

KRIOKONSERWACJA I PRZECHOWYWANIE NASIENIA TRUTNI – ASPEKTY TECHNOLOGICZNE I PRAWNE REGULACJE

Monika Trzcńska, Małgorzata Kralka-Tabak

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,
32-083 Balice k. Krakowa

*Działalność człowieka, nowe technologie oraz zmiany klimatu mogą mieć w nadchodzących latach ogromny wpływ na globalną populację owadów. W związku z obserwowanym na całym świecie spadkiem populacji pszczoł miodnych (*Apis mellifera*) jedyną formą zabezpieczenia nasienia trutni jest jego kriokonserwacja, umożliwiającą przechowywanie przez nieograniczony czas. W niniejszym artykule omówiona została tematyka krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni, jak również aspekty związane z regulacjami prawnymi, dotyczącymi możliwości przechowywania mrożonego materiału genetycznego pszczoły miodnej.*

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, materiał biologiczny, kriokonserwacja, regulacje prawne

W 2014 roku na terenie Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego utworzono Krajowy Bank Materiałów Biologicznych (KBMB), w którym zlokalizowane są centra przechowywania materiału biologicznego zwierząt gospodarskich, takich jak bydło, konie, świnie oraz owce i kozy. Funkcjonowanie i zakres działalności centrów przechowywania opiera się na określonych przepisach, wynikających z ustawy o organizacji hodowli i rozrodzie zwierząt gospodarskich (Dz. U. 2021 poz. 36) oraz przepisów określonych w rozporządzeniu delegowanym Komisji (UE) 686/2020. W związku z działalnością Instytutu Zootechniki PIB polegającą zarówno na opracowaniu efektywnych metod konserwacji nasienia zwierząt gospodarskich w stanie płynnym i mrożonym, jak również związaną z prowadzeniem centrów przechowywania, w artykule podjęto tematykę dotyczącą badań nad opracowaniem metod krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni, a także dokonano analizy regulacji prawnych dotyczących możliwości przechowywania mrożonego materiału genetycznego pszczoły miodnej.

Ogromne znaczenie pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) dla środowiska naturalnego i życia człowieka skłoniło naukowców do intensywnych prac nad opracowaniem

efektywnych metod zabezpieczenia materiału biologicznego tego gatunku. Pszczoły miodne są nieodłączną częścią ekosystemu, zapylają ponad 80% roślin (uprawowych, jak również dziko rosnących) (Gül i in., 2017; Kucharczyk i in., 2017). Ocenia się, że 1/3 produktów spożywanych przez człowieka jest zależna w większym lub mniejszym stopniu od zapylania roślin przez owady (Zych i in., 2018). W ciągu ostatnich dziesięcioleci na całym świecie nastąpiły znaczące straty w rodzinach pszczół miodnych (Kucharczyk i in., 2017; Abderkader i in., 2018). Przyczyn tego niekorzystnego zjawiska jest kilka: niszczenie siedlisk naturalnych, pasożyty, choroby, ekspozycja na pestycydy czy niedobory w pożywieniu (Czekońska, 2009; Kucharczyk i in., 2017; Abderkader i in., 2018; Ciereszko i in., 2018; Fisher i Rangel, 2018; Liu i in., 2020). Jednak czynnikiem najbardziej zagrażającym pszczołom jest degradacja środowiska naturalnego (Gül i in., 2017; Fisher i Rangel, 2018; Kucharczyk i in., 2017). Na terenie Polski według danych Zakładu Pszczelnictwa Instytutu Ogrodnictwa w Puławach znajduje się około 1,77 mln rodzin pszczelich (Semkiw, 2020). Mimo widocznego w ostatnim czasie w kraju systematycznego wzrostu liczby rodzin pszczelich (Semkiw, 2020) liczebność pszczół, biorąc pod uwagę potrzeby zapylania arealów rolnych szczególnie w okresie kwitnienia, jest niewystarczająca (Kucharczyk i in., 2017).

Pszczoła miodna powszechnie użytkowana przez człowieka poddawana jest stale intensywnym pracom hodowlanym, które w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt gospodarskich różnią się głównie ze względu na biologię rozrodu i sposób dziedziczenia. U pszczół miodnych matki pszczele są poliandryczne i w czasie lotu godowego kopulują z wieloma trutniami (Crozier i Page, 1985; Collins, 2004; Cobey, 2007; Cobey i in., 2013; Cobey, 2016a), co pozwala na zgromadzenie nasienia w zbiorniczku nasiennym, które będzie wykorzystywane przez matkę pszczołę do końca jej życia (w pasiekach hodowlanych matkę użytkuje się kilka lat) (Woyke, 1998a; Cobey, 2016a,b). Wielokrotna kopulacja sprzyja utrzymaniu różnorodności genetycznej, przez co pozwala na obniżenie wskaźnika inbrodu w danej populacji (Woyke, 1998 b; Cobey, 2007; Cobey i in., 2013; Cobey, 2016a,b).

Sztuczne unasienianie matek pszczelich

Pierwsze udane prace nad sztucznym unasienianiem matek pszczelich zapoczątkowane przez Lloyda Watsona w latach 30. XX wieku (Woyke, 1960; Cobey, 2016a; Llewellyn, 2019), a następnie kontynuowane w kolejnych dziesięcioleciach, pozwoliły na dokładne rozpoznanie czynników wpływających zarówno negatywnie (infekcje, nieodpowiednia dawka nasienia, brak akceptacji rodziny) (Woyke, 1960; Woyke i Jasiński, 1982; Woyke i Jasiński, 1990), jak i pozytywnie (jakość matki pszczelej, jej wiek w chwili inseminacji, inseminacja odpowiednią dawką nasienia, umieszczenie matki z robotnicami po unasienianiu) (Woyke, 1960; Vesely, 1970; Woyke i Jasiński, 1976; Cobey, 2007; Cobey, 2016a,b; Liu i in., 2020) na skuteczność tej biotechniki rozrodu.

Aby zachować zróżnicowanie genetyczne zbliżone do tego, jakie osiąga się przy kryciu naturalnym, podczas sztucznego unasieniania u pszczół należy zastosować zarówno właściwą liczbę zabiegów unasienienia, jak również odpowiednią objętość rozcieńczonego nasienia. Woyke i Jasiński (1990) wykazali, że matki pszczele, od których oczekuje się jak najdłuższego czerwienia, powinny być unasieniane podwój-

ną dawką nasienia: $2 \times 4 \text{ mm}^3$ lub $2 \times 6 \text{ mm}^3$ zamiast jednorazowo 8 mm^3 . Matki unasienione sztucznie mniejszymi dawkami nasienia łatwiej i szybciej przeprowadzają nasienie z jajowodów do zbiorniczka nasiennego, co powoduje efekt wcześniejszego rozpoczęcia czerwienia (Woyke, 1960). Postęp hodowlany można osiągać np. poprzez chów wsobny, co jednak ogranicza frekwencję genów i alleli płciowych (Moritz, 1984; Harbo, 1990; Skowronek i in., 1995).

Sztuczne unasienianie matek jest metodą pozwalającą na sterowanie procesem kojarzenia (Cobey i in., 2013) i niezbędnym narzędziem, zarówno w realizacji programów doskonalenia genetycznego pszczoł, jak również ich krzyżowania. Niekorzystne warunki atmosferyczne ograniczające rozród naturalny pszczoł nie mają już znaczenia w przypadku sztucznego unasieniania. Zabieg inseminacji pozwala na unasienienie matki pszczelej nasieniem pobranym od jednego lub wielu trutni, a w szczególnych przypadkach nasieniem pobranym ze zbiorniczka matki czerwiałej (Cobey, 2016a; Kołdyński i Bieńkowska, 2018). Za optymalny wiek trutni do pobrania nasienia uważa się okres między 14-21. dniem życia, odpowiadający osiągnięciu przez nie pełnej dojrzałości płciowej (Woyke i Jasiński, 1978). Po 30 dniach życia u trutni stwierdzono znaczny spadek liczby plemników (Metz i Tarpy, 2019). Przy pobieraniu nasienia należy zwrócić uwagę, aby nie zbierać śluzu wraz z nasieniem. Z badań przeprowadzonych przez Woyke i Jasińskiego (1978) wynika bowiem, że śluz w drogach rozrodczych zatyka jajowód i może doprowadzić do śmierci matki.

Krótko- i długoterminowe przechowywanie nasienia trutni

Rozpoczęcie badań nad opracowaniem metod krótko- i długoterminowego przechowywania nasienia trutni wynikały z potrzeby wydłużenia sezonu produkcji matek (w klimacie umiarkowanym nie ma możliwości wychowu matek wczesną wiosną, o tej porze roku ograniczeniem jest również brak trutni, a rodziny zaczynają wychodzić z ula zwykle dopiero w drugiej połowie kwietnia), stworzenia możliwości transportu nasienia oraz czasochłonności polegającej na pobraniu nasienia od wielu trutni, przygotowaniu dawki inseminacyjnej i wykonaniu zabiegu inseminacji w tym samym dniu.

Standardowo nasienie po pobraniu rozcieńcza się w różnych płynach, a następnie przechowuje w temperaturach dodatnich (Ruttner, 1975; Locke i Peng, 1993; Skowronek i in., 1995; Ciereszko i in., 2017; Yániz i in., 2019). Najlepsze wyniki uzyskuje się, przechowując nasienie w zamkniętych kapilarach szklanych. Matki unasieniane takim nasieniem gromadzą zbliżoną liczbę plemników w porównaniu do matek unasienianych nasieniem świeżym (Skowronek i Szymula, 1998). Z kolei doświadczenia przeprowadzone przez Collins (2000) wykazały, że przechowywanie plemników trutni w temp. 12°C przez okres 6 tygodni umożliwia utrzymanie żywotności plemników na poziomie 80%, natomiast wydłużenie czasu przechowywania do 39 tygodni powoduje obniżenie żywotności plemników do 65%, co jednak nie wpływa negatywnie na wyniki płodności matek (Cobey, 2007; Cobey i in., 2013).

Jedyną metodą pozwalającą na długoterminowe przechowywanie nasienia trutni jest kriokonserwacja. Użycie do inseminacji kriokonserwowanego nasienia pszczoł miodnych pozwala na wykonanie tego zabiegu o każdej porze roku, racjonalne sterowanie rozrodem oraz w sposób istotny wpływa na postęp hodowlany i zachowanie

pożądaney różnorodności genetycznej (Paillard i in., 2017). Prace nad kriokonserwacją nasienia trutni rozpoczęły się w latach 70. i trwają do dnia dzisiejszego, nadal jednak nie opracowano skutecznej metody mrożenia umożliwiającej uzyskanie zadowalających wyników unasienniania matek pszczelich (Podlewski i in., 2000; Wilde i in., 2001; Podlewski i in., 2003; Cobey, 2016a).

W celu ochrony plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi stosuje się różne krioprotektanty. W przypadku kriokonserwacji nasienia trutni testowano m.in.: dimetylosulfotlenek (DMSO), glicerol, metylosulfotlenek (MeSO), dimetyloformamid, 1,3-propoanodiol, 2,3-butanodiol i glikol etylenowy (Hopkins i Herr, 2010; Wegener i Bienefeld, 2012; Wegener i in., 2014). Glicerol powszechnie stosowany jako dodatek do rozcieńczalnika mrożeniowego nasienia zwierząt gospodarskich nie znajduje jednak zastosowania w przypadku pszczół. W badaniach przeprowadzonych przez Harbo (1979) wynika, że glicerol powoduje uszkodzenia błon komórkowych plemników trutni podczas procesu kriokonserwacji. Badania z wykorzystaniem DMSO wykazały, że jest on skutecznym krioprotektantem (Wilde i in., 2001; Taylor i in., 2009), a jego dodatek do rozcieńczalnika mrożeniowego w stężeniu 10% pozwala na uzyskanie odpowiedniego odsetka żywych plemników trutni (Hopkins i Herr, 2010). Wczesniejsze badania wykazały również, że dodatek do rozcieńczalnika mrożeniowego DMSO nie wpływa negatywnie na odsetek plemników docierających do zbiorniczka nasiennego matki (Harbo, 1977). Z kolei Hopkins i Herr (2010) zaobserwowali, że 15-procentowe stężenie DMSO obniża żywotność plemników po rozmrożeniu. Wykonanie unasienniania nasieniem kriokonserwowanym z rozcieńczalnikiem z dodatkiem DMSO może być ponadto toksyczne dla matki pszczelej (Harbo i Hered, 1986; Wegener i Bienefeld, 2012).

Miarą skutecznej i efektywnej kriokonserwacji nasienia trutni jest produkcja przez unasiennianą matkę odpowiedniej liczby robotnic, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania rodziny pszczelej. Według Collinsa (2004) technika kriokonserwacji umożliwiająca zachowanie co najmniej 50% żywych plemników, pozwoliłaby hodowcom wychowywanie matek-córek o pożądanych genotypach z hodowlanego punktu widzenia. Stucky i in. (2008) wykazali, że dodatek DMSO do rozcieńczalnika mrożeniowego umożliwia uzyskanie po rozmrożeniu żywotności plemników powyżej 50%. Z badań Dadkhah i in. (2016) wynika, że kriokonserwacja nasienia trutni w rozcieńczalniku zawierającym żółtko jaja kurzego oraz lecytynę sojową wpływa korzystnie na jakość plemników po rozmrożeniu i pozwala na uzyskanie 50% plemników żywych. W badaniach przeprowadzonych przez Hopkinsa i in. (2012) stwierdzono, że ruchliwość plemników kriokonserwowanych w rozcieńczalniku bez dodatku jaja kurzego jest niższa, a matki pszczele unasiennione takim nasieniem produkowały tylko trutnie. W przypadku kriokonserwacji nasienia trutni przy użyciu rozcieńczalnika z dodatkiem zarówno żółtka jaja kurzego i 10-procentowego DMSO uzyskano wysoką przeżywalność plemników wynoszącą 90% (Hopkins i Herr, 2010). W badaniach tych nie przeprowadzono jednak oceny zdolności zapładniających kriokonserwowanych plemników trutni.

W kriokonserwacji nasienia kluczowe znaczenie ma odpowiednia szybkość schładzania, która powinna odbywać się w optymalnym dla danego gatunku tempie, w przeciwnym razie dochodzi do uszkodzenia plemników (Harbo, 1979; Kaftanoglu

i Peng, 1984; Hopkins i Herr, 2010). W przypadku plemników pszczoł miodnych kontrolowane wolne tempo schładzania jest warunkiem uzyskania odpowiedniej jakości plemników po rozmrożeniu. Pierwsze próby kriokonserwacji nasienia trutni przy zastosowaniu wolnego schładzania rozcieńzonego nasienia (3–4°C/min) wykazały jego pozytywny wpływ na ruchliwość plemników po rozmrożeniu. Matki unasieniane takim nasieniem produkowały jednak mniej niż 50% robotnic (Harbo, 1979; Hopkins i Herr, 2010).

Z dotychczasowych badań wynika, że rozmrażanie nasienia powinno odbywać się z szybkością od kilku sekund do jednej minuty w temperaturze 25–40°C (Harbo, 1979; Peng i in., 1992; Hopkins i Herr, 2010; Wegener i Bienefeld, 2012).

Pomimo prowadzenia intensywnych badań nad opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji nasienia trutni nadal nie uzyskano w pełni zadowalających wyników spełniających warunki praktycznego stosowania tej metody. Mimo to z uwagi na straty w rodzinach pszczoł miodnych podejmowane są działania mające na celu zabezpieczenie materiału biologicznego tego gatunku. Na Uniwersytecie Stanu Waszyngton w USA utworzono pierwszy na świecie bank, w którym przechowywane jest kriokonserwowane nasienie trutni – Washington State University (Wasson, 2013).

Regulacje prawne oraz przepisy weterynaryjne dotyczące przechowywania kriokonserwowanego nasienia trutni

Pszczoła miodna (*Apis mellifera*) jest gatunkiem owada uznanym za zwierzę gospodarskie zgodnie z art. 2 (pkt 1b) ustawy o hodowli i rozrodzie zwierząt gospodarskich z dnia 10 grudnia 2020 roku (Dz. U. 2021 poz. 36). Ustawa o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych z 11 marca 2004 roku (Dz. U. 2020 poz. 1421) określa wymagania weterynaryjne dla podejmowania i prowadzenia działalności w zakresie zarobkowego wytwarzania, pozyskania, konserwacji, obróbki, przechowywania, prowadzenia obrotu lub wykorzystania materiału biologicznego. Zgodnie z ustawą (Dz. U. 2021 poz. 36) materiałem biologicznym jest nasienie, komórki jajowe, zarodki oraz tkanki użyte do ich produkcji, pochodzące od zwierząt, przeznaczone do wykorzystania w rozrodzie, z wyłączeniem jaj wylęgowych drobiu oraz akwakultury. Stosownie do tego zapisu, materiałem biologicznym jest także nasienie pochodzące od trutni pszczoły miodnej. Oznacza to, że prowadzenie działalności w zakresie przechowywania i obrotu nasieniem pszczoły miodnej jest działalnością nadzorowaną i podlega przepisom ustawy zgodnie z art. 1 (Dz. U. 2020 poz. 1421).

Podmiot, który zamierza prowadzić działalność nadzorowaną, polegającą na zarobkowym przechowywaniu lub obrocie mrożonym nasieniem pszczoły miodnej, może podjąć taką działalność po stwierdzeniu przez powiatowego lekarza weterynarii w drodze decyzji spełnienia przez ten podmiot określonych wymagań weterynaryjnych. Jednocześnie MRiRW nie wydało rozporządzenia określającego szczegółowe warunki weterynaryjne dla prowadzenia działalności nadzorowanej w postaci przechowywania nasienia pszczoły miodnej, jak ma to miejsce w przypadku przepisów dotyczących materiału biologicznego bydła, świń, koniowatych, kóz oraz owiec. Oznacza to, że w chwili obecnej nie ma przepisów regulujących funkcjonowanie centrum przechowywania nasienia pszczoły miodnej, a tym samym szczegółowych regulacji dotyczących dokumentacji niezbędnej do przyjmowania i wydawania mate-

riału biologicznego do centrum. Zgodnie z rozporządzeniem UE 429/2016 regulacje dotyczące przechowywania i obrotu mrożonym nasieniem pszczoły miodnej nie ulegną zasadniczym zmianom. Unijny legislator nie przewidział szczególnych przepisów dedykowanych materiałowi biologicznemu pszczoły miodnej, w odróżnieniu od samej pszczoły miodnej, której poświęcone są szczegółowe postanowienia dotyczące przechowywania, obrotu i importu.

Podsumowanie

Jedyną formą zabezpieczenia nasienia trutni jest kriokonserwacja, umożliwiająca przechowywanie przez nieograniczony czas, dająca możliwość zachowania rezerwy genetycznej oraz transportu materiału biologicznego na znaczne odległości, a tym samym wykorzystania zamrożonego nasienia do unasielenia matek pszczelich, zarówno w kraju, jak i zagranicą. Jak wynika z niniejszego opracowania, pomimo licznych badań nad opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji nasienia trutni nadal nie uzyskano w pełni zadowalających wyników. Opracowanie efektywnej metody kriokonserwacji nasienia trutni i spełnienie przez nią warunków praktycznego zastosowania będzie podstawą do ustanowienia regulacji prawnych określających zasady funkcjonowania centrum przechowywania nasienia pszczoły miodnej, jak również regulacji dotyczących dokumentacji niezbędnej w obrocie materiałem biologicznym w ramach centrum.

Piśmiennictwo

- Abderkader F., Kairo G., Tchamitchian S., Bonnet M., Cousin M., Barbouche N., Belzunces L.P., Brunet J. (2018). Effects of Clothianidin exposure on semen parameters of honey bee drones. *J. New Sci.*, 59: 3791–3798.
- Ciereszko A., Wilde J., Dietrich G.J., Siuda M., Bąk B., Judycka S., Karol H. (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48: 211–222.
- Cobey S. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38: 390–410.
- Cobey S.W. (2016a). Instrumental insemination. *Bee Culture*, 144: 28–33.
- Cobey S.W. (2016b). An introduction to instrumental insemination of honey bee queens. *Bee World*, 93: 33–36.
- Cobey S., Tarpy D., Woyke J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.*, 52: 1–18.
- 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. (2004). Effective viability threshold for preserved honey bee semen. *Proc. 30th Annual Conference of the IETS. Portland, Oregon, USA, 10-13.01.2004. Reprod. Fertil. Dev.*, 16: 166.
- Crozier R.H., Page R.E. (1985). On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 18: 105–115.
- Czekońska K. (2009). Problemy pszczelarstwa początku XXI wieku. *Mat. konf.: XLVI Naukowa Konferencja Pszczelarska. Puławy, 10-11.03.2009*, ss. 65–66.
- 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.
- Dz. U. z 2021, poz. 36, Ustawa z dnia 10 grudnia 2020 r. o organizacji hodowli i rozrodzie zwierząt gospodarskich.
- Dz. U. z 2020, poz. 1421, Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt.

- Fisher A., Rangel J. (2018). Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. *PLoS One*, 13(12): 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.
- Harbo J.R. (1977). Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after 2 years in liquid nitrogen (–196°C). *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.R. (1990). Artificial mixing of spermatozoa from honey bees and evidence for sperm competition. *J. Apic. Res.*, 29: 151–158.
- Harbo J., Hered J. (1986). Sterility in honey bees caused by dimethyl sulfoxide. *J. Hered.*, 77: 129–130.
- 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.
- Kaftanoglu O., Peng Y.S. (1984). Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen. *J. Apic. Res.*, 23: 157–163.
- Kołodnyński M., Bieńkowska M. (2018). Sztuczne unasienianie matek pszczelich w obiektywie aparatu fotograficznego. *Mat. Konf.: 55 Naukowa Konferencja Pszczelarska. Kazimierz Dolny, 06–07.03.2018*, ss. 38.
- Kucharczyk M., Krzywonos M., Błaszczuk J., Seruga P., Piekara A., Zimny S., Borowiak D. (2017). Problemy pszczelarstwa w Polsce. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*, 494: 123–131.
- Liu Z., Liu F., Li G., Chi X., Wang Y., Wang H., Ma L., Han K., Zhao G., Guo X., Xu B. (2020). Metabolite support of long-term storage of sperm in the spermatheca of honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Front. Physiol.*, 11: 1303.
- Llewellyn D.A. (2019). Instrumental insemination and semen cryopreservation: Can honey bees be selectively bred like cattle? *Journal of NACAA*, 12, <https://www.nacaa.com/journal/index.php?jid=998>
- Locke S.J., Peng Y.S. (1993). The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiol. Entomol.*, 18: 144–148.
- Metz B.N., Tarpay D.R. (2019). Reproductive senescence in drones of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insects*, 10: 11.
- Moritz R.F.A. (1984). The effect of different diluents insemination success in the honey bee using mixed semen. *J. Apic. Res.*, 23: 164–167.
- 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.
- Peng C.Y.S., Yin C.M., Yin L.R.S. (1992). Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. *Physiol. Entomol.*, 17: 269–276.
- Podlewski M., Glogowski J., Ciereszko A., Wilde J., Demianowicz W. (2000). Wstępne wyniki badań nad przydatnością kriokonserwowanego nasienia trutni. *Mat. Konf.: 37 Międzynarodowa Konferencja Pszczelarska. Puławy, 08-09.03.2000. Pszczeln. Zeszyt. Nauk.*, 44: 68–70.
- Podlewski M., Wilde J., Glogowski J., Demianowicz W., Białkowska J. (2003). Application of fluorescent microscopy to determine the quality of drone sperm. [Fluoreszenzmikroskopie zur Qualitätskontrolle von Drohnensperma.]. *Apidologie*, 34: 500–502.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/429 z dnia 9 marca 2016 roku w sprawie przenośnych chorób zwierząt oraz zmieniające i uchylające niektóre akty w dziedzinie zdrowia zwierząt („Prawo o zdrowiu zwierząt”) (Dz. U. L 84/1 z 31.3.2016).
- Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2020/686 z dnia 17 grudnia 2019 roku uzupełniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/429 w odniesieniu do zatwierdzania zakładów zajmujących się materiałem biologicznym oraz wymagań w zakresie identyfikowalności i zdrowia zwierząt dotyczących przemieszczania w obrębie terytorium Unii materiału biologicznego niektórych utrzymywanych zwierząt lądowych (Dz. U. L. 174/1 z 3.6.2020).
- Ruttner F. (ed.) (1975). *The instrumental insemination of the queen bee*. Apimondia Pub. Ho., Bucharest, Romania, 80 pp.

- Semkiw P. (2020). Sektor pszczelarski w Polsce w 2020 roku. Instytut Ogrodnictwa, Zakład Pszczelnictwa w Puławach. Puławy, ss.1–13.
- Skowronek W., Kruk C., Lóc K. (1995). The insemination of queen honey bees with diluted semen. *Apidologie*, 26: 487–493.
- Skowronek W., Szymula J. (1998). Opracowanie metody krótkoterminowego przechowywania nasienia trutni. *Pszczel. Zesz. Nauk.*, 42: 145–150.
- Stucky M., Hopkins B.K., Herr C. (2008). Cryopreservation of honey bee spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20: 127–128.
- Taylor M., Guzmán-Novoa E., Morfin N., Buhr M. (2009). Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72: 149–159.
- Vesely V. (1970). Retention of semen in the lateral oviducts of artificially inseminated honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Acta Ent. Bohemoslov.*, 67: 83–92.
- Wasson D. (2013). WSU Insider – WSU researchers preparing bee semen bank. <https://news.wsu.edu/2013/06/06/wsu-researchers-preparing-bee-semen-bank>
- Wegener J., Bienefeld K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77: 600–607.
- Wegener J., May T., Kamp G., Bienefeld K. (2014). A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, 69: 236–242.
- Wilde J., Podlewski M., Siuda M., Głogowski J., Ciereszko A., Demianowicz W. (2001). Preliminary results of artificial insemination of honeybee queens with spermatozoa stored in liquid nitrogen (–196°C). *Apidologie*, 32: 513–514.
- Woyke J. (1960). Naturalne i sztuczne unasienianie matek pszczelich. *Pszczeln. Zesz. Nauk.*, 4: 183–275.
- Woyke J. (1998a). *Biologia pszczół*. W: *Pszczelnictwo*, Prabucki J. (red.). Szczecin, ss. 186–243.
- Woyke J. (1998b). *Zasady pracy hodowlanej*. W: *Pszczelnictwo*, Prabucki J. (red.). Szczecin, ss. 271–332.
- 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. (1978). Influence of age of drones on the results of instrumental insemination of honeybee queens. *Apidologie*, 9: 203–212.
- 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.
- Yániz J., Palacín 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. (2018). *Po co nam zapylacze? W: Narodowa Strategia Ochrony Owadów Zapyłających*, Kędzierska-Zaporowska M. (red). Fundacja Greenpeace, Warszawa, ss. 12–15.

Zatwierdzono do druku: 27 IV 2021

MONIKA TRZCIŃSKA, MAŁGORZATA KRALKA-TABAK

Cryopreservation and storage of honeybee drone semen – technological aspects and legal regulations

SUMMARY

Human activity, new technologies and climate change may have a huge impact on the global insect population in the coming years. Due to the decreasing population of honeybee (*Apis mellifera*) observed

all over the world, the only method of protection of drone semen is cryopreservation, enabling its storage for an unlimited time. This article discusses the subject of short- and long-term storage of drone semen as well as aspects related to legal regulations regarding the possibility of storing frozen honeybee genetic material.

Key words: honeybee, biological material, cryopreservation, legal regulations