

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора сельскохозяйственных наук, доцента Воробьевой Светланы Леонидовны на диссертационную работу Гулова Алексея Николаевича «Разработка методов консервации спермы трутней для сохранения генофонда *Apis Mellifera L.*», представленную в диссертационный совет Д 006.018.01 на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» по специальности 06.02.10 – частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства.

Актуальность темы. Медоносная пчела является экономической и экологической составляющей агропромышленного комплекса. Однако в последние десятилетия произошли существенные потери пчелиных семей во всем мире. Пчеловодами мира сообщается о высоких темпах потерь пчелиных семей – 35 - 75% в год.

Сложившееся на сегодняшний день состояние генофонда медоносной пчелы, является одной из основных причин современного кризиса в пчеловодстве. Сохранение генетических ресурсов медоносных пчел России, является актуальной проблемой в связи с бесконтрольной интродукцией различных пород и нарастающим экологическим кризисом. Появилась настоятельная необходимость использования биотехнологических методов сохранения генофонда медоносных пчел: искусственное осеменение пчелиных маток, консервация спермы трутней.

В связи с этим, сохранение спермы трутней медоносных пчел в сочетании с инструментальным осеменением пчелиных маток как эффективной стратегии для сохранения видов и их генетического разнообразия и является необходимой и важной задачей в улучшении генотипов пчелиных семей, что и определяет актуальность темы исследования данной диссертационной работы.

Достоверность и обоснованность научных положений, сформулированных в диссертации обусловлена экспериментальными данными, конкретностью методик и проведенных расчетов. Исследования выполнены на современном уровне и в достаточном количестве отобранного материала. Сформулированные диссертантом выводы и предложения сделаны на основе глубокого научного анализа результатов экспериментальных данных и логично подтверждают фактический материал, полученный в ходе проведения лабораторных исследований и научно-хозяйственного опыта.

По теме диссертации опубликована 21 научная работа, в том числе 11 публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ: «Пчеловодство», «Научная жизнь», «Генетика и разведение животных» «Вестник аграрной науки». Выводы и предложения производству вытекают из результатов исследований и отражают содержание диссертации.

Цифровой материал обработан биометрически. Экспериментальные данные, выводы и предложения производству, приведенные в автореферате, полностью соответствуют содержанию диссертации.

Научная новизна исследований заключается в разработке способа криоконсервации спермы трутней на основе 10% медового разбавителя с акации белой.

Разработан способ консервации спермы трутней в охлажденном состоянии при плюсовых температурах.

Проведена сравнительная оценка качества спермы трутней 5, 7 и 25 летней консервации в жидком азоте на основе полусинтетической среды С46 с использованием современной методики определения жизнеспособности сперматозоидов. Длительное хранение спермы трутней в жидком азоте не оказывает существенного влияния на сохранность плазматических мембран сперматозоидов. В свою очередь, высокие показатели жизнеспособности сопровождаются многочисленными аномалиями в морфологии заморожено-оттаянных сперматозоидов и заметным снижением их оплодотворяющей способности. В данной работе впервые проведен анализ морфологических и морфометрических параметров сперматозоидов после длительного криохранения. Оценка морфологических и морфометрических параметров спермы после консервации является неотъемлемым элементом прогнозирования ее оплодотворяющей способности.

Практическая и теоретическая значимость работы. Увеличение генетического биоразнообразия популяций позволит повысить эффективность селекции медоносных пчел. Криоконсервация спермы трутней позволяет провести дополнительный этап селективной работы с пчелами, так как во время криоконсервации погибают, в первую очередь, именно слабые нежизнеспособные сперматозоиды. Селекция медоносной пчелы решит задачу по генетической паспортизации аборигенных пород пчел с целью сохранения генофонда.

Устранение последствий бесконтрольной интродукции разных пород медоносных пчел на территории России немыслимо без инструментального осеменения пчелиных маток и консервации спермы трутней. Получены необходимые сведения по глубокому замораживанию спермы трутней медоносных

пчел, которые способствуют повышению эффективности искусственного осеменения пчелиных маток, и представляют интерес для специалистов в области разведения медоносных пчел. Полученные результаты исследований позволяют модернизировать существующую технологию криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы, разработанную НИИ пчеловодства. Дальнейшая апробация натурального пчелиного меда в качестве разбавителя позволит значительно упростить и удешевить процедуру криоконсервации спермы трутней, сделать ее доступной для племенных пчелоразведенческих хозяйств России. Результаты исследований по хранению спермы в охлажденном состоянии можно применять на практике уже сегодня в виде реализации сперматозоидов от чистопородных трутней основных пород пчел, разводимых на территории РФ с гарантией сохранения оплодотворяющей способности в течение 2 - 3 мес. в температурном диапазоне от 2 до 8 °С.

Оценка содержания работы. Объем диссертационной работы Гулова А.Н. составляет 158 страниц компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, выводов, предложения производству, списка литературы. Список литературы включает 216 источника, в т.ч. 132 на иностранном языке. В работе имеется 28 таблиц и 30 рисунков.

Во введении соискатель дает обоснование актуальности темы диссертации и необходимости научных исследований в избранном им направлении.

В первой главе представлен обзор литературы, где соискатель обобщил большое количество источников, непосредственно связанных с темой диссертации. В результате хорошего анализа, ранее проведенных научных исследований по теме диссертации, обоснованно определяется степень изученности научной проблемы.

В главе «Материалы и методы исследований» изложены методология и методы исследований. Исследования по теме диссертационной работы выполнялись с 2013 по 2020 гг. в условиях научно-экспериментальной пасеки и лаборатории селекции и молекулярно-генетических исследований медоносных пчел ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства», насчитывающей более 100 пчелиных семей породного типа «Приокский» среднерусской породы; научно-экспериментальной пасеки и лаборатории инструментального осеменения пчелиных маток «Краснополянской опытной станции пчеловодства» (г. Сочи, Краснодарский край), насчитывающей более 2 тыс. пчелиных семей серой горной кавказской породы пчел; лаборатории инструментального осеменения пчелиных маток «ППХ Майкопское» (г. Майкоп, Республика Адыгея), насчитывающей более 2 тыс. пчелиных семей карпатской породы пчел и породы карника.

Организуемые работы проводились в соответствии с «Методическими указаниями к постановке эксперимента в пчеловодстве» (РАСХН, 2000) и «Методами проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве» (НИИП, 2002).

С 2013 по 2016 гг. проводились исследования по выявлению оптимальных условий воспроизводства половозрелых трутней (способ одновременного выращивания трутней и неплодных маток в пчелиной семье-воспитательнице). Изучались функциональные показатели (концентрация, подвижность и жизнеспособность сперматозоидов) половозрелых трутней разного возраста (17, 22 и 30 сут.).

С 2017 по 2018 гг. проводился анализ качества спермы трутней после 5, 7 и 25 летней консервации в жидком азоте. Изучались способы хранения спермы трутней без криоконсервации (в течение 30, 60 сут. при 3 °С; 24 – 26 °С). Исследовались репродуктивные показатели пчелиных маток после инструментального осеменения спермой разных способов ее сохранения.

С 2019 по 2020 гг. проводились испытания различных разбавителей (культуральные среды, натуральный пчелиный мед) и криопротекторов (глицерин, метанол, этанол) для длительного хранения спермы трутней в жидком азоте.

В разделе «Результаты собственных исследований» проведены подробные исследования по влиянию различных сред на криоустойчивость спермы трутней и морфометрические параметры сперматозоидов. В результате чего диссертантом разработан способ криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы в медовом разбавителе с акации белой. Предложенный метод криоконсервации позволил сохранить жизнеспособность спермы на высоком уровне. В оттаянных образцах, замороженных в концентрированном (90 – 100%) меде в сочетании с 10% диметилсульфоксидом (ДМСО), жизнеспособность составила $79,6 \pm 1,2\%$, с 3% глицерином $78,0 \pm 1,4\%$.

Разработан способ хранения неразбавленной спермы в охлажденном состоянии без обработки от бактериальной контаминации в течение 30 сут. при 3 °С. Предложенный метод консервации спермы позволил сохранить жизнеспособность сперматозоидов на уровне $91,0 \pm 2,6\%$. Показатель концентрации сперматозоидов в семяприемнике маток, инструментально осемененных неразбавленной охлажденной спермой, достоверно ($p < 0,05$) превысил данные показатели опытных образцов, разбавленных в средах, и составил $1,2 \pm 0,5$ млн/мкл (0,04 – 2,78). Указанного количества сперматозоидов достаточно для полноценного воспроизводства пчелиной семьи.

Диссертантом приведен анализ функциональных показателей половозрелых трутней – концентрация сперматозоидов и активность ферментов

спермы, которые имеют тенденцию к увеличению с возрастом трутней. Наиболее высокие функциональные показатели половозрелости выявлены у трутней в возрасте 22 - 30 сут ($p < 0,05$). Концентрация сперматозоидов у 22 сут. трутней составила $4,9 \pm 0,7$ млн/мкл ($1,9 - 7,2$), 30 сут. – $5,9 \pm 0,4$ млн/мкл ($5,1 - 6,6$). Активность ферментов спермы дегидрогеназ у 22 сут. составила $24,0 \pm 0,6$ с ($23 - 25$), 30 сут. – $28,0 \pm 1,2$ с ($25 - 30$). Дегидрогеназы спермы тем активнее, чем выше концентрация сперматозоидов. Была установлена обратная тесная связь $r = -0,75$ между концентрацией сперматозоидов и активностью ферментов спермы.

В главе «Заключение» приводятся основные выводы, вытекающие из проведенных исследований. В целом, можно отметить, что поставленные перед соискателем цель и задачи успешно выполнены. Полученный научный материал и его анализ не вызывает сомнений. Автореферат по своей форме и содержанию соответствует данным, приведенным в диссертации и предъявляемым требованиям.

Вместе с тем по диссертационной работе имеются замечания:

1. Вы проводили анализ качества спермы трутней после 5, 7 и 25 летней консервации в жидком азоте, уточните какая порода пчел анализировалась в этом исследовании.
2. Почему в качестве разбавителя для изучения криоустойчивости спермы вы использовали именно мед с акации белой. Можно ли использовать другие виды медов для данного процесса.
3. В таблице 5 стр. 79 указано, что в анализируемой группе –ММ (где в сочетании с медом использовали метанол) произошла потеря образца. Уточните причину потери образца.
4. В таблице 15 «Темп яйцекладки пчелиных маток, искусственно осемененных разными объемами свежей спермы, за период осеннего наращивания пчел» показан учет печатного расплода. По требованию учет проводится через 12 сут. Согласно результатам исследований диссертанта, учет проводился в период с 15.08 по 30.08, то есть по истечении 15 сут. С чем это связано.
5. Какими породами медоносных пчел, на сегодняшний день, представлена биоресурсная коллекция образцов спермы, законсервированной с целью сохранения генофонда *Apis mellifera* L.
6. Чем, по Вашему мнению, можно объяснить увеличение количества сперматозоидов с аномальной морфологией головок при использовании ДМСО как до эквilibрации образцов спермы (таблица 1, стр. 73), так и после (таблица 2, стр. 74) в группе №3. Увеличение практически в два раза.

Заключение

Диссертационная работа Гулова Алексея Николаевича «Разработка методов консервации спермы трутней для сохранения генофонда *Apis mellifera* L.», представленная на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 06.02.10 – частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства, является завершенным самостоятельным квалификационным исследованием. По объему материала для исследования, новизне результатов, достоверности полученных данных и выводов, научно-практической значимости работа соответствует критериям п.п. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Исходя из изложенного, автор диссертации Гулов Алексей Николаевич достоин присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 06.02.10 – частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства.

Официальный оппонент:

доктор сельскохозяйственных наук, (06.02.10 – частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства),

профессор кафедры кормления и разведения сельскохозяйственных животных ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА

Воробьева Светлана
Леонидовна,

«28» января 2022 г.

Подпись Воробьевой С.Л. заверяю

Начальник управления кадрового делопроизводства:



Саратова Елена
Сергеевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия» (ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА). Адрес: 426069, г. Ижевск, ул. Студенческая, д. 11; телефон +7(3412)58-99-36, prorector@izhgsha.ru.