

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной и инновационной деятельности Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет»,  
доктор биологических наук, доцент  
Иван Владимирович Чудов



«31» января 2022 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ) на диссертационную работу Гулова Алексея Николаевича «Разработка методов консервации спермы трутней для сохранения генофонда *Apis mellifera* L.» представленной на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук в диссертационный совет Д 006.018.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» по специальности 06.02.10 Частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства

**Актуальность темы.** Биологическое разнообразие медоносных пчел - генетический ресурс России, которое в жизни человека имеет экономическое, экологическое и социальное значение. Особый интерес в сохранении биоразнообразия пчел представляют таксономически изолированные виды и популяции, уникальные по своей генетической структуре.

Однако, бесконтрольная интродукция различных пород способствует распространению заболеваний и скрытых генетических дефектов пчел. Массовая интродукция неадаптированных пород медоносных пчел ведет к утрате разнообразия эндемичных популяций, сопровождающаяся снижением возможностей селекционной работы и сокращением опылителей энтомофильных растений растений.

Такие биотехнологические методы как инструментальное осеменение пчелиных маток и консервация спермы трутней перспективны для сохранения генофонда исчезающих аборигенных пород и популяций медоносных пчел. Использование этих методов в пчеловодстве дает возможность избежать

спаривания пчелиных маток с трутнями неизвестного происхождения и надежно контролировать спаривание при проведении селекционно-генетических исследований. В этой связи, выполненная соискателем А.Н. Гуловым диссертационная работа, является актуальной, своевременной и имеет научно-производственное значение.

**Новизна исследования и достоверность полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Диссертантом в представленной работе решается крупная научная проблема, имеющая важное научно-хозяйственное значение. На основании проведенных исследований впервые дана комплексная оценка качеству свежесобранной неразбавленной спермы, заморожено-оттаянной и после краткосрочной консервации в охлажденном состоянии при плюсовых температурах.

Впервые предложена методика оценки качества спермы трутней, позволяющая отбирать наиболее ценных родоначальников (отцовские пчелиные семьи) для ведения селекционно-племенной работы на пасеке. Впервые на практике определен возраст половой зрелости для трутней породного типа «Приокский» среднерусской породы пчел.

Научно обоснован, разработанный и внедренный в производство малозатратный метод консервации свежесобранной неразбавленной спермы трутней в охлажденном состоянии при плюсовых температурах.

Научно обоснован, разработанный малозатратный метод криоконсервации спермы трутней в медовом разбавителе на основе натурального пчелиного меда с акции белой.

Полученные научные результаты репрезентативны и достоверны, статистически обработаны. Методики исследования и расчеты, выполненные в диссертации, корректны. Экспериментальные результаты получены на сертифицированном оборудовании.

Способ хранения неразбавленной спермы в охлажденном состоянии без обработки от бактериальной контаминации в течение 30 сут. при 3 °С внедрен на производство Краснополянской опытной станции пчеловодства в 2018 г.

Результаты исследований вошли в Раздел 1 Программы создания и развития Селекционно-племенного центра в области сельского хозяйства для создания и внедрения в АПК современных технологий на основе собственных разработок ФГБНУ «Федеральный научный центр пчеловодства». Программа Селекционно-племенного центра ФНЦ пчеловодства поддержана Министерством науки и высшего образования РФ в рамках «Соглашения о предоставлении грантов в форме субсидий в соответствии с п.4 ст. 78.1 Бюджетного кодекса РФ» от 31.05.2021 г. № 075-15-2021-561.



### **Теоретическая и практическая значимость результатов работы.**

Теоретическая значимость исследования обоснована возможностью длительного сохранения (25 лет) в жидком азоте спермы трутней медоносных пчел. Длительное криохранение спермы трутней, замороженной в полусинтетической среде, не оказывает влияния на целостность мембран спермиев, но существенно снижает их фертильность.

Результаты исследований Гулова А.Н. впервые продемонстрировали перспективу натурального пчелиного меда для сохранения жизненного ресурса спермы трутней в процессе криоконсервации. При этом, для замораживания использовалась сперма в состоянии мезабиоза и прекращения активного переноса. Для оптимизации существующей технологии длительного сохранения спермы трутней в жидком азоте, данный технологический прием представляет особую теоретическую значимость. Снижение метаболических процессов спермиев во время их хранения в состоянии глубокого охлаждения увеличивает сроки переживаемости спермиев и наилучшим образом сохраняет их оплодотворяющую способность.

Значение полученных результатов исследования для практики подтверждается тем, что впервые доказана возможность длительного сохранения в жидком азоте спермы трутней медоносных пчел.

Дальнейшая апробация натурального пчелиного меда в качестве разбавителя позволит значительно упростить и удешевить процедуру криоконсервации спермы трутней, сделать ее доступной для племенных пчелоразведенческих хозяйств РФ.

Результаты исследований по хранению спермы в охлажденном состоянии позволяют начать коммерческую реализацию спермадоз от чистопородных трутней основных пород пчел, разводимых на территории РФ с гарантией сохранения оплодотворяющей способности спермиев до трех мес.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Научные положения, представленные к защите в диссертационном совете, выводы и рекомендации сформулированы автором на основании проведенных экспериментальных исследований в период с 2013 по 2020 гг. в условиях научно-экспериментальной пасеки, 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» (филиал ФНЦ пчеловодства), насчитывающей более 2 тыс. пчелиных семей серой горной кавказской породы пчел; лаборатории

инструментального осеменения пчелиных маток «ППХ Майкопское» (филиал ФНЦ пчеловодства), насчитывающей более 2 тыс. пчелиных семей карпатской породы пчел и породы карника.

Лабораторные исследования проведены с применением современных биотехнологических методов исследований на сертифицированном оборудовании.

Автору принадлежит постановка, разработка и выполнение научных исследований по теме диссертационной работы. Автор на 90% самостоятельно провел все исследования по теме диссертации в лабораторных условиях ФГБНУ «Федеральный научный центр пчеловодства».

Автором в своей диссертационной работе научно доказана возможность длительного сохранения спермы трутней в жидком азоте. Обоснованность научных положений и выводов подтверждается практикой. Сперма трутней медоносной пчелы, замороженная в полусинтетической среде С46, сохраняет свою жизнеспособность на достаточно высоком уровне 71 – 93%. Но, получение потомства рабочих пчел менее 50% по итогам инструментального осеменения пчелиных маток, свидетельствует о снижении оплодотворяющей способности спермиев во время длительного криохранения.

Автором в своей диссертационной работе научно доказана возможность сохранности спермы трутней в охлажденном состоянии при плюсовых температурах и в составе разбавителей, приготовленных из естественных продуктов (натуральный пчелиный мед, яичный желток). Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается практикой. Показатель концентрации сперматозоидов в семяприемнике маток, инструментально осемененных неразбавленной охлажденной спермой составил  $1,2 \pm 0,5$  млн/мкл. Указанного количества сперматозоидов достаточно для полноценного воспроизводства пчелиной семьи. Пчелиные матки, инструментально осемененные заморожено-оттаянной спермой на основе медового разбавителя дали потомство рабочих пчел 96,5 – 99,1%.

Качественные характеристики спермы являются одними из определяющих факторов ее криоустойчивости. Автор в своей диссертационной работе научно обосновал связь возраста половозрелых трутней с качеством их спермы. В селекционно-племенной работе с трутнями медоносных пчел следует учитывать возраст трутней и такие качественные характеристики спермиев как концентрация, подвижность, жизнеспособность, морфология спермиев, «дыхание» спермы. Предпочтение следует отдавать половозрелым трутням в возрасте 20-30 суток. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается практикой. Концентрация сперматозоидов у 22 сут. трутней составила  $4,9 \pm 0,7$  млн/мкл, 30 сут. –  $5,9 \pm 0,4$  млн/мкл.



Активность ферментов спермы дегидрогеназ у 22 сут. составила  $24,0 \pm 0,6$  с, 30 сут. –  $28,0 \pm 1,2$  с.

**Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.** Результаты исследований и выводы диссертационной работы Гулова А.Н. имеют практическое значение и рекомендуются для внедрения в племенных пчелоразведенческих хозяйствах с целью повышения эффективности отрасли и рентабельности производства разведенческой продукции.

Полученные результаты исследований представляют практический интерес для специалистов, практикующих инструментальное осеменение пчелиных маток. Знание биологических особенностей полового созревания трутней позволит специалистам повысить качество инструментально осемененных маток, их выживаемость и прием пчелиными семьями.

Результаты научного поиска рекомендуются для использования в учебном процессе в высших учебных заведениях, реализующих основные образовательные программы по направлению подготовки «Зоотехния».

**Оценка объема, структуры и содержания работы.** Диссертационная работа Гулова А.Н. изложена на 159 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка литературы, приложения. Выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы резюмируют данную работу. Список использованной литературы включает 216 источников, в том числе 132 на иностранном языке.

Во «Введение» автором освещены вопросы современного состояния генофонда медоносной пчелы, дано обоснование актуальности изучаемой проблемы, сформулированы цель и задачи работы.

В разделе «Обзор литературы» рассмотрены исследования отечественных и зарубежных ученых по вопросам получения и сохранения племенного материала, воспроизводства медоносных пчел. Систематизированный литературный материал дает представление об основных направлениях исследований в изучаемой автором области пчеловодства.

В разделе «Материалы и методы исследований» приведена общая схема исследований, их направление и объем. За 7 лет работы диссертантом была отобрана сперма более, чем у 10 тыс. трутней, инструментально осеменено и исследовано более 0,5 тыс. пчелиных маток, заготовлено и исследовано порядка 50 образцов криоконсервированной и 50 образцов охлажденной спермы.

При изучении поставленных вопросов, автором были использованы современные методы исследований.

Экспериментальные результаты диссертационной работы изложены в разделе «Результаты собственных исследований», который состоит из 8 подразделов. Научно-исследовательская часть соответствует поставленным задачам, проиллюстрирована 28 информативными таблицами и 30 рисунками.

Предложенный протокол криоконсервации спермы трутней медоносной пчелы на основе натурального пчелиного меда с акации белой позволил сохранить жизнеспособность спермы на высоком уровне. В оттаянных образцах, замороженных в концентрированном меде в сочетании с 10% ДМСО, жизнеспособность составила  $79,6 \pm 1,2\%$ , с 3% глицерином  $78,0 \pm 1,4\%$ .

В образцах на основе 10% медового разбавителя с акации белой жизнеспособность спермы в сочетании с 10% ДМСО составила  $70,6 \pm 6,2\%$ , а с 3% глицерином  $86,8 \pm 9,3\%$ .

Предложенный диссертантом протокол консервации спермы трутней медоносной пчелы в охлажденном состоянии при  $3\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 30 сут. без разбавления и средств противобактериальной контаминации позволил сохранить жизнеспособность сперматозоидов на уровне  $91,0 \pm 2,6\%$ .

В главе «Заключение» диссертант интерпретирует результаты собственных экспериментальных исследований в сопоставлении с общеизвестными научными фактами, завершая выводами.

Выводы диссертации вытекают из данных собственных исследований и являются логичными ответами на поставленные для решения задачи.

Практические рекомендации и предложения по дальнейшей разработке темы являются логичным завершением работы.

Основные положения диссертационной работы доложены и одобрены на 5 международных научно-практических и 4 научно-практических конференциях.

Полученные автором экспериментальные данные приведены в 21 научных публикациях, в том числе 11 статей опубликованы в рецензируемых изданиях, рекомендованных в Перечне ВАК Минобрнауки РФ.

Оценивая работу Гулова А.Н. в целом положительно, следует отметить некоторые замечания и пожелания:

1. В разделе «Обзор литературы» отсутствует информация о биоразнообразии генетических ресурсов медоносной пчелы на обширной территории Российской Федерации, вследствие разнообразия ее природно-климатических условий.

2. В Таблице 7 (стр. 82) диссертации автором вводятся термины «Общая подвижность сперматозоидов» и «Активная подвижность сперматозоидов»,



выраженные в процентах. При этом, в разделе работы «Материалы и методы исследований» отсутствует сама методика определения данных показателей.

3. В разделе 4.1.1 (стр. 86) с целью оценки репродуктивных показателей пчелиных маток, инструментально осемененных заморожено-оттаянной спермой на основе 10% медового разбавителя, автор провел осеменение маток в количестве 6 шт. в одной повторности. Для подтверждения полученных результатов исследований, следовало, на наш взгляд, провести повторные испытания на большем количестве пчелиных маток.

4. В разделе 4.4 (стр. 104) автором освещены экспериментальные исследования по сохранению спермы трутней в охлажденном состоянии при плюсовых температурах, имеющих важное научно-практическое значение. Однако, автору не удалось осуществить инструментальное осеменение пчелиных маток охлажденной спермой из контрольных образцов и образцов, разбавленных средами Graces, C46 после 60 сут. хранения по причине отсутствия неплодных маток в конце активного сезона. Диссертанту следовало провести повторные испытания в следующем пчеловодном сезоне.

5. В таблице 20 и таблице 21 (стр. 109-110) у исследуемого параметра качества спермы «жизнеспособность» отсутствует статистический показатель – ошибка среднего арифметического.

6. При исследовании качественных показателей половозрелости трутней (раздел 4.5, стр. 116, 118) автором осуществлен малый объем выборки трутней ( $n=10$ ), который следовало бы увеличить до 30 шт.

7. Встречаются отступления от ГОСТа по оформлению источников литературы.

8. В качестве пожелания соискателю в последующих научных исследованиях необходимо обратить внимание на хозяйственно-полезные признаки пчелиных семей с матками, инструментально осемененными заморожено-оттаянной и охлажденной спермой трутней.

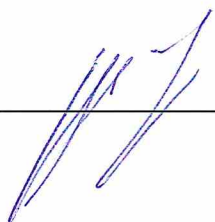
#### **Заключение.**

Диссертация Гулова Алексея Николаевича на тему: «Разработка методов консервации спермы трутней для сохранения генофонда *Apis mellifera* L.» является основополагающей научно-квалифицированной работой, вносит существенный вклад в зоотехническую науку и практику. В ней положено начало решения крупной научной проблемы по сохранению генетических ресурсов медоносной пчелы на территории Российской Федерации.

По объему проведенных исследований, актуальности, новизне, достоверности полученных данных, научной и практической ценности работа соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской

Федерации от 24.09.2013 года № 842, а ее автор – Гулов Алексей Николаевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 06.02.10 – частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства.

Диссертация, автореферат и отзыв рассмотрены и одобрены на заседании кафедры пчеловодства, частной зоотехнии и разведения животных ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, протокол № 7 от «31» января 2022 г.



Шелехов Дмитрий Викторович,  
кандидат сельскохозяйственных наук,  
доцент, исполняющий обязанности  
заведующего кафедрой пчеловодства,  
частной зоотехнии и разведения животных  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Башкирский государственный  
аграрный университет»

Сведения об организации: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, адрес: 450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34; тел/факс 7(347) 228-08-98; E-mail: bgau@ufanet.ru

