

А. Н. Гулов¹, Н. А. Нагоева², К. В. Кугейко³, Р. М. Еникеев⁴, А. И. Шестакова¹, А. З. Брандорф¹

Морфометрический и морфологический анализ сперматозоидов трутней медоносных пчел *A. mellifera* L. в России

Аннотация.

Цель: изучение морфометрических параметров и морфологических характеристик головок сперматозоидов трутней серой горной кавказской породы медоносных пчел (*A. mellifera caucasica*), башкирской (*A. m. mellifera* L.), дальневосточной (*A. mellifera from far-eastern*) и породы пчел карника (*A. mellifera carnica*).

Материалы и методы. Для изучения морфометрических параметров головок сперматозоидов использовали дифференциальное окрашивание Diff Quick. Фиксацию изображений сперматозоидов на мазке осуществляли цифровой камерой Canon 1300D на биологическом микроскопе Altami-LUM 1 LED с использованием масляной иммерсии при увеличении 2000×. Морфометрические промеры проводили на программном обеспечении Altami Studio версии 3.5. Для каждой исследуемой породы пчел делали 200 изображений головок сперматозоидов, которые гарантировали 150 правильно измеренных головок. В общей сложности 573 сперматозоида было оценено по морфометрическим параметрам головок: длина ядра, длина акросомы, периметр ядра и его площадь.

Результаты. Результаты морфометрического анализа сперматозоидов трутней показывают индивидуальные различия между сперматозоидами внутри каждой из исследуемых пород медоносных пчел. В межпородном сравнении выявленные различия между сперматозоидами не являются статистически значимыми. В этом исследовании были определены минимальные и максимальные значения длины акросомы 3,14-5,02 мкм, длины ядра 4,02-5,9 мкм, периметра ядра 10,4-13,4 мкм и площади ядра 3,4-6,73 мкм² сперматозоидов трутней медоносной пчелы *A. mellifera* L. Морфологический анализ выявил наличие различных аномалий головки (включая акросому) и жгутика сперматозоидов.

Ключевые слова: трутень, морфометрия сперматозоидов, длина акросомы, длина ядра.

Авторы:

Гулов Алексей Николаевич – кандидат сельскохозяйственных наук; e-mail: blee3@yandex.ru;

Нагоева Наталья Александровна – e-mail: apis_kavkaz35@mail.ru;

Кугейко Кирилл Владимирович – e-mail: kd-mellifera@yandex.ru;

Еникеев Рамиль Мадарисович – e-mail: enikeev80@bk.ru;

Шестакова Анастасия Ивановна – кандидат сельскохозяйственных наук; e-mail: anastasiya_07.83@mail.ru;

Брандорф Анна Зиновьевна – e-mail: apis mellifera-mellifera-l@yandex.ru.

¹ ФНЦ пчеловодства; 391110, Россия, Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, 22;

² ППХ «Майкопское», ФНЦ пчеловодства; 385011, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Красногвардейская, д. 3.

³ АНО "Межрегиональный центр защиты и продвижения продуктов пчеловодства Республики Башкортостан "Алтын Солок" (Золотая борты); 450077, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Цюрупы, 40.

⁴ Общественная организация «Союз пчеловодов Приморского края»; 692501, Приморский край, г. Уссурийск, ул. Сергея Есенина, д. 21.

Введение. Медоносные пчелы являются важным элементом экологической системы. На их долю приходится 80-90 % опыляемых энтомофильных растений. Широкий ареал обитания медоносной пчелы в России обусловлен высокими адаптивными свойствами этого вида. Биологическое разнообразие медоносных пчел в России яв-

ляется генетическим ресурсом России. Этот ресурс поддерживает гомеостаз экосистем благодаря опылению энтомофильных растений. Биоразнообразие пчел в жизни человека имеет экологическое, социальное, экономическое и эстетическое значение. Особый интерес для сохранения биоразнообразия пчел представляют таксономически

изолированные виды и популяции, не похожие на другие и поэтому уникальные по своей генетической структуре. Эти виды часто являются эндемичными, то есть распространение ограничено одной территорией. Их исчезновение будет означать потерю биоразнообразия.

Сегодня состояние генофонда медоносных пчел является одной из главных причин кризиса пчеловодства в мире. Сохранение генетических ресурсов медоносных пчел является актуальной проблемой растущего экологического кризиса. Существует острая необходимость в использовании биотехнологических методов для сохранения генофонда медоносных пчел, таких как инструментальное осеменение пчелиных маток и сохранение спермы трутней. Инструментальное осеменение пчелиных маток спермой специально отобранных трутней является надежным способом контроля передачи генетической информации потомству, что необходимо в селекционной работе.

Сохранение спермы трутней медоносных пчел в сочетании с инструментальным осеменением является эффективной стратегией сохранения видов и их генетического разнообразия. Первой задачей для решения этих проблем в России является создание биоресурсной коллекции спермы трутней медоносных пчел (криобанк) [1]. Криобанк позволит сохранить генетическое биоразнообразие медоносных пчел, которым обладает Россия: среднерусская порода пчел (*A. m. mellifera* L.), карпатская (*A. mellifera carpatica*), серая горная кавказская (*A. mellifera caucasica*), дальневосточная (*A. mellifera from far-eastern*) и башкирская порода пчел (*A. m. mellifera* L.). Перед формированием биоресурсной коллекции сперма трутней подвергается полноценной оценке ее качественных показателей. Основными показателями качества спермы трутней медоносных пчел являются подвижность, жизнеспособность и концентрация сперматозоидов.

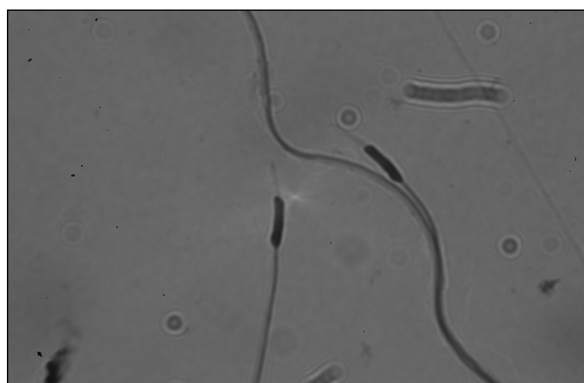
Подвижность обычно считается одной из наиболее важных характеристик, связанных с фертильностью сперматозоидов. Подвижность – это выражение жизнеспособности и структурной целостности сперматозоида [1]. Оценка жизнеспособности (функциональной целостности мембран) служит контролем точности оценки подвижности сперматозоидов [2]. Концентрация сперматозоидов также является выражением фертильности сперматозоидов. Однако полное представление о фертильности можно получить, только изучив морфологию сперматозоидов. На сегодняшний день имеется немного исследовательских работ, посвященных изучению морфо-

логии и морфометрии параметров сперматозоидов трутней медоносной пчелы.

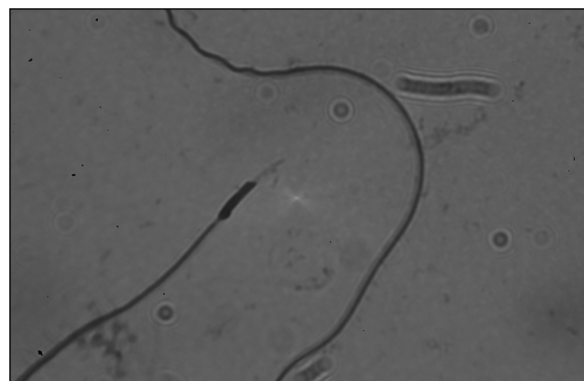
Tarliyah et al. [3] отметили довольно высокий процент сперматозоидов с морфологическими дефектами, такими как разрывы и расслоение жгутиков, двойные головки. Gontarz et al. [4] в своем исследовании обнаружили значительный процент сперматозоидов трутней *A. mellifera carnica* с двойными жгутиками (расслоение жгутика). Также авторы показали изменение морфометрических параметров сперматозоидов трутней в течение активного сезона. В весенний период активного сезона сперматозоиды трутней обладали несколько большей длиной, чем летом [4]. Морфологический анализ сперматозоидов трутней итальянской породы пчел *A. mellifera ligustica* [5] выявил аналогичные дефекты в виде разрывов и расслоений жгутиков, а также двойных головок. Результаты исследований Power et al. [5] указывают на наличие высокой вариативности общей длины сперматозоидов. В этом исследовании сперматозоиды трутней итальянской породы пчел оказались немного короче, чем сперматозоиды трутней *A. mellifera carnica*. Морфологический анализ сперматозоидов трутней *A. mellifera buckfast* [6] выявил наличие различных аномалий головки (включая акросомы) и жгутика. Аномалии в морфологии головки сперматозоидов касались формы и размера ядра. Обнаруженные изменения в акросоме представляли собой наличие изогнутой акросомы или полное ее отсутствие.

Наиболее распространенными и легко визуализируемыми изменениями в микроскопическом поле являются морфологические изменения жгутика сперматозоидов [6]. В результате морфологического анализа, например образцов заморожено-оттаянной спермы *A. m. mellifera* L. [7], было установлено значительное влияние криоконсервации на морфометрические параметры головок сперматозоидов. Размеры головок сперматозоидов из заморожено-оттаянных образцов были значительно меньше в сравнении со свежееотобранными.

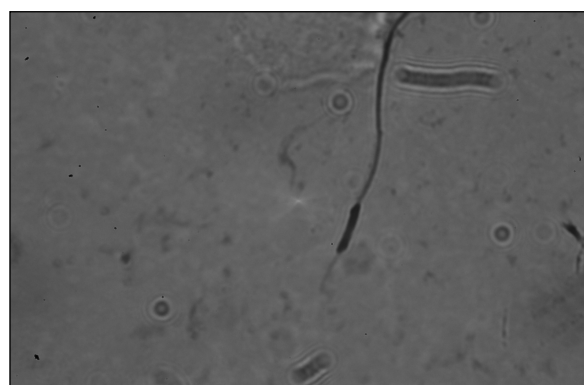
Скорость оплодотворения более тесно коррелирует с морфологией сперматозоидов, нежели с концентрацией или подвижностью [8, 9]. Высокая доля морфологически аномальных сперматозоидов в эякуляте снижает фертильный потенциал сперматозоидов у собак [10], лошадей [11], крупного рогатого скота [12] и свиней [13]. Морфология ядра сперматозоида имеет большое значение для оплодотворения. Наиболее объективными показателями морфологии ядра сперматозоида являются размер и форма головки [14]. Таким образом,



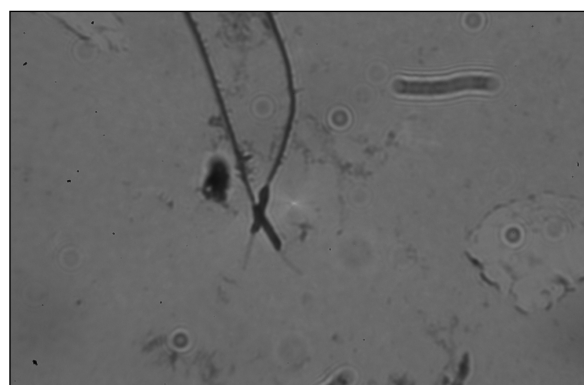
1а



1б



1в



1г

Рис. 1. Микроскопические изображения: нормальные головки сперматозоидов трутней без морфологических аномалий: а) дальневосточной породы пчел, б) башкирской породы, в) серой горной кавказской породы, г) породы пчел карника (окрашивание Diff Quick, увеличение 2000х).

морфология сперматозоидов также является показателем фертильности сперматозоидов.

Цель исследования – изучение морфометрических параметров головок сперматозоидов трутней серой горной кавказской породы пчел (*A. mellifera caucasica*), башкирской (*A. m. mellifera L.*), дальневосточной (*A. mellifera from far-eastern*) и породы пчел карника (*A. mellifera carnica*).

Материалы и методы. Сбор свежееотобранной спермы трутней серой горной кавказской породы пчел и породы карника проводили в филиалах Федерального научного центра пчеловодства: “Краснополянская опытная станция пчеловодства” (Краснодарский край, Адлерский район, пос. Молдовка, ул. Пчеловодов, 4) и “Племенное пчелоразведенческое хозяйство «Майкопское»” (Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Красногвардейская, 3). Сбор свежееотобранной спермы трутней башкирской породы пчел был проведен в АНО “Алтын Солок” (Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Цюрупы, 40). Сбор свежееотобранной спермы трутней дальневосточной породы пчел проводили на пасеке Федерального научного центра агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А. К. Чайки (Приморский край, г. Уссурийск, ул. Воложенина, 30).

От половозрелых трутней в возрасте 22-30 сут., совершивших выворачивание эндофаллоса посредством искусственной стимуляции, сперму отбирали посредством капиллярного шприца прибора для инструментального осеменения пчелиных маток SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz, Espelkamp Deutschland). Далее свежееотобранную сперму трутней в объеме 50 – 60 мкл помещали в пробирку erpendorf (Германия) объемом 1,5 мл, содержащую 500 мкл 10%-ного медового разбавителя [15] собственной модификации pH 9-11.

Полученную смесь пипетировали в течение 1 мин. Затем образцы суспензии центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 3 мин. После центрифугирования удаляли супернатантную жидкость из пробирки. Далее из образца суспензии спермы отбирали 1 мкл и помещали его в стерильную чашку Петри (Nunc), содержащую 2,5 мл 10%-ного медового разбавителя pH 9-11 [16]. Медовый разбавитель перед применением выдерживали на водяной бане в течение 10 мин при температуре 37°C. Подвижность свежееотобранной спермы оценивали визуально методом светлопольной микроскопии.

Подвижность сперматозоидов была оценена на “отлично”. Для изучения морфометрических параметров головок сперматозоидов использовали дифференциальное окрашивание Diff Quick

(ABRIS+, Санкт-Петербург, Россия). Окрашивание Diff Quick широко используется для изучения морфологии сперматозоидов животных [17,18]. Для каждой исследуемой породы медоносных пчел было заготовлено по 5 мазков спермы, окрашенных методом Diff Quick. Фиксация мазка в растворе № 1-10 мин, экспозиция в растворе № 2 (эозин) - 15 мин, затем высушенный мазок окрашивали в растворе № 3 (тиазин) - 10 мин. После чего окрашенные предметные стекла промывали в буфере pH 6,8 в течение 2 мин. Окрашенные образцы спермы исследовали на биологическом микроскопе Altami-LUM 1 LED с использованием масляной иммерсии при увеличении 2000х.

Фиксацию изображений сперматозоидов на мазке осуществляли цифровой камерой Canon 1300D. Морфометрические промеры проводили на программном обеспечении Altami Studio версии 3.5 (ООО "Альтами", Россия). Для каждой исследуемой породы пчел делали 200 изображений головок сперматозоидов, которые гарантировали 150 правильно измеренных головок. В общей сложности 573 сперматозоида было оценено по морфометрическим параметрам головок: длина ядра, длина акросомы, периметр ядра и его площадь.

Статистические различия между выборками были проверены с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) на программном обеспечении STATISTICA версии 13.0 (StatSof Russia, Москва). Групповые различия сравнивались с помощью критерия Крускала-Уоллиса. Эффекты считались значимыми при $p \leq 0,01$.

Результаты и обсуждение. Сперматозоиды трутней исследуемых пород медоносных пчел ха-

рактеризуются длинным жгутиком и удлинённой головкой, включающей в себя ядро и акросому (рис. 1). Результаты морфометрического анализа указывают на наличие индивидуальных различий между сперматозоидами в каждой исследуемой группе (породе) пчел (табл. 1).

Различия между средними показателями исследуемых групп медоносных пчел *A. mellifera* не являются статистически достоверными. Следовательно, головки сперматозоидов трутней исследуемых пород пчел имеют одинаковые размеры.

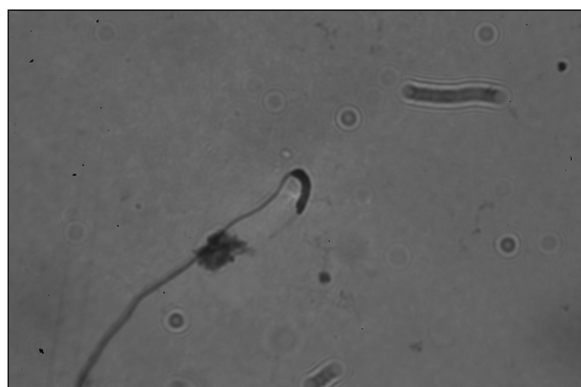
Морфологический анализ позволил выявить различные аномалии головки, включая акросому и жгутика сперматозоидов. В 8,5-9,1 % случаев мы наблюдали аномалии форм ядра (рис. 2 а, б). Аномалии акросомы, которые были выявлены в мазках спермы по всем исследуемым группам медоносных пчел, представляли собой изогнутую акросому в 17,2-18,3 % случаев (рис. 2 г). Наиболее распространенной аномалией жгутика сперматозоида является его расслоение (30-35 % случаев) (рис. 2 в).

В нашем исследовании средняя длина акросомы сперматозоидов трутней медоносных пчел *A. mellifera* был меньше, чем у сперматозоидов трутней породы пчел карника (*A. mellifera Carniolan*) [4] и трутней бакфаст (*A. mellifera buckfast*) [6], но больше, чем у трутней итальянской породы пчел (*A. mellifera ligustica*) [5] (табл. 2).

Средняя длина ядра сперматозоидов трутней *A. mellifera*, составляющая в нашем исследовании 5,18-5,4 мкм, согласуется с результатами работы Lenski et al. [21], но при этом оказалась немного больше, чем в исследованиях выше указанных авторов [4-6]. Однако полученные в нашем иссле-

Таблица 1. Результаты морфометрического анализа головок сперматозоидов трутней медоносных пчел *A. mellifera*

Морфометрические параметры	Порода пчел				Статистические показатели	
	Карника (<i>A. mellifera carnica</i>) (n = 157)	Башкирская (<i>A. m. mellifera L.</i>) (n = 151)	Серая горная кавказская (<i>A. mellifera caucasica</i>) (n = 137)	Дальневосточная (<i>A. mellifera from far-east-ern</i>) (n = 128)	Критерий Крускала-Уоллиса, H (3, n = 573)	Уровень значимости, P
	M±m	M±m	M±m	M±m		
Акросома, длина (мкм)	3,95±0,02 (3,45-4,8)	3,86±0,02 (3,14-4,9)	3,98±0,03 (3,14-4,64)	4,06±0,03 (3,2-5,02)	30,09	0
Ядро, длина (мкм)	5,18±0,02 (4,02-5,8)	5,18±0,02 (4,6-5,9)	5,38±0,02 (4,8-5,9)	5,4±0,02 (4,9-5,9)	124,52	0
Периметр ядра (мкм)	11,5±0,03 (10,4-12,5)	11,5±0,03 (10,4-13,0)	11,9±0,04 (10,8-13,4)	12,1±0,03 (10,9-12,9)	146,81	0
Площадь ядра (мкм ²)	4,38±0,03 (3,4-5,7)	4,42±0,03 (3,4-5,5)	4,82±0,04 (3,71-6,6)	5,02±0,04 (4,04-6,73)	165,96	0



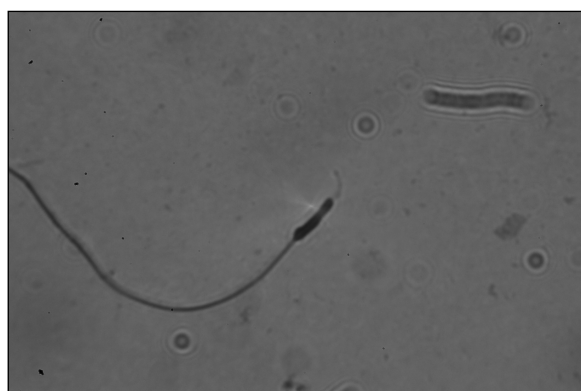
2а



2б



2в



2г

Рис. 1. Микроскопические изображения:
а, б) аномалии формы ядра сперматозоидов;
в) расслоение жгутика;
г) изогнутая акросома
(окрашивание Diff Quick, увеличение 2000х)

довании лимиты значений длины акросомы (3,14-5,02 мкм) и длины ядра (4,02-5,9 мкм) соответствуют минимальным и максимальным значениям длины ядра и акросомы сперматозоидов *A. mellifera buckfast* [6]. В нашей работе и в исследовании Bratu et al. [6] использовалось дифференциальное окрашивание Diff. Quick.

В исследовании [6] авторы проводили выбор оптимального красителя для изучения морфологии и морфометрического анализа сперматозоидов трутней медоносных пчел. В результате испытаний трех красителей Eosin G 2%, Spermas и Diff Quick, именно дифференциальное окрашивание Diff лучше идентифицировало акросому, в том числе ее увеличенную сферическую область. По причине использования одного метода окрашивания (Diff Quick) нам удалось получить результаты исследований морфометрических параметров акросомы и длины ядра сперматозоидов аналогичные Bratu et al. [6]. В исследовании Power et al. [5] сперматозоиды трутней итальянской породы пчел были окрашены красителем гематоксилин-эозин. В работе Gontarz et al. [4] сперматозоиды трутней породы пчел карника окрашивали пурпурным красителем горечавки и нитратом серебра AgNO_3 , приготовленного в растворе коллоидного желатина. При этом оба метода окрашивания позволяют идентифицировать отдельные структуры сперматозоидов, однако сперматозоиды, окрашенные нитратом серебра AgNO_3 , оказались все же менее отчетливыми.

На отличия в промерах головки сперматозоидов могут оказывать влияние методы фиксации и окрашивания, процедура обработки спермы, используемые разбавители, метод измерения, качество микроскопа и, возможно, самое главное, навыки оценщика [17, 22, 23]. В нашем исследовании морфометрический анализ головок сперматозоидов проводился одним оператором. Ранее было установлено [23], что размер головки сперматозоидов, разведенных, например, в трис-буфере [16], значительно отличался от размера головок сперматозоидов, разбавленных медовым разбавителем. Так, результаты промеров головок сперматозоидов, разбавленных в трис-буфере, достоверно отличались от разбавленных в медовом разбавителе в среднем по длине акросомы ($U = 2073$; $z = -5,8$; $p < 0,05$), площади ядра ($U = 5472$; $z = -15,4$ при $p < 0,05$) и периметру ядра ($U = 18331$; $z = -7,3$ при $p < 0,05$). Трис-буфер, представляющий собой химическое соединение солей триса с аминокислотами и углеводами, мог способствовать большему проник-

новению в ядро и тело гаметы красителя Diff Quick. В связи с чем данное обстоятельство в итоге нашло отражение в морфометрических промерах головок сперматозоидов [23]. В медовом разбавителе головка сперматозоида имела более вытянутую, продолговатую форму. При этом ядро сперматозоидов обладало на изображении плавными контурами. Также было установлено, что период активного сезона не оказывает влияния на морфометрические параметры головки сперматозоидов [23].

Вероятно, морфометрические параметры сперматозоидов трутней *A. mellifera* не будут иметь достоверных различий в межпородном сравнении. Существующие различия в результатах возникают в случае использования авторами разных методов окрашивания, процедур подготовки спермы и методов измерения. Очень важным обстоятельством остается здесь разработка единого протокола окрашивания и подготовки суспензии спермы. Применение единого протокола позволит получить результаты, имеющие биологическую значимость [14].

Выявленные в ходе нашего исследования аномалии ядра, акросомы и жгутика сперматозоидов согласуются с результатами исследований других авторов [3-6, 24]. Многие аномалии сперматозоидов могут являться выражением мужского бес-

плодия у большинства изученных видов [25]. Помимо того, различные факторы могут негативно повлиять на морфологию нормальной спермы, такие как: температура хранения, криоконсервация, генетические заболевания медоносных пчел, окружающая среда. Следует также отметить, что на сегодняшний день отсутствует общепринятая классификация аномалий в морфологии сперматозоидов трутней медоносной пчелы *A. mellifera*. Необходимы дальнейшие исследования для сбора большего количества данных, чтобы создать стандарт аномальных сперматозоидов трутней, который позволял бы использовать его для описания любых изменений.

Заключение. Это первое исследование, в котором проанализированы морфометрические параметры головок сперматозоидов трутней: серой горной кавказской породы пчел (*A. mellifera caucasica*), башкирской (*A. m. mellifera L.*), дальневосточной (*A. mellifera from far-eastern*) и породы пчел карника (*A. mellifera carnica*) в России. Результаты морфометрического анализа сперматозоидов трутней показывают индивидуальные различия между сперматозоидами внутри каждой из исследуемых пород медоносных пчел. В межпородном сравнении выявленные различия между сперматозоидами не являются статистически значимыми.

Исследование проведено при финансовой поддержке ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (№ 075-15-2021-1037 от 28 сентября 2021 года).

Таблица 2. Морфометрические параметры сперматозоидов трутней породы пчел карника [4], итальянской [5] и бакфаст [6]

Морфометрические параметры	Порода пчел		
	Итальянская <i>A. mellifera ligustica</i> (n=100)	Карника <i>A. mellifera carnica</i> (n=40)	Бакфаст <i>A. mellifera backfast</i> (n=50)
	M±m	M±m	M±m
Длина сперматозоида (мкм)	230,81±17,22	273,50±16,58	238,10±15,17
Длина жгутика (мкм)	222,96±17,15	264,07±16,57	229,13±15,15
Головка, длина (мкм)	7,85±0,65	9,43±0,38	8,97±0,27
Ядро, длина (мкм)	4,44±0,61	4,78±0,25	4,84±0,17
Акросома, длина (мкм)	3,58±1,21	4,73±0,32	4,12±0,21

Литература

1. Гулов А. Н. Биоразнообразие медоносной пчелы *A. mellifera L.* в России и пути его сохранения / А. Н. Гулов, З. Н. Сайфутдинова, А. З. Брандорф [Электронный ресурс] // Генетика и разведение животных. — 2022. — №4. — С.114-123. DOI: 10.31043/2410-2733-2022-4-114-123.
2. Naumenkova V. Comparative evaluation of different methods for assessing stallion sperm membrane integrity [Электронный ресурс] / V. Naumenkova, M. Atroshchenko, A. Gulov, O. Shirokova, N. Frolova // Russian Agricultural Sciences. — 2020. — V. 46. — № 4. — P. 381-384.

3. Tarliyah L. Motility of honeybee *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera*, *Apidae*) spermatozoa in various storage temperature in dilution media containing different glucose levels [Электронный ресурс] / L. Tarliyah, A. Boedino, D. Walujo // Media Veteriner. — 1999. — V. 6. — P.15-20.
4. Gontarz A. Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season [Электронный ресурс] / A. Gontarz, D. Banaszewska, M. Gryzinska, K. Andraszek // Turk J Vet Anim Sci. — 2016. — V.40. — P.598-602. DOI: 10.3906/vet-1511-6.
5. Power K. Morphological and morphometric analysis of the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*) spermatozoa: a preliminary study in Campania region [Электронный ресурс] / K. Power, E. D'Anza et. al // Veterinary Medicine and Animal Sciences. — 2019. — V. 6. — P. 1-4. DOI: 10.7243/2054-3425-6-2.
6. Bratu I. The influence of body weight on semen parameters in *Apis mellifera* [Электронный ресурс] / I. Bratu, V. Igna et. al // Insects. — 2022. — V. 13 (12). — P. 1141. DOI: 10.3390/insects13121141.
7. Gulov A. Morphofunctional changes in frozen-thawed sperm of *Apis mellifera* L. drones [Электронный ресурс] / A. Gulov, E Bragina // Russian Agricultural Sciences. — 2022. — V. 48. — № 6. — P.512-520.
8. Duncan W. Prediction of fertilization rates from semen variables [Электронный ресурс] / W. Duncan, M. Glew, X. Wang, S. Flaherty, C. Matthews // Fertility Sterility. — 1993. — V. 59. — P. 1233-1238.
9. Hinting A. Value of sperm characteristics and the result of in vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction [Электронный ресурс] / A. Hinting, F. Comhaire, L. Vermeulen, M. Dhorth, A. Vermeulen, D. Vanderberhove // International Journal Andrology. — 1990. — V. 13. — P. 59-64.
10. Oettle E. Sperm morphology and fertility in the dog [Электронный ресурс] / E. Oettle // J Reprod Fertil Suppl. — 1993. — V.47. — P. 257-260. PMID: 8229933.
11. Jasko D. The relationship between sperm morphological classification and fertility in the stallion [Электронный ресурс] / D. Jasko, D. Lein, R. Foote // J. Am. Vet. Med. Assoc. — 1990. — V. 197. — P. 389-394. PMID: 2391279.
12. Sekoni V. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination [Электронный ресурс] / V. Sekoni, B. Gustafsson // Br Vet J. — 1987. — V. 143. — P. 312-317. DOI: 10.1016/0007-1935(87)90064-9.
13. Hannock J. The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility / J. Hannock // Int J Fertil. — 1959. — V. 4. — P. 347-359.
14. Foote R. Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads [Электронный ресурс] / R. Foote // Theriogenology. — 2003. — V. 59. — P. 1765-1773.
15. Печников П., Скаткин П. Способ разбавления спермы жеребцов для искусственного осеменения лошадей. Патент на изобретение SU77192A1 в соответствии с IPC A61D7/02. Москва, ул. Академика Миллионщикова, № 379661. Заявление от 22.04.48. Опубликовано 01.01.49.
16. Rhodes J. W. Semen production in drone honeybees [Электронный ресурс] / J. W. Rhodes // Rural Industries Research and Development Corporation, Australia. — 2008. — V. 08. — 130 p.
17. Rijsselaere T. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer [Электронный ресурс] / T. Rijsselaere, A. Van Soom, G. Hoflack, D. Maes, A. de Kruif // Theriogenology. — 2004. — V.62. — P. 1292-1306. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.005.
18. Таджиева А. Порода козлов и морфометрические параметры сперматозоидов [Электронный ресурс] / А. Таджиева, Б. Иолчиев, А. Требунский // Материалы международной научной конференции. ВИЖ им. Л. К. Эрнста. — 2019. — С. 216-252. Москва—Россия.
19. Collins A. Effect of Varroa Infestation on Semen Quality / A. Collins, J. Pettis // Am. Bee J. — 2001. — V. 141. — P. 29-38.
20. Peng C. Y.-S. Ultrastructure of honeybee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation [Электронный ресурс] / C. Y.-S. Peng, C. Yin, L. R. S. Yin // Physiol. Entomol. — 1993. — V. 18. — P. 93-101.
21. Lensky Y. Ultrastructure of the Spermatozoon of the Mature Drone Honeybee / Y. Lensky, E. Ben-David, H. Schindler // J Apic Res. — 1979. — V.18. — P. 264-271.

22. Hough S. Effect of density gradient osmolality on specific gravity of bull sperm and their separation, but not on the basis of sex [Электронный ресурс] / S. Hough, R. Foote // J. Reprod. – 2002. – V.48. – P. 399-407. DOI: 10.1262/jrd.48.399.
23. Гулов А. Н. Морфологическая оценка спермы трутней медоносных пчел *Apis mellifera* L. как показатель ее качества [Электронный ресурс] / А. Н. Гулов, А. С. Ласкин, Е. П. Лапынина // Агрозоотехника. – 2022. – № 5 (3). – С. 1-12. DOI: 10.15838/alt.2022.5.3.6.
24. Lodesani M. Functional characterisation of semen in honeybee queen (*A.m.ligustica* S.) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination [Электронный ресурс] / M. Lodesani, D. Balduzzi, A. Galli // Ital. J. Anim. Sci. – 2004. – V. 3. – P.385-392.
25. Chenoweth P. Animal Andrology: Theories and Applications [Электронный ресурс] / P. Chenoweth, S. Lorton // CABI: Wallingford, UK. – 2014.

Gulov A.¹, Nagoeva N.², Kugeyko K.³, Enikeev R.⁴, Shestakova A.¹, Brandorf A.¹

Morphometric and morphological analysis of the *A. m. mellifera* L. spermatozoa in Russia

Abstract.

Honey bees are an important element of the ecological system. Today the state of the gene pool of honey bees is one of the main causes of the beekeeping crisis in the world. The quality of drone sperm is a significant factor for breeding productive bee colonies. Sperm concentration, motility, and viability of spermatozoa are an expression of sperm fertility. However, a full understanding of fertility can be obtained only by studying the morphology of spermatozoa. The purpose of this study was to describe the morphometric parameters and morphological characteristics of sperm heads of the Caucasian honey bee (*A. mellifera caucasica*), Bashkir honey bee (*A. m. mellifera* L.), of the Russian Far East honey bee (*A. mellifera* from far-eastern Russia) and Carnica honey bee (*A. mellifera carnica*) in order to determine standard features that could be used in further studies. Diff Quick staining was used to study the morphometric parameters of sperm heads. Sperm images were taken on each of the slides from a Canon 1300D digital cameras with an Altami-LUM 1 LED microscope using oil immersion at a magnification of 2000 ×. Sperm images and morphometric parameters were studied using Altami Studio software version 3.5. The morphometric dimensions for area nucleus, perimeter nucleus, nucleus length and acrosome length were acquired for 200 images drone spermatozoa for each *A. mellifera*. Acquiring 200 images assures that a minimum of 150 properly measured sperm heads are analysed after improperly measured sperm heads are deleted from the analysis. The sperm cells were randomly selected for the morphometric analysis. A total of 573 spermatozoa were assessed with morphometric parameters of sperm heads. The results of the morphometric analysis of drone spermatozoa show individual differences between the spermatozoa dimensions in each group. Between the *A. mellifera* groups the differences are not statistically significant. In this study, the min and max values of the acrosome length 3.14-5.02 μm, and nucleus length 4.02 -5.9 μm, perimeter nucleus 10.4-13.4 μm, and area nucleus 3.4-6.73 μm², of *A. mellifera* spermatozoa. The morphological analysis of the drone spermatozoa revealed the presence of various abnormalities of the head (including the acrosome) and flagellum of the spermatozoa.

Key words: Drone, sperm morphometry, acrosoma length, nucleus length

Authors:

Gulov A. – PhD (Agr. Sci.); e-mail: Blee3@yandex.ru;

Nagoyeva N. – e-mail: apis_kavkaz35@mail.ru;

Kugeiko K. – e-mail: kd-mellifera@yandex.ru;

Enikeev R. – e-mail: enikeev80@bk.ru;

Shestakova A. – PhD (Agr. Sci.); e-mail: anastasiya_07.83@mail.ru;

Brandorf A. – e-mail: Apis mellifera-mellifera-l@yandex.ru.

¹ Federal Tax Service of beekeeping; 391110, Russia, Ryazan region, Rybnoye, st. Postal, 22;

² PPX "Maykopskoye", Federal Tax Service of beekeeping; 385011, Republic of Adygea, Maykop, st. Krasnogvardeiskaya, d. 3.

³ ANO "Interregional Center for Protection and Promotion of Beekeeping Products of the Republic of Bashkortostan" Altyn Solok "(Golden Bort); 450077, Russia, the Republic of Bashkortostan, Ufa, 40 Zurupa St.

⁴ Public Organization "Union of Beekeepers of the Primorsky Territory"; 692501, Primorsky Territory, Ussuriysk, st. Sergei Yesenin, d. 21.

References

1. Gulov A. N. Biostasis of the honey bee *A. Mellifera L.* in Russia and ways to preserve it / A. N. Gulov, Z. N. Saifutdinova, A. Z. Brandorf [Electronic resource] // Genetics and breeding of animals. – 2022. – №4. – P.114-123. DOI: 10.31043/2410-2733-2022-4-114-123.
2. Naumenkova V. Comparative evaluation of different methods for assessing stallion sperm membrane integrity [Электронный ресурс] / V. Naumenkova, M. Atroshchenko, A. Gulov, O. Shirokova, N. Frolova // Russian Agricultural Sciences. – 2020. – V. 46. – № 4. – P. 381-384.
3. Tarliyah L. Motility of honeybee *Apis mellifera L. (Hymenoptera, Apidae)* spermatozoa in various storage temperature in dilution media containing different glucose levels [Электронный ресурс] / L. Tarliyah, A. Boedino, D. Walujo // Media Veteriner. – 1999. – V. 6. – P.15-20.
4. Gontarz A. Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season [Электронный ресурс] / A. Gontarz, D. Banaszewska, M. Gryzinska, K. Andraszek // Turk J Vet Anim Sci. – 2016. – V.40. – P.598-602. DOI: 10.3906/vet-1511-6.
5. Power K. Morphological and morphometric analysis of the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*) spermatozoa: a preliminary study in Campania region [Электронный ресурс] / K. Power, E. D'Anza et. al // Veterinary Medicine and Animal Sciences. – 2019. – V. 6. – P. 1-4. DOI: 10.7243/2054-3425-6-2.
6. Bratu I. The influence of body weight on semen parameters in *Apis mellifera* [Электронный ресурс] / I. Bratu, V. Igna et. al // Insects. – 2022. – V. 13 (12). – P. 1141. DOI: 10.3390/insects13121141.
7. Gulov A. Morphofunctional changes in frozen-thawed sperm of *Apis mellifera L.* drones [Электронный ресурс] / A. Gulov, E. Bragina // Russian Agricultural Sciences. – 2022. – V. 48. – № 6. – P.512–520.
8. Duncan W. Prediction of fertilization rates from semen variables [Электронный ресурс] / W. Duncan, M. Glew, X. Wang, S. Flaherty, C. Matthews // Fertility Sterility. – 1993. – V. 59. – P. 1233-1238.
9. Hinting A. Value of sperm characteristics and the result of in vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction [Электронный ресурс] / A. Hinting, F. Comhaire, L. Vermeulen, M. Dhoot, A. Vermeulen, D. Vanderberhove // International Journal Andrology. – 1990. – V. 13. – P. 59-64.
10. Oettle E. Sperm morphology and fertility in the dog [Электронный ресурс] / E. Oettle // J Reprod Fertil Suppl. – 1993. – V.47. – P. 257-260. PMID: 8229933.
11. Jasko D. The relationship between sperm morphological classification and fertility in the stallion [Электронный ресурс] / D. Jasko, D. Lein, R. Foote // J. Am. Vet. Med. Assoc. – 1990. – V. 197. – P. 389-394. PMID: 2391279.
12. Sekoni V. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination [Электронный ресурс] / V. Sekoni, B. Gustafsson // Br Vet J. – 1987. – V. 143. – P. 312-317. DOI: 10.1016/0007-1935(87)90064-9.
13. Hannock J. The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility / J. Hannock // Int J Fertil. – 1959. – V. 4. – P. 347-359.
14. Foote R. Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads [Электронный ресурс] / R. Foote // Theriogenology. – 2003. – V. 59. – P. 1765-1773.

15. Pechnikov P., Skatkin P. Method of diluting sperm stallions for artificial insemination of horses. Patent for the invention of SU77192A1 in accordance with the IPC A61D7/02. Moscow, st. Academician Millionshchikova, No. 379661. Application of 04.22.48. Published 01.01.49.
16. Rhodes J. W. Semen production in drone honeybees [Электронный ресурс] / J. W. Rhodes // Rural Industries Research and Development Corporation, Australia. – 2008. – V. 08. – 130 p.
17. Rijsselaere T. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer [Электронный ресурс] / T. Rijsselaere, A. Van Soom, G. Hoflack, D. Maes, A. de Kruif // Theriogenology. – 2004. – V. 62. – P. 1292-1306. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.005.
18. Tajiev A. Breed Kozlov and morphometric parameters of sperm [Electronic resource] / A. Tajiev, B. Iolchiev, A. Refunsky // Materials of the International Scientific Conference. Vizh them. L.K. Ernst. – 2019. – P. 216-252. Moscow, Russia.
19. Collins A. Effect of Varroa Infestation on Semen Quality / A. Collins, J. Pettis // Am. Bee J. – 2001. – V. 141. – P. 29-38.
20. Peng C. Y.-S. Ultrastructure of honeybee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation [Электронный ресурс] / C. Y.-S. Peng, C. Yin, L. R. S. Yin // Physiol. Entomol. – 1993. – V. 18. – P. 93-101.
21. Lensky Y. Ultrastructure of the Spermatozoon of the Mature Drone Honeybee / Y. Lensky, E. Ben-David, H. Schindler // J Apic Res. – 1979. – V.18. – P. 264-271.
22. Hough S. Effect of density gradient osmolality on specific gravity of bull sperm and their separation, but not on the basis of sex [Электронный ресурс] / S. Hough, R. Foote // J. Reprod. – 2002. – V.48. – P. 399-407. DOI: 10.1262/jrd.48.399.
23. Gulov A. N. Morphological assessment of the sperm of drone honey bees *Apis Mellifera* L. as an indicator of its quality [Electronic resource] / A. N. Gulov, A. S. Laskin, E.P. Lapinin // Agrozootechnics. – 2022. – № 5 (3). – P. 1-12. DOI: 10.15838/alt.2022.5.3.6.
24. Lodesani M. Functional characterisation of semen in honeybee queen (*A.m.ligustica* S.) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination [Электронный ресурс] / M. Lodesani, D. Balduzzi, A. Galli // Ital. J. Anim. Sci. – 2004. – V. 3. – P.385-392.
25. Chenoweth P. Animal Andrology: Theories and Applications [Электронный ресурс] / P. Chenoweth, S. Lorton // CABI: Wallingford, UK. – 2014.