

KRIOGENICZNE ZABEZPIECZANIE NASIENIA TRUTNI PSZCZOŁY MIODNEJ *APIS MELLIFERA* – WYBRANE ROZWIĄZANIA BIOTECHNOLOGICZNE I PERSPEKTYWY BADAWCZE

Magdalena Bryła, Monika Trzcińska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu
i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa
E-mail: magdalena.bryla@iz.edu.pl

Źródło finansowania: Praca finansowana ze środków Funduszu Badań Własnych nr 04-19-15-11, realizowanego w Instytucie Zootechniki PIB

Abstrakt

W hodowli pszczoły miodnej Apis mellifera w Polsce sukcesywnie wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem sztucznej inseminacji w rozrodzie matek pszczelich. W selekcji oraz doborze materiału matecznego i ojcowskiego do kojarzeń bierze się pod uwagę wyniki oceny cech użytkowych, takich jak produktywność, łagodność czy nierojliwość, a także zimotrwałość i dostosowanie rozwoju rodzin pszczelich do warunków środowiska, w którym są utrzymywane. Z roku na rok rośnie zapotrzebowanie na matki pszczele o wysokiej jakości, których cechy rozrodcze i produkcyjne wpływają na wzrost liczebności i poprawę kondycji rodzin pszczelich. Rozwój techniki sztucznej inseminacji odbywa się głównie w oparciu o wykorzystanie nasienia świeżego, jednak w przyszłości zastosowanie nasienia kriokonserwowanego pozwoli na przyspieszenie postępu hodowlanego i przyczyni się do wzrostu różnorodności genetycznej populacji pszczoły miodnej w Polsce. W artykule omówiono kluczowe rozwiązania biotechnologiczne i perspektywy badawcze polegające na wykorzystaniu kriogenicznie zabezpieczonego nasienia trutni w hodowli pszczoły miodnej.

Słowa kluczowe: nasienie trutni, sztuczna inseminacja, pszczoła miodna

Wstęp

Pszczoły miodne, zapylając ponad 80% roślin, zarówno uprawnych, jak i dziko rosnących, stanowią integralną część ekosystemu (Gül i in., 2017; Kucharczyk i in., 2017). Szacuje się, że 1/3 produktów spożywanych przez ludzi zależy w mniejszym lub większym stopniu od owadów zapylających rośliny (Zych i in., 2020). W ostatnich latach na całym świecie odnotowano jednak znaczne straty w rodzinach pszczelich (Kucharczyk i in., 2017; Ben Abdelkader i in., 2018). Wśród najważniejszych przyczyn tego niekorzystnego zjawiska jest występowanie chorób zakaźnych i przenoszonych przez ekto- i endopasożyty, bakterie, mykoplazmy, grzyby i wirusy, stosowanie nawozów i pestycydów w rolnictwie (Ciereszko i in., 2017; Ben Abdelkader i in., 2018; Fisher i in., 2018; Bugin i in., 2022; Smilga-Spalvina i in., 2023) oraz degradacja środowiska naturalnego, intensywne rolnictwo monokulturowe i wzrost powierzchni terenów zurbanizowanych (Gül i in., 2017; Kucharczyk i in., 2017; Fisher i in., 2018). Gwałtowny spadek liczby owadów zapylających coraz częściej związany jest z występowaniem syndromu masowego giniecia pszczół (ang. Colony Collapse Disorder, CCD), ma-

jącym miejsce gdy większość robotnic pozostawia pożywienie i matkę pszczelą z kilkoma robotnicami i odlatuje z ula (Smilga-Spalvina i in., 2023).

Działania na rzecz ochrony populacji pszczoły miodnej w Polsce w kontekście kolejnych lat powinny obejmować nie tylko utrzymanie, ale też zwiększanie obecnego poziomu jej liczebności oraz poprawę kondycji rodzin pszczelich i wartości użytkowej pszczół. Wprowadzanie do pasiek matek pszczelich o wysokiej wartości hodowlanej pozwala na utrwalanie w populacji pożądaných cech użytkowych, takich jak produktywność, łagodność, nierojliwość, zimotrwałość czy dostosowanie rozwoju rodzin pszczelich do warunków środowiska, w którym są utrzymywane. Dlatego wzrasta liczba pasiek realizujących programy hodowlane, których podstawowym narzędziem jest sztuczna inseminacja matek pszczelich. Jej znaczenie w hodowli pszczół jest szczególne i wynika z zachowania matek i trutni w okresie godowym, podczas którego samica kopuluje z kilkoma lub kilkunastoma samcami (Withrow i Tarpy, 2018; Tarpy i Page, 2000). W naturalnych warunkach około 10% ejakulatu każdego samca jest przenoszone do jajowodów matki pszczelej (Brutscher i in., 2019) i mieszane (Haberl i Tautz, 1998), dlatego dobór materiału ojcowskiego do kojarzeń jest niemożliwy. Jedynie zastosowanie sztucznej inseminacji umożliwi sterowanie doбором kojarzeń matek i trutni, co pozwala hodowcy decydować o jakości materiału genetycznego rodzin pszczelich (czystość rasowa czy kontrolowane mieszańce międzyliniowe i międzyrasowe) oraz o selekcji w kierunku istotnych cech użytkowych, które będą dziedziczone i przekazywane następnemu pokoleniu pszczół.

Sztuczna inseminacja u pszczoły miodnej została zainicjowana przez Lloyda Watsona w latach 30. XX wieku (Cobey, 2016). Kolejne badania trwające do chwili obecnej pozwoliły na dokładną identyfikację czynników wpływających zarówno negatywnie (infekcje, nieodpowiednia dawka nasienia, brak akceptacji matki przez rodzinę pszczelą) (Woyke, 1960; Woyke i Jasiński, 1982, 1990), jak i pozytywnie (jakość matki pszczelej, jej wiek w momencie inseminacji, inseminacja odpowiednią dawką nasienia, umieszczenie matki z robotnicami po inseminacji) (Woyke, 1960; Woyke i Jasiński, 1976) na skuteczność tej metody biotechnologicznej. W ostatnich latach badania koncentrują się na wykorzystaniu do zabiegów sztucznej inseminacji nasienia trutni nie tylko świeżego zaraz po pobraniu, ale również przechowywanego krótkoterminowo (Harbo, 1977; Collins, 2000; Özkök i Selcuk, 2020) i kriokonserwowanego (Harbo, 1979; Hopkins i Herr, 2010; Hopkins i in., 2012).

Kriokonserwacja nasienia trutni i jego wykorzystanie do inseminacji matek pszczelich

Kriokonserwacja nasienia trutni to jedyna metoda biotechnologiczna pozwalająca na długoterminowe przechowywanie materiału genetycznego samców pszczoły miodnej przez nieograniczony okres czasu i transport materiału biologicznego na duże odległości, a tym samym wykorzystanie zamrożonego nasienia do inseminacji matek pszczelich, zarówno w kraju, jak i za granicą. Ponadto kriogenicznie zabezpieczone nasienie samców pełni istotną rolę w zachowaniu pożądaných puli genetycznej populacji przed nieprzewidzianymi zagrożeniami, takimi jak epidemie chorób pszczół, zmiany klimatyczne czy inne czynniki środowiskowe, które mogą negatywnie wpływać na liczebność pszczół. Użycie do inseminacji mrożonego nasienia trutni umożliwia elastyczne zarządzanie hodowlą pszczół i niezależnienie się od sezonowej dostępności dobrej jakości nasienia od dojrzałych płciowo trutni. Efektywna technologia kriokonserwacji nasienia trutni pozwala na tworzenie banków materiału genetycznego, które w przyszłości mogą stać się kluczowym elementem strategii ochrony bioróżnorodności pszczół zwłaszcza małych populacji ras rodzimych w Polsce. Zabezpieczone w ciekłym azocie nasienie trutni umożliwia odbudowanie populacji pszczół o pożądaných cechach czy przeciwdziałanie stratom allelicznym spowodowanych przez pasożyty np.: *Varroa destructor*,

inwazje infekcji wirusowych (Topolska i in., 2008; Pohorecka i in., 2011) czy zespół masowego ginięcia pszczół. Wykorzystanie kriogenicznie zabezpieczonego nasienia od samców o dużej zmienności genetycznej do inseminacji może wpłynąć na wzrost żywotności rodzin pszczelich i zdolności adaptacyjnych pszczół oraz wyższą tolerancję na choroby determinowane genetycznie (Tarpy, 2003; Tarpy i Seeley, 2006; Mattila i Seeley, 2007). Z danych literaturowych wynika, że w populacji bardziej zróżnicowanej genetycznie częstotliwość występowania chorób i śmiertelność rodzin pszczelich jest niższa (Tarpy, 2003; Mattila i Seeley, 2007).

Po raz pierwszy do inseminacji wykorzystano kriokonserwowane nasienie trutni pod koniec lat 70. i na początku 80. XX wieku (Harbo, 1977, 1983; Kaftanoglu i Peng, 1984). Takie działanie pozwala na wydłużenie sezonu pszczelarskiego, racjonalne sterowanie rozrodem i dobór materiału matecznego i ojcowskiego, co znacząco wpływa na postęp hodowlany i zachowanie pożądaney różnorodności genetycznej bez efektu inbrodu w populacji (Pailliard i in., 2017). Wykorzystanie mrożonego nasienia trutni jest jednak ograniczone, ze względu na brak skutecznej i powtarzalnej metody kriogenicznego zabezpieczania materiału genetycznego oraz zadowalających wyników po inseminacji matek pszczelich tym nasieniem (Cobey, 2016, Smilga-Spalvina i in., 2023).

Głównymi wskaźnikami zdolności zapładniających nasienia trutni poddanych procedurze zamrażania-rozmrażania są odsetek i przeżywalność czerwu żeńskiego, który produkują zapłodnione matki pszczele oraz liczba plemników, które docierają do spermateki. W 1984 r. Kaftanoglu i Peng, wykorzystując nasienie trutni wstępnie wyselekcjonowane pod kątem wysokiej ruchliwości plemników po rozmrożeniu, uzyskali czerwiec na poziomie 56% i 290 000 plemników w spermatece, tymczasem Hopkins i in. (2012) uzyskali przeżywalność czerwu na poziomie 50%. Nadmienić należy, że badania te nie obejmowały selekcji jakości nasienia po kriokonserwacji.

Na kondycję fizyczną matek pszczelich i ich zdolności reprodukcyjne po inseminacji wpływają również procedury niezbędne do wykonywania samego zabiegu sztucznej inseminacji, takie jak: separacja matek od robotnic, narkoza dwutlenkiem węgla, zastosowanie rozcieńczalników mrożeniowych do nasienia trutni. Często matki pszczele inseminowane nasieniem zamrożonym-rozmrożonym mają obniżoną żywotność i w ciągu dwóch miesięcy od zabiegu następuje ich cicha wymiana. Jest to sygnał, że liczba plemników w spermatece była zbyt niska lub składniki rozcieńczalnika mrożeniowego szkodliwie wpłynęły na samice (Wegener i in., 2014).

W ciągu ostatnich lat nastąpił postęp w badaniach nad zwiększeniem skuteczności inseminacji matek pszczelich i jakości kriokonserwowanego nasienia trutni poprzez modyfikację składu rozcieńczalnika mrożeniowego i optymalizację technologii kriokonserwacji (Hopkins i in., 2012; Wegener i Bienefeld, 2012). Technologia kriokonserwacji nasienia składa się z kilku etapów: selekcja dojrzałych płciowo samców, pobieranie nasienia, badanie jakości nasienia, rozcieńczanie nasienia, dodawanie krioprotektantów, konfekcjonowanie, zamrażanie i ocena nasienia po rozmrożeniu (Smilga-Spalvina i in., 2023). Szukanie nowych rozwiązań technologicznych pozwala na ograniczenie uszkodzeń kriogenicznych plemników wywołanych obniżoną temperaturą, szokiem termicznym i tworzeniem się wewnątrzkomórkowych kryształków lodu (Pegg, 2002). W przypadku plemników trutnia kontrolowane powolne tempo chłodzenia do około 4–5°C jest warunkiem wstępnym uzyskania odpowiedniej jakości nasienia po rozmrożeniu (Taylor i in., 2009; Hopkins i Herr, 2010). Pierwsze próby kriokonserwacji plemników trutni poprzez powolne chłodzenie nasienia z szybkością 3–4°C/min wykazały pozytywny wpływ na ruchliwość plemników po rozmrożeniu, a matki inseminowane takim nasieniem czerwiły na poziomie 50% (Harbo, 1979; Hopkins i Herr, 2010). Z dostępnych materiałów wynika, że w skutecznej technologii kriokonserwacji po wstępnym schładzaniu nasienia następuje jego konfekcjonowanie w słómkach 0,25 ml lub

kapilarach o objętości 22 μl , a następnie stopniowe schładzanie z prędkością nieprzekraczającą $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do temperatury -120°C , a następnie zanurzenie porcji nasienia w ciekłym azocie w -196°C (Harbo, 1983; Alcay i in., 2019). Z kolei rozmrażanie nasienia trutni powinno odbywać się w zakresie temperatur od 25 do 40°C z szybkością od kilku sekund do jednej minuty (Wegener i Bienefeld, 2012).

Związki osłaniające i substancje antyoksydacyjne jako składnik rozcieńczalnika mrożeniowego

Skutkiem procesu kriokonserwacji nasienia jest występowanie funkcjonalno-strukturalnych uszkodzeń plemników objawiających się w postaci obniżonej ruchliwości, zaburzenia integralności błon plazmatycznych, integralności błony akrosomowej, zwiększonego odsetka uszkodzeń chromatyny plemnikowej, spadku potencjału mitochondrialnego (Pegg, 2002; Alcay i in., 2022). Podczas procesu zamrażania-rozmrażania powstają reaktywne formy tlenu (ang. Reactive Oxidative Species, ROS) w wyniku peroksydacji lipidów w błonie cytoplazmatycznej, a powstające wolne rodniki wpływają negatywnie na parametry ruchliwości plemników po rozmrożeniu, co prowadzi do obniżenia efektywności sztucznej inseminacji.

W celu ochrony plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi wywołanymi procesem kriokonserwacji stosuje się dodatek do rozcieńczalnika substancji osłaniających błony plazmatyczne. Do chwili obecnej na plemnikach trutni testowano działanie dimetylosulfotlenku (DMSO), glicerolu, dimetyloformamidu, 1,3-propanodiolu, 2,3-butanodiolu i glikolu etylenowego (Hopkins i Herr, 2010; Wegener i Bienefeld, 2012; Wegener i in., 2014; Alcay i in., 2022). Glicerol, powszechnie stosowany jako dodatek do rozcieńczalnika mrożeniowego nasienia większości zwierząt gospodarskich, nie znalazł zastosowania w odniesieniu do plemników trutni pszczoły miodnej. Badania przeprowadzone przez Harbo (1979) wykazały, że glicerol uszkadza błony komórkowe plemników trutni podczas procesu kriokonserwacji. DMSO wykazuje natomiast silne działanie krioprotekcyjne (Taylor i in., 2009), a jego dodanie do rozcieńczalnika do zamrażania w stężeniu 10% pozwala na uzyskanie wysokiego odsetka ruchliwych plemników trutni (Hopkins i Herr, 2010). Stucky i in. (2008) wykazali, że dodatek DMSO do kriokonserwacji umożliwia uzyskanie po rozmrożeniu ponad 50% odsetka plemników żywych. Ponadto DMSO nie wpływa negatywnie na odsetek plemników docierających do spermateki matki po inseminacji. Hopkins i Herr (2010) zaobserwowali również, że 15% stężenie DMSO obniża żywotność plemników po rozmrożeniu. Wykonywanie zabiegu sztucznej inseminacji kriokonserwowanym nasieniem z rozcieńczalnikiem zawierającym DMSO może wpływać toksycznie na matki pszczele (Wegener i Bienefeld, 2012; Smilga-Spalvina i in., 2023). W niektórych badaniach do przeciwdziałania uszkodzeniom kriogenicznym oprócz krioprotektanta stosowano żółtko jaja kurzego. Hopkins i in. (2012) wykazali, że ruchliwość plemników kriokonserwowanych w rozcieńczalniku bez jaja kurzego była niższa, a matki pszczele zapłodnione takim nasieniem produkowały tylko trutnie. Gdy nasienie trutni było kriokonserwowane przy użyciu rozcieńczalnika zawierającego zarówno żółtko jaja kurzego, jak i 10% DMSO, po rozmrożeniu uzyskiwano odsetek plemników ruchliwych na poziomie 90% (Hopkins i Herr, 2010). Stosowanie tego dodatku do rozcieńczalnika mrożeniowego ze względu na pochodzenie i niejednorodny skład może jednak przyczyniać się do zanieczyszczenia nasienia, zmniejszenia powtarzalności technologii kriokonserwacji i wzrostu ryzyka obniżonej płodności matek pszczelich poprzez możliwość wystąpienia niedrożności jajowodów i infekcji (Hopkins i in., 2012).

W ostatnich latach prowadzone są intensywne prace nad modyfikacją składu rozcieńczenia w oparciu o dodatek substancji o działaniu antyoksydacyjnym i osłaniającym błony plazmatyczne plemników. Dodatek takich związków zmniejsza negatywne skutki wywoływane przez ROS, co przyczynia się do zwiększenia skuteczności kriokonserwacji i jakości na-

sienia po rozmrożeniu. W dostępnych materiałach źródłowych przedstawiono wyniki dotyczące wpływu dodatku katalazy na jakość nasienia trutni po rozmrożeniu, wykazując wyższy odsetek plemników z integralną błoną komórkową po dodatku antyoksydantu do rozcieńczalnika mroźniowego w stężeniu 1.59 mM/L (Taylor i in., 2009). Z kolei badania, które przeprowadzili Alcaay i in. (2021), wykazały, że niezależnie od zastosowanego stężenia dodatek katalazy nie wpływa znacząco na poziom ruchliwości plemników po rozmrożeniu, podczas gdy suplementacja rozcieńczalnika mroźniowego 5 mM L-karnityną pozwala na uzyskanie zarówno wyższego odsetka plemników ruchliwych jak i wyższego odsetka plemników z zachowaną integralnością błon plazmatycznych oraz wysokim potencjałem mitochondrialnym. Inne stosowane związki w kontekście nasienia trutni obejmują (1) trehalozę, która minimalizuje uszkodzenia kriogeniczne podczas procesu zamrażania-rozmrażania poprzez zwiększenie osmolarności rozcieńczalnika (Nur i in., 2020) oraz (2) mleczko pszczele, które pełni ochronną rolę w utrzymaniu stabilności błon plazmatycznych plemników (Alcaay i in., 2019a). Badania przeprowadzone przez Nur i in. (2020) wykazały, że uzupełnienie rozcieńczalnika mroźniowego o trehalozę o stężeniach 0,1 lub 0,05 M oraz 12% DMSO pozwoliło uzyskać po rozmrożeniu wyższy odsetek plemników ruchliwych o wysokiej integralności błon plemnikowych w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym bez dodatku antyoksydanta. Jednocześnie badania przeprowadzone przez Alcaay i in. (2019a) wykazały korzystny wpływ dodatku 1% mleczka pszczelego do rozcieńczalnika na parametry jakościowe plemników trutnia, takie jak ruchliwość, integralność błon plazmatycznych i błon akrosomowych po rozmrożeniu. Z kolei badania, w których testowano rozcieńczalniki uzupełnione o albuminę surowicy bydlęcej (BSA) (Alcaay i in., 2019b) i lecytynę sojową (Dadkhah i in., 2016) wykazały, że taka suplementacja zwiększa odsetek plemników ruchliwych do 50% a także poprawia parametry strukturalno-funkcjonalne takie jak: integralność błon plazmatycznych oraz akrosomowych po rozmrożeniu w porównaniu z rozcieńczalnikami bez tych dodatków.

Porównując najnowsze wyniki badań (Taylor i in., 2009; Dadkhah i in., 2016; Alcaay i in., 2019a,b; Nur i in., 2020; Alcaay i in., 2021) warto podkreślić, że najwyższe parametry jakościowe (związane z oceną ruchliwości plemników po rozmrożeniu) zostały odnotowane zarówno w przypadku kriokonserwacji plemników trutni w rozcieńczalnikach uzupełnionych L-karnityną (Alcaay i in., 2021), jak i trehalozą (Nur i in., 2020).

Ocena jakości nasienia trutni

Jednym z czynników ograniczających skuteczną reprodukcję pszczoły miodnej jest jakość nasienia trutni. Biorąc pod uwagę fakt, że królowa matka po sztucznej inseminacji przechowuje plemniki w spermatece przez kilka lat, badanie jakości nasienia wykorzystywanego do tej procedury biotechnologicznej jest szczególnie istotne, ponieważ determinuje sukces reprodukcyjny matki pszczelej, a w konsekwencji przetrwanie rodziny i jej wysoki poziom produktywności (Pettis i in., 2016). Czynniki wpływające na jakość nasienia trutni to przede wszystkim wiek trutni (Rhodes i in., 2011; Stürup i in., 2013; Rousseau i in., 2015), wielkość ciała samca (Schluns i in., 2003), rodzaj linii hodowlanej (Rhodes i in., 2011; Rousseau i in., 2015), temperatura otoczenia (Stürup i in., 2013; Czekańska i in., 2013), rodzaj pożywienia (Stürup i in., 2013), choroby pszczele (Collins i Pettis, 2001), środki owadobójcze (Ciereszko i in., 2017) zastosowana technologia konserwacji (Taylor i in., 2009; Hopkins i Herr, 2010; Wegener i in., 2012; Hopkins i in., 2017).

Badania jakości nasienia trutni koncentrują się głównie na identyfikacji kilku parametrów, takich jak objętość nasienia, koncentracja plemników i/lub żywotność plemników oraz ich morfologia (Wegener i in., 2012). Objętość nasienia, którą można pobrać od pojedynczego trutnia, waha się w zakresie 0,4–2,4 μL . Z kolei koncentracja plemników w nasieniu trutnia wynosi zazwyczaj od 2 do 9 milionów plemników w 1 μL , a jej ocenę przeprowadza się przy

użyciu hemocytometru (Collins i Pettis, 2001; Rousseau i in., 2015) lub spektrofotometru (Ciereszko i in., 2017). Uzyskane wyniki oceny koncentracji nasienia cechuje jednak duża zmienność z powodu trudności w uzyskaniu jednorodnego, powtarzalnego rozcieńczenia plemników w badanej próbce i w komorze obserwacyjnej (Collins, 2000; Koeniger i in., 2005).

Ocena morfologii plemników trutni wykazała nieliczny odsetek plemników z wadami morfologicznymi. Wśród obserwowanych wad można wymienić nieprawidłowe formy zwinętej, postrzępionej czy podwójnie zakończonej witki plemników (Lodesani i in., 2004). Jedynie w nasieniu poddawanych procedurze zamrażania-rozmrażania odsetek wad morfologicznych może wzrastać, ale dotyczy on głównie rejonu główki plemników martwych (Paynter i in., 2014).

Podstawowym parametrem określającym jakości nasienia u zwierząt gospodarskich jest ruchliwość. W przypadku pszczoły miodnej ten parametr jakościowy jest oceniany sporadycznie (Yaniz i in., 2019), pomimo że badania przeprowadzone przez Hopkinsa i in., (2017) wykazały, że odsetek plemników ruchliwych jest pozytywnie skorelowany z efektywnością zabiegu sztucznej inseminacji matek pszczelich. Większość metod oceny tego parametru u pszczoły miodnej opiera się na subiektywnej 4–6-stopniowej skali, zgodnej z odsetkiem ruchliwych plemników (Taylor i in., 2009; Nur i in., 2012; Dadkhah i in., 2016) lub też na podstawie odsetka plemników poruszających się określonym rodzajem ruchu (Wegener i in., 2012; Wegener i in., 2014; Ciereszko i in., 2017; Yaniz i in., 2019). Najistotniejszym wskaźnikiem wysokiej jakości nasienia trutni jest odsetek plemników ruchliwych poruszających się ruchem okrężnym (Wegener i in., 2012; Ciereszko i in., 2017).

Kolejnym parametrem plemników jest ich żywotność oceniana na podstawie integralności błon plazmatycznych i akrosomalnych. Metody oceny opierają się na zastosowaniu barwników fluorescencyjnych takich jak jodek propidyny (PI), SYBR-14, Hoechst 33342 lub oranżu akrydyny (Dadkhah i in., 2016; Alcay i in., 2015) lub poprzez zastosowanie testu pęcznienia hipoosmotycznego (HOST) (Nur i in., 2012; Alcay i in., 2019). Do oceny integralności akrosomu stosowano z kolei barwienie lektyną *Pisum sativum* agglutinin (PSA), a badania przeprowadzono na utrwalonych plemnikach, przy czym akrosomy o intensywnej fluorescencji uznawano za prawidłowe, natomiast te o słabszej lub niejednolitej fluorescencji za uszkodzone (Alcay i in., 2019a).

Nieliczne doniesienia wskazują na możliwość zastosowania obiektywnych metod oceny ruchliwości i parametrów kinetycznych nasienia trutni poprzez zastosowanie komputerowej analizy systemem CASA (Murray i in., 2022; Divasón i in., 2024), a także innych parametrów jakościowych takich jak integralność błon komórkowych i akrosomowych, stopień fragmentacji DNA, potencjał mitochondrialny czy zmiany apoptotyczne z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (Peng i in., 2014; Paynter i in., 2014). Pomimo prowadzonych badań w tym zakresie wiedza na temat oceny wyżej wymienionych parametrów jakościowych tego gatunku jest nadal znacznie ograniczona w porównaniu do innych gatunków zwierząt gospodarskich. Specyficzna budowa morfologiczna i rodzaj ruchu plemników trutni wymuszają opracowanie spersonalizowanych protokołów pozwalających na zdefiniowanie parametrów strukturalno-funkcjonalnych dla tego gatunku i uzyskanie wiarygodnych, powtarzalnych wyników oceny.

Podsumowanie i perspektywy badawcze

Opracowanie optymalnych procedur zabezpieczania materiału biologicznego ma szczególne znaczenie w aspekcie ochrony *in situ* zasobów genetycznych ras rodzimych w Polsce. Obecny program obejmuje monitoring i ochronę pszczoł miodnych w ich naturalnych enklawach, w których dotychczas przebywały, ze względu na swoją odrębność genetyczną i unikalne ce-

chy przystosowania do naturalnych warunków klimatycznych i pokarmowych (Leclerck i in., 2023; Fine i in., 2023). Utrzymywanie małych populacji pszczoł miodnych przy użyciu wyłącznie sztucznej inseminacji zmusza jednak do konieczności krzyżowania z innymi liniami pszczoł (Gül i in., 2017). Opracowanie skutecznej, powtarzalnej metody kriokonserwacji nasienia trutni i spełnienie warunków do jej praktycznego zastosowania pozwoli na stworzenie kolekcji nasienia jako unikalnej puli rezerwy genetycznej *ex situ* populacji pszczoły miodnej (Rajamohan i in., 2020; Gül i in., 2022; Oleksa i in., 2023). Ponadto skuteczna technologia kriokonserwacji pozwoli na zachowanie wysokiej jakości nasienia po procedurze zamrażania/rozmrężania i przyczyni się do zastosowania kontrolowanego komponentu ojcowskiego do sztucznej inseminacji matek pszczelich, co umożliwi hodowcom uzyskiwanie córek pszczelich o pożądanym genotypie (Paillard i in., 2017).

W Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ-PIB w roku 2024 w ramach realizacji zadania o numerze 04-19-15-11 rozpoczęto badania nad opracowaniem zarówno składu rozcieńczalnika mrozeniowego, jak i technologii kriokonserwacji, pozwalającej na efektywne kriogeniczne zabezpieczenie nasienia trutni. Ponadto w ramach podjętej tematyki badawczej zostaną przygotowane spersonalizowane protokoły do automatycznego pomiaru jakości nasienia trutni pszczoły miodnej po procedurze zamrażania-rozmrężania z wykorzystaniem komputerowo wspomaganą analizy nasienia (CASA) oraz cytometrii przepływowej. Działania te pozwolą na zdefiniowanie podstawowych parametrów jakości plemników m.in. rodzaju i charakterystyki ruchu plemników, koncentracji ejakulatu, parametrów kinetycznych ruchu, odsetka ruchliwych plemników w badanej próbie, zmian morfologicznych i morfometrycznych a także określenie parametrów strukturalnych obejmujących ocenę żywotności, integralności błon plazmatycznych, poziomu transbłonowego potencjału mitochondrialnego oraz stopnia fragmentacji chromatyny plemnikowej.

Obiektywna ocena jakości kriokonserwowanego nasienia trutni pszczoły miodnej na podstawie szerokiego panelu parametrów strukturalno-funkcjonalnych pozwoli na określenie jego zdolności zapładniających i przydatności do sztucznej inseminacji.

Piśmiennictwo

- Alcay S., Ustuner B., Cakmak I., Cakmak S., Nur Z. (2015). Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 21:31–35.
- Alcay S., Cakmak S., Cakmak I., Mulkpınar E., Gokce E., Ustuner B., Sen H., Nur Z. (2019a). Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, 87: 28–31.
- Alcay S., Cakmak S., Cakmak I., Mulkpınar E., Toker M.B., Ustuner B., Sen H., Nur Z. (2019b). Drone semen cryopreservation with protein supplemented TL-Hepes based extender. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 25: 553–557.
- Alcay S., Cakmak S., Cakmak I., Aktar A., Yilmaz M., Ustuner B., Akkasoglu M., Taskiran S., Ayaz E., Sagirkaya H., Nur Z. (2021). L-carnitine supplemented extenders improve post-thawing quality of honey bee drone (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 27: 489–493.
- Alcay S., Cakmak S., Cakmak I., Aktar A., Ustuner B., Yilmaz M., Ozkan M.D.H., Akkaya Y., Sagirkaya H., Nur Z. (2022). Honey bee drone (*Apis mellifera*) sperm cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented extenders. *J. Hell. Vet. Med. Soc.*, 4: 527–534.
- Ben Abdelkader F., Kairo G., Tchamitchian S., Bonnet M., Cousin M., Barbouche N., Belzunces L., Brunet J. (2018). Effects of clothianidin exposure on semen parameters of honey bee drones. *J. New Sci.*, 59: 3791–3798.

- Brutscher L.M., Baer B., Nino E.L. (2019). Putative drone copulation factors regulating honey bee (*Apis mellifera*) queen reproduction and health: A review. *Insects*, 10:8.
- Bugin G., Lenzi L., Ranzani G., Barisan L., Porrini C., Zanella A., Bolzonella C. (2022). Agriculture and pollinating insects, no longer a choice but a need: EU agriculture's dependence on pollinators in the 2007–2019 period. *Sustainability*, 14: 3644.
- Ciereszko A., Wilde J., Dietrich G.J., Siuda M., Bak B., Judycka S., Karol H. (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48: 211–222.
- Cobey S.W. (2016). An introduction to instrumental insemination of honey bee queens. *Bee World*, 93: 33–36.
- Collins A.M. (2000). Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above-freezing temperatures. *J. Econ. Entomol.*, 93: 568–571.
- Collins A.M., Pettis J.S. (2001). Effect of varroa infestation on semen quality. *Am. Bee J.*, 141: 590–593.
- Czekonska K., Chuda-Mickiewicz B., Chorbinski P. (2013). The effect of brood incubation temperature on the reproductive value of honey bee (*Apis mellifera*) drones. *J. Apic. Res.*, 52: 96–105.
- Dadkhah F., Nehzati-Paghaleh G., Zhandi M., Emamverdi M., Hopkins B.K. (2016). Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *J. Apic. Res.*, 55: 279–283.
- Divasón J., Romero A., Silvestre M. A., Santolaria P., Yániz J. L. (2024). *In vitro* maintenance of drones and development of a new software for sperm quality analysis facilitate the study of honey bee reproductive quality. *J. Apic. Res.*, 63: 1088–1095.
- Fine J.D., Foster L.J., McAfee A. (2023). Indirect exposure to insect growth disruptors affects honey bee (*Apis mellifera*) reproductive behaviors and ovarian protein expression. *PLoS One*, 18: e0292176.
- Fisher A., Rangel J. (2018). Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. *PLoS One*, 13: e0208630.
- Gül A., Şahinler N., Onal A.G., Hopkins B.K., Sheppard W.S. (2017). Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, 101: 109–113.
- Gül A., Yildiz C., Coşkun Çetin, N., Yalçın O.K. (2022). Effect of ascorbic acid and proline amino acid supplementations on cryosurvival and fertility rates of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera*) semen. *Biopreserv. Biobank.*, 20: 551–556.
- Haberl M., Tautz D. (1998). Sperm usage in honey bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 42: 247–255.
- Harbo J. (1977). Survival of honey bee spermatozoa in liquid nitrogen. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 70: 257–258.
- Harbo J.R. (1979). Storage of honeybee spermatozoa at -196°C . *J. Apic. Res.*, 18: 57–63.
- Harbo J. (1983). Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after 2 years in liquid nitrogen (-196°C). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 76: 890–891.
- Hopkins B.K., Herr C. (2010). Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie* 41: 548–556.
- Hopkins B.K., Herr C., Sheppard W.S. (2012). Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 24: 1079–1083.
- Hopkins B.K., Cobey S.W., Herr C., Sheppard W.S. (2017). Gel-coated tubes extend above-freezing storage of honey bee (*Apis mellifera*) semen to 439 days with production of fertilised offspring. *Reprod. Fertil. Dev.*, 29: 1944–1949.
- Kaftanoglu O., Peng Y.C. (1984). Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen. *J. Apic. Res.*, 23: 157–163.

- Koeniger G., Koeniger N., Tingek S., Phiancharoen M. (2005). Variance in spermatozoa number among *Apis dorsata* drones and among *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, 36: 279–284.
- Kucharczyk M., Krzywonos M., Błaszczyk J., Seruga P., Piekara A., Zimny S., Borowiak D. (2017). Problemy pszczelarstwa w Polsce. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*, 494: 123–131.
- Leclercq N., Marshall L., Weekers T., Basu P., Benda, D., Bevk, D., Bhattacharya R. et al. (2023). Global taxonomic, functional, and phylogenetic diversity of bees in apple orchards. *Sci. Total Environ.*, 901: 165933.
- Lodesani M., Balduzzi D., Galli A. (2004). Functional characterisation of semen in honeybee queen (*Amligustica* S.) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination. *Ital. J. Anim. Sci.*, 3: 385–392.
- Mattila H.R., Seeley T.D. (2007). Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science*, 317: 362–364.
- Murray J.F., van der Horst G., Allsopp M., Kotzé R.C.M. (2022). A new fluorescent method to determine honey bee sperm motility parameters with computer-aided sperm analysis. *J. Apic. Res.*, 62: 944–952.
- Nur Z., Seven-Cakmak S., Ustuner B., Cakmak I., Erturk M., Abramson C.I., Sagirkaya H., Soylu M.K. (2012). The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43: 31–38.
- Nur Z., Cakmak S.S., Cakmak I., Onder N.T., Gokce E., Ustuner B., Alcay S., Toker M.B., Soylu M.K. (2020). Effects of trehalose supplementation on postthaw sperm quality of honey bee drones. *J. Anim. Feed Sci.*, 10: 191–196.
- Oleksa A., Căuia E., Siceanu A., Puškadija Z., Kovačić M., Pinto M.A., Rodrigues P.J., Hatjina F., Charistos L., Bouga M., Prešern J., Kandemir İ., Rašić S., Kusza S., Tofilski A. (2023). Honey bee (*Apis mellifera*) wing images: a tool for identification and conservation. *Gigascience*, 12: giad019.
- Özkök A.O., Selcuk M. (2020). Sperm storage and artificial insemination in honey bees. *IJSL*, 2: 12–25.
- Paillard M., Rousseau A., Giovenazzo P., Bailey J.L. (2017). Preservation of domesticated honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *J. Econ. Entomol.*, 110: 1412–1418.
- Paynter E., Baer-Imhoof B., Linden M., Lee-Pullen T., Heel K., Rigby P., Baer B. (2014). Flow cytometry as a rapid and reliable method to quantify sperm viability in the honeybee *Apis mellifera*. *Cytometry*, 85: 463–472.
- Pegg D.E. (2002). The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.*, 20: 5–13.
- Peng Y., Lee-Pullen T.F., Heel K., Millar A.H., Baer B. (2014). Quantifying spore viability of the honey bee pathogen *Nosema apis* using flow cytometry. *Cytometry*, 85: 454–462.
- Pettis J.S., Rice N., Joselow K., van Engelsdorp D., Chaimanee V. (2006). Colony failure linked to low sperm viability in honey bee (*Apis mellifera*) queens and an exploration of potential causative factors. *PLoS ONE*, 11: e0147220.
- Pohorecka K., Bober A., Skubida M., Zdańska D. (2011). Epizootic status of apiaries with massive losses of bee colonies (2008-2009). *J. Apic. Sci.*, 55: 137–150.
- Rajamohan A., Danka R.G., Hopkins B.K., Rinehart J.P. (2020). A non-activating diluent to prolong *in vitro* viability of *Apis mellifera* spermatozoa: Effects on cryopreservation and on egg fertilization. *Cryobiology*, 92: 124–129.
- Rhodes J.W., Harden, S., Spooner-Hart R., Anderson D.L., When G. (2011). Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, 42: 29–38.

- Rousseau A., Fournier V., Giovenazzo P. (2015). *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *Can. Entomol.*, 147: 702–711.
- Schluns H., Schluns E.A., van Praagh J., Moritz R.F.A. (2003). Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*, 34: 577–584.
- Smilga-Spalvina A., Spalvins K., Veidenbergs I. (2023). Review of sustainable cryopreservation and above-freezing storage solutions of European honey bee (*Apis mellifera*) drone semen. *Environmental and Climate Technologies*, 27: 177–194.
- Stucky M., Hopkins B.K., Herr C. (2008). Cryopreservation of honey bee spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20: 127–128.
- Stürup M., Baer-Imhoof B., Nash D.R., Boomsma J.J., Baer B. (2013). When every sperm counts: Factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behav. Ecol.*, 24: 1192–1198.
- Tarpy D.R. (2003). Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. Biol. Sci.*, 270: 99–103.
- Tarpy D.R., Page R.E. (2000). No behavioural control over mating frequency in queen honey bees (*Apis mellifera* L.): implications for the evolution of extreme polyandry. *Am. Nat.*, 155: 820–827.
- Tarpy D.R., Seeley T.D. (2006). Lower disease infections in honeybee (*Apis mellifera*) colonies headed by polyandrous vs monandrous queens. *Naturwissenschaften*, 93: 195–199.
- Taylor M., Guzman-Novoa E., Morfin N., Burh, M. (2009). Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72: 149–159.
- Topolska G., Gajda A., Hartwig A. (2008). Polish honey bee colony-loss during the winter of 2007/2008. *J. Apic. Sci.*, 52: 95–104.
- Wegener J., Bienefeld K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77: 600–607.
- Wegener J., May T., Knollmann U., Kamp G., Muller K., Bienefeld K. (2012). *In vivo* validation of *in vitro* quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology*, 65: 126–131.
- Wegener J., May T., Kamp G., Bienefeld K. (2014). A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, 69: 236–242.
- Withrow J.M., Tarpy D.R. (2018). Cryptic “royal” subfamilies in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *PLoS One*, 13: e0199124.
- Woyke J. (1960). Naturalne i sztuczne unasiennianie matek pszczelich. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 4: 183–275.
- Woyke J., Jasiński Z. (1976). The influence of age on the results of instrumental insemination of honeybee queens. *Apidologie*, 7: 301–306.
- Woyke J., Jasiński Z. (1982). Influence of the number of attendant workers on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated queens kept outdoors in mating nuclei. *J. Apic. Res.*, 21: 129–133.
- Woyke J., Jasiński Z. (1990). Effect of the number of attendant worker bees on the initiation of egg laying by instrumentally inseminated queens kept in small nuclei. *J. Apic. Res.*, 29: 101–106.
- Yaniz J., Palacin I., Santolaria P. (2019). Effect of chamber characteristics, incubation, and diluent on motility of honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm. *Apidologie*, 50: 472–481.
- Zych M., Denisow B., Gajda A., Kiljanek T., Kramarz P., Szentgyörgyi H. (2020). *Narodowa Strategia Ochrony Owadów Zapyłających*. Fundacja Greenpeace. Warszawa.

**CRYOGENIC PRESERVATION OF SEMEN OF HONEYBEE DRONES
APIS MELLIFERA – BIOTECHNOLOGICAL SOLUTIONS AND RESEARCH
PERSPECTIVES**

Magdalena Bryła, Monika Trzcńska

SUMMARY

In the breeding of the honeybee *Apis mellifera* in Poland, interest in the use of artificial insemination of bee queens in reproduction is gradually increasing. In the selection and selection of maternal and paternal material for mating, account is taken of the results of the evaluation of functional traits, such as productivity, gentleness or no tendency for swarming, as well as winter hardiness and adaptation of the development of bee colonies to the environmental conditions in which they are kept. From year to year there is a growing demand for high-quality bee queens, whose reproductive and productive qualities increase the number and improve the condition of bee colonies. The development of artificial insemination technology is mainly based on the use of fresh semen, but in the future, it is the use of cryopreserved semen that will accelerate breeding progress and contribute to the increase in genetic diversity of the honeybee population in Poland. The article discusses key biotechnological solutions and research prospects involving the use of cryogenically preserved semen of drones in honeybee breeding.

Keywords: drone semen, artificial insemination, cryopreservation, protective compounds, antioxidants