

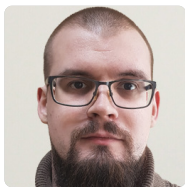
МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СПЕРМЫ ТРУТНЕЙ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ *APIS MELLIFERA L.* КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЕЕ КАЧЕСТВА

© Гулов А.Н., Ласкин А.С.,
Лапынина Е.П., Брандорф А.З.



Алексей Николаевич Гулов

Федеральный научный центр пчеловодства
Рязанская обл., г. Рыбное, Российская Федерация
e-mail: blee3@yandex.ru
ORCID: 0000-0001-6417-5422



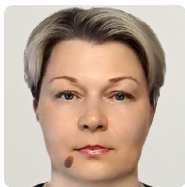
Александр Сергеевич Ласкин

Федеральный научный центр пчеловодства
Рязанская обл., г. Рыбное, Российская Федерация
e-mail: laskinsania@yandex.ru
ORCID: 0000-0003-1828-2678



Елена Петровна Лапынина

Федеральный научный центр пчеловодства
Рязанская обл., г. Рыбное, Российская Федерация
e-mail: elena.p56@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-6473-1393



Анна Зиновьевна Брандорф

Федеральный научный центр пчеловодства
Рязанская обл., г. Рыбное, Российская Федерация
e-mail: gordenchuk@mail.ru
ORCID: 0000-0003-0535-6578

*Качество спермы трутней медоносных пчел оценивают по показателям подвижности, жизнеспособности и концентрации сперматозоидов. Большое значение для оплодотворения имеет морфология ядра сперматозоида. Наиболее объективными показателями морфологии ядра спермия являются размер и форма головки. Цель исследования – изучение морфометрических параметров сперматозоидов трутней медоносных пчел *Apis mellifera L.* в оценке качества спермы. Сперму отбирали методом искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса у половозрелых трутней в возрасте 22–30 суток с помощью оборудования для искусственного осеменения SCHLEY-System модель 1.04. Для разбавления спермы впервые использовали медовый разбавитель, а фиксацию осуществляли с помощью Diff Quick. Сперматозоиды оценивали на подвижность, концентрацию и жизнеспособность. Изучали следующие морфометрические параметры: длина акросомы (3,8–4,3 мкм), длина ядра (5,2–5,5 мкм), периметр ядра (11,7–12,2 мкм) и его площадь (5,0–6,2 мкм). Между морфометрическими па-*

раметрами сперматозоидов и качественными характеристиками спермы выявлена корреляция ($r = -0,4-0,3$ при $p < 0,05$). Наиболее стабильная связь отмечена между общей подвижностью сперматозоидов, их длиной ядра ($r = -0,3$ при $p < 0,05$) и площадью ядра головок ($r = -0,2$, $r = -0,3$ при $p < 0,05$). Как показали исследования, большое значение для изучения морфометрических параметров сперматозоидов имеет выбор разбавителя для спермы ($z = -5,8$; $z = -15,4$; $z = -7,3$). Основные характеристики сперматозоидов трутней подвержены влиянию сезонности. По результатам исследований 2020 года отмечено наилучшее качество спермы трутней летней генерации ($t = 6,0$; $t = 14,3$; $t = 2,4$), а в 2021 году – весенней генерации ($t = 6,2$; $t = 6,3$; $t = 5,5$). Причиной могли послужить природно-климатические условия местности, оказавшие влияние на рацион питания трутней.

Трутень, морфометрия сперматозоидов, подвижность сперматозоидов, жизнеспособность сперматозоидов.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание № 0470-2019-0001).

Медоносные пчелы – важный элемент экологической системы. На их долю приходится 80–90% опыляемых энтомофильных растений. Широкий ареал обитания медоносной пчелы на территории России обусловлен высокими адаптивными свойствами данного вида (Брандорф и др., 2012).

Сложившееся на сегодняшний день состояние генофонда медоносной пчелы является одной из основных причин современного кризиса в пчеловодстве. Сохранение генетических ресурсов медоносных пчел России стало актуальной проблемой в связи с экспансией зарубежных пород и нарастающим экологическим кризисом (Саттаров и др., 2014; Чиндина и др., 2017). Исправить эту ситуацию можно с использованием таких биотехнологических методов сохранения генофонда медоносных пчел, как инструментальное осеменение пчелиных маток, консервация спермы трутней. Инструментальное осеменение пчелиных маток спермой специально подобранных трутней – надежный способ контроля передачи генетической информации потомству, необходимый в селекционно-племенной работе. Сохранение

спермы трутней медоносных пчел в сочетании с инструментальным осеменением является эффективной стратегией для сохранения видов и их генетического разнообразия. Первой задачей на пути решения указанных проблем выступает создание биоресурсной коллекции с целью сохранения генетического биоразнообразия основных пород пчел, разводимых на территории России. Это среднерусская (*Apis mellifera mellifera* L.), карпатская (*Apis mellifera carpatica*), серая горная кавказская (*Apis mellifera caucasica*), дальневосточная (*Apis mellifera far-eastern*) и башкирская (*Apis mellifera mellifera* L.) породы.

Формирование биоресурсной коллекции немислимо без проведения предварительной оценки качественных характеристик спермы. Качество спермы трутней медоносных пчел оценивают по общепринятым показателям: подвижность, жизнеспособность и концентрация сперматозоидов. Подвижность обычно считается одной из наиболее важных характеристик, связанных с фертильностью сперматозоидов. Подвижность, по сути, является выражением структурной целостности

спермы (Gil et al., 2009). Оценка жизнеспособности (целостности цитоплазматических мембран) может быть контролем точности при оценке подвижности сперматозоидов (Науменкова и др., 2020). Показатель концентрации сперматозоидов является выражением оплодотворяющей способности спермы. Однако полноценное представление об оплодотворяющей способности можно получить лишь при изучении морфологии сперматозоидов.

Изучению морфологических и морфометрических параметров сперматозоидов трутней посвящено сравнительно мало исследований. Так, L. Tarliyah (Tarliyah et al., 1999), изучая морфологию спермы *Apis mellifera* L. (европейская темная пчела) после хранения ее в различных температурных режимах, отметил довольно высокий процент сперматозоидов с морфологическими дефектами, такими как сломанные жгутики, расслоение жгутиков и двойные головки. A. Gontarz, исследуя свежееотобранную (неразбавленную) сперму *A. m. carnica* (краинская порода медоносных пчел), также выявил значительный процент сперматозоидов с расслоением жгутиков, особенно весной. Автор обнаружил, что сперматозоиды трутней весенней генерации несколько длиннее летних (Gontarz et al., 2016). K. Power (Power et al., 2019) в своей работе по изучению морфологии свежееотобранной спермы *A. m. ligustica* (итальянская порода пчел) обнаружила аналогичные морфологические дефекты сперматозоидов, выявив высокую вариабельность показателя длины тела сперматозоида. При этом длина тела спермиев трутней итальянских пчел оказалась меньше длины спермиев трутней краинской породы. Следует отметить, что указанные авторы рассматривают морфологию спермиев трутней без взаимной связи с качественными характеристиками самой спермы.

Высокая доля морфологически аномальных сперматозоидов в эякуляте сни-

жает потенциал фертильности спермиев у собак (Oettle', 1993), лошадей (Jasko et al., 1990), крупного рогатого скота (Sekoni, Gustafsson, 1987), свиней (Hannock, 1959). Большое значение для оплодотворения имеет морфология ядра сперматозоида. Наиболее объективными показателями морфологии ядра спермия являются размер и форма головки (Foote, 2003). Следовательно, морфология спермы – также показатель фертильности сперматозоидов.

Для понимания вопросов, связанных с физиологией и патологией сперматогенеза, наряду с исследованием морфологии сперматозоидов требуется изучение химического состава эякулята (Лебедев и др., 1972). Биохимия спермы (микроэлементы, углеводы, органические кислоты) – исследование, которое проводится для диагностики концентрации веществ, влияющих на образование, морфологию и оплодотворяющую способность сперматозоидов. Микроэлементный состав спермы оказывает большое влияние на процессы метаболизма сперматозоидов, их способность к движению. Микро- и макроэлементы обеспечивают поддержание осмотического давления в плазме спермы и наряду с другими факторами создают благоприятные условия для осуществления гаметными своих физиологических функций. Литературных данных, относящихся к проблеме изучения минерального состава спермы трутней медоносной пчелы, сравнительно мало. Основные результаты, как правило, получены исследователями в середине прошлого века.

В животноводстве, как известно, качество спермы производителей сельскохозяйственных животных не является постоянным и зависит от многих факторов: условий кормления, содержания, режима полового использования, состояния здоровья производителя. Что касается изучения репродуктивных показателей трутней медоносных пчел, то на сегодня

нышний день установлена связь только между возрастом трутней и качеством их спермы (Гулов, Бородачев, 2016). Вопрос о влиянии других факторов, в том числе сезонности, остается неизученным.

Таким образом, целью настоящего исследования является изучение морфометрических параметров сперматозоидов трутней медоносных пчел *Apis mellifera L.* в оценке качества спермы. Предполагается решить следующие задачи:

1) провести оценку качества спермы трутней весенней и летней генераций по показателям подвижности и концентрации сперматозоидов, жизнеспособности и содержанию в ней микроэлементов: цинк, медь, железо;

2) изучить морфометрические параметры сперматозоидов трутней и выявить их связь с качественными характеристиками спермы.

Научная новизна исследования состоит в том, что для оценки качества спермы трутней впервые использовали замену трис-буфера на 10%-ный медовый разбавитель на основе натурального пчелиного меда с акации белой с собственной модификацией.

Полученные результаты впервые продемонстрируют морфометрический анализ сперматозоидов трутней, изменение качественных характеристик спермы и ее микроэлементного состава в течение активного сезона.

Материалы и методы исследований

Исследование проводили на экспериментальной пасеке ФГБНУ «Федеральный научный центр пчеловодства» (Россия, г. Рыбное) в период активного сезона (май – август) 2020–2021 гг.

Объектом исследований являлась сперма трутней внутривидового типа среднерусской породы пчел «Приокский» (А.с. № 5818 от 21.10.1992), который был выведе-

ден на основе скрещивания среднерусской и серой горной кавказской пород сотрудниками ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства».

Сперму отбирали методом искусственной стимуляции выворачивания эндотеллоса у половозрелых трутней в возрасте 22–30 суток. Трутней, выращенных в апреле – мае, исследовали по достижении ими половой зрелости в конце июня, а выращенных в мае – июне, исследовали в конце июля – начале августа. Сперму собирали непосредственно в стерильный стеклянный капилляр шприца оборудования для искусственного осеменения SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz). Свежеотобранную сперму разбавляли в стерильной чашке Петри (Nunc) путем добавления 2,5 мл трис-буфера pH 8,75 (Rhodes, 2008). Перед оценкой качества спермы трис-буфер выдерживали на водяной бане в течение 10 минут при 37 °С. С целью сокращения финансовых затрат на приобретение дорогостоящих химических реагентов, входящих в состав трис-буфера, он был заменен нами в 2021 году на 10%-ный медовый разбавитель, приготовленный по методике П.П. Печникова и П.Н. Скаткина (Печников, Скаткин, 1949) на основе натурального пчелиного меда с акации белой с собственной модификацией – разбавитель титровали 6М NaOH до значений pH 9–10.

Сперматозоиды оценивали на подвижность, концентрацию с помощью счетной камеры Горяева (МиниМед, Россия) и жизнеспособность методом суправитального окрашивания 1%-ным раствором эозина. Микроскопирование проводили на светодиодном флуоресцентном микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 (ООО «Альтами», Россия) при увеличении $\times 400$. Общую подвижность сперматозоидов (ОП, %) оценивали в 10 полях зрения микроскопа. Учитывали прямолинейно-поступательное, мажорное и колебательное (вибрация) движение спермиев. Для определения общей

подвижности использовали следующую формулу: общая подвижность сперматозоидов (%) = (общее количество сперматозоидов – неподвижные сперматозоиды / общее количество сперматозоидов) × 100%.

Всего в период исследований 2020–2021 гг. было оценено 9000 сперматозоидов.

Для изучения морфометрических параметров головок сперматозоидов использовали метод дифференциального окрашивания Diff Quick (АБРИС+, Россия). Для приготовления мазка брали 20 мкл суспензии спермы, приготовленной в 2020 году на трис-буфере, а в исследованиях 2021 года – на 10%-ном медовом разбавителе. Мазки спермы сушили на воздухе. Фиксация мазка в растворе № 1 – 10 мин, окраска в растворе № 2 (эозин) – 15 мин, затем окраска высушенного мазка в растворе № 3 (тиазин) – 10 мин. После окрашивания предметные стекла промывали в буферах с рН 6,8 в течение 2 мин. Сперматозоиды исследовали на светодиодном микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 в режиме масляной иммерсии при увеличении × 2000. Изображения сперматозоидов фиксировали с помощью цифровой камеры Canon 1300D. Морфометрические параметры сперматозоидов изучали на полученных изображениях с помощью программы «Альтами Студио» версии 3.5 (ООО «Альтами», Россия).

Морфометрические параметры: длина акросомы, длина ядра, периметр и площадь ядра – изучали с 199–300 изображений сперматозоидов. Для морфометрического анализа сперматозоиды отбирали случайным образом. Измерения каждой отдельной головки сперматозоида автоматически сохранялись в Microsoft Excel.

Сперму трутней медоносных пчел подвергали исследованию на микроэлементы. Изучали содержание в сперме цинка (Zn), меди (Cu), железа (Fe) атомно-абсорбционным методом определения токсичных элементов посредством адаптации ГОСТ Р 56634-2015 (маточное молочко).

Для выполнения поставленной задачи сперму набирали в стерильные стеклянные капилляры объемом по 50–60 мкл. За период с 2020 по 2021 год было заготовлено и исследовано 12 образцов.

Статистический анализ проводили на программном обеспечении Statistica версия 13 для Windows (StatSoft, Россия). Влияние периода активного сезона (весна, лето) на основные показатели качества спермы и морфометрические размеры головок сперматозоидов сравнивали между исследуемыми группами с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Нормальность распределения проверяли с помощью статистики Шапиро – Уилка. Групповые различия по виду используемого разбавителя для спермы сравнивались с помощью критерия Манна – Уитни. Влияние считалось значимым при $p < 0,05$. Корреляции между размерами головок сперматозоидов и качественными характеристиками спермы проводили с помощью коэффициентов линейной корреляции Пирсона. Эффекты считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

В ходе проведенных исследований установлено, что сезонная генерация трутней оказывает существенное влияние на качественные характеристики спермы. В условиях активного сезона 2020 года качество спермы трутней летней генерации достоверно превосходило сперму трутней весенней генерации по подвижности ($t = 6,0$), жизнеспособности ($t = 14,3$) и концентрации сперматозоидов ($t = 2,4$). В условиях активного сезона 2021 года качество спермы трутней весенней генерации достоверно превосходило сперму трутней летней генерации по подвижности ($t = 6,2$), жизнеспособности ($t = 6,3$) и концентрации сперматозоидов ($t = 5,5$). Таким образом, результаты качественных

характеристик спермы за исследуемый период оказались диаметрально противоположными (табл. 1).

Однако сезонная генерация трутней не оказала достоверного влияния на общую подвижность сперматозоидов трутней весенней генерации за исследуемый период. Качество спермы формируется у трутней в личиночной стадии, которая продолжается в течение 7 суток. Именно этот момент является в жизни трутня особенно важным, определяющим его в качестве будущего полноценного самца, способного спариться с пчелиной маткой и передать наследственную информацию. Полноценное питание личинки трутня напрямую зависит от поступления в пчелиное гнездо свежего нектара и пыльцы с

тех источников кормовой базы, которые окружают пчелиную семью во время продуктивного лета. Определяющими факторами обильного выделения нектара и пыльцы в цветках являются температура окружающего воздуха и осадки. Лето 2021 года сопровождалось аномально жаркой погодой и крайне малым количеством осадков в виде дождя (табл. 2).

Сложившиеся природно-климатические условия крайне негативно сказались на цветении медоносных культур и, соответственно, на развитии пчелиных семей и половом созревании трутней.

Сперма трутней летней генерации 2021 года значительно превосходит аналогичные образцы 2020 года по содержанию исследуемых микроэлементов.

Таблица 1. Влияние сезонной генерации трутней на качество их спермы (n = 60–100, г. Рыбное, Рязанская обл., 2020–2021 гг.)

Показатель качества спермы	Сезонная генерация трутней			
	весенняя		летняя	
	2021 год	2020 год	2021 год	2020 год
Общая подвижность, %	62,7 ± 2,8 ^a	56,3 ± 3,0 ^a	39,3 ± 2,5 ^a	81,7 ± 3,0 ^a
Жизнеспособность, %	91,9 ± 0,7 ^a	83,0 ± 0,8 ^a	82,9 ± 1,2 ^a	96,7 ± 0,5 ^a
Концентрация, млн/мкл	4,1 ± 0,1 ^a	5,25 ± 0,3 ^a	3,4 ± 0,1 ^a	6,2 ± 0,3 ^a
Цинк (Zn), n = 6	30,0 ± 1,9	44,1 ± 11,5	34,8 ± 2,5	27,9 ± 9,8
Медь (Cu), n = 6	114,9 ± 6,7	125,0 ± 32,0	125,7 ± 7,2	89,03 ± 10,1
Железо (Fe), n = 6	295,1 ± 50,9	12,2 ± 5,2	908,8 ± 78,2	32,5 ± 6,4

Примечание: а – различия существенны на уровне $p < 0,05$.
Источник: собственные исследования.

Таблица 2. Погодные условия Рязанской области в 2020–2021 гг.

Климатические показатели	2020 год			2021 год		
	май	июнь	июль	май	июнь	июль
Средний показатель температур, °С						
дневной	15	22	23	16,8	22,2	26
ночной	8	13	15	11,3	16,3	16
min	4	9	12	4	9,5	11,4
max	23	31	30	30	26,3	34,1
отклонение от нормы (+/-)	-1,5	+2,0	-0,5	+0,7	+3,2	+2,5
Количество осадков, мм	156	159	170	143	95,9	43
отклонение от нормы, %	312	198	200	234	123	51
Количество дождливых дней	8	10	12	8	6	4

Источник: Weatherarchive.ru (2022). URL: <https://weatherarchive.ru>

Однако сперма трутней весенней генерации 2021 года превосходит аналогичные образцы 2020 года только по содержанию железа.

Анализ полученных результатов указывает на обратно пропорциональное соотношение качественных характеристик спермы с ее микроэлементным составом. Так, увеличение показателей подвижности, жизнеспособности и концентрации сперматозоидов сопровождается снижением в сперме концентрации исследуемых микроэлементов: цинка, меди и железа.

В табл. 3 представлены морфометрические характеристики головок сперматозоидов, окрашенных красителем Diff Quick, в динамике за два года исследований.

Результаты собственных морфометрических измерений по показателям длины акросомы и длины ядра заметно отличаются от данных по сперматозоидам *A. m. ligustica* (окрашенных гематоксилин-эозином) только по длине ядра ($4,44 \pm 0,61$ мкм) (Power et al., 2019), и незначительно от сперматозоидов *A. m. carnica* (окрашенных горечавкой фиолетовой) (Gontarz et al., 2016). Отличия в промерах могут свидетельствовать как о видовом различии сперматозоидов, так и элементарно о разных протоколах фиксации.

Статистический анализ полученных результатов указывает на то, что акросома сперматозоидов летних трутней оказалась достоверно длиннее ($t = 6,6$), чем весенних. Однако периметр и пло-

щадь ядра сперматозоидов весенних трутней достоверно больше, чем летних ($t = 3,6$ и $6,3$, соответственно). При этом показатели длины ядра обеих исследуемых групп статистически не отличались друг от друга. На первый взгляд, данные таблицы могут свидетельствовать об изменении морфометрических параметров головок сперматозоидов трутней между весенней и летней генерациями. Однако повторные исследования в период активного сезона 2021 года подтвердили полученные результаты только по показателю периметра ядра ($t = 10,5$).

По мнению T. Rijsselaere (Rijsselaere et al., 2004), на оценку морфологии сперматозоидов влияют многочисленные факторы, такие как техника фиксации и окрашивания, процедура подготовки суспензии спермы, применяемые разбавители, качество микроскопа и, возможно самое главное, навыки оценщика. Как отметили S. Hough и R.H. Foote (Hough, Foote, 2002), в свежееотобранной сперме размер гамет сильно зависит от суспендирующего раствора (разбавителя), влияющего на осмотические свойства мембран сперматозоидов. В настоящем исследовании результаты промеров головок сперматозоидов, разбавленных в трис-буфере, достоверно отличались от разбавленных в медовом разбавителе по длине акросомы ($z = -5,8$ при $p < 0,05$), площади ядра ($z = -15,4$ при $p < 0,05$) и его периметру (только весенней генерации $z = -7,3$ при $p < 0,05$). Вероятно, на результаты собственных исследований

Таблица 3. Морфометрические параметры головок сперматозоидов трутней ($n = 199-300$, г. Рыбное, Рязанская обл., 2020–2021 гг.)

Генерация трутней	Морфометрические параметры							
	акросома (длина), мкм		длина ядра, мкм		периметр ядра, мкм		площадь ядра, мкм ²	
	2020 год	2021 год	2020 год	2021 год	2020 год	2021 год	2020 год	2021 год
Весенние	$4,01 \pm 0,03^a$	$3,8 \pm 0,02^a$	$5,3 \pm 0,02$	$5,2 \pm 0,01$	$12,2 \pm 0,05^a$	$11,7 \pm 0,03^a$	$6,2 \pm 0,04^a$	$5,0 \pm 0,04^a$
Летние	$4,3 \pm 0,03^a$	$3,8 \pm 0,02$	$5,3 \pm 0,02$	$5,5 \pm 0,01$	$11,9 \pm 0,05^a$	$12,1 \pm 0,02^a$	$5,87 \pm 0,04^a$	$5,0 \pm 0,03^a$

Примечание: а – существенные различия на уровне $p < 0,05$.
Источник: собственные исследования.

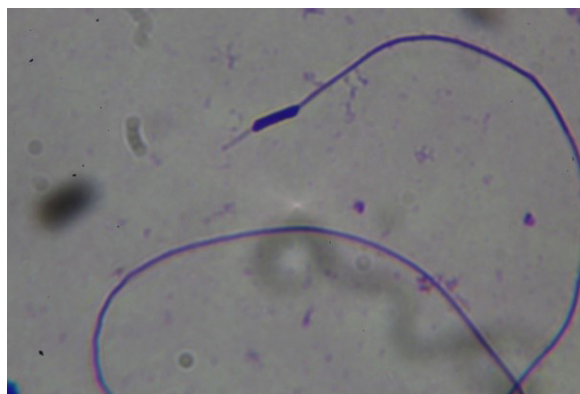
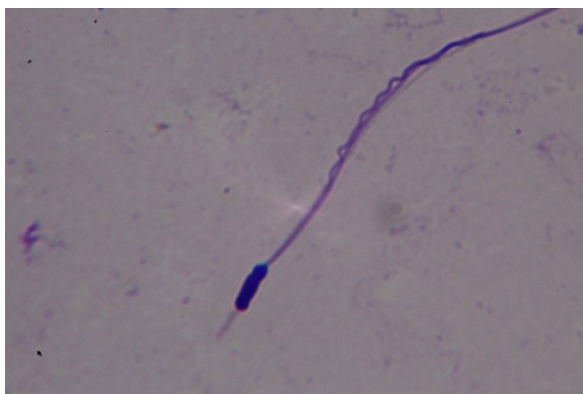


Рис. Фото сперматозоидов, окрашенных Diff Quick: (слева) на основе трис-буфера, (справа) на основе медового разбавителя (увеличение $\times 2000$, Альтами Люм 1 LED, Россия)

Источник: собственные исследования.

повлияло использование в первую очередь разных разбавителей. Трис-буфер, представляющий собой химическое соединение солей триса с аминокислотами и углеводами, мог способствовать большому проникновению в ядро и тело гаметы красителя Diff Quick. В связи с этим, данное обстоятельство в итоге нашло отражение в морфометрических промерах головок сперматозоидов. Визуальная оценка полученных снимков с мазков спермы с помощью цифровой камеры микроскопа позволила выявить некоторые различия в форме головок сперматозоидов (рис.).

Головки сперматозоидов, разбавленных в медовом разбавителе и окрашенных Diff Quick, имели более ровные контуры. Что же касается другого фактора – навыков оценщика, то все промеры за два года исследований осуществлял один и тот же оператор. Однако следует отметить, что подобные исследования выполняются впервые, в связи с чем затрудняется сравнение и обсуждение собственных результатов исследований с данными других авторов. Субъективность принятых решений затрудняет точную интерпретацию полученных данных. Отсутствие необходимого опыта на начальном этапе наших исследований все же могло отразиться на результатах.

Исследуемые качественные характеристики спермы были изучены на взаим-

ную связь с морфометрическими параметрами головок спермиев. Установлено, что параметры головок сперматозоидов не оказывают существенного влияния на качественные характеристики спермы трутней. За исследуемый период (2020–2021 гг.) наиболее стабильная связь выявлена между общей подвижностью сперматозоидов, их длиной ядра ($r = -0,3$ при $p < 0,05$) и площадью ядра головок ($r = -0,2$, $r = -0,3$ при $p < 0,05$).

Выводы

Таким образом, основные характеристики сперматозоидов трутней подвержены влиянию сезонности. По результатам исследований 2020 года наилучшим качеством была отмечена сперма трутней летней генерации ($t = 6,0$; $t = 14,3$; $t = 2,4$), а в 2021 году – весенней ($t = 6,2$; $t = 6,3$; $t = 5,5$). Причиной этого могли послужить природно-климатические условия местности, оказавшие влияние на рацион питания трутней. Причем улучшение качественных характеристик спермы сопровождается снижением в ней концентрации цинка, меди и железа.

Как показали исследования, большое значение для изучения морфометрических параметров сперматозоидов имеет выбор разбавителя для спермы ($z = -5,8$; $z = -15,4$; $z = -7,3$). Рекомендуется использовать

10%-ный медовый разбавитель (рН 9–10) для морфометрии головок сперматозоидов.

Между исследуемыми качественными характеристиками сперматозоидов и их морфометрическими параметрами существует как положительная, так и от-

рицательная корреляция ($r = -0,4-0,3$). За период 2020–2021 гг. наиболее стабильная связь выявлена между общей подвижностью сперматозоидов, длиной ядра ($r = -0,3$ при $p < 0,05$) и площадью ядра головок ($r = -0,2$, $r = -0,3$ при $p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

- Брандорф А.З., Ивойлова М.М., Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. (2012). Популяционно-генетическая дифференциация медоносных пчел Кировской области // Пчеловодство. № 7. С. 14–16.
- Гулов А.Н., Бородачев А.В. (2016). Качество спермы в оценке отцовских семей // Пчеловодство. № 10. С. 25.
- Лебедев А.А., Акунц К.Б., Степанов А.А. [и др.] (1972). Морфологические и биохимические характеристики спермы в связи с изучением причин бесплодия в браке // Акушерство и гинекология. № 2. С. 50–54.
- Науменкова В.А., Атрощенко М.М., Гулов А.Н., Широкова О.В., Фролова Н.А. (2020). Сравнительная оценка определения целостности мембран спермиев жеребцов различными методами // Российская сельскохозяйственная наука. № 3. С. 45–48.
- Печников П.П., Скаткин П.Н. (1949). Способ разбавления спермы жеребцов для искусственного осеменения лошадей. Патент на изобретение SU77192A1 по МПК А61D7/02. Моск. ул. Ак. Миллионщ., № 379661. Заявл. 22.04.1948. Опубл. 01.01.1949.
- Саттаров В.Н., Туктаров В.Р., Мухаметова Н.Ф., Иванцов Е.М. (2014). Аномалии глаз рабочих пчел на территории Башкортостана // Пчеловодство. № 5. С. 18–19.
- Чиндина С.Р., Валиуллина Р.Р., Ахтарьянова Г.Ш. (2017). Влияние генотоксичности среды на возникновение морфологических аномалий пчел в Самарской области // Современные проблемы пчеловодства: сб. докладов I международной научно-практической конференции по пчеловодству в Чеченской Республике. Грозный: Изд-во Чеченского гос. ун-та им. А.А. Кадырова. С. 256–259.
- Foote R.H. (2003). Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads. *Theriogenology*, 59, 1765–1773. DOI: 10.1016/s0093-691x(02)01236-0
- Gil M.C., Garcia-Herreros M., Baron F.J., Aparicio I.M., Santos A.J., Garcia-Marin L.J. (2009). Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, 71, 254–263. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.2007
- Gontarz A., Banaszewska D., Gryzinska M., Andraszek K. (2016). Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40, 598–602. DOI: 10.3906/vet-1511-6
- Hannock J.L. (1959). The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility. *International Journal of Fertility and Sterility*, 4, 347–359.
- Hough S.R., Foote R.H. (2002). Effect of density gradient osmolality on specific gravity of bull sperm and their separation, but not on the basis of sex. *Journal of Reproduction and Development*, 48, 399–407. DOI: 10.1262/jrd.48.399
- Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H. (1990). The relationship between sperm morphological classification and fertility in the stallion. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197, 389–394.
- Oettle´ E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, 257–260.
- Power K., D’Anza E., Martano M., Albarella S., Ciotola F., Peretti F., Maiolino P. (2019). Morphological and morphometric analysis of the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*) spermatozoa: A preliminary study in Campania region. *Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 6, 1–4. DOI: 10.7243/2054-3425-6-2

- Rhodes J.W. (2008). *Semen production in drone honeybees*. Rural industries research and development corporation, Australia, 08, 130. Available at: <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/08-130> (accessed 09.05.2013).
- Rijsselaere T., Van Soom A., Hoflack G., Maes D., de Kruif A. (2004). Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 62, 1292–1306. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.005
- Sekoni V.O., Gustafsson B.K. (1987). Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *British Veterinary Journal*, 143, 312–7. DOI: 10.1016/0007-1935(87)90064-9
- Tarliyah L., Boedino A., Walujo D. (1999). Motility of honeybee *Apis mellifera L.* (Hymenoptera, Apidae) spermatozoa in various storage temperature in dilution media containing different glucose levels. *Media Veteriner*, 6, 15–20. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/277773040>

Сведения об авторах

Алексей Николаевич Гулов – научный сотрудник, Федеральный научный центр пчеловодства (Российская Федерация, 391110, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, д. 22; e-mail: blee3@yandex.ru)

Александр Сергеевич Ласкин – младший научный сотрудник, Федеральный научный центр пчеловодства (Российская Федерация, 391110, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, д. 22; e-mail: laskinsania@yandex.ru)

Елена Петровна Лапынина – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, ученый секретарь, Федеральный научный центр пчеловодства (Российская Федерация, 391110, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, д. 22; e-mail: elena.p56@yandex.ru)

Анна Зиновьевна Брандорф – доктор сельскохозяйственных наук, доцент, директор, Федеральный научный центр пчеловодства (Российская Федерация, 391110, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, д. 22; e-mail: gordenchuk@mail.ru)

MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF THE SPERM OF HONEY BEE DRONES *APIS MELLIFERA L.* AS AN INDICATOR OF ITS QUALITY

Gulov A.N., Laskin A.S., Lapynina E.P., Brandorf A.Z.

*The sperm quality of honey bee drones is assessed by the motility, viability and concentration of spermatozoa. The morphology of the sperm nucleus is of great importance for fertilization. The most objective indicators of sperm nucleus morphology are the size and shape of the head. The purpose of the research is to study morphometric parameters of spermatozoa of honey bee drones *Apis mellifera L.* in the assessment of sperm quality. We harvested semen by artificial stimulation of endophallus eversion from sexually mature drones at the age of 22–30 days using SCHLEY-System artificial insemination equipment model 1.04. For the first time, we used honey diluent for sperm dilution, and fixation was performed using Diff Quick. We assessed*

spermatozoa for motility, concentration, and viability. We studied the following morphometric parameters: acrosome length (3.8–4.3 μm), nucleus length (5.2–5.5 μm), nucleus perimeter (11.7–12.2 μm), and area (5.0–6.2 μm^2). There was a correlation between morphometric parameters of spermatozoa and qualitative characteristics of sperm ($r = -0,4-0,3$ with $p < 0,05$). We noted the most stable relationship between total sperm motility, their nucleus length ($r = -0.3$ at $p < 0.05$) and nucleus area of the heads ($r = -0.2$, $r = -0.3$ at $p < 0.05$). As studies have shown, the choice of sperm diluent ($z = -5.8$; $z = -15.4$; $z = -7.3$) is of great importance for the study of spermatozoa morphometric parameters. The main characteristics of drones' spermatozoa are influenced by seasonality. The results of studies in 2020 showed the best sperm quality in the drones of the summer generation ($t = 6.0$; $t = 14.3$; $t = 2.4$), and in 2021 – in the spring generation ($t = 6.2$; $t = 6.3$; $t = 5.5$). The reason could be natural and climatic conditions of the area, which influenced the diet of drones.

Drone, sperm morphometry, sperm motility, sperm viability.

REFERENCES

- Brandorf A.Z., Ivoilova M.M., Il'yasov R.A. et al. (2012). Population-genetic differentiation of honey bees in the Kirov Region. *Pchelovodstvo=Beekeeping*, 7, 14–16 (in Russian).
- Chindina S.R., Valiullina R.R., Akhtar'yanova G.Sh. (2017). The influence of environmental genotoxicity on the occurrence of morphological anomalies of bees in the Samara Oblast. In: *Sovremennye problemy pchelovodstva: sb. dokladov I mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii po pchelovodstvu v Chechenskoj Respublike* [Modern Problems of Beekeeping: Proceedings of the I International Scientific and Practical Conference on Beekeeping in the Chechen Republic]. Grozny: Izd. Kadyrov Chechen State University (in Russian).
- Foote R.H. (2003). Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads. *Theriogenology*, 59, 1765–1773. DOI: 10.1016/s0093-691x(02)01236-0
- Gil M.C., Garcia-Herreros M., Baron F.J. et al. (2009). Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, 71, 254–263. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.2007
- Gontarz A., Banaszewska D., Gryzinska M. et al. (2016). Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40, 598–602. DOI: 10.3906/vet-1511-6
- Gulov A.N., Borodachev A.V. (2016). Sperm quality in the assessment of paternal families. *Pchelovodstvo=Beekeeping*, 10, 25 (in Russian).
- Hannock J.L. (1959). The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility. *International Journal of Fertility and Sterility*, 4, 347–359.
- Hough S.R., Foote R.H. (2002). Effect of density gradient osmolality on specific gravity of bull sperm and their separation, but not on the basis of sex. *Journal of Reproduction and Development*, 48, 399–407. DOI: 10.1262/jrd.48.399
- Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H. (1990). The relationship between sperm morphological classification and fertility in the stallion. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197, 389–394.
- Lebedev A.A., Akunts K.B., Stepanov A.A. et al. (1972). Morphological and biochemical characteristics of sperm in connection with the study of causes of infertility in marriage. *Akusherstvo i ginekologiya=Obstetrics and Gynecology*, 2, 50–54 (in Russian).
- Naumenkova V.A., Atroshchenko M.M., Gulov A.N. et al. (2020). Comparison of assessment of the membrane integrity stallion sperm using of different methods. *Rossiiskaya sel'skokhozyaistvennaya nauka=Russian Agricultural Sciences*, 3, 45–48 (in Russian).
- Oettle' E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, 257–260.

- Pechnikov P.P., Skatkin P.N. (1949). Method of diluting stallion semen for artificial insemination of horses. Patent for the invention SU77192A1, IPC A61D7/02. Moscow, Akademiya Millionshchikov St., No. 379661. Application April 22, 1948. Published January 01, 1949.
- Power K., D'Anza E., Martano M. et al. (2019). Morphological and morphometric analysis of the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*) spermatozoa: A preliminary study in Campania region. *Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 6, 1–4. DOI: 10.7243/2054-3425-6-2
- Rhodes J.W. (2008). Semen production in drone honeybees. *Rural industries research and development corporation*, Australia, 08, 130. Available at: <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/08-130> (accessed: May 9, 2013).
- Rijsselaere T., Van Soom A., Hoflack G. et al. (2004). Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 62, 1292–1306. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.005
- Sattarov V.N., Tuktarov V.R., Mukhametova N.F. et al. (2014). Anomalies of the eyes of worker bees in the territory of Bashkortostan. *Pchelovodstvo=Beekeeping*, 5, 18–19 (in Russian).
- Sekoni V.O., Gustafsson B.K. (1987). Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *British Veterinary Journal*, 143, 312–7. DOI: 10.1016/0007-1935(87)90064-9
- Tarliyah L., Boedino A., Walujo D. (1999). Motility of honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) spermatozoa in various storage temperature in dilution media containing different glucose levels. *Media Veteriner*, 6, 15–20. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/277773040>

Information about the authors

Aleksei N. Gulov – Researcher, Federal Beekeeping Research Center (22, Pochtovaya Street, Rybnoye, 391110, Russian Federation; e-mail: blee3@yandex.ru)

Aleksandr S. Laskin – Junior Researcher, Federal Beekeeping Research Center (22, Pochtovaya Street, Rybnoye, 391110, Russian Federation; e-mail: laskinsania@yandex.ru)

Elena P. Lapynina – Candidate of Sciences (Agricultural), Senior Researcher, Academic Secretary, Federal Beekeeping Research Center (22, Pochtovaya Street, Rybnoye, 391110, Russian Federation; e-mail: elena.p56@yandex.ru)

Anna Z. Brandorf – Doctor of Sciences (Agricultural), Associate Professor, Director, Federal Beekeeping Research Center (22, Pochtovaya Street, Rybnoye, 391110, Russian Federation; e-mail: gordenchuk@mail.ru)