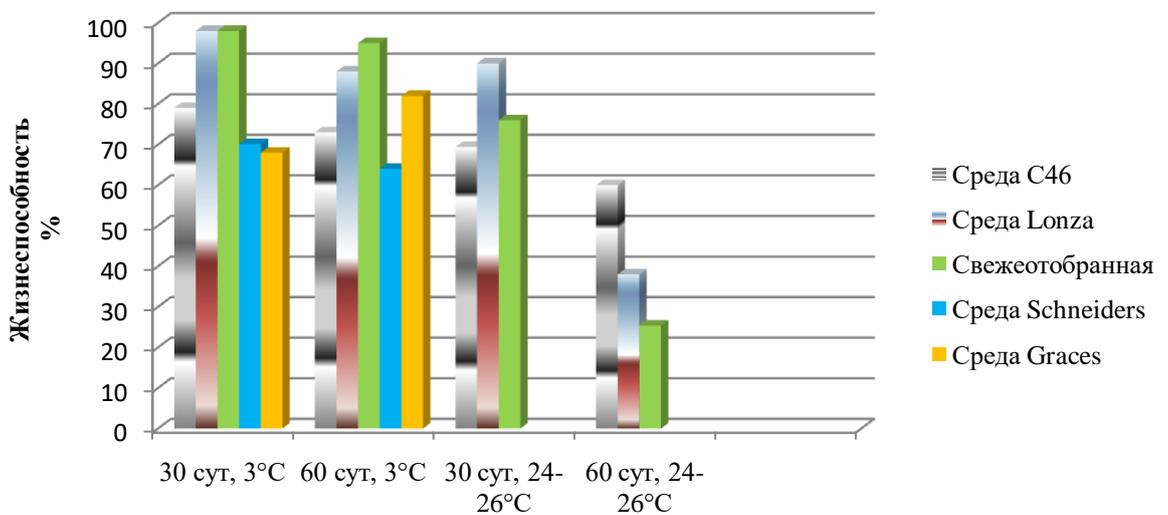


Рисунок 29 - Динамика показателя жизнеспособности неразбавленной и разбавленной спермы в процессе хранения в охлажденном состоянии и при комнатной температуре

После искусственного осеменения объемом вводимой спермы 4 – 8 мкл была установлена низкая концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, осемененных спермой из опытных образцов (Таблица 23).

Таблица 23 - Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, искусственно осемененных охлажденной (3°C) разбавленной спермой, после 30 сут. хранения

Показатели	Контроль (неразбавленная охлажденная сперма)	Разбавитель			
		среда С46 (из данных табл. 21)	среда Lonza	среда Grace's	среда Schneider's
Жизнеспособность сперматозоидов, %	91,0 ± 2,6	79,0	98,2 ± 5,3	67,8 ± 6,3	70,1 ± 2,7
Количество осе- мененных маток, шт.	5	8	11	9	9
Выживаемость маток, %	80	100	54,5	77,8	66,7
Количество маток с семяприемни- ком, содержащим сперму, шт. (%)	5 (100)	5 (62,5%)	11 (100)	9 (100)	6 (66,7)
Количество маток с пустым семя- приемником, шт. (%)	0 (0)	3 (37,5%)	0 (0)	0 (0)	3 (33,3)
Концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, млн/мкл M ± m	1,2 ± 0,55 ^a (0,04 – 2,78)	0,54 ± 0,15 ^{ba} (0,12 - 0,88)	0,32 ± 0,07 ^{ca} (0,07 – 0,73)	0,35 ± 0,03 ^{da} (0,17 – 0,45)	0,04 ± 0,01 ^{ea} (0 – 0,11)

abcde - достоверные различия при $p < 0,05$

По истечении 60 сут. хранения показатель жизнеспособности сперматозоидов контрольных образцов превысил опытные на 7 - 22%.

По результатам осеменения пчелиных маток охлажденной спермой, разбавленной питательными средами Lonza, Schneider's после 60 сут. хранения, сперматозоидов в семяприемнике маток не обнаружено. Искусственное осеменение ох-

лажденной спермой из контрольного образца и образцов, разбавленных средой Grace's, C46 осуществить не удалось по причине отсутствия неплодных маток.

4.5 Качественные показатели половозрелости трутней

В активный сезон 2015 - 2016 гг. на экспериментальной пасеке ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства» провели сравнительный анализ половой потенции трутней в возрасте 17 и 30 сут. (Таблица 24). На момент проведения весенней ревизии опытные пчелиные семьи имели в гнездах по 9 - 10 кг кормового меда, 7 улочек пчел, 3 - 4 рамки с разновозрастным расплодом.

Таблица 24 - Половая потенция трутней в зависимости от возраста

Возраст трутней, сут.	Отобрано трутней, шт.	Число трутней, имевших сперму на конце эндофаллоса	
		шт.	%
17	277	60	21,7
30	177	49	27,7

Относительное количество трутней, имевших на конце эндофаллоса сперму, в возрасте 17 сут. на 6% меньше аналогичных трутней в возрасте 30 сут. Следовательно, половозрелые трутни в возрасте 30 сут. должны обладать лучшей половой активностью и потенцией. Дальнейшие исследования подтвердили предположение (Таблица 25).

Таблица 25 - Качество спермы разновозрастных половозрелых трутней (n = 10)

Возраст трутней, сут.	Концентрация сперматозоидов, млн/мкл					Активность дегидрогеназ, с				
	M ± m	Lim	Σ	Cv,%	td	M ± m	Lim	σ	Cv,%	td
17 (контроль)	3,06 ± 0,3	2,6 - 3,6	0,5	16	-	80,3 ± 26	52 - 132	44,8	55,8	-
22	4,9 ± 0,7	1,9 - 7,2	1,8	36,7	2,4	24,0 ± 0,6	23 - 25	1	4,2	2,2
30	5,9 ± 0,4	5,1 - 6,6	0,7	11,9	5,7	28,0 ± 1,2	25 - 30	2,4	8,6	2,0

Анализ данных, представленных в таблице 25, позволяет отметить, что наилучшими показателями качества отличалась сперма у трутней в возрасте 30 сут., как по концентрации сперматозоидов, так и по активности дегидрогеназ. Соответственно, при сравнении 30 сут. с 17 сут. трутнями по концентрации сперматозоидов, установлено $td = 5,7 > tst = 2,02$ при $V = 33$, в возрасте 22 сут. с 17 сут. $td = 2,4 > tst = 2,09$ при $V = 20$. Различия сравниваемых показателей достоверны, при этом в первом случае с высокой степенью надежности.

Сравнительный анализ активности дегидрогеназ спермы 30 и 17 сут. трутней показал $td = 2 = tst = 2,02$ при $V = 32$; 22 и 17 сут. – $td = 2,2 > tst = 2,1$ при $V = 18$. Таким образом, различия достоверны и по показателю качества спермы активности дегидрогеназ.

Анализируя экспериментальные данные по качеству спермы трутней, была установлена обратная тесная связь между концентрацией сперматозоидов и активностью дегидрогеназ («дыханием» спермы) (Рисунок 30).

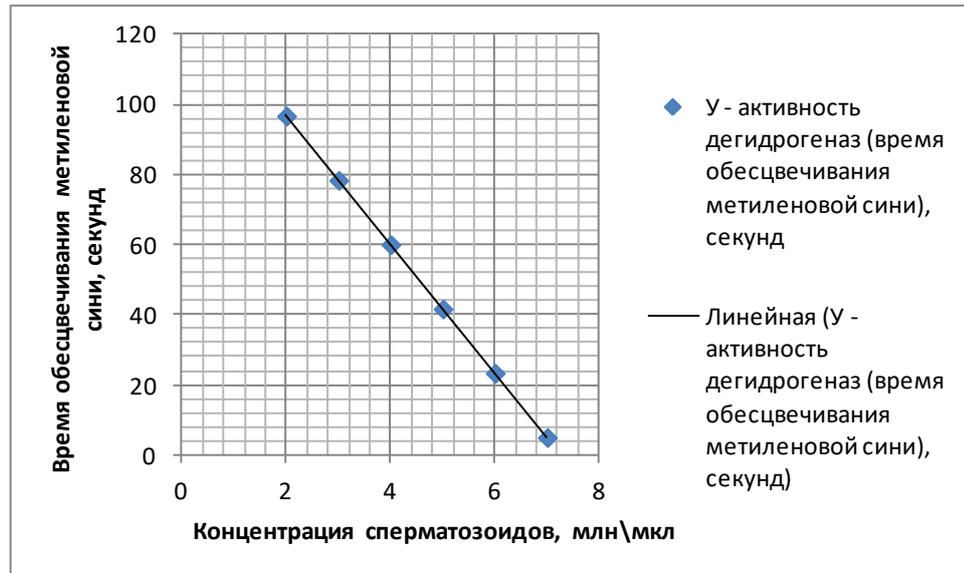


Рисунок 30 - Отрицательная корреляция между активностью ферментов и концентрацией сперматозоидов трутней

Полученная величина ($r_{xy} = -0,75$) указывает на наличие отрицательной корреляции между концентрацией сперматозоидов и активностью дегидрогеназ, так как $t_{\phi} = 2,775 > t_{st} = 2,02$, $r_{xy} = 0,75 > r_{st} = 0,30$ при $V = 40$ и $p = 0,95$ значимость коэффициента корреляции достоверна. Коэффициент детерминации, $r^2 = 0,567$, указывает на то, что активность дегидрогеназ на 57% зависит от варьирования концентрации сперматозоидов.

В 2016 г. провели наблюдение за изменениями массы суточных трутней в течение активного сезона. Меньшей массой отличались суточные трутни, выведенные в июне. В мае они имели массу больше на 14 мг ($td = 1,7$), а в июле на 17 мг ($td = 2,5$), чем в июне (Таблица 26). Возможно, на эти различия повлияли погодные условия. Весна и начало лета в 2016 г. сопровождались устойчивой прохладной погодой и осадками.

Таблица 26 - Масса суточных трутней по периодам активного сезона, мг (n = 30)

Время отбора	Масса, мг M ± m	Lim	σ	Cv,%	td
24.05 - 26.05	273,0 ± 6,7	261 – 290	13,4	5	1,7
23.06 - 30.06	259,0 ± 4,5	251 – 268	9	3,5	-
4.07 - 11.07	276,0 ± 5,0	271 – 281	7	2,5	2,5

По достижении половозрелого возраста этих трутней исследовали на качество спермы. В результате анализа выявлены достоверные различия между сравниваемыми группами трутней по концентрации сперматозоидов ($p < 0,001$) и их подвижности ($p < 0,01$) (Таблица 27).

Таблица 27 - Половая потенция половозрелых трутней по периодам активного сезона 2016 г.

Время отбора	Возраст трутней, Суток	Масса, мг (n = 30)		Концентрация сперматозоидов, млн/мкл (n = 10)			Подвижность сперматозоидов, балл (n = 10)		
		M ± m	Lim	M ± m	Lim	td	M ± m	Lim	td
24.06 - 28.06	30	216,0 ± 13,0	203 - 228	4,7 ± 0,5	3,8 - 5,32	3,3	3,4 ± 0,2	3,0 - 3,8	3
12.07 - 20.07	22 – 25	218,0 ± 7,2	211 - 225,3	4,5 ± 0,3	4,1 - 5,0	4,6	3,7 ± 0,1	3,5 - 3,7	3
5.09	25	-	-	6,8 ± 0,4	5,4 - 8,6	-	4	-	-

У исследованных в июле трутней (выращенные в июне), концентрация сперматозоидов была меньше на 0,2 млн/мкл ($td = 0,3$), чем у майских. Из чего следует, что первоначальная разница в массе суточных трутней между группами 14 мг не оказала влияния на концентрацию сперматозоидов в половозрелом возрасте.

По оценке подвижности сперматозоидов, числу осуществляющих маневренное и поступательное движение, наибольшей активностью характеризовалась сперма трутней летней генерации (выращенных в июле) – 4 балла.

4.6 Влияние одновременного выращивания трутней и неплодных пчелиных маток на их массу в пчелиных семьях-воспитательницах

Изучение влияния одновременного выращивания трутней и неплодных маток на их массу в семьях-воспитательницах проводили в период с 2013 по 2016 гг. По данным проведенного опыта, масса суточных трутней, выращенных в семье-воспитательнице одновременно с матками, превысила этот показатель для трутней, выращенных в отцовских семьях (контроль), на 13,8 мг ($td = 2,2$). Неплодные матки при этом, незначительно (на 4,3 мг) уступали, выведенным без присутствия трутней (контроль) (Таблица 28).

Таблица 28 - Масса трутней и неплодных маток в зависимости от способа выращивания, мг (n = 30)

Год	Масса					
	Суточные трутни			Суточные неплодные матки		
	опыт	контроль	td	опыт	Контроль	td
2014	258,3 ± 6,1	244,5 ± 1,5	2,2	189,7 ± 5,9	194,0 ± 2,0	0,7
2015	268,5 ± 8,5	266,0 ± 11,0	0,2	188,5 ± 8,5	195,2 ± 7,8	0,6
2016	268,4 ± 2,0	269,0 ± 6,6	0,09	181,0 ± 6,4	188,4 ± 2,8	1

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.

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы в полусинтетической среде С46 обеспечивает сохранение 80 - 95% жизнеспособных сперматозоидов после длительного хранения в жидком азоте. Сперма сохраняет свой жизненный ресурс в течение 10 и более лет криохранения. Результаты собственных исследований согласуются с данными А. Бородачева и О. Кабашовой (2007). Но, высокие показатели целостности мембран сперматозоидов (жизнеспособность) сопровождались их низкой оплодотворяющей способностью (50%). Применение же подкисленных синтетических сред Lonza Insect-XPRESS, Graces, JPL-41 и Schneider's, подвергает сперматозоиды наибольшему воздействию агрессивных условий криохранения. При этом в морфологии спермиев, разбавленных в полусинтетической или синтетической среде, наблюдаются значительные аномалии в виде деформации их головок и расслоений жгутиков. В образцах спермы с низкой оплодотворяющей способностью, как раз было выявлено массовое повреждение головок сперматозоидов (25 - 46%): чем больше деформированных сперматозоидов, тем меньше оплодотворенных яиц.

У сперматозоидов, хранившихся в жидком азоте в составе медового разбавителя, зафиксирована простая форма расслоения жгутика в области шейки. Шейка является весьма чувствительной структурой к изменениям внешней среды. В ней происходят нарушения при температурном (осмотическом) шоке сперматозоидов, при действии высокого гидростического давления и при глубоком охлаждении (Ф. Осташко, 1976). По теории Е.М. Платова (1973) причиной температурного шока сперматозоидов является повреждение фибрилл жгутика, а также изменение конформации и конфигурации белковых и других макромолекул. Данные процессы могут возникать и как вторичные явления, то есть как следствия шока (Ф. Осташко, 1976). При использовании меда в качестве криопротектора, необходимо учитывать и тот факт, что физико-химический состав меда зависит и от его ботанического происхождения. Данное обстоятельство может объяснить различные

результаты, полученные другими исследователями при использовании меда в составе основного разбавителя. Собственные же результаты исследований продемонстрировали натуральный пчелиный мед с акации белой в качестве криопротектора. В сочетании с глицерином 3% или диметилсульфоксидом 10% мед обеспечил самую высокую сохранность цитоплазматических мембран сперматозоидов и их подвижность в сравнении с полусинтетической средой С46. Как показали исследования, среда С46 без криопротектора не обладает криофилактическими свойствами. Следует отметить и тот факт, что использование меда в сочетании с яичным желтком позволило установить новый порог оттаивания образца в пределах от 30 с до 1,5 - 2 мин. в сравнении с синтетическими средами, где на полное оттаивание затрачивается 10 мин. Следовательно, на процессы рекристаллизации в замороженной сперме с медом и желтком затрачивается в несколько раз меньше времени, что способствует снижению количества повреждений сперматозоидов.

Испытания глицерина, в качестве криопротектора для спермы трутней медоносных пчел, проводились ранее отечественными исследователями (В. Какпаков, с соавт., 1993) и зарубежными (В. Hopkins et al., 2010). В. Какпаков с соавт., (1993) в среде С46 с 10% глицерина в сходных условиях замораживания обнаружили очень низкую жизнеспособность (подвижность) сперматозоидов. В таком соотношении среда оказалась пригодной только для хранения спермы в охлажденном состоянии при 4 °С. В. Hopkins et al. (2010), применив глицерин в концентрации от 8 - 11,8%, также установили низкую жизнеспособность (35% целостных мембран) сперматозоидов еще до замораживания.

Таким образом, предварительные результаты исследования впервые демонстрируют перспективы неэлектролитной среды по сохранению жизненного ресурса спермы трутней медоносной пчелы во время криоконсервации.

Хранение спермы в диапазоне положительных температур от 24 - 26 °С негативно сказывается на ее качественных показателях. Высокая температура, возможно, способствует развитию гнилостных микроорганизмов в неразбавленной сперме без противомикробных средств. В опытных образцах с питательной средой, вероятной причиной низких показателей жизнеспособности сперматозоидов,

может служить рН растворов. Кислотность среды в семяприемнике матки - щелочная. Консервация спермы в данных условиях возможна в свежееотобранном виде в сочетании с противомикробными препаратами, в частности, с Метрогил Дента. Результаты исследований с применением антибиотика тетрациклина согласуются с данными Ю. Вавилова и А. Клепиковой (1978).

Охлаждение неразбавленной спермы без применения противомикробных средств в течение 60 сут. при 3 °С оказывает положительное действие на ее сохранность.

Малая концентрация сперматозоидов в семяприемнике маток, осемененных консервированной спермой, вероятно, объясняется многочисленными дефектами сперматозоидов, приобретаемыми во время хранения. По энзимной гипотезе выживаемости сперматозоидов в семяприемнике маток (А. Молодюк, 1987), порция сперматозоидов, закачиваемая насосом семяприемника из полости органа, снабжается секретом железы семяприемника. Под действием секрета активируется вся дыхательная цепь митохондрий сперматозоида, синтезируется большое количество АТФ и сперматозоид, приобретая подвижность, устремляется к яйцеклетке. Именно здесь, по мнению автора, он или оплодотворяет яйцеклетку, или погибает вследствие быстрого израсходования питательных веществ. Но, показатели концентраций сперматозоидов в семяприемнике, полученные в ходе собственных исследований, заставляют сделать предположение о том, что у матки существует механизм отбора сперматозоидов на пути их следования из яйцеводов в семяприемник. Вследствие чего, в него попадают только те сперматозоиды, которые имеют нормальную морфологию и, соответственно, обладают оплодотворяющей способностью. Следовательно, насос семяприемника при недостаточном количестве сперматозоидов в органе, закачивает порцию из его полости, состоящую из среды семяприемника и какого-то количества сперматозоидов. Вероятно, этим можно объяснить качество печатного расплода маток, осемененных заморожено-оттаянной спермой.

Заметное снижение оплодотворяющей способности сперматозоидов свидетельствует о слабой устойчивости спермы в целом к воздействию внешних фак-

торов среды. Не следует исключать из внимания и тот факт, что при осеменении матки консервированной спермой существует большая вероятность попадания в ее половые пути питательной среды, антибиотиков и т.д. Безусловно, данные обстоятельства могут повлиять на выживаемость маток и их физиологические показатели после процедуры осеменения. С этой точки зрения, целесообразнее пчелиных маток осеменять по методике В. Броварского (2002). Биологические аспекты этого метода максимально приближены к условиям естественного спаривания маток с трутнями.

А. Молодюк с соавт. (1979) исследовали ферментативную активность сперматозоидов, используя в качестве акцепторов электронов нитросиний тетразолий (Нитро-СТ). Восстанавливаясь, Нитро-СТ образует нерастворимые ярко окрашенные в синий цвет гранулы диформаза. Интенсивность окраски и число гранул диформаза в клетке после проведения цитохимической реакции соответствует активности выявляемого фермента (А. Молодюк, с соавт., 1979). По итогам цитохимического исследования авторы обнаружили резкое снижение активности ферментов сперматозоидов (дегидрогеназ) с 16 по 20 сут. с момента выхода имаго и полное их отсутствие в половых клетках трутней в возрасте 45 сут. Однако, активность ферментов в сперматозоидах из семяприемника маток, оказалась выше, чем в сперматозоидах трутня, осеменяющего матку (А. Молодюк, с соавт., 1979). Метод оценки активности дегидрогеназ сперматозоидов с использованием метиленовой синьки основан на скорости присоединения водородного атома к молекуле метиленовой сини, способствуя ее обесцвечиванию. Метод обесцвечивания метиленовой сини дает указания, зависящие не только от активности спермы, но и от концентрации ее, а также от содержания бактерий, которые более активно, чем сперматозоиды восстанавливают метиленовую синь (В. Милованов, 1962). Результаты собственных исследований подтвердили данное положение наличием отрицательной корреляции $r_{xy} = -0,75$ между концентрацией сперматозоидов трутней и временем обесцвечивания метиленовой сини. И чем выше концентрация, тем быстрее происходит обесцвечивание. Высокие показатели концентрации

сперматозоидов, полученные в ходе собственных исследований, объясняют более тесную связь в сравнении с данными, полученными ранее А. Бородачевым и В. Бородачевой (1977) $r_{xy} = -0,20; -0,39$. При этом авторы отмечают, что различия в скорости обесцвечивания сини спермой из семяприемника маток и трутней, статистически недостоверны. В. Милованов (1962) при проведении исследований на сохранность семени жвачных при 0°C отмечал, что более энергичное нарушение обмена кислыми продуктами происходит в семени барана по причине его высокой концентрации в сравнении с семенем быка (в 3 - 4 раза больше). По данным автора при температурах выше 7°C переживаемость неразбавленного семени барана в несколько раз короче, чем семени быка (в 3 - 5 раз при $15 - 25^{\circ}\text{C}$). В отличие от семени сельскохозяйственных животных сперма трутней медоносных пчел обладает очень высокой концентрацией сперматозоидов и их переживаемости. После искусственного осеменения сперма из парных яйцеводов пчелиной матки переходит в семяприемник в течение 24 - 48 ч. А. Бородачев, В. Бородачева (1977) в опытах с метиленовой синью установили достоверное уменьшение времени обесцвечивания сини спермой трутней с увеличением температуры от 20 до 40°C . Отбор спермы трутней для оценки качества и искусственного осеменения маток проводится в лабораторных условиях при температуре $25 - 28^{\circ}\text{C}$ (А. Бородачев, В. Бородачева 1990). Следовательно, в сперме трутней при указанном температурном диапазоне усиливаются обменные процессы.

Размах показателей концентрации сперматозоидов, полученных в ходе собственных исследований, соотносится с данными J. Woyke и Z. Jasinsky (1978), T. Rinderer, et al., (1999), D. Andersen (2004), F. Abdelkader и G. Kairo (2013), K. Czekonska et al. (2015). Концентрация сперматозоидов 17 сут. трутней $3,06 \pm 0,3$ млн/мкл с незначительным отклонением совпала с данными J. Rhodes (2008) по 14 сут. трутням $3,27 \times 10^6$ млн/мкл; 22 сут. трутней с концентрацией $4,9 \pm 0,7$ млн/мкл с показателями D. Bubalo et al. (2005) $4,5 \times 10^6$ млн/мкл, исследовавших трутней в возрасте от 20 - 30 сут.; L. Burley et al. (2008) $4,78 \pm 0,36$ млн/мкл и S. Shoukry Rasha et al. (2013) $4,7 \pm 1,85$, исследовавших трутней в возрасте от 14 - 20 сут.

Таким образом, отрицательная корреляция, обнаруженная в ходе собственных исследований между временем обесцвечивания метиленовой сини (показатель активности ферментов спермы дегидрогеназ) и концентрацией сперматозоидов у половозрелых трутней в возрасте от 22 - 30 сут. не соотносятся с опытными данными А. Молодюк с соавт. (1979) по причине использования разных методик исследования.

Следует также отметить, что показатели подвижности и концентрации сперматозоидов трутней весенней генерации, выращенных в мае и июне, статистически недостоверны ($t_d = 1,4$ и $t_d = 0,3$). При этом показатели подвижности сперматозоидов аналогичны данным J. Rhodes (2008), S. Locke и Y. Peng (1993).

В условиях активного сезона 2017 г. наибольшую яйценоскость показали матки, осемененные 6 мкл спермы. Данное обстоятельство больше связано с началом яйцекладки маток этой группы за две недели до главного медосбора, а не по причине наличия большего количества сперматозоидов в семяприемнике маток, как отмечал V. Vesely (1970). Предварительная изоляция маток после осеменения и объем вводимой спермы 8 мкл способствовали гарантированному приему и сохранности пчелиных маток в семье, что согласуется с выводами J. Woyke (1983). В свою очередь, применение подобного способа подсадки осемененных маток способствует началу их яйцекладки в более поздние сроки (9 - 13 сут.). Отсутствие же предварительной изоляции маток до и после осеменения и наличие в пчелиной семье в среднем 2 кг пчел создают предпосылки к началу воспроизводительной деятельности маток в более ранние сроки (5 - 7 сут.). Результат лучшего приема маток, осемененных 8 мкл спермы и ранние сроки начала яйцекладки маток, осемененных 4 мкл спермы, совпадают с данными J. Woyke, Z. Jasinski (1980, 1983, 1990), Г. Галкиной и С. Кадоры (2015). Однократное осеменение маток дозой 4 мкл спермы привело к их значительным потерям при подсадке в пчелиные семьи, о чем свидетельствовала S. Cobey (2007).

Первые наблюдения о положительном влиянии совместного воспитания трутней и маток на их массу проводились в 1974 г. в Майкопском опорном пункте

НИИ пчеловодства (И. Хруст, 1974). Сотрудники института установили, что масса трутней, выращенных в семьях-воспитательницах, превышала данный показатель у трутней из обычных отцовских семей на 17 мг. Масса маток, одновременно выращенных с трутнями в семьях-воспитательницах, была на 9 мг больше, чем при отдельном выращивании (И. Хруст, 1974). На результаты собственных исследований могли оказать существенное влияние погодные условия. Начало активного сезона 2015, 2016 и 2017 гг. сопровождалось частыми возвратными похолоданиями с выпадением осадков в виде дождя и мокрого снега. Снижение летной активности пчелиных семей уменьшало поступление в гнездо свежей пыльцы и нектара. Данные обстоятельства оказали влияние на сроки воспроизводства трутней в отцовских семьях и качество приема личинок на воспитание в семьях-воспитательницах. В связи с чем, данный способ одновременного выращивания трутней и неплодных маток не следует рассматривать для племенных и крупных фермерских хозяйств в условиях нечерноземной зоны Российской Федерации.

5.1 ВЫВОДЫ

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 - 100%) 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 °С. Предложенный метод консервации спермы позволил сохранить жизнеспособность сперматозоидов на уровне $91,0 \pm 2,6\%$. Показатель концентрации сперматозоидов в семяприемнике маток, искусственно 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 жизнеспособность 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.

5.2 ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

5.2.1 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, 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 6М NaOH до pH 8 – 9.
5. Расфасовка в криопробирки Nunc 1,8 мл.
6. Эквilibрация 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.

5.2.2 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 физиологиче-

ский раствор 0,9%, отделенный с обеих сторон от спермы воздушными пробками.

2. Оценка спермы по основным параметрам качества: концентрация, подвижность, жизнеспособность, 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.

5.2.3 Рекомендации по транспортировке неразбавленной спермы

Рекомендуется проводить транспортировку неразбавленной спермы в охлажденном состоянии при 3 °С. Для транспортировки спермы использовать стеклянные капилляры $L = 75 \pm 1,0$ мм, $d = 1,8 \pm 0,2$ мм, концы которых 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.

5.3 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.

6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Багиров, В.А. Оценка репродуктивного потенциала производителей с помощью лабораторных исследований спермы / В.А. Багиров, Б.С. Иолчиев, А.В. Таджиева, П.М. Кленовицкий // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2015. - №1-2. - С. 51-54.
- 2 Бородачев, А.В. Организация и техника искусственного осеменения пчелиных маток / А.В. Бородачев А.В., В.Т. Бородачева // Пчеловодство. – 1982. - № 6. – С.11-12.
- 3 Бородачев, А.В. Сохранение спермы трутней медоносной пчелы в различных разбавителях / А.В. Бородачев, В.Т. Бородачева // Сборник научных трудов. - Рязань: НИИ пчеловодства. – 1977. – Вып. 2. - 163 с.
- 4 Бородачев, А.В. Технология инструментального осеменения пчелиных маток / А.В. Бородачев, В.Т. Бородачева. – Рыбное: НИИ пчеловодства. - 1989. – 33 с.
- 5 Бородачев, А.В. Технология длительного хранения спермы трутней в жидком азоте / А.В. Бородачев, О.В. Кабашова // ГНУ НИИП РАСХН. – 2007. – 26 с.
- 6 Бородачев, А.В. Селекция пчел и вывод ранних маток с использованием инструментального осеменения / А.В. Бородачев, К. Богомолов, Е. Грабски // Рязань, 2012. – 160 с.
- 7 Бородачев, А.В. Генетические ресурсы медоносных пчел России / А.В. Бородачев, Л.Н. Савушкина, В.А. Бородачев // В сб. докладов науч.- практ. конф. Киров: НИИСХ Северо-Востока, - 2017. – С.25-32.
- 8 Брандорф, А.З. Популяционно-генетическая дифференциация медоносных пчёл Кировской области / А.З. Брандорф, М.М. Ивойлова, Р.А. Ильясов, А.В. Поскряков, А.Г.. Николенко // Пчеловодство. - 2012. - №7. – С.14-16.
- 9 Броварский, В.Д. Искусственное осеменение пчелиных маток / В.Д. Броварский, В.И. Стащенко. – Киев. УСХА. - 1990. – С. 47.

- 10 Броварский, В.Д. Миграция спермы трутней / В.Д. Броварский, В.П. Полищук // Пчеловодство. – 1991. - №2. – С.5-6.
- 11 Броварский, В.Д. Новый способ осеменения маток / В.Д. Броварский // Пчеловодство. – 2002. - №6. – С.16-17.
- 12 Броварский, В.Д. Миграция спермы и развитие яичников пчелиной матки / В.Д. Броварский // Пчеловодство. – 2005а. - № 6. – С.22-25.
- 13 Броварский, В.Д. Поведение трутней в пчелиной семье / В.Д. Броварский // Пчеловодство. – 2005. - № 9. – С. 21-23.
- 14 Вавилов, Ю.Л. Антибиотики и жизнеспособность спермы / Ю.Л. Вавилов // Пчеловодство. – 1978. - №4. – С. 9-10.
- 15 Вавилов, Ю.Л. Хранение спермы трутней / Ю.Л. Вавилов, А.П. Клепикова // Пчеловодство. – 1978. - №9. – С. 15-16.
- 16 Вассилиади, Г..К. Клещ варроа и сперматогенез / Г..К. Вассилиади // Пчеловодство. – 1989. - № 9. – С.13-14.
- 17 Вассилиади, Г..К. Сперматека – показатель качества пчелиных маток / Г..К. Вассилиади // Сельскохозяйственная биология (Серия Биология Животных). – 1991. - № 6. – С.76-81.
- 18 Галкина, Г..А. Содержание трутней при контролируемом спаривании / Г..А. Галкина, С.А. Кадора // Пчеловодство. - 2013. - №4. – С. 14-15.
- 19 Галкина, Г..А. Способы подсадки инструментально осемененных маток и использование белковых подкормок при выращивании трутней / Г..А. Галкина, С.А. Кадора // Сборник НИР по пчеловодству. – Рыбное: ФГБНУ «НИИ пчеловодства». – 2015. – 190 с.
- 20 Гулов, А.Н. Выращивание и сохранение трутней для инструментального осеменения / А.Н. Гулов, А.С. Березин // Сборник НИР по пчеловодству. – Рыбное: ФГБНУ «НИИ пчеловодства». - 2015. – 190 с.
- 21 Гулов, А.Н. Возраст трутней и качество спермы / А.Н. Гулов, А.В. Бородачев, А.С. Березин // Пчеловодство. - 2015. - №9. – С. 24.
- 22 Гулов, А.Н. Качество спермы в оценке отцовских семей / А.Н. Гулов, А.В. Бородачев // Пчеловодство. – 2016. - №10. – С. 25.

- 23 Гулов, А.Н. Выращивание трутней для инструментального осеменения / А.Н. Гулов, А.В. Бородачев // Пчеловодство. – 2017. - №1. – С. 16-17.
- 24 Гулов, А.Н. Инструментальное осеменение пчелиных маток / А.Н. Гулов // Научная жизнь. – 2018. - №2. – С. 80-88.
- 25 Гулов, А.Н. Воспроизводительные способности инструментально осемененных маток / А.Н. Гулов // Пчеловодство. – 2018. - №4. – С. 13-15.
- 26 Гулов, А.Н. Проблемы сохранения генетических ресурсов медоносной пчелы / А.Н. Гулов // Пчеловодство. – 2018. - №6. – С. 22-25.
- 27 Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов: учебно-методическое пособие [Электронный ресурс] / А.Ф. Сайфитдинова // СПб.: «СОЛО», 2008. – 72 с. - Режим доступа: chromas.spbu.ru/upload.
- 28 Дьяконов, Л.П. Живая клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под общ. ред. Л.П. Дьяконова, В.И. Ситьковой // М.: Компания Спутник+, 2000. – 400 с.
- 29 Епишина, Т.М. Совершенствование способов повышения воспроизводительных качеств свиней и овец // Т.М. Епишина // Дисс. докт. биол. наук. М.2011. 295 с.
- 30 Еськов, Е.К. Качество трутней, голодавших на личиночной стадии / Е.К. Еськов // Пчеловодство. – 1999. - №1. – С. 17.
- 31 Еськов, Е.К. Возрастная динамика массы тела и содержания воды в нем у трутней медоносной пчелы / Е.К. Еськов // Рязанский педагогический институт. – Рязань. – 1991. – 10 с.
- 32 Иолчиев, Б.С. Компьютерная технология оценки семени животных / Б.С. Иолчиев, В.А. Багиров, П.М. Кленовицкий, В.П. Кононов, Ш.Н. Насибов, В.А. Воеводин // Достижения науки и техники АПК. - 2011. - №9. - С. 46-48.
- 33 Исаев, Д.А., Шишанова, Е.И., Кавтаров, Д.А., Глебов, А.П. Подвижность, сохранность мембран и фрагментация ДНК в сперме стерляди при гипотермическом хранении в безэлектролитном растворе глюкозы и трегалозы /

- Д.А. Исаев, Е.И. Шишанова, Д.А. Кавтаров, А.П. Глебов // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. - 2016. - №3. - С. 100-108
- 34 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.
- 35 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.
- 36 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.
- 37 Какпаков, В.Т. Осеменение маток спермой после глубокой заморозки / В.Т. Какпаков, О.В. Кабашова, А.В. Бородачев, Е.С. Какпакова // Пчеловодство. – 1994. - №2. – С.24-25.
- 38 Какпаков, В.Т. Способ получения маток медоносной пчелы / В.Т. Какпаков, О.В. Кабашова, А.В. Бородачев, В.Т. Бородачева // Приоритет от 25 октября 1999 г.. Патент РФ №2173045 от 10.09.2001г.
- 39 Какпаков, В.Т. Криогенетика гамет, соматических клеток и эмбрионов насекомых. Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов» / В.Т. Какпаков, О.В. Кабашова // Цитология. - 2004. - Т.46. - №9. - С.798.
- 40 Какпаков, В.Т. Центр инструментального (искусственного) осеменения медоносной пчелы (ЦИОМП) / В.Т. Какпаков // Ветеринарная патология. – 2007. - №1(20). – С. 28-30.
- 41 Коперницки, Я. Качество спермы в зависимости от кормления трутней / Я. Коперницки, Л. Кепеня // Программа и аннотации докладов, ЧССР. – 1987. – С.70-71.
- 42 Кудрявцев, И.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии [Электронный ресурс] / И.В. Кудрявцев, А.С.

- Головкин, А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков // Медицинская иммунология. - 2012. - Т. 14. - № 6 - С. 461-482 - Режим доступа: <http://mimmun.ru/mimmun/article/view/534/537>.
- 43 Куренной, Н.М. К вопросу о сроках полового созревания трутней / Н.М. Куренной // Пчеловодство. - 1953. - №11. – С. 28.
- 44 Куренной, Н.М. О строении и живучести живчиков трутня / Н.М. Куренной // Пчеловодство. - 1954. - №10. – С. 41-44.
- 45 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.
- 46 Лебедев, В. И. Биология медоносной пчелы / В.И. Лебедев, Н.Г.. Билаш. - М.: Агропромиздат, 1991. – 239 с.
- 47 Ляхов, В.В. Влияние кратности и дозы семени на выход и качественные показатели плодных маток / В.В. Ляхов // Сб. студенческих научных работ. – М., 2010. – Вып. 16.
- 48 Маннапов, А.Г.. Технологические аспекты сохранения пчелиных маток до и после искусственного осеменения / А.Г.. Маннапов // Сохранение и улучшение генофонда по племенным и продуктивным качествам с/х животных: Сборник научных трудов. – С.-Петербург-СПб; Уфа. – 2001. – С. 199-200.
- 49 Маннапов, А.Г.. Проблемы инструментального осеменения и производства физиологически полноценных пчелиных маток / А.Г.. Маннапов, О.С. Ларионова // Новое в науке и практике пчеловодства. – Рыбное, 2008. – 128 с.
- 50 Маннапов, А.Г.. Факторы, влияющие на качество плодных маток при инструментальном осеменении породы пчел в Европе. Состояние матководства. Критерии оценки качества пчелиных маток / А.Г.. Маннапов, В.В. Ляхов, О.С. Ларионова // Материалы Минской международной научно-практической конференции 29.01.2011. – Минск. – 2011. – С. 56-59.
- 51 Маннапов, А.Г.. Оценка технологий инструментального осеменения / А.Г.. Маннапов, В.В. Ляхов, В.Д. Броварский // Пчеловодство. – 2013. - №6. – С.21.

- 52 Мельниченко, А.Н. Хранение трутневой спермы / А.Н. Мельниченко, Ю.Л. Вавилов, В.И. Макаров, А.П. Клепикова // Пчеловодство. - 1976. - №12. – С. 4-5.
- 53 Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных // В.К. Милованов // - М. – 1962. – 696 с.
- 54 Молодюк, А.В. Морфо-гистохимическое исследование семенных пузырьков трутня / А.В. Молодюк, Е.Н. Беляева // Пчеловодство. - 1978. - №3. – С. 18.
- 55 Молодюк, А.В. Оценка сперматозоидов трутня / А.В. Молодюк, Е.Н. Беляева, С.Б. Артифексов // Пчеловодство. - 1979. - №3. – С. 11-12.
- 56 Молодюк, А.В. Изоферменты ЛДГ трутня / А.В. Молодюк, Е.Н. Беляева, С.В. Миронова // Пчеловодство. - 1980. - №1. – С. 15-16.
- 57 Молодюк, А.В. Энзимная гипотеза выживаемости сперматозоидов в сперматеке / А.В. Молодюк // Пчеловодство. - 1987. - №6. – С. 8-9.
- 58 Милованов, В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных / В.К. Милованов - М.: Изд-во с/х литературы, журналов и плакатов, 1962. – 696 с.
- 59 Науменкова, В.А. Сравнительная оценка определения целостности мембран спермиев жеребцов различными методами // В.А. Науменкова, М.М. Атрощенко, А.Н. Гулов, О.В. Широкова, Н.А. Фролова // Российская с/х наука. – 2020. - №3. – С.45-48.
- 60 Никитина, Е.В. Использование флуоресцентного метода для оценки качества спермы жеребцов / Е.В. Никитина, Е.А. Олексиевич, И.Ш. Шапиев // Сборник докладов научно-практической конференции. – ВНИИК. – 2004. – С. 81-82.
- 61 Определение жизнеспособности клеточных культур: учебно-методическое пособие для студентов ННГ, обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология» / Е.В. Митрошина. - Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, 2015. - 21 с.
- 62 Осташко, Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей // Ф.И. Осташко // «Урожай», К., 1978. - 256 с.

- 63 Паниюков, В.В. Качество трутней и условия их выращивания / В.В. Паниюков // Пчеловодство. – 1996 а. - №5. – С.16-17.
- 64 Паниюков, В.В. Еще раз о качестве трутней / В.В. Паниюков // Пчеловодство. – 1996 б. - №6. – С.13.
- 65 Пинаев, Г..П. Методы культивирования клеток / под общ. ред. Г..П. Пинаева, М.С. Богдановой. - СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2008. – 278 с.
- 66 Плосконос, М.В. Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека [Электронный ресурс] / М.В. Плосконос // Клиническая лабораторная диагностика. - № 11. - 2014. – С. 22-25. - Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/journal/n/klinicheskaya-laboratornaya-diagnostika>.
- 67 Разработать теоретические основы и эффективные селекционные методы повышения и реализации генетического потенциала медоносных пчел: отчет о НИР / Кабашова О.В. - Рыбное: ГНУ НИИП, 2005. - 57 с.
- 68 Решетникова, Н.М. Национальная технология замораживания и использования спермы племенных быков-производителей / под ред. Н.М. Решетниковой. – М., 2008. – 160 с.
- 69 Риб, Р.Д. Феромоны медоносной пчелы / Р.Д. Риб // Пчеловодство. - 2005. - №4. – С. 22-24.
- 70 Руттнер, Ф. Инструментальное осеменение пчелиных маток / Ф. Руттнер. – Бухарест: Апимондия, 1975. – 127 с.
- 71 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.
- 72 Сайфутдинова, З.Н. Биотехнологические методы в сохранении генетических ресурсов медоносной пчелы / З.Н. Сайфутдинова // Сборник НИИР по пчеловодству. – Киров: НИИСХ Северо-востока. – 2014. – 276 с.
- 73 Сингига, Г..Н. Криобанки соматических клеток как перспективный способ сохранения генетических ресурсов животных (обзор) [Электронный ресурс]

- / Г..Н. Сингига, Н.А. Волкова, В.А. Багиров, Н.А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. – 2014. - №6. – С. 3-14. - Режим доступа: www.agrobiology-ru/6-2014singina.html.
- 74 Скиркявичюс, А. О чувствительности рабочих пчел *Apis mellifera* L. к феромонам пчелиной матки / А. Скиркявичюс, Л. Блажите, З. Скиркявичене // Материалы международной научной конференции «Пчеловодство – XXI век». – М., 2000. – С. 108-110.
- 75 Тимошинова, А.Е. Интенсификация производства неплодных маток без снижения их качества / А.Е. Тимошинова. - Рыбное: НИИ пчеловодства. - 1988. – 13 с.
- 76 Годерич, В. Морфологические, продуктивные и поведенческие особенности пчелиных маток *Apis mellifera*, полученных от естественно оплодотворенных и инструментально осемененных пчелиных маток [Электронный ресурс] / В. Годерич // Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii. – 2014. - Nr. 2(323). – P. 122-129. Режим доступа: <http://docplayer.ru/61325213>.
- 77 Хруст, И.И. Получение и сохранение трутней / И.И. Хруст // Пчеловодство. - 1984. - №7. – С. 9.
- 78 Циколенко, С.П. Феромонный препарат «Кандисил» в теплицах / С.П. Циколенко, Н.М. Ишмуратова // Пчеловодство. – 2004. - №8. – С. 16.
- 79 Циколенко, С.П. Вывод ранних трутней в теплицах на Южном Урале / С.П. Циколенко, Н.М. Ишмуратова // Пчеловодство. – 2011. - №8. – С. 19-20.
- 80 Черевко, Ю.А. Продолжительность жизни трутней / Ю.А. Черевко // Пчеловодство. – 1998. - №3. – С.11.
- 81 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.
- 82 Шаскольский, Д.В. Племенные трутни от пчел-трутовок / Д.В. Шаскольский // Пчеловодство. – 1985. - №11. – С. 16.

- 83 Шмелева, Н.Д. Возрастная изменчивость некоторых признаков трутней / Н.Д. Шмелева // Пчеловодство. - 1975. - №1. - с. 14
- 84 Шмелева, Н.Д. Отбор трутней в племенной работе / Н.Д. Шмелева // Пчеловодство. - 1976. - №8. - С. 9.
- 85 Abdelkader, F. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions [Электронный ресурс] / F. Abdelkader, G. Kairo et al. // *Apidologie*. - 2014. - V. 45. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/257386866>.
- 86 Alaux, C. Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*) [Электронный ресурс] / C. Alaux et al. // *Journal of invertebrate pathology*. - 2011 - V.106 - P. 380–385. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/49681583>.
- 87 Andersen, D. Improving queen bee production. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation [Электронный ресурс] / D. Andersen. - Publication CSE-85A, Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, Australia, 2004. - Режим доступа: <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/04-153>.
- 88 Andere, C.I. *Apis mellifera* semen: bacterial contamination and susceptibility to antibiotics [Электронный ресурс] / C.I. Andere, C. Monteavaro, M.A. Palacio, M. Catena, E.M. Rodriguez, A.M. Collins // *Apidologie*. - 2011. - V. 42. - P. 551–559. - Режим доступа: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01003586/document>.
- 89 Arruda R.P., Ball B.A., Gravance C.G., Garcia A.R., Liu IKM, 2002: Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphology / R.P. Arruda, B.A. Ball, C.G. Gravance, A.R. Garcia, Liu IKM // *Theriogenology*. - 2002. - V. 58, P. 253–256.
- 90 Baer, B. Sexual selection in *Apis* bees [Электронный ресурс] / B. Baer // *Apidologie*. - 2005. - V. 36. - P. 187–200. - Режим доступа: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00892137/document>.
- 91 Berg, S. Body size and reproductive success of drones (*Apis mellifera* L.) [Элек-

- тронный ресурс] / S. Berg, N. Koeniger, G. Koeniger, S. Fuchs // *Apidologie*. – 1997. - V. 28. – P. 449–460. - Режим доступа: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891475/document>.
- 92 Bieńkowska, M. Influence of the age of honey bee queens and dose of semen on condition of instrumentally inseminated queens kept in cages with 25 worker bees in the colonies [Электронный ресурс] / M. Bieńkowska, P. Węgrzynowicz, B. Panasiuk, K. Loc // *Journal of Apicultural Science*. – 2008. – V. 52. - № 2. – P. 23-33. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/258841458>.
- 93 Bieńkowska, M. The effect of different thermal conditions on drone semen quality and number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee [Электронный ресурс] / M. Bieńkowska, B. Panasiuk et al. // *Journal of Apicultural Science*. – 2011. - Vol. 55 No. 2. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/258840720>.
- 94 Bieńkowska, M. Effect of semen dose and application on the performance of instrumentally inseminated honeybee queens kept with 25 worker bees [Электронный ресурс] / M. Bieńkowska, K. Loc, B. Panasiuk, P. Węgrzynowicz, D. Gerula // *Journal of Apicultural Science*. – 2011. – V. 55. - № 1. – P. 99-109. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/287732577>.
- 95 Boes, K.E. Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: an interplay of queen and worker decisions [Электронный ресурс] / K.E. Boes // *Insectes Sociaux*. – 2010. - V. 57. – P. 1–9. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/226943551>.
- 96 Brodschneider, R. Nutrition and health in honey bees [Электронный ресурс] / R. Brodschneider, K. Crailsheim // *Apidologie*. – 2010. - V. 41. – P. 278–294. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/2010>.
- 97 Burley, L.M. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides [Электронный ресурс] / L.M. Burley, R.D. Fell, R.G. Saacke // *J. Econ. Entomol.* - 2008. - V. 101(4). – P. 1081-1087. - Режим доступа: <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/101/4/1081/> .

- 98 Cobey, S.W. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens [Электронный ресурс] / S.W. Cobey, D.R. Tarpy, J. Woyke // *Journal of Apicultural Research*. – 2013. - V. 52(4). – P. 1-18. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/256306523>. Без даты.
- 99 Cobey S.W. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance [Электронный ресурс] // *Apidologie*. – 2007. - V. 38. – P. 390-410. - Режим доступа: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00892280/document>.
- 100 Collins, A.M. Effect of *Varroa* infestation on semen quality / A.M. Collins, J.S. Pettis // *American Bee Journal*. – 2001. - № 141. – P. 590–593.
- 101 Collins, A.M. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens [Электронный ресурс] / A.M. Collins // *Apidologie*. – 2000. - V. 31. – P.421–429. Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2000/03/m0307.pdf>.
- 102 Collins, A.M. Survival of honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) spermatozoa stored at above freezing temperatures [Электронный ресурс] / A.M. Collins // *Journal of Economic Entomology*. – 2000a. – V. 93 (3). – P. 568-571. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/12417627>.
- 103 Collins, A.M. Viability assessment of honeybee *Apis mellifera* sperm using dual fluorescent staining [Электронный ресурс] / A.M. Collins, A.M. Donoghue // *Theriogenology*. – 1999. - V.51. – P. 1513-1523. - Режим доступа: <https://www.ars.usda.gov/research/publications/>.
- 104 Collins, A. M. A scientific note on the effect of centrifugation on pooled honey bee semen [Электронный ресурс] / A.M. Collins // *Apidologie*. - 2003. - V. 34 – P. 469-470. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/248855334>.
- 105 Collins, A. M. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. [Электронный ресурс] / A.M. Collins, V. Williams, J.D. Evans // *Insect Mol Biol*. – 2004. - V. 13 (2). – P.141-146. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15056361>.

- 106 Colonello, N. A. She's my girl – male accessory gland products and their function in the reproductive biology of social bees [Электронный ресурс] / N.A. Colonello, K. Hartfelder // *Apidologie*. – 2005. - V. 36. - P. 231-244. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2005/02/M4071.pdf> .
- 107 Cruz-Landim, D. Virus present in the reproductive tract of asymptomatic drones of honey bee (*Apis mellifera* L.), and possible infection of queen during mating [Электронный ресурс] / D. Cruz-Landim, T.C. Roat, F.C. Fernandez // *Microscopy research and technique*. – 2012. - V. 75(7). – P. 986-990. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/221703719>.
- 108 Cruz-Landim, C. D. Morphology and protein patterns of honey bee drone accessory glands [Электронный ресурс] / C.D. Cruz-Landim, R.P. Dallacqua // *Genetics and Molecular Research*. – 2005. - V. 4(3). – P. 473-481. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16342031>.
- 109 Currie, R.W. The biology and behavior of drones / R.W. Currie // *Bee World*. – 1987. - № 68. – P. 129–143.
- 110 Czekonska, K. The influence of honey bee (*Apis mellifera*) drone age on volume of semen and viability of spermatozoa [Электронный ресурс] / K. Czekonska, B. Chuda-Mickiewicz, P. Chorbinski // *J. apic. Sc.* - 2013. – Vol. 57. - №1. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/274432370>.
- 111 Dadkhah, F. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol [Электронный ресурс] / F. Dadkhah, G. Nehzati-Paghaleh, M. Zhandi, B.K. Hopkins // Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/310389037>.
- 112 Duay, P. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honeybee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development [Электронный ресурс] / P. Duay, D. De Jong, W. Engels // *Genetic Molecular Research*. – 2002. - V. 1 (3). – P. 227-232. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/8693000>.

- 113 Duncan W.W., Glew M.J., Wang X., Flaherty S.P., Matthews C.D. 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. 1233-8.
- 114 El-Sheshtawy, R.I., El-Badry, D.A. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters [Электронный ресурс] / R.I. El-Sheshtawy, D.A. El-Badry // *Asian Pacific Journal of Reproduction*, - 2016. - V. 5(4). - P. 331-334. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjr.2016.06.004>
- 115 El-Sheshtawy, R.I., El-Nattat, W.S. et al. Effect of Honey Solution on Semen Preservability of Local Breeds of Cattle Bulls / R.I. El-Sheshtawy, W.S. El-Nattat et al. // *World Applied Sciences Journal*, - 2014. - V. 32 (10). - P. 2076-2078. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2014.32.10.911
- 116 Estes M.C., Fernandez-Santos M.R., Soler A.G., Montoro V., Quintero-Moreno A., Gard J.J. The Effects of Cryopreservation on the Morphometric Dimensions of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Sperm Heads / M.C. Estes, M.R. Fernandez-Santos, A.J. Soler, V. Montoro, A. Quintero-Moreno, J.J. Gard // *Reprod Dom Anim*, - 2006. - V. 41, P. 241–246. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00676.x
- 117 Fakhrildin, M-B. M-R., M.D., Rana A-R. Alsaadi. Honey Supplementation to Semen-Freezing Medium Improves Human Sperm Parameters Post-Thawing / M-R., M-B. Fakhrildin, M.D., Rana A-R. Alsaadi. // *Journal of Family and Reproductive Health*, - 2014. - V. 8(1). - P. 27-31.
- 118 Fanni, N.A., Santanumurti, M.B. et al. Quality enhancement of cryopreserved spermatozoa of sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) with honey addition [Электронный ресурс] / N.A. Fanni, M.B. Santanumurti et al. // *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, - 2018. - V. 32(2). - P. 231-236. Режим доступа: <http://www.vetmedmosul.com>
- 119 Foley, K. Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae [Электронный ресурс] / K. Foley, G. Fazio, A.V. Jensen, W.O.H. Hughes // *J. Invert. Pathol.* – 2012. - V. 111. – P. 68–73. Режим

доступа:

http://socialevolution.ku.dk/papers/Foley_et_al_J_of_Invert_Pathology_2012.pdf.

- 120 Garner, D.L. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide [Электронный ресурс] / D. L. Garner, L.A. Johnson // *Biology of reproduction*. - 1995. - V. 53. – P. 276-284. - Режим доступа: <https://watermark.silverchair.com/biolreprod0276.pdf>.
- 121 Gencer, H. V. Reproductive and morphological comparisons of drones reared in queen right and laying worker colonies [Электронный ресурс] / H.V. Gencer, C. Firatli // *Journal of Apiculture Research*. – 2005. - V. 44(4). – P. 163-167. - Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080>.
- 122 Gençer H. Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination [Электронный ресурс] / H. Gençer, Y. Kahya, J. Woyke // *Apidologie*. - 2014. - V. 45. – P.757–770. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/262808543>.
- 123 Gerula, D. Instrumental insemination of honey bee queens during flight activity predisposition period 2. Number of spermatozoa in spermatheca [Электронный ресурс] / D. Gerula, B. Panasiuk, P. Węgrzynowicz, M. Bieńkowska // *Journal of Apicultural Science*. – 2012. – V. 56. - № 1. – P. 159-167. - Режим доступа: <https://www.degruyter.com/view/j/jas.2012.56.issue-1/>.
- 124 Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration [Электронный ресурс]. – Rome: Food and Agriculture Organization (FAO), 2007. - Режим доступа: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1404e/a1404e00.pdf>.
- 125 Gul, A. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility [Электронный ресурс] / A. Gul, S. Nuray, A.G. Onal, B.K. Hopkins, W.S. Sheppard // *Theriogenology*. – 2017. - V .101. – P. 109-113. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/317834856>.
- 126 Golshahia, K., Sadegh Aramlib, M. et al. Disaccharide supplementation of ex-

- tenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon [Электронный ресурс] / K. Golshahia, M. Sadegh Aramlib et al. // *Aquaculture*, - 2018. - V. 486. - P. 261-265. Режим доступа: www.elsevier.com/locate/aquaculture
- 127 Gravance C.G., White C., Robertson K.R., Champion Z.J., Casey P.J., The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads / C.G. Gravance, C. White, K.R. Robertson, Z.J. Champion, P.J. Casey // *Anim Reprod Sci.* – 1997. – V. 49, P. 37–43.
- 128 Gravance C.G., Vishwanath R., Pitt C., Garner D.L., Casey P.J., 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.
- 129 Haarman, T. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations [Электронный ресурс] / T. Haarman, M. Spivak et al. // *J. Econ. Entomol.* – 2002. - V. 95. – P. 28–35. - Режим доступа: <http://www.uvm.edu/~orchard/PollinatorProtection>.
- 130 Harbo, J. R. Storage of honeybee spermatozoa at -196°C [Электронный ресурс] / J.R. Harbo // *Journal of Apicultural Research.* – 1979. - V. 18. - P. 57–63. - Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080>.
- 131 Harbo, J. R. Survival of honey bee (Hymenoptera, Apidae) spermatozoa after 2 years in liquid-nitrogen (-196°C) [Электронный ресурс] / J.R. Harbo // *Ann. Entomol. Soc. Am.* – 1983. – V. 76. – P. 890–891. - Режим доступа: <https://academic.oup.com/aesa/article-abstract/76/5/890/57103>.
- 132 Harbo, J.R. Effect of above-freezing temperatures on temporary storage of honeybee spermatozoa [Электронный ресурс] / J.R. Harbo, J.L. Williams // *Journal of Apicultural Research.* – 1987. - V. 26. – P. 53–55. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/292939857>.
- 133 Herranz-Jusdado J.G., Gallego V., Morini M. et al. Eel sperm cryopreservation: An overview [Электронный ресурс] / J.G. Herranz-Jusdado, V. Gallego, M. Morini et al. // *Theriogenology*, 2019. - V. 133. - P. 210-215. Режим доступа: www.theriojournal.com

- 134 Herranz-Jusado J.G., Gallego V., Rozenfeld C. et al. European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation of large volumes [Электронный ресурс] / J.G. Herranz-Jusado, V. Gallego, C. Rozenfeld et al. // *Aquaculture*, - 2019. - V. 506. - P. 42-50. Режим доступа: www.elsevier.com/locate/aquaculture
- 135 Hinting A., Comhaire F., Vermeulen L., Dhort M., Vermeulen A., Vanderberhove D. 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. Dhort, A. Vermeulen, D. Vanderberhove // *Int J Androl*. - 1990. – V. 13, P. 59-64.
- 136 Hopkins, B. K. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa [Электронный ресурс] / В.К. Hopkins, С. Herr // *Apidologie*. – 2010. – V. 41. – P. 548-556. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2010/05/m09054.pdf>.
- 137 Hopkins, B. K. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen [Электронный ресурс] / В.К. Hopkins, С. Herr, W.S. Sheppard // *Reproduction, Fertility and Development*. - 2012. – V. 24. - P. 1079-1083. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/>.
- 138 Hopkins, B. K. Gel-coated tubes extends above-freezing storage of honey bee (*Apis mellifera*) semen to 439 days with production of fertilised offspring [Электронный ресурс] / В.К. Hopkins // *Reproduction, Fertility and Development*. - 2017. - V. 29(10). - P. 1944-1949. - Режим доступа: <https://www.semanticscholar.org/paper/Gel-coated-tubes-extend-above-freezing-storage>.
- 139 Huang, Q. Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections [Электронный ресурс] / Q. Huang, P. Kryger, Y. Le Conte, R.F.A. Moritz // *J. Invertebr. Pathol.* – 2012. - V. 109. – P. 297–302. - Режим доступа: <https://www.semanticscholar.org/paper/>.
- 140 Huang, Z. Pollen nutrition affects honey bee stress resistance [Электронный ресурс] / Z. Huang // *Terr. Arthropod Rev.* – 2012. - V. 5. – P. 175–189. - Режим

- доступа: <https://www.researchgate.net/publication/229135314>.
- 141 Jarolimek, J.P. A comparison of fitness components in large and small honeybee drones / J.P. Jarolimek, G.W. Otis // *Am. Bee J.* – 2001. - V. 12. – P. 891–892.
- 142 Jerez-Ebensperger, R., Gil, L. et al. The combined use of honey, garlic (*Allium Sativum L.*) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen [Электронный ресурс] / R. Jerez-Ebensperger, L. Gil et al. // *CryoLetters*, - 2015. - V. 36 (4). - P. 243-251. Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/281930260>
- 143 Johnson, R.M. Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability [Электронный ресурс] / R.M. Johnson, L. Dahlgren, B.D. Siegfried, M.D. Ellis // *Journal of Apicultural Research*. – 2013. – V. 52(2). – P. 88-95. - Режим доступа: https://www.researchgate.net/profile/Reed_Johnson/.
- 144 Kaftanoglu, O. Preservation of honey bee spermatozoa in liquid-nitrogen / O. Kaftanoglu, Y.S. Peng // *J. Apic. Res.* – 1984. – V. 23. – P. 157–163.
- 145 Kandiel, M.M.M., El-Khawagah, A.R.M. et al. Quantitative Ultrastructure Evaluation of Egyptian Buffalo Bull Frozen-Thawed Spermatozoa under the Effect of Honey [Электронный ресурс] / M.M.M. Kandiel, A.R.M. El-Khawagah et al. // *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, - 2019. - V. 6 (3). - P. 92–98. DOI: 10.21276/sjav.2019.6.3.4
- 146 Koeniger, N. Factors determining the laying of drone and worker eggs by the queen honey bee / N. Koeniger // *Bee World*. - 1970a. - V. 51. – P. 166-169.
- 147 Koeniger, N. On the natural disposition of the honey bee *Apis mellifera* queen for distinguishing worker bee cells from male cells / N. Koeniger // *Annales de l'Abbeille (Paris)*. – 1970b - V. 1. – P. 115-142.
- 148 Koeniger, G. Comparative reproductive biology of honeybees. In: Hepburn H. R., Radloff S. E. (Eds.) *Honeybees of Asia* [Электронный ресурс] / G. Koeniger, N. Koeniger, M. Phiancharoen. – 2011. - Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. – P. 159-206. - Режим доступа: <https://books.google.ru/books?id>.
- 149 Конорска, Z. Przechowywanie nasienia trutni / Z. Конорска // *Przegl. Hodowl.* – 1987. – V. 55, I. 15. – P. 15-17.

- 150 Knell, R. J. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behavior [Электронный ресурс] / R.J. Knell, K.M. Webberley // *Biological Reviews*. -2004. - V. 79. – P. 557–581. - Режим доступа: <http://webspaces.qmul.ac.uk/rknell/pdfs/>
- 151 Łangowska, A. Liczba i żywotność plemników w pszczołach nasiennech utrzymywanych w cieplarni [Электронный ресурс] /A. Łangowska, M. Fliszkiewicz, P. Chorbiński // *Pszczelnictwo Naukowe*. – XLVI Naukowa Konferencja Pszczelarska, 2009. – P. 26-27. - Режим доступа: <http://www.opisik.pulawy.pl/pdf/konf52.pdf>.
- 152 Lee, P.C. Effects of reproductive timing and colony size on the survival, offspring colony size and drone production in the honey bee (*Apis mellifera*) [Электронный ресурс] / P.C. Lee, M.L. Winston // *Ecological Entomology*. – 1987. – V. 12. – P. 187–195. - Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/>.
- 153 Locke, S.J. The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*) [Электронный ресурс] / S.J. Locke, Y.S. Peng // *Physiological Entomology*. – 1993. - V. 18. – P. 144–148. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/229484112>.
- 154 Locke, S. J. A supravital staining technique for honey bee spermatozoa [Электронный ресурс] / S.J. Locke, Y.S. Peng, N.L. Cross // *Physiological Entomology*. - 1990. – V. 15. – P. 187-192. - Режим доступа: <https://eurekamag.com/ftxt.php?pdf>.
- 155 Malik, A., Fauzi, R., Zakir M.I. Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali / A. Malik, R. Fauzi, M.I. Zakir // *Acta veterinaria indonesiana*, - 2017. - V. 5(2). - P. 98-104. Режим доступа: <http://www.journal.ipb.ac.id/index.php/actavetindones>
- 156 Mazeed, A. M. Some reproductive characteristics of honeybee drones in relation to their ages [Электронный ресурс] / A.M. Mazeed, K.M. Mohanny // *Entomological Research*. – 2010. - V. 40. – P. 245-250. - Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/>

- 157 De Miranda, J. R. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.) [Электронный ресурс] / J.R. De Miranda, I. Fries // *J.Invertebr. Pathol.* - V. 98. - P. 184–189. - Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/user/>.
- 158 Moors, L. Morphological and ultrastructural changes in the mucus glands of *Apis mellifera* drones during pupal development and sexual maturation [Электронный ресурс] / L. Moors, O. Spaas, G. Koeniger, J. Billen // *Apidologie.* – 2005. - V. 36. – P. 245-254. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/>.
- 159 Moritz, R.F.A. The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen / R.F.A. Moritz // *J. Apic. Res.* – 1984. – V. 23. – P. 164–167.
- 160 Moritz, R.F.A. The origin of inbreeding depression in honeybees [Электронный ресурс] / R.F.A. Moritz // *Bee World.* – 1986. - V. 67. – P. 157-163. - Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/>.
- 161 McNally, L.C. Drone production and drone comb utilization in colonies of the African honey bee, *Apis mellifera scutellata* LePeletier, in Africa [Электронный ресурс] / L.C. McNally, S.S. Schneider // *Apidologie.* – 1994. - V. 25. – P. 547–556. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.
- 162 Nomura K, Chong Chu Kohb I, Iiob R. et al. Sperm cryopreservation protocols for the large-scale fertilization of Japanese eel using a combination of large-volume straws and low sperm dilution ratio [Электронный ресурс] / K. Nomura, I. Chong Chu Kohb, R. Iiob et al. // *Aquaculture*, 2018. - V. 496. - P. 203-210. Режим доступа: www.elsevier.com/locate/aquaculture
- 163 Nguyen, V.N. Effect of protein nutrition and pollen supplementation of honey bee, *Apis mellifera* L., colonies on characteristics of drones with particular reference to sexual maturity [Электронный ресурс] / V.N. Nguyen // *Australasian Beekeeper.* – 1995. - V. 100. – P. 374-376. - Режим доступа: www.theabk.com.au/.

- 164 Ogretmen, F., İnanan, B.E. Evaluation of cryoprotective effect of turkish pine honey on common carp (*Cyprinus Carpio*) spermatozoa [Электронный ресурс] / F. Ogretmen, B.E. İnanan // *CryoLetters*, - 2014. - V. 35(5). - P. 427-437. Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/268281045>
- 165 Omar, R. E. M. Effect of varroa infestation on the development of body weight and some reproductive organs of honeybee drones, *Apis mellifera* L. [Электронный ресурс] / R.E. Omar // *Middle East Journal of Applied Sciences*. – 2017. - V. 7, Issue 2. - P. 272-279. - Режим доступа: www.curreweb.com/mejas/mejas/.
- 166 Paillard, M. Preservation of honey bee (*Apis mellifera* L.) Semen [Электронный ресурс] / M. Paillard // *Universite Laval*. - Québec, Canada. – 2016. – Режим доступа: www.theses.ulaval.ca/2016/32724/32724.pdf.
- 167 Di Pasquale, G. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? [Электронный ресурс] / G. Di Pasquale, M. Salignon, Y. Le Conte, L.P. Belzunces, A. Decourtye, A. Kretzschmar, C. Alaux // *PloSone* 8(8). – 2013. - e72016. - Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/>.
- 168 Paynter, E. Insights into the molecular basis of long-term storage and survival of sperm in the honeybee (*Apis mellifera*) [Электронный ресурс] / E. Paynter, A.H. Millar, M. Welch, B. Baer-Imhoof, D. Cao, B. Baer // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – Article number 40236. - Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/srep40236>.
- 169 Phiancharoen, M. Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero- and conspecific spermatozoa results in different sperm survival [Электронный ресурс] / M. Phiancharoen, S. Wongsiri, N. Koeniger, G. Koeniger // *Apidologie*. – 2004. - V. 35. – P. 503-511. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.
- 170 Peng, Y. Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility [Электронный ресурс] / Y. Peng et al. // *Sci. Rep.* – 2015. - V. 5. – P. 1065. - Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/srep10565>.

- 171 Pettis, J.S. Colony failure linked to low sperm viability in honey bee (*Apis mellifera*) queens and an exploration of potential causative factors [Электронный ресурс] / J.S. Pettis, N. Rice, K. Joselow, D. Engelsdorp, V. Chaimanee // PLoS One. – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/>.
- 172 Poole, H. K. In vitro preservation of honey bee Hymenoptera-Apidae semen enhanced by storage at 13-15 degrees C. [Электронный ресурс] / H.K. Poole, S. Taber // Annals of the Entomological Society of America. – 1970. – V. 63. – P. 1673. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/233574797>.
- 173 Retschnig, G. Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*) [Электронный ресурс] / G. Retschnig, G.R. Williams, M.M. Mehmman, O. Yanez, J.R. De Miranda, P. Neumann // PLoS One 9(1). – 2014. - e85261. – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/>.
- 174 Rhodes, J. Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones [Электронный ресурс] / J. Rhodes, S. Harden // Apidologie. - 2010.- V. 41. – P. 106. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/227309035>.
- 175 Rhodes, J. W. Semen production in drone honeybees [Электронный ресурс] / J.W. Rhodes // RIRDC Pub., 2008. - No. 08/130. – Режим доступа: <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/08-130>.
- 176 Riel, J. M., Yamauchi, Y., Huang, T. T. F., Grove, J., Ward, M. A. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation / J.M. Riel, Y. Yamauchi, T.T.F. Huang, J. Grove, M.A. Ward // Biol. Reprod. 2011. - V. 85. - P. 536–547.
- 177 Rijsselaere T., Van Soom A., Hoflack G., Maes D., de Kruif A., Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer / T. Rijsselaere, A. Van Soom, G. Hoflack, D. Maes, A. de Kruif // Theriogenology. – 2004. – V. 62, P. 1292–1306.
- 178 Rinderer, T.E. Varroa in the mating yard: I. The effect of *Varroa jacobsoni* and Apistan on drone honey bees [Электронный ресурс] / T.E. Rinderer, L. De

- Guzman et al. // *Am. Bee J.* – 1998. - V. 139. – P. 134–139. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/285837546>.
- 179 Rousseau, A. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of Breeding [Электронный ресурс] / A. Rousseau, V. Fournier, P. Giovenazzo // *The Canadian Entomologist.* – 2015. – Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/276163103>.
- 180 Saifutdinova, Z.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 – 45th Apimondia International Apicultural Congress. – Turkey. – 2017. – P. 38.
- 181 Seeley, T.D. The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.) [Электронный ресурс] / T.D. Seeley, R.A. Morse // *Insect Soc.* – 1976. - V. 23. – P. 495–512. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/269996264>.
- 182 Schluns, H. Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size [Электронный ресурс] / H. Schluns, E. Schluns et al. // *Apidologie.* – 2003. - V. 34. – P. 577–584. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.
- 183 Schmickl, T. Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages [Электронный ресурс] / T. Schmickl, K. Crailsheim // *J. Comp. Physiol.* – 2001. - A. 187 – P. 541–547. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/11626345>.
- 184 Schmid-Hempel, P. Parasites in social insects [Электронный ресурс] / P. Schmid-Hempel // Princeton University Press. - 1998. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/228692502>.
- 185 Schatton-Gadelmayer, K. Hemolymph protein und Körpergewicht frischgeschlüpfter Bienen-Arbeiterinnen nach unterschiedlich starker Parasitierung durch Brutmilben (*Hymenoptera: Apidae: Apis mellifera* / *Acarina: Varroidae: Varroa Jacobsoni*) [Электронный ресурс] / K. Schatton-Gadelmayer, W. Engeles // *Entomol. Gen.* – 1988. - V. 14. – P. 93-101. - Режим доступа: www.schweizerbart.de/content/papers_preview/.../79872.

- 186 Schneider, P. The effect of *Varroa jacobsoni*, on weight, development of hypopharyngeal gland lifespan of *Apis mellifera* [Электронный ресурс] / P. Schneider, W. Drescher // *Apidologie*. - 1987. - V. 18 (1). – P. 101-110. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.
- 187 Shikh Maidina, M., Padlana, M.H. et al. Supplementation of *Nigella sativa* Oil and Honey Prolong the Survival Rate of Fresh and Post-Thawed Goat Sperms / M. Shikh Maidina, M.H. Padlana et al. // *Tropical Animal Science Journal*, - 2018. - V. 41(2). - P. 94-99. DOI: <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.2.94>
- 188 Shoukry Rasha, S. Effect of some materials for controlling *Varroa* mite on the honeybee drones (*Apis mellifera* L.) [Электронный ресурс] / S. Shoukry Rasha, A. Khattaby // *J. Agric. Res.* – 2013. - V. 91(3). - Режим доступа: <http://www.arc.sci.eg>.
- 189 Skowronek, W. The effect of inseminating queen honey bees with semen stored under laboratory conditions [Электронный ресурс] / W. Skowronek, Z. Kono-packa // *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*. – 1983. - V. 27. – P. 3-12. - Режим доступа: <http://miesiecznik-pszczelarstwo.pl/pzn/sites/>.
- 190 Skowronek, W. The insemination of queen honeybees with diluted semen [Электронный ресурс] / W. Skowronek, C. Kruk, K. Lok // *Apidologie*. - 1995. - V. 26. - P. 487-493. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1995/>.
- 191 Skowronek, W. Opracowanie metody krótkoterminowego przechowywania nasienia trutni [Электронный ресурс] / W. Skowronek, J. Szymula // *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*. – 1998. - Rok XLII. - Nr. 1. - P. 145-150. - Режим доступа: <http://miesiecznik-pszczelarstwo.pl/pzn/sites/>.
- 192 Sitaula, R., Fowler, A., Toner, M., Bhowmick, S. A study of the effect of sorbitol on osmotic tolerance during partial desiccation of bovine sperm [Электронный ресурс] / R. Sitaula, A. Fowler, M. Toner, S. Bhowmick // *Cryobiology*, - 2010. - V. 60. - P. 331-336. Режим доступа: www.elsevier.com/locate/ycryo
- 193 Sturup, M. When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera* [Электронный ресурс] / M. Sturup, B. Baer-Imhoof, D.R.

- Nash, J.J. Boomsma, B. Baer // Behavioral Ecology. – 2013. - V. 24(5) – P. 1192-1198. - Режим доступа: <https://academic.oup.com/beheco/article/24/5/1192/255447>.
- 194 Sunarma, A., Wisudiyanti Budihastuti, D., Sistina, Y. Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842) [Электронный ресурс] / A. Sunarma, D. Wisudiyanti Budihastuti, Y. Sistina // Omni-Akuatika, - 2010. - V. 9(11). - P. 51-55. Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/303388236>
- 195 Syazana, N.S., Hashida, N.H. et al. Effects of Gelam Honey on Sperm Quality and Testis of Rat / N.S. Syazana, N.H. Hashida et al. // Sains Malaysiana, - 2011. - V. 40(11). - P. 1243-1246.
- 196 Thompson L.A., Brook P.F., Warren M.A., Barratt C.L.R., Cooke I.D., 1994: A morphometric comparison of the nuclear morphology of fresh and frozen-thawed human zona-bound and unbound sperm / L.A. Thompson, P.F. Brook, M.A. Warren, C.L.R. Barratt, I.D. Cooke // J Androl. – 1994. – V. 15, P. 337–342.
- 197 Traver, B. E. Nosema ceranae in drone honey bees (*Apis mellifera*) [Электронный ресурс] / B.E. Traver, R.D. Fell // J. Invertebr. Pathol. – 2011. - V. 107. - P. 234–236. - Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/>.
- 198 Yue, C. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*) [Электронный ресурс] / C. Yue, E. Genersch // J.Gen. Virol. – 2005. - V. 86. – P. 3419–3424. - Режим доступа: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/>.
- 199 Vesely, V. Retention of semen in the lateral oviducts in artificially inseminated honey bee queens [Электронный ресурс] / V. Vesely // Acta Ent. Bohemoslov. – 1970. - V. 67. – P. 83–92. - Режим доступа: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19740200976>.
- 200 Vesely, V. Evaluation of short-term storage of drone honeybee semen / V. Vesely, D. Titera // Ved. Pr. Vyz. Ust. Vcelarskeho Dole. - 1987. – V. 9. – P. 223.229.

- 201 Verma, L.R. Biology of honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa 1. Effect of different diluents on motility and survival [Электронный ресурс] / L.R. Verma // *Apidologie*. - 1978. - V. 9 (3). - P. 167-174. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.
- 202 Wegener, J. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen [Электронный ресурс] / J. Wegener, T. May, U. Knollmann, G. Kamp, K. Müller, K. Bienefeld // *Cryobiology*. - 2012. - V. 65. - Issue 2. - P. 126-131. - Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.04.010>.
- 203 Wegener, J. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens [Электронный ресурс] / J. Wegener, K. Bienefeld // *Theriogenology*. - 2012. - V. 77 (2012). - P. 600-607. - Режим доступа: <http://www.academia.edu/26878018/>.
- 204 Wegener, J. New methods and media for the centrifugation of honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) drone semen [Электронный ресурс] / J. Wegener, T. May, G. Kamp, K. Bienefeld. // *Journal of Economic Entomology*. - 2014. - V. 107. - P. 47-53. - Режим доступа: <https://academic.oup.com/>.
- 205 Willard, L.E. Food manipulation in honeybees induces physiological responses at the individual and colony level [Электронный ресурс] / L.E. Willard, A.M. Hayes, M.A. Wallrichs, O. Rueppel // *Apidologie*. - 2011. - V. 42(4). - P. 508–518. - Режим доступа: <https://link.springer.com/article/>.
- 206 Woyke, J. Influence of age of drones on the results of instrumental insemination of honeybee queens [Электронный ресурс] / J. Woyke, Z. Jasinsky // *Apidologie*. - 1978. - V. 3. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.
- 207 Woyke, J. Effect of the access of worker honey bees to the queen on the results of instrumental insemination [Электронный ресурс] / J. Woyke // *J. Apic. Res.*, 1979. - V. 18. - P. 136–143. - Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00218839.1979>.
- 208 Woyke, J. Influence of the number of attendant workers on the results of instrumental insemination of honey bee queens kept at room temperature [Электронный ресурс] / J. Woyke, Z. Jasinski // *Apidologie*. - 1980. - V. 11. - P. 173–179. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.

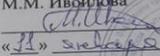
- 209 Woyke, J. Influence of the number of attendant workers on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated queens kept outdoors in mating nuclei [Электронный ресурс] / J. Woyke, Z. Jasinski // J. Apic. Sci., 1982. – V. 21. – P. 129–133. - Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/239521776>.
- 210 Woyke, J. Dynamics of entry of spermatozoa into the spermatheca of instrumentally inseminated queen honey bees / J. Woyke // J. Apic. Res., 1983. - V. 22. – P. 150–154.
- 211 Woyke, J. Effect of the number of attendant worker bees on the initiation of egg laying by instrumentally inseminated queens kept in small nuclei / J. Woyke, Z. Jasinski // J. Apic. Res., 1990. - V. 29. P. 101–106.
- 212 Woyke, J. Why the eversion of the endophallus of honey bee drone stops at the partly everted stage and significance of this [Электронный ресурс] / J. Woyke, // Apidologie. - 2008. - V. 39. – P. 627–636. - Режим доступа: <https://www.apidologie.org/articles/apido/>.
- 213 Woyke, J. Three substances ejected by *Apis mellifera* drones from everted endophallus and during natural matings with queen bees [Электронный ресурс] / J. Woyke // Apidologie. - 2010. -V. 41(6). – P. 613-621. - Режим доступа: <https://link.springer.com/article/10.1051/apido/20010007>.
- 214 Zaghoul, A. A. Relevance of Honey Bee in Semen Extender on the Quality of Chilled-Stored Ram Semen / A.A. Zaghoul // J. Animal and Poultry Prod., - 2017. - V. 8(1). - P. 1- 5.
- 215 Zaitoun, S. Monthly changes in various drone characteristics of *Apis mellifera ligustica* and *Apis mellifera syriaca* [Электронный ресурс] / S. Zaitoun, A.M. Al-Ghzawi, R. Kridli // Entomological Science. - 2009. - V. 12. – P. 208–214. - Режим доступа: <http://www.academia.edu/9951531/>.
- 216 Zoheir, K.M.A., Harisa, G.I. et al. Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice / K.M.A. Zoheir, G.I. Harisa et al. // Pak. J. Pharm. Sci., - 2015. -V. 28(3). - P. 973-981.

7 ПРИЛОЖЕНИЕ

7.1 Приложение 1



**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр пчеловодства»
(ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства»)
ФИЛИАЛ КРАСНОПОЛЯНСКАЯ ОПЫТНАЯ СТАНЦИЯ
ПЧЕЛОВОДСТВА**
 ул. Пчеловодов 4, г. Сочи, Краснодарский край, 354393
 тел./факс: 8 (862) 243-03-36, 243-01-27
 E-mail: info@kosp-plem.ru Сайт: <http://kosp-plem.ru>
 ИНН 6213000373 КПП 621301001 ОГРН 1026200700350

УТВЕРЖДАЮ
 И.о. директора
 М.М. Ивойлова

 «11» сентября 2021 г.

АКТ № 1
внедрения научно-исследовательской работы


 «11» сентября 2021 г.

Краснодарский край, г. Сочи

Комиссия в составе:

- заведующая лабораторией отдела технологий переработки продуктов пчеловодства
- зоотехник
- пчеловод

В.В. Колесникова-Левченко
 В.И. Козакуло
 И.В. Коробкина

составила настоящий Акт о том, что в период с 28 мая по 1 июня 2018 г. проводились научные и практические исследования на тему «Разработка методов консервации спермы трутней для сохранения генофонда *Apis mellifera* L.» научным сотрудником лаборатории селекции и молекулярно-генетических исследований медоносных пчел ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства» Алексеем Николаевичем Гуловым, а именно внедрение способа хранения спермы в охлажденном состоянии при плюсовых температурах (3 °С).

В данный период в лаборатории инструментального осеменения пчелиных маток КОСП – филиала ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства» было заготовлено два образца свежесобранной спермы по 50 мкл от половозрелых трутней серой горной кавказской породы медоносных пчел с пасеки № 27. Образцы спермы хранились при 3 °С в запаянных стеклянных капиллярах в течение 30 суток. По истечении указанного срока консервации сперму использовали для инструментального осеменения 8 неплодных маток серой горной кавказской породы с пасеки № 27. Применяли однократное осеменение с объемом вводимой спермы 10 мкл. Выживаемость и прием искусственно осемененных маток пчелиными семьями составили 100%. Все искусственно осемененные матки дали потомство рабочих пчел более 50%. На основе проделанной работы показатели экстерьерных признаков полученного потомства соответствовали стандарту серой горной кавказской породы медоносных пчел.

Таким образом, способ хранения спермы в охлажденном состоянии при плюсовых температурах (3 °С) позволил сохранять качество спермы от половозрелых трутней серой горной кавказской породы медоносных пчел в течение 30 суток без изменений.

