

БИОТЕХНОЛОГИЯ / BIOTECHNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.25.4>

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДВУХ ПРОТОКОЛОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ПРИ ПРОГРАММИРУЕМОМ ЗАМОРАЖИВАНИИ СПЕРМЫ ТРУТНЕЙ

Научная статья

Гулов А.Н.<sup>1\*</sup>, Жаринов П.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ORCID : 0000-0001-6417-5422;

<sup>1,2</sup>Федеральный научный центр пчеловодства, Рыбное, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (blee3[at]yandex.ru)

**Аннотация**

Главная цель низкотемпературного хранения спермы трутней – сделать возможным использование ее для искусственного осеменения пчелиных маток с сохранением воспроизводительной способности на уровне осемененных свежееотобранной спермой. Наиболее распространенными методами криоконсервации спермы трутней являются замораживание в парах жидкого азота и с помощью программируемого замораживателя. Самой распространенной формой криохранения спермы медоносной пчелы являются криосоломины. Но в криосоломине воздействие жидкого азота на образец сильнее, так как увеличивается площадь поверхности образца. Цель работы – сравнительная оценка криосоломин и криовиал при программируемом замораживании спермы трутней. Выживаемость сперматозоидов оценивали по показателям общей подвижности и целостности их мембран (жизнеспособность) методом окрашивания 1% эозином. В ходе сравнительного анализа исследуемых форм криохранения выявлено достоверное превосходство криовиал перед криосоломинами при программируемом замораживании со скоростью 1-3°/мин по общей подвижности ( $U = 3166,5-3637$ , при  $p < 0,05$ ) и жизнеспособности сперматозоидов ( $U = 2786,5$ , при  $p < 0,05$ ). Выбранные режимы криоконсервации оказали влияние на качество заморожено-оттаянной спермы. Общая подвижность сперматозоидов, замороженных в криовиалах и криосоломинах со скоростью 1°/мин, оказалось достоверно выше в сравнении с образцами, замороженными со скоростью 3°/мин ( $t = 2,3$  и  $t = 2,9$ , при  $p < 0,05$ ). Таким образом, криоконсервация спермы трутней в криовиалах имеет явное преимущество перед криосоломинами в особенности при более медленном программируемом замораживании со скоростью 1°/мин.

**Ключевые слова:** сперма, трутень, криоконсервация.

COMPARATIVE EVALUATION OF TWO CRYOPRESERVATION PROTOCOLS FOR PROGRAMMED FREEZING OF DRONE SPERM

Research article

Gulov A.N.<sup>1\*</sup>, Zharinov P.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ORCID : 0000-0001-6417-5422;

<sup>1,2</sup>Federal beekeeping research centre, Rybnoe, Russian Federation

\* Corresponding author (blee3[at]yandex.ru)

**Abstract**

The main purpose of low-temperature storage of sperm is to make it possible to use it for artificial insemination of bee queens, while maintaining the reproductive capacity at the level of freshly inseminated sperm. The most common methods of cryopreservation of sperm are freezing in liquid nitrogen vapour and using a programmable freezer. The most common form of cryopreservation of honeybee sperm is cryosolomines. But in cryosolomine the effect of liquid nitrogen on the sample is stronger because the surface area of the sample is increased. The aim of the work is a comparative evaluation of cryosolomine and cryovial in programmed freezing of the sperm of drones. The sperm survival was evaluated by the indices of total motility and integrity of their membranes (viability) by staining with 1% eosin. The comparative analysis of the studied forms of cryopreservation revealed a reliable superiority of cryovials over cryosolomines under programmed freezing at a rate of 1-3°/min in terms of total motility ( $U = 3166.5-3637$ , at  $p < 0.05$ ) and sperm viability ( $U = 2786.5$ , at  $p < 0.05$ ). The selected cryopreservation regimes had an effect on the quality of frozen-thawed semen. The total motility of the sperm frozen in cryovials and cryosolominae at 1°/min was significantly higher compared to samples frozen at 3°/min ( $t = 2.3$  and  $t = 2.9$ , at  $p < 0.05$ ). Thus, cryopreservation of the sperm of drones in cryovials has a clear advantage over cryosolomines, especially for the slower programmed freezing at a rate of 1°/min.

**Keywords:** sperm, drone, cryopreservation.

**Введение**

Криоконсервация спермы различных животных довольно широко применяется в практике их разведения, воспроизводства и сохранения. Сельскохозяйственное животноводство сегодня сталкивается с целым рядом проблем, вызванных изменением климата, распространением новых видов заболеваний, а также растущим из года в год спросом на животноводческую продукцию. Криоконсервация генетических ресурсов посредством создания биоресурсных коллекций является одним из наиболее действенных инструментов, имеющихся в распоряжении правительств различных государств, для управления генетическим биоразнообразием как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе [1]. Формирование биоресурсных коллекций (биобанкингов) генетических ресурсов является одним из

этапов Глобального плана действий по генетическим ресурсам животных, разработанного и принятого странами-членами FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Главная цель низкотемпературного хранения спермы трутней – сделать возможным использование ее для искусственного осеменения пчелиных маток с сохранением воспроизводительной способности на уровне осемененных свежееотобранной спермой или полученных в условиях естественного спаривания [2]. Разработка приемов и технических средств длительного сохранения жизнеспособной спермы трутней имеет исключительно важное значение для селекционной работы в пчеловодстве. Выведение чистых линий медоносных пчел методом инбридинга практически невозможно без инструментального осеменения пчелиных маток спермой трутней, сохраняющейся по крайней мере в течение одного года. Для этого требуется сохранение спермы одной породы и генерации в течение развития 2-3 поколений маток.

Результатом многолетних исследований в области криобиологии медоносной пчелы, стало создание криобанков спермы трутней в России [2], США [3], Германии [4]. В методических рекомендациях FAO по криоконсервации генетических ресурсов животных [1] опубликованы протоколы замораживания и оттаивания спермы трутней медоносной пчелы [3], [5] с использованием программируемого замораживателя. Наиболее распространенными методами криоконсервации спермы трутней, обеспечивающими сохранение оплодотворяющей способности сперматозоидов на достаточно высоком уровне, являются замораживание в парах жидкого азота [2], [6], [7], [8] и с помощью программируемого замораживателя [3], [5], [9], [11].

Основоположниками применения терморегулирующих технологий в криоконсервации спермы трутней были Harbo J. (1979) [12], протестировавший скорости замораживания в диапазоне от 4-300°/мин Kaftanoglu O. & Peng Y.S. (1984) [13], изучавших скорости в диапазоне 1-8°/мин. Сперматозоиды трутней не выдерживают такой высокой скорости замораживания как 300°/мин [12] и более [7].

Отдельного внимания заслуживает опыт длительного хранения спермы медоносной пчелы в жидком азоте по методике Какпакова В. с соавт. (1993) [2]. По данной методике, удалось сохранить оплодотворяющую способность спермы медоносной пчелы в течение 25 лет криохранения [14], замороженной без применения программируемого замораживателя со скоростью близкой к 1°С/мин. Но, в более ранних исследованиях [13] была показана неэффективность применения скоростей замораживания менее 3°С/мин. Следовательно, в вопросе использования медленных скоростей криоконсервации для спермы трутней еще имеются разногласия.

Наиболее практичной формой криохранения спермы медоносной пчелы являются криосоломины 0,25 мл (250 мкл). В силу того, что объем разбавленной спермы для замораживания составляет, как правило, 5-10 мкл, то криосоломины подрезают до 6,5 см в длину [3] или до 4 см [9]. Помимо этого, в криосоломины дополнительно вводят небольшой объем физиологического раствора (или разбавителя для спермы), который отделяется по обе стороны от спермы воздушными пробками. Такая форма криохранения является весьма удобной при инструментальном осеменении пчелиных маток, так как соломины удачно подходят в прибор для осеменения маток [5]. Тогда как с криовиалами все выглядит гораздо сложнее. Требуется выполнение дополнительной операции по забору заморожено-оттаянной спермы из криовиалы в шприц для осеменения пчелиных маток. Подобные манипуляции могут сказаться на снижении качественных характеристик заморожено-оттаянной спермы. Однако следует обратить внимание на одно обстоятельство, которое может крайне высоко отразиться на качестве образца при замораживании. Речь идет о диаметре криосоломины (наружный Ø 1,8 мм, внутренний Ø 1,0 мм) и криовиалы (наружный Ø 12,5 мм, внутренний Ø 0,9 мм виалы объемом 1,5 мл). Один и тот же объем образца может иметь разные площади поверхности в зависимости от выбранного способа криохранения. Будь то большая капля в случае с криовиалами или длинный столб в криосоломине. Отличительной особенностью криосоломины является большая площадь наружной поверхности контейнера, отнесенная к единице объема препарата. Соответственно, в криосоломине воздействие жидкого азота на образец будет сильнее, так как в ней увеличивается площадь поверхности образца.

Таким образом, целью настоящего исследования является – сравнительная оценка криосоломин и криовиал при программируемом замораживании спермы трутней.

## Материалы и методы

### 2.1. Местоположение и характеристики исследуемой территории

Сбор свежей спермы проводился в ФГБНУ «Федеральный научный центр пчеловодства (г. Рыбное, Рязанская область, Россия) от трутней породного типа «Приокский» среднерусской породы пчел (*A. mellifera* L.). Образцы спермы были исследованы в лаборатории селекции и молекулярно-генетических исследований медоносных пчел ФНЦ пчеловодства в 2023 г.

### 2.2. Сбор и подготовка спермы

Трутней *A. mellifera* L. выращивали в отцовских пчелиных семьях на экспериментальной пасеке Федерального научного центра пчеловодства. В августе 2023 года отбирали сперму у половозрелых трутней в возрасте 20-30 суток методом искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса на оборудовании SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz, Espelkamp Deutschland). Сперму отбирали в стерильные стеклянные капилляры для гематологических исследований (L = 90 ± 1,0 мм, Ø 1,8 ± 0,2 мм) объемом по 50 мкл без разбавления и применения средств против бактериальной контаминации. Всего было заготовлено 200мкл свежееотобранной спермы – 100 мкл для замораживания в криосоломинах и 100 мкл для криоконсервации в криовиалах. До использования сперма хранилась в холодильнике при температуре 3°С в течение суток.

### 2.3. Оценка качества спермы

Качество спермы оценивали по следующим показателям – подвижность [15] и целостность мембран методом суправитального окрашивания раствором эозина. Свежееотобранную сперму (контроль) исследовали в двух повторностях и дополнительно подсчитывали концентрацию сперматозоидов по методике [15]. В одной повторности были исследованы сперматозоиды 50 трутней. В день отбора свежееотобранной спермы были подготовлены

предметные стекла и проведены необходимые измерения. Общую подвижность (ОП) каждого образца определяли с помощью визуального микроскопического анализа, выраженного в процентах сперматозоидов, проявляющих подвижность. Были приняты во внимание все сперматозоиды, которые проявляли подвижность, независимо от формы движения. Результаты по подвижности выражали в процентах. Каждый образец заморожено-оттаянной спермы исследовали в 100 повторностей. Подвижность сперматозоидов трутней оценивали микроскопически (Leica, США) при увеличении 400×.

#### 2.4. Жизнеспособность сперматозоидов

Жизнеспособность сперматозоидов оценивали методом окрашивания 1%-ным раствором эозина (1 г эозина на 100 мл дистиллированной воды). На 100 мкл суспензии сперматозоидов использовали 10 мкл 1%-ного раствора эозина. Жизнеспособность сперматозоидов (%) оценивали в 10 полях зрения микроскопа Leica (США) при увеличении 400×.

#### 2.5. Разбавление спермы и криоконсервация

В состав разбавителя для криоконсервации входили следующие компоненты: 10% мед – 50 мл, лактоза – 10 мг, сахара – 10 мг, яичный желток – 2,5 мл, ДМСО – 5 мл (10% от объема меда). Для приготовления 10%-го раствора использовали мед с акации белой, предварительно разогретый на водяной бане 40-45°C в течение 30 мин и стерильную деионизированную воду (ООО «Пан-Эко», Россия). Концентрацию ионов водорода в готовом разбавителе доводили с помощью 6М NaOH до значений pH 8-9. 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 [16], [17].

Далее для подготовки одного образца в криовиалу Nunc объемом 1,5 мл добавили 80 мкл свежеприготовленного разбавителя и 10 мкл охлажденной спермы (на 1 часть спермы 8 частей разбавителя). Все перемешали до однородного состояния с помощью стеклянного капилляра, запаянного с двух сторон и поместили в бытовой холодильник на 1 ч при 3 °C для эквilibрации. Для замораживания в криовиалах было заготовлено всего 10 образцов.

При заморозке в криосоломинах (0,25 см<sup>3</sup>, 133 мм; Minitube, Germany) в криовиалу Nunc объемом 1,5 мл добавили 400 мкл свежеприготовленного разбавителя и 50 мкл охлажденной спермы (1:8). Все перемешали до однородного состояния и с помощью одноканального пипеточного дозатора (Thermo Scientific, USA) расфасовали в 5 криосоломин. Перед заполнением разбавленной спермой, криосоломину подрезали до 90 мм в длину. Таким образом, было заготовлено 10 криосоломин, которые запечатали пластиковыми стержнями и поместили в бытовой холодильник на 1 ч при 3 °C для эквilibрации.

Замораживание образцов осуществляли на программируемом замораживателе BioFreeze BV-65 (Consarctic, Germany). Сравнительную оценку криовиал и криосоломин проводили по двум протоколам замораживания спермы трутней: со скоростью 3°/мин и 1°/мин. Протокол криоконсервации со скоростью 3°/мин (продолжительность 30 мин) был следующий:

- старт с 3 °C;
- от 3 °C до -5 °C со скоростью 3°/мин;
- удержание при -5 °C в течение 1 мин;
- от -5 до -12 °C со скоростью 1°/мин;
- удержание при -12 °C в течение 9 мин;
- от -12 °C до -50 °C со скоростью 3°/мин;
- после -50 °C свободное падение температуры до -196 °C.

Протокол криоконсервации со скоростью 1°/мин (продолжительность 1 ч 40 мин) был следующий:

- старт с 3 °C;
- от 3 °C до -5 °C со скоростью 1°/мин;
- удержание при -5 °C в течение 1 мин;
- от -5 до -12 °C со скоростью 0,15°/мин;
- удержание при -12 °C в течение 9 мин;
- от -12 °C до -50 °C со скоростью 1°/мин;
- после -50 °C свободное падение температуры до -196 °C.

Следовательно, в исследованиях принимали две опытные группы, в каждой из которых было 5 образцов спермы замороженной в криовиалах и 5 образцов замороженных в криосоломинах.

Оттаивание образцов проводили через сутки после криохранения на водяной бане при 37 °C в течение 30 с. После оттаивания в образец добавляли 1 мл разбавителя нагретого до 37 °C, тщательно пипетировали и оставляли на 5-10 мин. Затем, проводили однократное центрифугирование на MiniSpin(Germany) в течение 3 мин при 3000 об. После центрифугирования снимали супернатант и с помощью капилляра блока-шприца для искусственного осеменения маток набирали сперму со дна криовиалы для оценки качества.

#### 2.6. Статистический анализ

Статистические различия между выборками были проверены с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием отдельного построения графиков (STATISTICA версии 13.0; StatSof Россия, Москва). Групповые различия сравнивались с использованием t-критерия Стьюдента. Сравнительную оценку криовиал с криосоломинами проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Эффекты считались значимыми при  $p \leq 0,05$ .

#### Основные результаты

В период окончания активного сезона пчеловодства (август) в условиях Рязанской области прошлого года трутни отличались достаточно высокой половой потенцией, а сперма имела насыщенный кремовый цвет. При этом, была отмечена достаточно высокая вязкость эякулята и снижение активности сперматозоидов. Так, средний показатель общей подвижности составил  $62,4 \pm 2,35\%$ , жизнеспособности  $93,1 \pm 1,11\%$  и концентрации сперматозоидов  $3,3 \pm 0,13$  млн/мкл. По качественным характеристикам такая сперма подходила для экспериментальных исследований.

Через сутки после криоконсервации со скоростью 3°/мин подвижность сперматозоидов замороженных в криовиалах сократилась в 4,7 раза, а в криосоломинах в 15 раз (табл. 1).

Таблица 1 - Качество спермы трутней *A. mellifera L* после замораживания со скоростью 3°/мин

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.25.4.1>

Статистические показатели	Качество заморожено-оттаянной спермы			
	в криовиалах, n = 100		в криосоломинах, n = 101	
	общая подвижность, %	жизнеспособность, %	общая подвижность, %	жизнеспособность, %
M ± m	13,1 ± 1,9 (0 – 100)	92,5 ± 1,5 (50 – 100)	4,1 ± 1,3 (0 – 100)	76,7 ± 1,9 (33,4 – 100)
σ	19,9	14,8	12,9	19,8
Cv, %	151,8	16,0	315,5	25,8
U- критерий	3637,0	2786,5	-	-
Z	3,42	5,49	-	-
p	0,000613	0,000000	-	-

Тогда как мембраны спермиев замороженных в криовиалах незначительно подверглись воздействию агрессивных условий жидкого азота (снижение на 0,6%). Средний показатель жизнеспособности заморожено-оттаянной спермы из криосоломин снизился на 16,4%.

В ходе сравнительного анализа исследуемых форм криохранения для спермы трутней с помощью критерия Манна-Уитни выявлено достоверное превосходство криовиал перед криосоломинами при программируемом замораживании со скоростью 3°/мин.

Через сутки после криоконсервации со скоростью 1°/мин подвижность сперматозоидов замороженных в криовиалах сократилась в 3,3 раза, а в криосоломинах в 6,4 раза (табл. 2).

Таблица 2 - Качество спермы трутней *A. mellifera L* после замораживания со скоростью 1°/мин

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.25.4.2>

Статистические показатели	Качество заморожено-оттаянной спермы			
	в криовиалах, n = 100		в криосоломинах, n = 101	
	общая подвижность, %	жизнеспособность, %	общая подвижность, %	жизнеспособность, %
M ± m	18,8 ± 1,5 (0 – 66,7)	93,0 ± 1,2 (33,4 – 100)	9,7 ± 1,4 (0 – 66,7)	89,7 ± 1,6 (25 – 100)
σ	15,3	11,9	13,8	16,7
Cv, %	81,4	12,7	141,9	18,6
U- критерий	3166,5	4499,5	-	-
Z	4,48	1,22	-	-
p	0,000008	0,221824	-	-

Показатель целостности мембран спермиев замороженных в криовиалах снизился на 0,1%, а в криосоломинах на 3,4%.

По результатам сравнительного анализа исследуемых форм криохранения установлено достоверное превосходство криовиал перед криосоломинами только по показателю общей подвижности при программируемом замораживании со скоростью 1°/мин.

Выбранные нами режимы замораживания оказали влияние на качественные характеристики сперматозоидов во время криоконсервации в исследуемых формах хранения. Так, замораживание спермы в криовиалах со скоростью 1°/мин оказалось достоверно эффективней в сравнении со скоростью 3°/мин по показателю общей подвижности сперматозоидов ( $t = 2,3$  при  $p < 0,05$ ). Исследуемые режимы замораживания не оказали достоверного влияния на жизнеспособность спермиев ( $t = 0,6$  при  $p > 0,05$ ).

Криоконсервация спермы в криосоломинах со скоростью 1°/мин оказалась достоверно эффективней в сравнении со скоростью 3°/мин по показателю общей подвижности сперматозоидов ( $t = 2,9$  при  $p < 0,05$ ) и жизнеспособности ( $t = 5,0$  при  $p < 0,05$ ).

Таким образом, замораживание спермы трутней в криовиалах имеет явное преимущество перед криосоломинами по показателю общей подвижности в особенности при более медленном программируемом замораживании со скоростью 1°/мин. Подвижность спермиев в нашем опыте оказалась наиболее уязвимой при воздействии предельно низких температур.

### Обсуждение

Настоящая работа демонстрирует перспективы медленного программируемого замораживания спермы трутней медоносных пчел со скоростью менее 3°/мин. Это первое исследование, направленное на сравнительную оценку двух, наиболее признанных форм криохранения для спермы трутней – криовиал и криосоломин.

На сегодняшний день, медленное программируемое замораживание является наиболее признанным и эффективным методом криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы. Как правило, авторы осуществляют криоконсервацию образцов со скоростью 3°/мин до -35°C [9], до -40°C [3], [10], до -45°C [5] в течение 20 – 25 мин. Интересен опыт замораживания спермы трутней с использованием маточного молочка [11] и пчелиного меда [18]. Так, Alsay S. et al. (2019) [11] замораживали разбавленную сперму в диапазоне температур от 5°C до -8°C со скоростью 3°/мин и далее от -8 – 120°C со скоростью 15°/мин. Gulov A. et al. (2023) [18] применили замораживание со скоростью 3°/мин в диапазоне температур от 3 до -5°C и от -12 – 50°C, а в диапазоне от -5 – 12°C со скоростью 1°/мин.

Одновременно с этим, программируемое замораживание представляет собой достаточно дорогостоящее оборудование, стоимость которого превышает 1 млн. рублей. Более доступной и весьма эффективной альтернативой программируемому замораживанию служит криоконсервация спермы в парах жидкого азота. Замораживание в парах жидкого азота осуществляется на расстоянии 2,5 см от поверхности азота в течение 5 мин [7], на уровне 5 см в течение 10 мин [8] и на расстоянии 4 см от поверхности жидкого азота в течение 20 мин [6].

Результаты наших исследований согласуются с данными, опубликованными нами ранее [17]. В предыдущем исследовании [17] мы зафиксировали общую подвижность заморожено-оттаянных спермиев на уровне  $20,4 \pm 1,9\%$ , а жизнеспособность  $70,6 \pm 6,2\%$  после замораживания в криовиалах по методике [19]. Другими словами, программируемое замораживание со скоростью 1°/мин дало схожие результаты с методикой, которая обеспечивает успешную криоконсервацию сперматозоидов в аналогичном режиме, но в парах жидкого азота [19]. По данной методике, перед процедурой замораживания в криовиалу Nunc объемом 1,5 мл помещается неразбавленная сперма от 20 трутней и добавляется к ней 150 мкл (0,15 мл) питательной среды C46, содержащей 15% ЭТС и 10% Me<sub>2</sub>SO (диметилсульфоксид). Образцы разбавленной спермы (4-5 криовиал) размещают в алюминиевой канистре (L = 200 мм, Ø 45 мм) и начинают замораживать на расстоянии 25 см от поверхности жидкого азота в термосе (L = 500 мм, Ø 80 мм), заполненного азотом на ½. Через каждые 15 мин канистру с образцами опускают к поверхности жидкого азота до непосредственного касания с ним. Затем, фиксируют на уровне 1 см от поверхности на 20 мин и далее опускают в жидкий азот на хранение. По мнению авторов [2], такой режим заморозки примерно соответствует скорости замораживания 1°/мин.

Наиболее уязвимой характеристикой качества спермы при воздействии жидкого азота, в нашем исследовании, оказалась подвижность сперматозоидов, в особенности замороженных в криосоломинах. Так, Wegener et al. (2012) [9] при заморозке образцов в криосоломинах с помощью программируемого замораживателя со скоростью 3°/мин получили подвижность  $8,8 \pm 0,8\%$ , что на 4,7% больше, чем в аналогичных условиях собственных исследований. Однако жизнеспособность сперматозоидов оказалась ниже на 46,9%, в сравнении с нашими данными и составила  $29,8 \pm 7,3\%$  [9]. Несмотря на относительно низкий показатель общей подвижности сперматозоидов, установленный в ходе собственных исследований, высокий процент целостности мембран спермиев свидетельствует о хорошей сохранности жизненного ресурса спермы трутней. Многие из тех спермиев, которые попадали в поле зрения микроскопа во время оценки, имели форму колец полуколец и спиралей, что свидетельствует об их жизнеспособном состоянии [20]. Ряд авторов [3], [5], [7] при оценке качества спермы добавляют 1 мкл раствора глюкозы (0,05 г глюкозы на 100 мл дистиллированной воды) в каплю суспензии спермы, расположенной на предметном стекле под объективом микроскопа. В другом случае [21], добавление 2% BSA к разбавителю спермы снижало адгезию сперматозоидов к поверхности покровного стекла и, тем самым, способствовало улучшению их подвижности в толще разбавителя на предметном стекле. Подобные процедуры подготовки образца к исследованию, вероятно, способствуют дополнительной активации спермиев и улучшению их общей подвижности более 70% [3], [5], [7].

### Заключение

В ходе сравнительного анализа исследуемых форм криохранения выявлено достоверное превосходство криовиал перед криосоломинами при программируемом замораживании со скоростью 1-3°/мин по общей подвижности ( $U = 3166,5 - 3637$ , при  $p < 0,05$ ) и жизнеспособности сперматозоидов ( $U = 2786,5$ , при  $p < 0,05$ ). Выбранные режимы криоконсервации оказали влияние на качество заморожено-оттаянной спермы. Общая подвижность сперматозоидов, замороженных в криовиалах и криосоломинах со скоростью 1°/мин, оказалась достоверно выше в сравнении с образцами, замороженными со скоростью 3°/мин ( $t = 2,3$  и  $t = 2,9$ , при  $p < 0,05$ ). Таким образом, криоконсервация спермы трутней в криовиалах имеет явное преимущество перед криосоломинами по показателю общей подвижности в особенности при более медленном программируемом замораживании со скоростью 1°/мин.

**Финансирование**

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1037 (внутренний номер 15.БРК.21.0001).

**Конфликт интересов**

Не указан.

**Рецензия**

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

**Funding**

This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, grant no. 075-15-2021-1037 (internal no. 15.BRK.21.0001).

**Conflict of Interest**

None declared.

**Review**

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

**Список литературы / References**

1. Boes J. Innovations in cryoconservation of animal genetic resources: practical guide / J. Boes, P. Boettcher, M. Honkatukia // FAO Animal Production and Health Guidelines. — 2023. — № 33. — DOI: 10.4060/cc3078en.
2. Какпаков В.Т. Криобанк спермы трутней медоносной пчелы / В.Т. Какпаков, О.В. Кабашова, А.В. Бородачев [и др.] // Пчеловодство. — 1993. — №8. — С. 4-6.
3. Hopkins B.K. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen / B.K. Hopkins, C. Herr, W.S. Sheppard // Reproduction, Fertility and Development. — 2012. — № 24. — P. 1079-1083.
4. Wegener J. Zwei Bienen institute legen in Deutschland eineneue Kryobank fur Honig bienen an / J. Wegener, V. Viert, M. Meixner [et al.] // Deutshes Bienen Journal. — 2019. — № 8. — S. 62.
5. Rajamohan A. A non-activating diluents to prolong in vitro viability of *Apis mellifera* spermatozoa: Effects on cryopreservation and on egg fertilization / A. Rajamohan, R.G. Danka, B.K. Hopkins [et al.] // Cryobiology. — 2020. — № 92. — P. 124-129. — DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.11.045.
6. Henry L. Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*) / L. Henry, D.R. Álvaro, C.M. Karen [et al.] // Abanico Veterinario. — 2019. — № 9(1). — P. 1-11. — DOI: 10.21929/abavet2019.921.
7. Auth C.A. Nitrogen vapor immersion: An accessible alternative for honey bee (*Apis mellifera* L.) semen cryopreservation / C.A. Auth, B.K. Hopkins // Cryobiology Journal. — 2021. — № 100. — P. 12-18. — DOI: 10.1016/j.cryobiol.2021.04.006.
8. Castillo A. Efecto de dos crioprotector sobre la viabilidad de spermática de zánganos de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) / A. Castillo, J.L. Ernesto // Universidad Nacional Agraria la Molina. — Peru, 2020.
9. Wegener J. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen / J. Wegener, T. May, U. Knollman [et al.] // Cryobiology Journal. — 2012. — № 65. — P. 126-131. — DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.04.010.
10. Gul A. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility / A. Gul, S. Nuray, A.G. Onal [et al.] // Theriogenology. — 2017. — № 101. — P. 109-113.
11. Alcay S. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders / S. Alcay, S. Cakmak, I. Cakmak [et al.] // Cryobiology. — 2019. — № 87. — P. 28-31. — DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.03.005.
12. Harbo J.R. Storage of honeybee spermatozoa at -196°C / J.R. Harbo // Journal of Apicultural Research. — 1979. — № 18(1). — P. 57-63
13. Kaftanoglu O. Preservation of honey bee spermatozoa in liquid-nitrogen / O. Kaftanoglu, Y.S. Peng // Journal of Apicultural Research. — 1984. — № 23. — P. 157—163.
14. Gulov A.N. Creation of a Biobank of the Sperm of the Honey Bee Drones of Different Subspecies of *Apis mellifera* L / A.N. Gulov, A.S. Berezin, E.O. Larkina [et al.] // Animals. — 2023. — № 13(23). — P. 3684. — DOI: 10.3390/ani13233684.
15. Gulov A.N. Morphofunctional Changes in Frozen-Thawed Sperm of *Apis Mellifera* Linnaeus Drones / A.N. Gulov, E.E. Bragina // Russian Agricultural Sciences. — 2022. — № 48(6). — P. 512-520. — DOI: 10.3103/S1068367422060040.
16. Rhodes J.W. Semen production in drone honeybees / J.W. Rhodes // RIRDC Pub. — 2008. — № 08/130.
17. Гулов А.Н. Медовый разбавитель для криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы / А.Н. Гулов, А.С. Ласкин // Генетика и разведение животных. — 2020. — № 4. — С. 27-36. — DOI: 10.31043/2410-2733-2020-3-106-113.
18. Пинаев Г.П. Методы культивирования клеток / Под общ. ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой. — СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2008. — 278 с.
19. Yaniz J. Sperm Quality Assessment in Honey Bee Drones / J. Yaniz, M. Silvestre, P. Santolaria // Biology. — 2020. — № 9(174). — P. 2-16. — DOI: 10.3390/biology9070174.
20. Yaniz J. Effect of chamber characteristics, incubation, and diluent on motility of honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm / J. Yaniz, I. Palacin, P. Santolaria // Apidologie. — 2019. — № 50. — P. 472-481. — DOI: 10.1007/s13592-019-00659-у.

**Список литературы на английском языке / References in English**

1. Boes J. Innovations in cryoconservation of animal genetic resources: practical guide / J. Boes, P. Boettcher, M. Honkatukia // FAO Animal Production and Health Guidelines. — 2023. — № 33. — DOI: 10.4060/cc3078en.
2. Какпаков В.Т. Криобанк спермы трутней медоносной пчелы [Cryobanking of honey bee drone sperm] / В.Т. Какпаков, О.В. Кабашова, А.В. Бородачев [et al.] // Pchelovodstvo [Beekeeping]. — 1993. — №8. — P. 4-6. [in Russian]

3. Hopkins B.K. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen / B.K. Hopkins, C. Herr, W.S. Sheppard // *Reproduction, Fertility and Development*. — 2012. — № 24. — P. 1079-1083.
4. Wegener J. Zwei Bienen institute legen in Deutschland eineneue Kryobank fur Honig bienen an [Two bee institutes set up a new cryobank for honey bees in Germany] / J. Wegener, V. Viert, M. Meixner [et al.] // *Deutshes Bienen Journal* [German Bee Journal]. — 2019. — № 8. — P. 62. [in German]
5. Rajamohan A. A non-activating diluents to prolong in vitro viability of *Apis mellifera* spermatozoa: Effects on cryopreservation and on egg fertilization / A. Rajamohan, R.G. Danka, B.K. Hopkins [et al.] // *Cryobiology*. — 2020. — № 92. — P. 124-129. — DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.11.045.
6. Henry L. Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*) / L. Henry, D.R. Álvaro, C.M. Karen [et al.] // *AbanicoVeterinario*. — 2019. — № 9(1). — P. 1-11. — DOI: 10.21929/abavet2019.921.
7. Auth C.A. Nitrogen vapor immersion: An accessible alternative for honey bee (*Apis mellifera* L.) semen cryopreservation / C.A. Auth, B.K. Hopkins // *Cryobiology Journal*. — 2021. — № 100. — P. 12-18. — DOI: 10.1016/j.cryobiol.2021.04.006.
8. Castillo A. Efecto de dos crioprotector essobre la viabilid a de spermática de zánganos de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) [Effect of two cryoprotectants on the viability of honey bee drones (*Apis mellifera* L.)] / A. Castillo, J.L. Emesto // *Universidad Nacional Agraria la Molina* [National Agrarian University of La Molina]. — Peru, 2020. [in Spanish]
9. Wegener J. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen / J. Wegener, T. May, U. Knollman [et al.] // *Cryobiology Journal*. — 2012. — № 65. — P. 126-131. — DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.04.010.
10. Gul A. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility / A. Gul, S. Nuray, A.G. Onal [et al.] // *Theriogenology*. — 2017. — № 101. — P. 109-113.
11. Alcaay S. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders / S. Alcaay, S. Cakmak, I. Cakmak [et al.] // *Cryobiology*. — 2019. — № 87. — P. 28-31. — DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.03.005.
12. Harbo J.R. Storage of honeybee spermatozoa at -196°C / J.R. Harbo // *Journal of Apicultural Research*. — 1979. — № 18(1). — P. 57-63
13. Kaftanoglu O. Preservation of honey bee spermatozoa in liquid-nitrogen / O. Kaftanoglu, Y.S. Peng // *Journal of Apicultural Research*. — 1984. — № 23. — P. 157—163.
14. Gulov A.N. Creation of a Biobank of the Sperm of the Honey Bee Drones of Different Subspecies of *Apis mellifera* L / A.N. Gulov, A.S. Berezin, E.O. Larkina [et al.] // *Animals*. — 2023. — № 13(23). — P. 3684. — DOI: 10.3390/ani13233684.
15. Gulov A.N. Morphofunctional Changes in Frozen-Thawed Sperm of *Apis Mellifera* Linnaeus Drones / A.N. Gulov, E.E. Bragina // *Russian Agricultural Sciences*. — 2022. — № 48(6). — P. 512-520. — DOI: 10.3103/S1068367422060040.
16. Rhodes J.W. Semen production in drone honeybees / J.W. Rhodes // *RIRDC Pub*. — 2008. — № 08/130.
17. Gulov A.N. Medovyy razbavitel' dlja kriokonservacii spermy trutnej medonosnoj pchely [Honey diluent for cryopreservation of honey bee drone sperm] / A.N. Gulov, A.S. Laskin // *Genetika i razvedenie zhivotnyh* [Genetics and Animal Breeding]. — 2020. — № 4. — P. 27-36. — DOI: 10.31043/2410-2733-2020-3-106-113. [in Russian]
18. Pinaev G.P. Metody kul'tivirovaniya kletok [Methods of cell cultivation] / Edited by G.P. Pinaev, M.S. Bogdanova. — SPb.: Publishing house of the Polytechnic University, 2008. — 278 p. [in Russian]
19. Yaniz J. Sperm Quality Assessment in Honey Bee Drones / J. Yaniz, M. Silvestre, P. Santolaria // *Biology*. — 2020. — № 9(174). — P. 2-16. — DOI: 10.3390/biology9070174.
20. Yaniz J. Effect of chamber characteristics, incubation, and diluent on motility of honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm / J. Yaniz, I. Palacin, P. Santolaria // *Apidologie*. — 2019. — № 50. — P. 472-481. — DOI: 10.1007/s13592-019-00659-y.