

ЛЕКЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Направление: Пчеловодство

Тема семинара: «Инструментальное осеменение при формировании селекционных программ в пчеловодстве»

Место проведения: г. Алматы ТОО «КазНИИЖиК»

Дата проведения: 16 ноября 2023 года, 12.30 ч

Эксперт: Красон Андрей Владимирович специалист отдела пчеловодства ТОО «КазНИИЖиК»

1. Организация лаборатории инструментального осеменения с отдельным устройством для отбора спермы трутней

Для лаборатории необходимо двух зонное разделение лаборатории так называемая грязная зона для работы с трутнем и чистая для работы с маткой, разделение зон должно осуществляться с помощью либо ширмы, либо жесткой стенки.

Рабочий стол должен иметь гладкое покрытие. Освещение должно быть установлено на некотором расстоянии от рабочего стола во избежание концентрации пчел (случайно залетевших в помещение) вокруг осветительных приборов, так как испражнения пчел могут случайно попасть в зону проводимых операций. Помещение для лаборатории должно максимально изолированным (исключить проникновение пыли, плотная дверь, внутренняя обшивка должны быть герметичны).

Необходимое оборудование и инвентарь для лаборатории:

- аппарат для осеменения пчелиных маток
- микроскоп стереоскопический
- осветитель
- устройство для отбора спермы трутней
- баллон высокого давления с газом СО₂ оснащенный редуктором с расходомером
- стол с гладким покрытием
- регулирующиеся стулья со спинками
- ультразвуковая виброванна для очистки элементов аппаратуры
- садок для хранения трутней
- стандартные осеменительные шприцы (для отбора спермы)
- полотенце, марля
- спирт-ректификат 96° для дезинфекции
- шприцы одноразовые для работы с физраствором (10-20мл)
- белый халат
- бумажные полотенца
- ватные палочки гигиенические
- стерильный медицинский физиологический раствор для заполнения шприца
- СВЧ – печь бытовая со стерилизатором детской посуды

Сборка и работа с осеменительным шприцом. В составные части шприца входит:

- а) муфта с поршнем, винтовым толкателем и маховиком;
- б) цилиндр;

- в) силиконовая трубка;
- г) капиллярная игла;
- д) наконечник;
- е) силиконовый уплотнитель в готовом виде;
- ж) трубка порпуса шприца;

Перед работой со шприцем необходима его обязательная стерилизация и промывка большим количеством физраствора с последующей сборкой. Стерилизация шприца проводится в 2 этапа:

1. Стерилизация всех компонентов шприца в детском стерилизаторе в СВЧ
2. Стерилизация всех компонентов шприца в ультразвуковой ванне заполненной 96°спиртом. (Данная процедура необходима для удаления микрзагрязнений с рабочей поверхности.)

После проведения стерилизации приступаем к сборке шприца: в трубку вставляют цилиндр, затем на трубку накручивают муфту, аккуратно вводя поршень в цилиндр, при этом глубина введения поршня должна быть небольшой при этом винтовой толкатель частично выкручивают удерживая муфту и вращая маховик против часовой стрелки, чтобы не более ¼ части длины винтового толкателя находилась внутри собранного шприца. После чего в цилиндр через узкую часть с помощью обыкновенного медицинского шприца с иглой заливают физраствор. Заполнять цилиндр физраствором необходимо медленно, не допуская пузырьков воздуха внутри цилиндра. Перед накручиванием наконечника цилиндр необходимо заполнить на 100%. Затем на капиллярную иглу осторожно надевают силиконовый уплотнитель. После сборки кончик капиллярной иглы проверяют под микроскопом при увеличении 20-40 крат на предмет сколов и повреждений.

Проведение и организация работ по отбору спермы трутней

Для инструментального осеменения используют половозрелых трутней известного происхождения (выводят непосредственно на племенной пасеке). Для поставленной цели готовят специальные отцовские пчелиные семьи. Выделяют такие семьи из числа наиболее продуктивных, устойчивых к низким температурам, здоровых и типичных для размножаемой породы пчел. В крепких семьях всегда имеется достаточное количество пчел-кормилиц, способных выращивать трутней. Поэтому отцовские семьи готовят к выращиванию трутневых личинок осенью. С этой целью выбирают достаточно сильные пчелиные семьи и обеспечивают за ними хороший уход. Лучше всего перевезти такие семьи в среду, поддерживающую активный медосбор. Если нет такой возможности, то семьи необходимо обеспечивать медово-пыльцевой подкормкой. При формировании гнезд к зиме в середину гнезда ставят комбинированные соты, в которых вместе с пчелиными ячейками имеются и трутневые. В подобные соты матки весной охотнее откладывают яйца. Создаются условия для оптимальной зимовки отцовских семей. Для ускорения выращивания трутневого расплода, отцовские семьи выставляют из зимовника для очистительного облета на две недели раньше срока. С аналогичной целью отцовские семьи подготавливают к зимовке с матками-трутовками. Подобные семьи выходят из зимовки уже с молодыми трутнями в гнезде. Для того чтобы получить матку-трутовку, от племенной матки выводят дочерей, которых трехкратно с суточным интервалом в течение 10 мин. обрабатывают углекислым газом. Обработанную матку выдерживают в специальной клеточке около 5-10 суток, а затем подсаживают в сильную, заранее

подготовленную пчелосемью. Семье с маткой-трутовкой весной обязательно периодически ставят рамки со зрелым печатным расплодом от других семей. Когда у трутней происходит накопление и созревание сперматозоидов то белковый корм они получают только в течение первых трех дней жизни. Отмечено, что в течение одного часа пчелы дают корм только что вышедшему из ячейки трутню от 22 до 33 раз. Только на пятые сутки жизни трутни могут самостоятельно брать корм из ячеек. В отцовских семьях трутни должны присутствовать в течение всего матковыводного периода. Нередко пчелы начинают выгонять трутней среди лета при временном прекращении медосбора. В этом случае отцовские семьи начинают подкармливать или же наоборот отбирают у них матку. Безматочные семьи не избавляются от трутней, наоборот они кормят трутней дольше и лучше, чем другие семьи. Хороший трутневый расплод иногда очень трудно получить от молодых плодных маток, а также вырастить трутней в семьях с инбредными матками. Рассмотрен оптимальный метод получения трутней в любые сроки сезона: Матку заключают на трутневом соте в специальном рамочном изоляторе из разделительной решетки. Изолятор с маткой ставят между рамками с расплодом. Через трое суток соты с яйцами вынимают из изолятора и ставят в гнездо, а матке ставят новый сот в изолятор.

Для получения полноценных половозрелых трутней требуется до 40 суток от откладки яиц маткой: 24 суток до выхода из ячейки и 12 – 16 суток до наступления половой зрелости. Трутень пригоден для забора спермы с 15 по 24 сутки.

Необходимо содержать отцовские семьи на небольшом расстоянии от лаборатории, что делает их доступными для работы в любое время. К настоящему времени разработано несколько способов содержания племенных трутней в период работы по инструментальному осеменению пчелиных маток, лучшим из которых, по общему мнению, является метод, при котором трутни имеют беспрепятственный вылет из улья. При использовании данного метода необходимо обязательное мечение трутней. За два дня до выхода трутней из ячеек сот помещают в рамочный изолятор из разделительной решетки и ставят его между рамками с расплодом. Можно изолятор с трутневым расплодом поместить в специальный инкубатор, который находится в лаборатории (если такой имеется). Как только трутни начнут выходить из ячеек, их метят маркером нужного цвета, краска быстро высыхает, и меченых трутней выпускают в гнездо, а сот возвращают в изолятор до следующего дня. В будущем для осеменения маток отбирают только меченых трутней.

2. Подготовка материала (спермы трутней) для инструментального осеменения пчелиных маток

Отбор спермы у трутней. Подготовленный к работе шприц устанавливают в поле зрения микроскопа (при увеличении в 8 раз), для того чтобы четко был виден конец капилляра. Правой рукой оттягивают поршень шприца, чтобы набрать в капилляр немного воздуха для разделения физиологического раствора и спермы. Из садка или другой клеточки берут трутня, дают ему поработать крыльями, держа его за конечности. Вынужденный «полет» увеличивает объем брюшка за счет нагнетания воздуха в воздушные мешки, что оказывает благоприятное воздействие необходимое для сокращения брюшных мышц. Затем быстрым движением пальцев другой руки сдавливают ему грудку или отрывают голову. Этот прием вызывает сокращение мышц, и частичное выворачивание эндофаллуса (а иногда и полное с эякуляцией).

Под давлением гемолимфы и воздуха, поступающего из воздушных мешков, конечная часть брюшка трутня выходит наружу, открывая отверстие эндофаллусу. Затем выталкивается основание эндофаллуса с волосками и рожками. Если трутни половозрелы, рожки их оранжевого цвета. Иногда выходит и шейка. Это первая стадия выворачивания, спермы в это время нет. Для того чтобы продолжить выворачивание эндофаллуса необходимо создать в нем дополнительное давление. Сдавливание брюшка от передней части к задней стимулирует сокращение брюшных мышц, которое можно ощутить. 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. Эякуляция осуществляется путем перистальтического сокращения мышечной ткани, начиная от внутреннего конца семенных пузырьков и придаточных желез, выталкивающих сперму и мукус. Нормальную эякуляцию семени нельзя получить без сокращения брюшных мышц. Вся подготовка трутня к эякуляции должна быть направлена не на выдавливание спермы, а на стимулирование сокращения брюшных мышц, только сокращение брюшных мышц может вызвать рефлекторную эякуляцию.

Затем трутня, совершившего эякуляцию, подносят к капилляру и поверхностью спермы касаются его кончика. Трутня слегка оттягивают от капилляра, сохраняя контакт между капелькой спермы и капилляром, что создает условия втягивания в капилляр чистой спермы, так как мукус более вязкий и не втягивается, как сперма. Следует избегать засасывания мукуса, так как он быстро свертывается и образует пробку, что остановит дальнейшее прохождение спермы. Если же мукус попал в капилляр, то необходимо подать поршень назад и освободить проход, и после этого возобновить засасывание спермы.

Когда подносят следующего трутня, из капилляра выпускают капельку спермы предыдущего, чтобы она соединилась с новой порцией и, оттянув немного трутня, засасывают ее вновь. Для осеменения одной, правильно подготовленной матки необходимо отобрать порцию спермы в объеме 8 микролитров (обычно не менее чем от 10 трутней). При этом современное оборудование позволяет набрать в капилляр 4-6 таких порций. Порции воздушными пузырьками не разделяют (как в случае с отделением первой порции от физраствора). При этом объем спермы, при ее введении в половые пути матки, измеряют специальными метками на капилляре. Если в ближайшие 3-5 мин после наполнения капилляра спермой осеменение маток не планируется, чтобы избежать образования пробки, сперму оттягивают в капилляр для образования воздушного пространства, в конец капилляра втягивают капельку физиологического раствора и отводят шприц в сторону.

3. Подготовка пчелиных маток для инструментального осеменения

После завершения процесса набора спермы, в упор-фиксатор устанавливают специальный маткодержатель, который прижимается винтом. Микроскоп настраивается на 15-20 кратное увеличение, затем по присоединенному штуцеру шлангу начинается подача газа CO₂. После выполнения вышеописанных процедур начинают готовить матку. Перед осуществлением процесса желательно проверять качество выведенных маток: матки должны быть максимально активны, стараться вырваться из рук, и обязательное отсутствие дефектов в виде отломанных или оторванных конечностей и т.д. Подготовленную и проверенную матку помещают в переходную трубку, эта трубка имеет такой же внутренний диаметр, как и пластиковая капсула маткодержателя, один конец

которой имеет внутренний паз для присоединения к капсуле маткодержателя. В этот момент матка начнет перемещаться вперед (к другому концу трубки, который закрыт пробкой с небольшим отверстием). Достигнув закрытого конца, матка начнет пятиться назад, и в этот самый момент в паз переходной трубки необходимо приставить капсулу маткодержателя, в результате чего матка переместится в капсулу. Когда матка достигнет суженной части капсулы (3 последних сегмента брюшка матки будут визуально выступать) капсулу надевают на маткодержатель, при этом желательно что бы задние конечности матки оставались внутри капсулы. После введения матки в наркоз, приступают к раскрытию её жальной камеры, в ходе работы необходимо контролировать процесс через микроскоп. Далее крючком осторожно захватывают вентральный стернит матки, затем немного отодвигают в левую сторону стернит брюшка и в этот момент выводят конец выступающего жала матки в отверстие жального крючка, далее осторожно растягивают жальную камеру матки. После раскрытия жальной камеры матки приступают к введению в ее половые пути капиллярной иглы на глубину 1,5-2 мм в отверстие влагалища. После введения капиллярной иглы в половые пути матки вводят нужное количество спермы, затем конец капиллярной иглы извлекают из половых путей и освобождают матку от крючков и метят. Осеменяют неплодных маток в возрасте 6-12 дней, но лучшие результаты показывают матки осемененные на 6-9 день.

4. Методы хранения пчелиных маток для инструментального осеменения

Учитывая, что наибольшее количество сперматозоидов матка усваивает в первые часы после осеменения, необходимо принять все меры к тому, чтобы после завершения процесса осеменения как можно скорее вернуть матку пчелам, этот промежуток не должен превышать 15 минут. Закончив инструментальное осеменение матку (предварительно пометив), помещают в клеточку к семье воспитательницы или в микронуклеус без клеточки (матки должны быть приняты пчелами заранее перед осеменением), предварительно подрезав одно крыло и установив заградитель на леток что бы матка не могла выйти на естественное спаривание, либо маток содержат до и после осеменения в клеточках Ящиньского в семье-инкубаторе или же в лаборатории при температуре 33-35 градусов.

Заместитель Председателя Правления по науке
ТОО «КазНИИЖиК»

Эксперт



Карымсаков Т.Н.

Красов А.В.