



Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: АГРОНОМИЯ И ЖИВОТНОВОДСТВО

2019 Том 14 № 1

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1

agrojournal.rudn.ru

Научный журнал

Издается с 2006 г.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-61171 от 30.03.2015 г.

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Главный редактор

В.Г. Плющиков, доктор с.-х. наук,
профессор, директор АТИ РУДН,
РУДН, Россия

E-mail: plushchikov_vg@rudn.university

Заместитель главного редактора

П.А. Докукин, кандидат технических
наук, доцент Агроинженерного департа-
мента АТИ РУДН, РУДН, Россия

E-mail: dokukin_pa@rudn.university

Ответственный секретарь

А.А. Терехин, кандидат с.-х. наук,
доцент АТИ РУДН,

РУДН, Россия

E-mail: terekhin_aa@rudn.university

Члены редакционной коллегии

Акимов В.А. — доктор тех. наук, профессор, главный научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института по проблемам гражданской обороны и чрезвычайных ситуаций МЧС России, Россия

Альтшулер А.М. — доктор мед. и общ. наук, старший научный сотрудник, Директор Исследовательского Департамента НУЧС, Израиль

Бородычев В.В. — доктор с.-х. наук, профессор, академик РАН, директор Волгоградского филиала ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт гидротехники и мелиорации им. А.Н. Костякова», Россия

Ватников Ю.А. — доктор вет. наук, профессор, директор департамента Ветеринарной медицины Аграрно-технологического института РУДН, Россия

Дончик И.М. — академик РАН, вице-президент РАН, Россия

Дубенок Н.Н. — доктор с.-х. наук, профессор, академик РАН, Российский государственный аграрный университет МСХА им. К.А. Тимирязева, Россия

Гитас Иоаннис — PhD, профессор Университета Аристотеля г. Салоники, Греция

Игнатов А.Н. — доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник НЦ «Биоинженерии» РАН, Россия

Карвальо Пауло Альфонсу — PhD, профессор Института Университета Бразилиа, Бразилиа

Ковеос Димитрис — PhD, профессор, декан факультета сельского хозяйства и природных ресурсов Университета Аристотеля г. Салоники, Греция

Комитов Борис — PhD, профессор Института астрономии Болгарской Академии Наук, Болгария

Кузнецов Вл.В. — доктор биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом физиологических и молекулярных механизмов регуляции процессов онтогенеза и адаптации Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Россия

Махутов Н.А. — доктор тех. наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник ИМАШ РАН, Советник РАН, Россия

Никитченко В.Е. — доктор вет. наук, профессор АТИ РУДН, Россия

Новиков А.Е. — доктор тех. наук, профессор, Волгоградский государственный технический университет (ВолГТУ), заведующий кафедрой «Процессы и аппараты химических и пищевых производств», Россия

Рикардо Валентини — доктор биол. наук, профессор Университета Туши, г. Витербо, Италия

Сааб Аби Сааб — PhD, ведущий научный сотрудник отдела физиологии и искусственного осеменения животных Американского университета Бейрута, Ливан

Савин И.Ю. — доктор с.-х. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Почвенного института им. В.В. Докучаева, Россия

Стакакис Димитрич — PhD, профессор Университета Фессалии, Греция

Уиаа Б.В. — доктор вет. наук, заслуженный деятель науки и техники РФ, академик РАН, директор Института ветеринарной экспертизы, санитарии и экологии МГУПП, Россия

Чамурлиев Г.О. — кандидат с.-х. наук, старший преподаватель Агроинженерного департамента АТИ РУДН, заместитель ответственного секретаря, Россия

**Вестник Российского университета дружбы народов.
Серия: АГРОНОМИЯ И ЖИВОТНОВОДСТВО**

ISSN 2312-7988 (online); 2312-797X (print)

4 выпуска в год.

<http://agrojournal.rudn.ru/agronomy/index>

Языки: русский, английский.

Материалы журнала размещаются на платформе РИНЦ Российской научной электронной библиотеки, Electronic Journals Library Cyberleninka, DOAJ, CABI.

Цели и тематика

Журнал *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство (Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство)* — периодическое международное рецензируемое научное издание в области сельского хозяйства. Журнал является международным как по составу редакционной коллегии и экспертного совета, так и по авторам и тематике публикаций.

Журнал предназначен для публикаций результатов фундаментальных и прикладных научных исследований российских и зарубежных ученых в виде научных статей, обзорных научных материалов, научных сообщений, библиографических обзоров по определенным темам научных исследований. В журнале могут быть опубликованы материалы, научная ценность которых и пригодность для публикации оценена редакционной коллегией журнала.

Журнал входит в перечень изданий, публикации которых учитываются **Высшей аттестационной комиссией России (ВАК РФ)** при защите диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Редакционная коллегия журнала приглашает к сотрудничеству авторов и специалистов, работающих по направлениям агрономия, животноводство, ветеринария, зоотехния, ветеринарно-санитарная экспертиза, техносферная безопасность, землеустройства и кадастра, ландшафтная архитектура для подготовки специальных тематических выпусков.

Правила оформления статей, архив и дополнительная информация размещены на сайте: <http://agrojournal.rudn.ru/agronomy/index>.

Электронный адрес: agroj@rudn.university.

Литературный редактор: К.В. Зенкин
Компьютерная верстка: Е.П. Довголевская

Адрес редакции:

115419, Москва, Россия, ул. Орджоникидзе, д. 3
Тел.: (495) 955-07-16; e-mail: ipk@rudn.university

Почтовый адрес редакции

117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2
Тел.: (495) 434-70-07
e-mail: agroj@rudn.university

Подписано в печать 21.03.2019. Выход в свет 29.03.2019. Формат 70×100/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура «Times New Roman».

Усл. печ. л. 11,63. Тираж 500 экз. Заказ № 13. Цена свободная.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Российский университет дружбы народов» (РУДН)

117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Отпечатано в типографии ИПК РУДН

115419, Москва, Россия, ул. Орджоникидзе, д. 3,
тел. (495) 952-04-41; ipk@rudn.university

© Российский университет дружбы народов, 2019



RUDN JOURNAL OF AGRONOMY AND ANIMAL INDUSTRIES

2019 VOLUME 14 No. 1
DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1
agrojournal.rudn.ru

Founded in 2006

Founder: PEOPLES' FRIENDSHIP UNIVERSITY OF RUSSIA

EDITOR-IN-CHIEF

Professor Dr. Plyushchikov V.G.
RUDN University, Russia

E-mail: pliushchikov_vg@rudn.university

HONORARY EDITOR

D-r Dokukin P.A.

RUDN University, Russia

E-mail: dokukin_pa@rudn.university

EXECUTIVE SECRETARY

Dr. Terekhin A.A.

RUDN University, Russia

E-mail: terekhin_aa@rudn.university

EDITORIAL BOARD

Akimov V.A. Doctor of Technical Sciences, Professor, chief researcher, All-Russian Institute for Research of Civil Defense and Emergencies Situations of the Emergencies Ministry of Russia, Russia

Altshuler A.M. Doctor of Medical and Social Sciences, Professor, Founding Head of NEMA, Israel

Borodichev V.V. Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Volgograd Branch of Russian Research Institute of Hydraulic Engineering and Land Reclamation, Russia

Vatnikov U.A. Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of the Clinical Medicine Department of Agrarian Technological Institute, RUDN University, Russia

Donnik I.M. Academician of RAS, Vice-president of RAS, Russia

Dubенок N.N. Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Russian State Agrarian University Moscow Agricultural Academy of Timiryazev, Russia

Ioannis Gitas PhD, Professor, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

Ignatov A.N. Doctor of Biological Sciences, Professor, Agrobiotechnological Department of Agrarian Technological Institute, RUDN University; Leading Researcher, Research Centre "Bioengineering", RAS, Russia

Paulo Alfonso Carvalho PhD, Professor, University of Brasilia, Brazil

Dimitris Koveos PhD, Professor, Dean of the Faculty of Agriculture and Natural Resources, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

Komitov Boris PhD, Professor, Institute of Astronomy of the Bulgarian Academy of Sciences, Bulgaria

Kuznetsov V.V. Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Physiological and Molecular Mechanisms of Ontogenesis and Adaptation Processes Regulation, Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russia

Makhutov N.A. Chief Researcher of IMASH RAS, Advisor of RAS, Russia

Nikitichenko V.E. Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Agrarian Technological Institute, RUDN University, Russia

Novikov A.E. Doctor of Technical Sciences, Volgograd State Technical University, Head of the Department "Processes and Apparatus of Chemical and Food Production", Russia

Ricardo Valentini Doctor of Biological Sciences, Professor, Tuscia University, Italy

Saab Abi Saab PhD in Biology, Leading Researcher, Department of Physiology and Artificial Insemination of Animals, American University of Beirut, Lebanon

Savin I.U. Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research of the Soil Institute of V.V. Dokuchaev, Russia

Dimitris Statakis PhD, Professor, University of Thessaly, Greece

Usha B.V. Honoured Scientist of Russia, Academician of RAS, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of the Institute of Veterinary Expertise, Sanitary and Ecology, Moscow State University of Food Production, Russia

Chamurliev G.O. Candidate of Agricultural Sciences, Senior Lecturer, Agricultural Engineering Department, Agrarian Technological Institute, RUDN University, Deputy Executive Secretary, Russia

RUDN JOURNAL OF AGRONOMY AND ANIMAL INDUSTRIES
Published by the RUDN University
(Peoples' Friendship University of Russia),
Moscow, Russian Federation

ISSN 2312-7988 (online); 2312-797X (print)

4 issues per year

<http://agrojournal.rudn.ru/agronomy/index>

Languages: Russian, English

Indexed/abstracted in Electronic Journals Library Cyberleninka, DOAJ, CABI.

Aims and Scope

RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries is an international peer-reviewed periodical covering the latest research in the field of Agricultural Sciences. The journal is international both in terms of the editorial structure and expert board and authors and subjects of publications.

The journal is intended to publish results of the fundamental and applied scientific researches of the Russian and foreign scientists in the form of scientific articles, review scientific material, bibliographical reviews on specific topics of scientific researches. The journal may publish the materials with the scientific value and suitability for publication valued by the journal editorial board.

The editorial board of the journal invites for cooperation the professionals engaged in such spheres as agronomy, animal industries, veterinary, veterinary-sanitary expertise, land use planning and cadaster, landscape architecture to prepare special thematic issues.

The editors are open to thematic issue initiatives with guest editors.

Further information regarding notes for contributors, subscription, and back volumes is available at <http://agrojournal.rudn.ru/agronomy/index>.

E-mail: agroj@rudn.university.

Review editor *K.V. Zenkin*
Computer design *E.P. Dvoglevskaya*

Address of the Editorial Board:
3 Ordzhonikidze str., 115419 Moscow, Russia
Ph. +7 (495) 952-04-41; e-mail: ipk@rudn.university

Postal Address of the Editorial Board:
8/2 Miklukho-Maklaya str., 117198 Moscow, Russia
Ph. +7 (495) 434-70-07;
e-mail: agroj@rudn.university

Printing run 500 copies. Open price

Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation
6 Miklukho-Maklaya str., 117198 Moscow, Russia

Printed at RUDN Publishing House:
3 Ordzhonikidze str., 115419 Moscow, Russia,
Ph. +7 (495) 952-04-41;
e-mail: ipk@rudn.university

© Peoples' Friendship University of Russia, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

РАСТЕНИЕВОДСТВО

- Niloufar Mahmoudi.** Влияние бета-аминомасляной кислоты на активность пероксидазы и полифенол-оксидазы у растений огурца, пораженных нематодой *Meloidogyne javanica* 7
- Кононенко Н.В., Диловарова Т.А., Канавский Р.В., Лебедев С.В., Баранова Е.Н., Федореева Л.И.** Оценка морфологических и биохимических параметров устойчивости различных генотипов пшеницы к хлоридному засолению 18
- Дубенок Н.Н., Гемонов А.В., Лебедев А.В., Глушенкова Е.В.** Формирование саженцев сливы при капельном орошении в условиях Центрального Нечерноземья 40

БОТАНИКА

- Тишкина Е.А., Чермных А.И.** Исследование эколого-фитоценотической приуроченности розы иглистой (*Rosa acicularis* L.) в лесопарковой зоне г. Екатеринбурга 49

ВЕТЕРИНАРИЯ

- Артюшина З.С., Абрамов П.Н., Полянский Н.Б., Ткачев Н.А., Сереженков В.А.** Оценка уровня нитрита — метаболита оксида азота — у лошадей с симптомокомплексом колик методом ЭПР-спектроскопии 57
- Нимбона К., Куликова Н.И., Буторе Ж., Нтунвенимана М.** Результаты трансплантации телкам эмбрионов, полученных от айрширской породы 66
- Споткай С.Е., Лыхина Л.Ю.** Анализ кожных узоров носового зеркала немецкой овчарки в сравнительном аспекте 73
- Судакова Д.П., Терентьева М.Г., Мардарьева Н.В.** Коэффициент де Ритиса в тканях желудка у разновозрастных чистопородных поросят, выращенных в условиях разных хозяйств 81

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА

- Никитченко В.Е., Рысцова Е.О., Чернышева А.Н.** Анализ и предупреждение рисков при изготовлении лабораторных микробиологических питательных сред методом FMEA 90

CONTENTS

CROP PRODUCTION

- Niloufar Mahmoudi.** Effect of beta-aminobutyric acid on activity of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes in cucumber infected with nematode *Meloidogyne javanica* 7
- Neonila V. Kononenko, Tat'yana A. Dilovarova, Roman V. Kanavsky, Svyatoslav V. Lebedev, Ekaterina N. Baranova, Larisa I. Fedoreeva.** Evaluation of morphological and biochemical resistance parameters to chloride salination in different wheat genotypes 18
- Dubenok N.N., Gemonov A.V., Lebedev A.V., Glushenkova E.V.** Formation of plum seedlings under drip irrigation in Central Non-Black Soil Region of Russia 40

BOTANY

- Elena A. Tishkina, Artem I. Chermnykh.** Ecological and phytocenotic characteristics of *Rosa acicularis* L. in Ekaterinburg forest park zone 49

VETERINARY SCIENCE

- Zinaida S. Artyushina, Pavel N. Abramov, Nikolai B. Polyansky, Nikolai A. Tkachev, Vladimir A. Serezhenkov.** Assessment of nitrite level — nitric oxide derivative — in horses with intestinal colic by ESR spectroscopy 57
- Nimbona C., Kulikova N.I., Butore J., Ntunzwenimana M.** The results of the embryo transfer to heifers from the Ayrshire breed 66
- Svetlana E. Spotkai, Lyudmila Y. Lykhina.** Analysis of skin patterns of german shepherd's rhinarium in comparative aspect 73
- Diana P. Sudakova, Maiya G. Terentyeva, Nataliya V. Mardaryeva.** De ritis ratio in stomach tissues in mixed-age pure-bred pigs, grown up in the conditions of different farms 81

VETERINARY SANITARY INSPECTION

- Vladimir E. Nikitchenko, Ekaterina O. Rystsova, Anastasiya N. Chernysheva.** Analysis and prevention of risks in the manufacture of laboratory microbiological culture media by FMEA method 90



РАСТЕНИЕВОДСТВО

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-7-17

EFFECT OF BETA-AMINOBUTYRIC ACID ON ACTIVITY OF PEROXIDASE AND POLYPHENOL OXIDASE ENZYMES IN CUCUMBER INFECTED WITH NEMATODE *MELOIDOGYNE JAVANICA*

Niloufar Mahmoudi

Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)
6 Miklukho-Maklaya Street, Moscow, 117198, Russian Federation
niloofarmahmoodi@ymail.com

Abstract. Beta-amino-butyric acid is introduced as an inducer of resistance in plants against plant pathogens. In this research, the induction of some defensive compounds including peroxidase and polyphenol oxidase enzymes by this compound against the rootstock node-producing nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber was investigated. The results showed that inoculation of cucumber roots infected with root-knot nematode with the chemical composition of BABA from the first day after inoculation increased the activity of peroxidase enzyme and reached its maximum on the fourth day of this activity. Induction of the activity of polyphenol oxidase enzyme showed a gradual increase with a significant difference in comparison to the control and healthy plants and reached the maximum on the fourth day. The electrophoresis of peroxidase isozymes showed that isozyme peroxidase forms in cucumber roots induced by BABA were much more potent than pathogen-induced isozymes. In plants treated with nematode plus BABA, two isozymes were $R_f = 00.31$ and $R_f = 34/0$, which were stronger than control (inoculated with nematode).

Key words: induction of resistance, nematode generating root node, beta-amino-butyric acid, peroxidase, polyphenol oxidase

INTRODUCTION

Nematodes generating root nodes (*Meloidogyne* spp.) are among the forced parasites and most important group of nematodes of plant parasite throughout the world [1–3]. These nematodes have a worldwide spread and have a very complicated mutual relationship with host compared to the other plant pathogens [4]. Various nematode killers including Chloropicrin, ethylene dibromide, D-D compound (1,3-Dichloropropene; 1,2-Dichloropropane) and methyl bromide have been introduced to control these nematodes. But in addition to much costs of using these chemical substances, various environmental dangers and problems have limited or prohibited use of them [5]. Induction resistance is considered to be a biological protection method aiming to activate the defensive system of plant and consequently limiting the pathogen's activity. The created resistance is not dedicated, is effective on a wide spectrum of pathogens, and varies

with antagonism in that active reaction of plant intervenes in this resistance. Also it is distinguished from chemical methods given that inducing agents are not poisonous for the pathogen [3, 6]. A group of agents such as pathogens (fungi, bacteria, viruses, and nematodes) that induce the over-sensitivity phenomenon, strains with weak pathogenicity or non-pathogenic, stimulants with pathogenic origin (Chitin, Glucan, proteins, fats), not live stimulants including synthetic chemical compounds like 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA), beta-aminobutyric acid (BABA), benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid s-methyl ester (BTH), salicylic acid, mineral salts, potassium phosphate and compounds with live organisms origins induce resistance in plants [7, 8]. The chemical composition of BABA is a synthetic non-protein amino acid that in many species of plants induces resistance against fungi pathogens, bacteria, viruses and nematodes [9, 10]. Oort and colleague (1960), for the first time, showed the induced resistance in tomato against late burning disease in the plants treated by BABA [11, 12]. BABA through stimulating a plant to make physical barriers, accumulation of proteins related to pathogenicity (PR-Proteins), phytotoxins, over-sensitivity reaction and rapid production of active oxygen are effective in stimulating defensive mechanisms of the plant against diseases. Different stimulators through a similar signaling route stimulate defensive system of the plant. BABA also acts in different signaling routes including salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene. However, the complete mechanism of BABA action on resistance induction is not exactly known [13]. Ben Rejeb (2018) showed that BABA resistance in the mutants of *Arabidopsis* plant in which routes of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene were damaged [14]. Therefore, in addition to the mentioned routes, it is possible that there are also other signaling routes for BABA. Plants always resist against the plant pathogenic agents and pests through a wide range of defensive compositions. Peroxidase and polyphenol-oxidase are among the enzymes related to plant defense against a wide range of plant pathogenic agents. These enzymes are oxidative and are involved in production and use of active oxygen, formation of lignin and other oxidized phenols as defensive barriers for strength of cell construction [15, 16]. Kim and colleagues showed that PR-1 is accumulated in the tobacco plants treated with BABA. Powell and Hodge (2018) reported that in the *Arabidopsis* plants, applying BABA in leaf-sprayed form even in low concentrations resulted in accumulation of proteins' PR (PR-5, PR-2 _PR-1) [17, 18]. The chemical composition of BABA creates a systemic resistance against peanut leaf spot disease (*Cercosporidium personatum*). Devran and Baysal (2018) showed that in the greenhouse conditions, BABA only is an inducer such that reduces this disease significantly [19]. Applying DL-2-Aminobutyric acid in soil has reduced the number of created scabies by *Nocobbus serendipiticus* without damage to tomato plants [12, 20]. Oka et al. (1999) demonstrated inducing resistance in tomato against nematode generating root node using BABA, through showing its effect on reduction of disease (evaluating number of scabies, number of nematode eggs and wet weight of root and stem) [20]. Given the notable results of using BABA against nematode generating root node by Oka et al. in 1999 [20], the impact of beta-aminobutyric acid as a stimulant of the defensive system of plant to induce resistance in cucumber against nematode generating root node was the objective of this research. In this investigation, also the possibility of induction and the rate of activity defensive enzymes of peroxidase and polyphenol oxidase have been evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Preparing *M. javanica* nematode population

After providing a plant sample infected to nematode, using Single egg mass method and reproducing it consecutively on the roots of tomato seedlings of type Rutgers, its purification and reproduction were performed. In most of the nematology investigation, the egg and larvae of two nematodes are used in order to create an infection. However, generally, because some eggs are not alive, using the second larvae of nematode is more common. Extracting egg and providing second larvae was done using Hussey (1973) method [21].

Preparing stimulant of beta-aminobutyric acid

Chemical substance of beta-aminobutyric acid (BABA) was supplied from Sigma Company and its 20 mM concentration was used for experiments [20].

Investigating the activity of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes in cucumber infected with the Nematode generating root node by inoculated with BABA

Disinfected cucumber seeds were planted in pots of 130 cm³ containing sterilized soil (including sand, leafy soil, farm soil with the ratio of 1 : 1 : 1). In the 4—6 leafy stages, the seedlings of cucumber were treated by the method of soaking soil-drench by 20 mM solution of beta-aminobutyric acid. 10 ml of the mentioned solution was added to each seedling [20]. One day after the treatment of cucumber seedlings with aminobutyric acid, the population of 2000 second larvae was inoculated for any plant. In order to hold constant the temperature around the plant root, pots were put in a big bath of water. The temperature of the water inside the bath was 27 °C and the environment temperature was set 27 ± 2 °C.

In this experiment inoculation of cucumber seedlings with only nematode (evidence), only BABA, nematode plus BABA and distilled sterile water as experiment treatments were considered. In the evidence plants instead of BABA, the distilled sterile water was used. After inoculation of seedling with nematode, a sampling of the plants' root was done in days, 1, 3, 4, 5 and 7 after inoculation of plants with nematode. This experiment was conducted with three iterations in the form of factorial experiment based on a completely random plan.

Extracting protein from plant tissue

An amount of 0.5 g of the plant root tissue was grinded well in a Chinese mortar that was cooled previously in the refrigerator using liquid nitrogen. Then 1 ml of a sample buffer of phosphate sodium (pH 6) was added to it and fully homogenized. During the whole work time, the mortar was in a bath full of ice. The resulting compound immediately was transferred to 1.5 ml micro-tubes and was centrifuged 13 000 rpm for 20 minutes at 4 °C (inside the refrigerator). The surface extract was separated to do experiments and was kept in -40 °C before performing an experiment [22].

Evaluation of the total soluble protein in the extract

Evaluation of the total soluble protein in the extract including providing standard curve using standard protein (bovine serum albumin, fraction 5) according to [23]. For the end, 20 µl of the extract of each sample was blended with 3 ml of Bradford reagent

in a little test tube then the amount of light absorption was read in wavelength $\lambda_{\max} = 595$ using the spectrophotometer. For each sample, three iterations were considered. The total amount of protein of each extraction was calculated using a standard curve.

Evaluation of the rate of peroxidase enzyme activity was made by [24] method. 2 ml of reaction mixture including some of the extract containing 40 mg protein, 20 micro-liters Guicoll and a sufficient amount of buffer 25 mM phosphate citrate (5.4 pH), such that the final measure is 2 ml, was blended in a test tube and spectrophotometer device was zeroed using this compound in wavelength $\lambda_{\max} = 475$ nm. Then 10 μ l of peroxidase hydrogen 30% was added to the mixture and was blended rapidly and changes of light absorption by 10-second intervals and for 1 minute was measured. The activity of enzyme was calculated in the form of changes of light absorption in a minute in mg protein.

Evaluating the rate of polyphenol oxidase enzyme activity

2 ml of the reaction compound including some of the extract sample containing 40 mg protein, 20 μ l of proline solution and a sufficient amount of buffer of 25 mM phosphate citrate (pH 6.4) was blended completely in a little test tube, such that the final measure is 2 ml, and this mixture was aerated for 2 minutes by vortex. Then spectrometer device using this compound was zeroed in wavelength $\lambda_{\max} = 515$ nm. Then 40 μ l of 100 mM Pyrocatechol solution was added to above compound and rapidly was blended and immediately the changes of light absorption was measured by 10-second intervals for 1 minute. The activity of the enzyme was calculated according to the changes of light absorption per minute in every mg of protein [24].

Indigenous electrophoresis (Native-PAGE) of peroxidase Isozymes

Indigenous electrophoresis using separator gel 12% and compactor 6% was conducted. In each well, some extract containing 30 μ g protein was poured and the final volume of each well was reached to 35 μ l using the sample buffer. Voltage in the compacting gel stage 75 V and in the separator gel stage 100 V was considered. Then the gel run through the glass plates exited and several times was washed by still water. Then in the buffer citrate-phosphate, 25 mM containing Glycol with the final concentration of 5 mM and pH 5.4 was put for 30 minutes on the shaker. Then 1 percent of hydrogen peroxidase was added to it drop by drop. After some moments brown bands showing peroxidase isozymes appeared [25].

RESULTS

Evaluating the rate of peroxidase enzyme activity

As it is observed in figure 1 in the two treatment of inoculation of seedlings with BABA only and with BABA plus nematode, the enzyme activity rate in day 1 and 3 had no significant difference with evidence (inoculated only with nematode), but since day 4 these two treatments had a significant difference with evidence. In the plants related to these two treatments and evidence, the maximum activity of the enzyme was observed in day 4 after inoculation with the nematode. The healthy plant treatment in day 1, 5 and 7 had no significant difference with evidence but in day, 3 and 4 had a sign with

evidence. In addition, the activity of peroxidase enzyme in the treatment of cucumber inoculated with BABA plus nematode in consecutive days increased with a significant difference compared to each other but there was a significant difference in days 5 and 7 of this treatment.

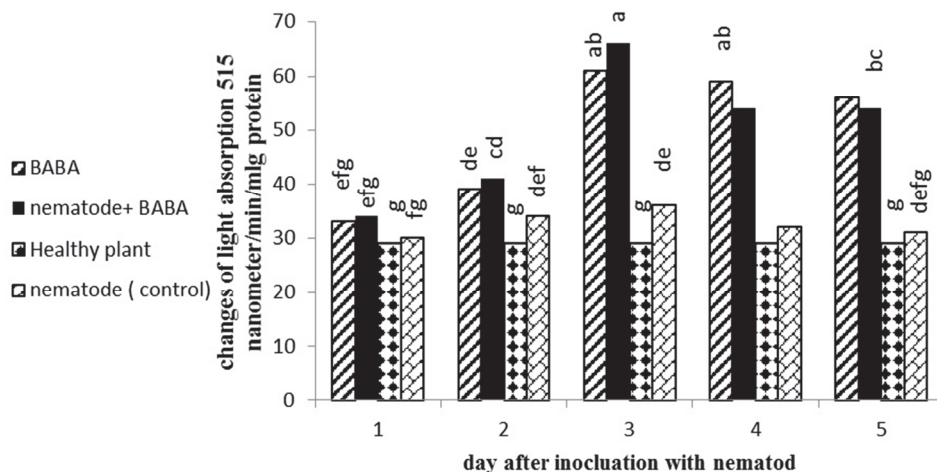


Figure 1. The effect of beta aminobutyric acid (BABA) on the activity of peroxidase enzyme in the root of cucumber infected with nematode generating root node. The numbers of this table are average of three iterations. Numbers having same letters, according to Danken's test has not a significant difference in level 5%. The activity of peroxidase enzyme has been shown in the form of changes light absorption in 475 nm per minute per mg protein

Evaluating the rate of activity of polyphenol oxidase enzyme

Two treatments of seedlings with BABA plus nematode and BABA only and treatment of healthy plant in day 1 with evidence (inoculated with nematode) had no significant difference but in days, 3 and 4 had a significant difference with evidence. The activity of the enzyme in treatment with BABA plus nematode in day 3 and 4 had no significant difference with each other and the maximum activity of the enzyme was in day 4 (figure 2).

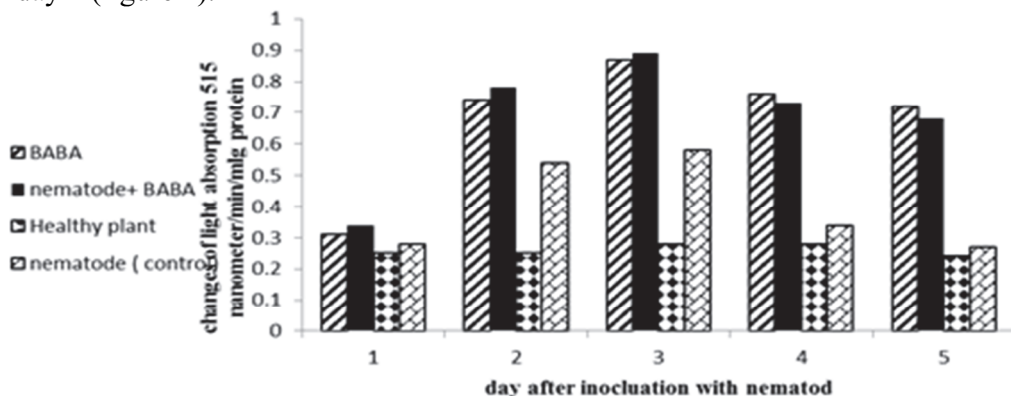


Figure 2. The effect of beta-aminobutyric acid (BABA) on the activity of polyphenol peroxidase enzyme in the seedlings of cucumber infected with nematode generating root node.

The numbers of this table are average of three iterations. Numbers having same letters, according to Danken's test hasn't a significant difference in level 5%. The activity of polyphenol peroxidase enzyme has been shown in the form of changes light absorption in 515 nm per minute per mg protein

Electrophoresis of peroxidase isozyme

As it is observed in figure 3, the bands of peroxidase isozymes are in red to brown color with a relative movement of $R_f = 0.31$ and $R_f = 0.34$.

A: bands of peroxidase isozyme are related to treating cucumbers inoculated with nematode plus BABA. In this treatment, two isozymes with $R_f = 0.34$ and $R_f = 0.31$ has been expressed that compared to the evidence (inoculated with nematode only) of healthy the plant (D) the bands have been expressed stronger. Isozymes with $R_f = 0.34$ I the healthy plant compared to this treatment was weaker in terms of density.

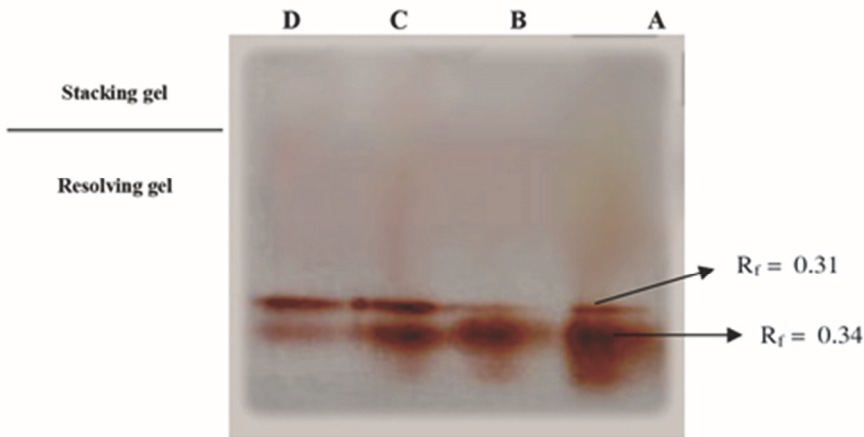


Figure 3. Indigenous electrophoresis of the peroxidase enzyme in the seedlings of cucumber infected with nematode generating root node inoculated with BABA and comparing it with a healthy plant respectively:

A: nematode plus BABA, B: BABA, C: nematode, D: healthy plant

B: bands of isozymes peroxidase is related to the treatment of seedlings of cucumber inoculated with BABA in which two isozymes with $R_f = 0.34$ and $R_f = 0.31$ have been expressed that compared to a healthy plant, isozyme with $R_f = 0.34$ is very weak in the healthy plant while in this treatment was observed with a notable density. Then it can be concluded that this isozyme is more important in the defensive mechanisms of the plant.

C: bands of isozymes is related to the treatment of cucumber seedlings inoculated with nematode (evidence) that compared to the treatment of nematode plus BABA, isozymes are weaker in density.

D: isozymic bands are related to the healthy plant. In this treatment, two isozymes with $R_f = 0.31$ and $R_f = 0.34$ have been expressed very weakly.

DISCUSSION

In plants confronted with microorganisms and development of mechanical damages, important physiologic changes are induced and generally, enzymes and defensive compositions of the plant are activated. Inducing resistance by increase and synthesis of the set of chemical substances occurs during a set of complicated reaction in the host

plant and cause stimulation of defensive system of the plant. Many substances have protein nature including defensive enzymes of peroxidase in the ligninization process, production of suberin and tannin (physical and chemical barriers) that intervene in the permeability the plant tissue against nematode generating root node. Despite important developments, regarding different stimulants and the defensive responses of plants are available but there is little information about the induced enzymes by BABA. In the recent study from the three isomer aminobutyric acid (α , β , γ), the isomer β was used. It has been found that BABA moves in plants systematically and explains some of the systemic protection that is created by BABA against plant diseases. In addition, induction of signal transmitters including salicylic acid and jasmonic acid also complement the systemic induction in the plant [16]. In this research, the induction resistance markers like peroxidase (POX) and polyphenol peroxidase (PPO) were used for examination. Peroxidase enzyme as a systemic induced and a marker is necessary for resistance induction in the plant to create cross-link and strengthening cell wall [26]. This enzyme by intervention in the final stage of lignin production increases the resistance against disease [18]. That for the end, the peroxidase of cell wall needs H_2O_2 and monolignal radicals [27]. The activity of peroxidase enzyme in the cucumber was measured by four different treatments including only nematode, BABA plus nematode, BABA only and healthy evidence. From the results of the examining the activity of peroxidase enzyme, it is inferred that BABA in the experiment has increased the activity of peroxidase enzyme. The activity of peroxidase enzyme began from day 1 after nematode inoculation and in day 4 reached its maximum activity, and then in the next days reduced gradually. The reduction that was taken place in the evidence harshly and in the other treatments very slowly is a reason for the sustainability of resistance induction effect by BABA. Similar to these results, the increase of peroxidase enzyme in the roots of cucumber treated by *P. corrugata* bacteria was observed against *Pythium aphanidermatum* fungi [28, 29]. Vasanthi et al. (2017) showed that treating rice by *Pseudomonas fluorescens* bacteria resulted in induction of systemic resistance against *Rhizoctonia solani* and the result of this resistance was increase of activity of kitinase and peroxidase enzymes activity. Castagnone-Sereno (2012) reported that peroxidase enzyme is involved in the resistance to nematode *Meloidogyne* spp. [30]. Also it was found that changes of activity of the peroxidase enzyme showed the biochemical changes of plant and some of resistance reactions [22, 31]. Reuveni and Bothma (1985) showed that increase of resistance of tomato plants inoculated with acibenzolar-S-methyl against bacterial canker of *Clavibacter michiganensis* ssp. [22]. *C. michiganensis* is associated with significant increase of activity of peroxidase and kitinase enzyme. In this study, also the activity of polyphenol oxidase enzyme in the cucumber was measured by the mentioned treatments. BABA resulted in an increase of activity of this enzyme compared to healthy plant and its activity had a significant difference with evidence (inoculated only with nematode). Therefore, BABA causes significant increase of activity of polyphenol oxidase in the roots of cucumber against nematode *M. javanica*. Reuveni showed that polyphenol oxidase enzyme in the roots of tomato increases at the temperature of 30 °C against nematode generating root node [22]. Also, it has been found that polyphenol oxidase in tomato plants is expressed very much and it is accompanied

with an increase of resistance to pathogens [32]. Shikano et al. (2018) identified in the roots of tomato infected with nematode generating root node *Meloidogyne* spp. genes in the defensive mechanisms of the plant that induces enzymes like polyphenol oxidase, catalase, lipoxygenase and peroxidase. The role of polyphenol oxidase in producing resistance in the *Penisetum glaucum* plant against *Sclerospora graminicola* was also demonstrated by [33, 34]. Considering the results obtained from changes of activity of the two-peroxidase and polyphenol oxidase enzymes in this experiment it can be said that nematode after reaching root and penetrating inside the root tissue, naturally hurts the root and through a lot of intercellular movement in the root tissue reaches the nutrition place. This penetration and movement of pathogen due to that is intercellular and does not destroy cells along its way results in the induction of defensive metabolites in a very little amount. By the introduction of nematodes into plant, some secretions are produced by the nematode that influences the biochemical reactions and accompanies with stopping some of the biochemical reactions and naturally reduction of synthesis of compositions and defensive enzymes [12]. Therefore, in the treatment with nematode, only the amount of induction of defensive enzymes of POX and PPO compared to the treatments inoculated with BABA is fewer significantly, while BABA causes the increase of induction and synthesis of peroxidase and polyphenol oxidase greatly. More research is needed about the effect of BABA on the other plants hosting nematode generating root node and other species of nematode on the mechanisms of action of BABA in producing resistance to nematode generating root node in cucumber.

CONCLUSIONS

The results showed that inoculation of roots of infected cucumber with root-knot nematode with the chemical composition of BABA from the first day after inoculation with nematode increased the activity of peroxidase enzyme and reached its maximum on the fourth day of this activity. Induction of the activity of polyphenol oxidase enzyme showed a gradual increase with a significant difference in comparison to the control and healthy plants and reached the maximum on the fourth day. The electrophoresis of peroxidase isozymes showed that isozyme peroxidase forms in cucumber roots induced by BABA were much more potent than pathogen-induced isozymes. In plants treated with nematode plus BABA, two isozymes were $R_f = 00.31$ and $R_f = 34/0$, which were stronger than control (inoculated with nematode).

ACKNOWLEDGMENTS

Ministry of Education and Science of the Russian Federation on the program to improve the competitiveness of RUDN University among the world's leading research and education centers during 2016—2020 financially supported this research.

© Niloufar Mahmoudi, 2019.

REFERENCES

- [1] Triki E., Trabelsi I., Amri M., Nefzi F., Kharrat M., Abbas Z. Effect of benzothiadiazole and salicylic acid resistance inducers on *Orobanche foetida* infestation in *Vicia faba*. *Tunisian Journal of Plant Protection*. 2018; 13(1):113—125.

- [2] Zhong Y., Wang B., Yan J., Cheng L., Yao L., Xiao L., Wu T. DL- β -aminobutyric acid-induced resistance in soybean against *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). *PloS one*. 2014; 9(1):e85142. Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0085142.
- [3] Gao J., Bi W., Li H., Wu J., Yu X., Liu D., Wang X. WRKY transcription factors associated with NPR1-mediated acquired resistance in barley are potential resources to improve wheat resistance to *Puccinia triticina*. *Frontiers in plant science*. 2018; (9):1486. Available from: doi: 10.3389/fpls.2018.01486.
- [4] Abad P., Favery B., Rosso M.N., Castagnone-Sereno P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular plant pathology*. 2003; 4(4):217—224. Available from: doi: 10.1046/j.1364-3703.2003.00170.x.
- [5] Nguyen C.N., Perfus-Barbeoch L., Quentin M., Zhao J., Magliano M., Marteu N., Da Rocha M., Nottet N., Abad P., Favery B. A root-knot nematode small glycine and cysteine-rich secreted effector, MiSGCR1, is involved in plant parasitism. *New Phytologist*. 2018; 217(2):687—699. Available from: doi: 10.1111/nph.14837.
- [6] Görlach J., Volrath S., Knauf-Beiter G., Hengy G., Beckhove U., Kogel K.H., Oostendorp M., Staub T., Ward E., Kessmann H., Ryals J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*. 1996; 8(4):629—643. Available from: doi: 10.1105/tpc.8.4.629.
- [7] Wagner A., Norris S., Chatterjee P., Morris P.F., Wildschutte H. Aquatic Pseudomonads inhibit oomycete plant pathogens of glycine max. *Frontiers in microbiology*. 2018; (9):1007. Available from: doi: 10.3389/fmicb.2018.01007.
- [8] Singh S., Singh A., Kumar S., Mittal P., Singh I.K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. *Insect science*. 2018. Available from: doi: 10.1111/1744-7917.12641.
- [9] Starý T., Satková P., Piterková J., Mieslerová B., Luhová L., Mikulík J., Kašparovský T., Petřivalský M., Lochman J. The elicitor β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitor—sterol interactions. *Planta*. 2018. 1—11. Available from: doi: 10.1007/s00425-018-3036-1.
- [10] Alshammari G.M., Balakrishnan A., Chinnasamy T. Protective role of germinated mung bean against progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats: A dietary therapy to improve fatty liver health. *Journal of Food Biochemistry*. 2018; 42(5):e12542. Available from: doi: 10.1111/jfbc.12542.
- [11] Oort A.J.P., Van Andel O.M. Aspects in chemotherapy. *Mededel. Opz. Gent*. 1960; 25:961—992.
- [12] Prasad S., Webster J.M. The effect of amino acid antimetabolites on four nematode species and their host plants. *Nematologica*. 1967; 13(2):318—320.
- [13] Cohen Y.R. β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant disease*. 2002; 86(5):448—457. Available from: doi: 10.1094/PDIS.2002.86.5.448.
- [14] Ben Rejeb I. *BABA in priming tomato for enhanced tolerance to drought, salinity and fungal stress and combinations thereof*. [Dissertation] Neuchâtel; 2018.
- [15] Singh S.K., Sung T.Y., Chung T.Y., Lin S.Y., Lin S.C., Liao J.C., Hsieh W.Y., Hsieh M.-H. ACR11 modulates levels of reactive oxygen species and salicylic acid-associated defense response in *Arabidopsis*. *Scientific reports*. 2018; 8(1):11851. Available from: doi: 10.1038/s41598-018-30304-0.
- [16] Wilkinson S., Pastor V., Paplauskas S., Pétriacq P., Luna E. Long-lasting β -aminobutyric acid-induced resistance protects tomato fruit against *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*. 2018; 67(1):30—41. Available from: doi: 10.1111/ppa.1272517.
- [17] Powell G., Hodge S. Effects of β -aminobutyric acid on aphid stylet activities. *IOBC-WPRS Bulletin*. 2018; 135:124—126.
- [18] Li K., Wu G., Li M., Ma M., Du J., Sun M., Sun X., Qing L. Transcriptome analysis of *Nicotiana benthamiana* infected by Tobacco curly shoot virus. *Virology journal*. 2018; 15(1):138. Available from: doi: 10.1186/s12985-018-1044-1.

- [19] Devran Z., Baysal Ö. Induction of resistance to *Meloidogyne incognita* by DL-beta amino butyric acid under salt stress condition. *Australasian Plant Disease Notes*. 2018; 13(1):20. Available from: doi: 10.1007/s13314-018-0304-7.
- [20] Oka Y., Cohen Y., Spiegel Y. Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL- β -amino-n-butyric acid. *Phytopathology*. 1999; 89(12):1138—1143. Available from: doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.12.1138.
- [21] Hussey R.S. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Rep.* 1973; 57:1025—1028.
- [22] Reuveni R., Bothma G.S. The relationship between peroxidase activity and resistance to *Sphaerotheca fuliginea* in melons. *Journal of Phytopathology*. 1985; 114(3):260—267. Available from: doi: 10.1111/j.1439-0434.1985.tb00851.x.
- [23] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72 (1—2):248—254.
- [24] Diniz I., Azinheira H., Figueiredo A., Gichuru E., Oliveira H., Guerra-Guimarães L., Silva M.C. Fungal penetration associated with recognition, signaling and defence-related genes and peroxidase activity during the resistance response of coffee to *Colletotrichum kahawae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2018. Available from: doi: 10.1016/j.pmpp.2017.12.005.
- [25] Porat R., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E.E., Droby S. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by β -aminobutyric acid. *European Journal of Plant Pathology*. 2003; 109(9):901—907. Available from: doi: 10.1023/B:EJPP.0000003624.28975.45.
- [26] Sabbagh E., Sabbagh S.K., Panjehkeh N., Bolok-Yazdi H.R. Jasmonic acid induced systemic resistance in infected cucumber by *Pythium aphanidermatum*. *Tarim Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Sciences*. 2018; 24(1):143—152.
- [27] Hossain M.A., Li Z.G., Hoque T.S., Burritt D.J., Fujita M., Munné-Bosch S. Heat or cold priming-induced cross-tolerance to abiotic stresses in plants: key regulators and possible mechanisms. *Protoplasma*. 2018; 255(1):399—412. Available from: doi: 10.1007/s00709-017-1150-8.
- [28] Dorjey S., Dolkar D., Sharma R. Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2017; 6(7):1335—1344. Available from: doi: 10.20546/ijcmas.2017.607.160.
- [29] Vasanthi V., Samiyappan R., Vetrivel T. Development of a new chitin based bio-formulation of *Pseudomonas fluorescens* and a natural insecticide (*Vitex trifolia*) against Indian Tomato Leaf Curl Virus (iTLCV) and its whitefly vector. *The Pharma Innovation Journal*. 2017; 6(11): 574—578.
- [30] Castagnone-Sereno P. *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species. *Nematology*. 2012; 14(2):133—138. Available from: doi: 10.1163/156854111X601650.
- [31] Nuñez A.M., Rodríguez G.A., Monteiro F.P., Faria A.F., Silva J.C., Monteiro A.C., Carvalho C.V., Gomes L.A., Souza R.M., de Souza J.T., Medeiros F.H. Bio-based products control black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and increase the nutraceutical and antioxidant components in kale. *Scientific Reports*. 2018; 8(1):10199. Available from: doi: 10.1038/s41598-018-28086-6.
- [32] Zheng Y., Wang X., Liu S., Zhang K., Cai Z., Chen X., Zhang Y., Liu J., Wang A. The endochitinase of *Clonostachys rosea* expression in *Bacillus amyloliquefaciens* enhances the *Botrytis cinerea* resistance of tomato. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(8):2221. Available from: doi: 10.3390/ijms19082221.
- [33] Shikano I., Pan Q., Hoover K., Felton G.W. Herbivore-induced defenses in tomato plants enhance the lethality of the entomopathogenic bacterium, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Journal of Chemical Ecology*. 2018; 44(10):947—956. Available from: doi: 10.1007/s10886-018-0987-4.

- [34] Babu A.N., Jogaiah S., Ito S.I., Nagaraj A.K., Tran L.S.P. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*. 2015; 231:62—73. Available from: doi: 10.1016/j.plantsci.2014.11.006.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Niloufar Mahmoudi — Department of AgroBiotechnology, Agrarian and Technological Institute, RUDN University, Moscow, Russian Federation; e-mail: niloufarmahmoodi@yml.com

For citation:

Mahmoudi N. Study of the activity of peroxidase and polyphenol oxidase enzymes in cucumber infected with the nematode generating *Meloidogyne javanica* root node by the beta-aminobutyric acid stimulant. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 2019, 14 (1), 7—17. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-7-17.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-7-17

ВЛИЯНИЕ БЕТА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И ПОЛИФЕНОЛ-ОКСИДАЗЫ У РАСТЕНИЙ ОГУРЦА, ПОРАЖЕННЫХ НЕМАТОДОЙ *MELOIDOGYNE JAVANICA*

Niloufar Mahmoudi

Российский университет дружбы народов
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Аннотация. Бета-аминомасляная кислота вводится в качестве индуктора устойчивости растений к патогенам растений. В данной работе была исследована индукция некоторых защитных соединений, в том числе ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы этим соединением, против нематоды *Meloidogyne javanica*, продуцирующей узел корневища, в огурце. Результаты показали, что инокуляция корней зараженного огурца нематодой из корневых узлов с химическим составом БАМК с первого дня после инокуляции нематодой увеличивала активность фермента пероксидазы и достигала своего максимума на четвертый день этой активности. Индукция активности фермента полифенолоксидазы показала постепенное увеличение со значительной разницей по сравнению с контрольными и здоровыми растениями и достигла максимума на четвертый день. Электрофорез пероксидазных изоформ показал, что изоферментные пероксидазные формы в корнях огурца, индуцированные БАМК, гораздо более эффективны, чем индуцируемые патогеном изоформы. У растений, обработанных нематодой плюс БАМК, два изофермента имеют $R_f = 0,31$ и $R_f = 34/0$, которые являются более сильными, чем контроль (инокулированные нематодой).

Ключевые слова: индукция резистентности, корневая галловая нематода, бета-амино-масляная кислота, пероксидаза, полифенолоксидаза

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-18-39

ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ К ХЛОРИДНОМУ ЗАСОЛЕНИЮ

Н.В. Кононенко¹, Т.А. Диловарова¹, Р.В. Канавский^{1,2},
С.В. Лебедев^{3,4}, Е.Н. Баранова¹, Л.И. Федорева^{1,5}

¹ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН
Москва, Российская Федерация, 127550

²РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева
Москва, Российская Федерация, 127550

³Оренбургский государственный университет
Оренбург, Российская Федерация, 460018

⁴Федеральный научный центр РАН,
Оренбург, Российская Федерация, 460000

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Москва, Российская Федерация, 119192
nilava@mail.ru

Аннотация. Проблема определения потенциала солеустойчивости пшеницы — одна из наиболее актуальных в селекционной практике для районов с первичным и вторичным засолением. Наличие больших площадей засоленных почв является значительным препятствием для роста, развития и стабильности получения высокого урожая сельскохозяйственных растений. В связи с этим существует необходимость всестороннего изучения и усовершенствования методов диагностики на ранних этапах онтогенеза. Для идентификации маркеров солеустойчивости были взяты разные генотипы пшеницы *Triticum aestivum* и *Triticum durum*. В качестве маркеров солеустойчивости были использованы как морфометрические показатели сортов пшеницы, так и некоторые биохимические параметры. На данном этапе было показано, что для оценки устойчивости сортов пшеницы к действию хлоридного засоления необходима всесторонняя характеристика сортов пшеницы.

Ключевые слова: пшеница, NaCl, устойчивость, рулонная культура, фенотипические и биохимические маркеры

ВВЕДЕНИЕ

Избыточное засоление почвы неблагоприятно для большинства культурных растений. Соли влияют на физиологические, биохимические и молекулярные функции растений и, следовательно, приводят к снижению продуктивности и качества сельскохозяйственных культур во всем мире [1]. Площади засоленных сельскохозяйственных угодий имеют тенденцию к постоянному увеличению в результате процессов вторичного засоления, которое ежегодно приносит большой урон многим отраслям растениеводства и ограничивает использование площадей под

сельскохозяйственные культуры в засушливых районах нашей страны [2, 3]. Общая площадь засоленных почв в мире составляет более 950 млн га [4]. Увеличение мирового объема производства зерновых злаков, для России в частности, является крайне актуальным. Потребности увеличения производства могут быть удовлетворены за счет расширения территории культивирования и/или повышения урожайности наиболее распространенной в России злаковой культуры мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* Host.). Основными препятствиями для расширения посевных площадей пшеницы являются абиотические факторы (холод, засуха, затопление, засоление, высокая кислотность и др.), к которым пшеница недостаточно устойчива, вызывающие заметное снижение урожайности. В настоящее время засоление почвы относится к одному из основных лимитирующих факторов, негативно влияющих на рост и развитие пшеницы. В условиях засоления у пшеницы падает урожайность и ухудшается качество зерна (размер, равномерность, выполненность [5—8]).

Проблема определения потенциала солеустойчивости пшеницы — одна из наиболее актуальных в селекционной практике для регионов, для которых характерно как первичное, так и вторичное засоление. Необходимость всестороннего изучения и усовершенствования методов диагностики на ранних этапах онтогенеза определяется наличием во многих странах засоленных почв, занимающих большие площади, представляющих значительное препятствие для роста, развития и стабильности получения высокого урожая сельскохозяйственных растений [9].

Известно о различиях в солеустойчивости отдельных видов пшеницы, а также о возможности использования диких видов для повышения толерантности к соли, что связывают с участием солеустойчивых генотипов и даже галофитов в геноме современных культурных пшениц [10].

Одним из способов, позволяющих преодолеть негативное воздействие фактора засоления, служит использование толерантных к засолению селекционных линий и сортов пшеницы. Эффективная всесторонняя оценка и отбор таких линий должна стать надежным инструментом для адресного подбора сортов в зависимости от климатических, химических и механических условий культивирования в конкретном хозяйстве. Однако для обеспечения оптимального подбора представляется важной надежная оценочная система, позволяющая по простым доступным параметрам оценивать процессы, способные проявляться на поздних этапах при закладке урожая. Для получения полной информации наиболее перспективным является совокупность данных морфологических и современных биохимических исследований, а также исследований, характеризующих изменения на уровне состояния ДНК. Поэтому крайне важным является получить первичные характеристики чувствительности ростовых процессов.

Устойчивость растений к засолению обусловлена наличием специфических или неспецифических механизмов обеспечения стабильного метаболизма, роста и развития в онтогенезе растения, связанных с чувствительностью к одному или нескольким видам стрессовых факторов, а именно к осмотическому, окислительному или токсическому стрессовому воздействию NaCl [11].

Для эффективной оценки различных генотипов очень важны методы ранней диагностики, которые существенно сокращают временные затраты селекционеров [1]. Однако в настоящее время установлено, что устойчивость и чувствительность к осмотическому и ионному воздействию NaCl большинства сельскохозяйственных растений на разных стадиях онтогенеза существенно отличается [12]. Так, растения, которые будут неустойчивыми при анализе прорастания в присутствии соли, могут обладать высокой чувствительностью, и напротив, выдерживать высокие концентрации соли во взрослом состоянии. С другой стороны, отсутствие ингибирования роста не обеспечивает устойчивый урожай и нормальное генеративное развитие, так как растения могут быть нечувствительны к действию соли и не проявлять какой-либо заметной реакции [12].

Показано, что при использовании двух методов диагностики не получено одинаковых результатов в отношении солеустойчивости изученных сортов яровой пшеницы [4]. Следует ожидать, что в ряде случаев в селекционном процессе могут присутствовать генотипы, в которых будет наблюдаться и зависимый от стадии онтогенеза процесс возникновения или потери устойчивости культурных злаков.

Для ускорения селекционного процесса необходимо идентифицировать маркеры, связанные с чувствительностью и устойчивостью пшеницы к засолению. Целью настоящего исследования является ранняя, на стадии проростков, дифференциальная диагностика устойчивости сортов мягкой и твердой пшеницы яровой и озимой форм к хлоридному засолению для выявления фенотипических и молекулярных мишеней чувствительности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектом изучения послужили 16 сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* Host.) яровых форм (Агата, Варяг, Дарья, Злата, Лиза, Оренбургская 13, Оренбургская 22, Оренбургская 233, Учитель, Эстер) и озимых форм (Жемчужина Поволжья, Калач, Мироновская 808, Московская 39) и твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) яровой формы: Оренбургская 10 и Оренбургская 21 из коллекции ТСХА им. К.А. Тимирязева, ФГБНУ Федерального научного центра РАН, Оренбург, Россия и селекционного центра «Немчиновка».

В стерильных чашках Петри на фильтровальной бумаге, увлажненной дистиллированной водой (контроль) или растворами солей (опытные варианты), проводили определение всхожести семян. Для создания хлоридного засоления использовали 150 мМ раствор NaCl. Объем выборки — 50 семян в трехкратной повторности для каждого варианта. Чашки с семенами помещали в термостат ТСО-1/80 СПУ с температурой 22—24 °С. На шестой день эксперимента определяли всхожесть семян.

Оценку чувствительности к хлоридному засолению проводили методом рулонной культуры [13]. В эксперименте брали 50 семян, в 3 повторностях. Отбирали выполненные семена, не имеющие деформаций, повреждений поверхности или зародыша и признаков повреждений патогенами. Семена обрабатывали в водном растворе гипохлорита натрия в течение 15 мин с последующей 3-кратной промывкой стерильной водой. На 20-ти см полоски фильтровальной бумаги, шириной 2 см, раскладывали семена на расстоянии 1 см от верхнего края. Рулоны

помещали в стаканы, добавляли 150 мл дистиллированной воды (контроль) или 150 мМ раствора NaCl. Стаканы помещали в климокамеру. Выращивание проводили при 24 °С с искусственным освещением, обеспеченным лампами дневного света (5000 лк) день/ночь — 10/14 часов соответственно. Через 6 суток определяли вес сырой и сухой биомассы, длину главного корня, длину побега, общую длину проростка.

Расчет основных статистических параметров проводили по стандартным методикам, а также использовались программы для статистической обработки данных Statistica 6.0 и STATAN.

Окрашивание препаратов трипановым синим. Прижизненное окрашивание колеоптиля трипановым синим — 0,5% водным раствором проводили в течение 5 мин. с 3-кратной промывкой. Визуализация осуществлялась с помощью световой микроскопии (микроскоп Olympus BX51, объектив $\times 10$. Изображения получали с помощью цифровой камеры ColorVien (Германия).

Флуоресцентная микроскопия. Кончик колеоптиля (4—5 мм) проростка пшеницы отделяли и помещали на предметные стекла в каплю воды не менее 5 шт. на стекло. Для прижизненной визуализации в клетках АФК использовали водный раствор Carboxy-H2DFFDA (Thermo Fisher Scientific, США), в концентрации 25—50 нМ, время инкубации составляло 30 мин с последующей 3-кратной промывкой в дистиллированной воде. Затем живые корешки помещали в экспериментальные растворы без красителя.

Прижизненные препараты анализировали с использованием микроскопа Olympus BX51 (Япония), объектив $\times 10$, при длине волны 490 нм. Изображения получали с помощью цифровой камеры ColorVien (Германия).

Статистическую обработку данных проводили с применением программы Excel.

Выделение ДНК. 6-дневные колеоптили из разных сортов пшеницы и выращенные в разных условиях, тщательно растирали в ступке с жидким азотом, к полученному тонкому порошку добавляли лизирующий раствор (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 25 мМ ЭДТА, 1% DS-Na), тщательно размешивали и смесь инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем к смеси добавляли NaCl до концентрации 1 М и депротеинизировали ее осторожным встряхиванием со смесью хлороформ-изоамиловый спирт (10 : 1, v/v). Полученные образцы ДНК обрабатывали рибонуклеазой А (50 мкг/мл) в течение 20 мин при 37 °С и протеиназой К (10 мкг) в течение 1 час при 37°. ДНК вновь осаждали добавлением трех объемов 96%-го этанола.

Горизонтальный электрофорез в агарозе. С помощью горизонтального электрофореза анализировали препараты ДНК. Выделенные и очищенные препараты ДНК (по 2 мкг) растворяли в Трис-боратном буфере (10 мМ, pH 8,0), содержащем 10 мМ ЭДТА, и подвергали горизонтальному электрофорезу в течение 2 ч в 1,2%-м агарозном геле при электрической напряженности 2—3 В/см в 0,09 М Трис-боратном буфере, pH 8,3, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. После электрофореза продукты гидролиза ДНК визуализировали в УФ-свете.

Определение содержания хлорофилла. Наземную часть пшеницы разных сортов (0,1 г) измельчали и растирали в фарфоровой чашке, добавляли немного

кварцевого чистого песка для лучшего результата. В кашицеобразную массу добавляли ацетон (10 мл), растирали массу до темно-зеленого цвета и центрифугировали в течение 10 мин. Супернатант отделяли и выдерживали в течение 30 минут в темном месте, затем определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре SmartSpecPlus при двух длинах волн 660 нм и 530 нм. Содержание хлорофилла в листьях рассчитывали по формуле:

$$Ca = 12,7 \cdot E_{660} - 2,69 \cdot E_{530}$$

и

$$Cb = 45,8 \cdot E_{530} - 2,34 \cdot E_{660},$$

где Ca и Cб — содержание хлорофилла а и б, 1 мг/л; E_{660} — оптическая плотность хлорофилла а при длине волны 660 нм; E_{530} — оптическая плотность хлорофилла в, при длине волны 530 нм.

Коэффициенты определяли из калибровочных кривых. Содержание хлорофилла в процентах (X) на сухое или сырое вещество вычисляют по формуле:

$$X = \frac{P \cdot 100}{H} \%,$$

где P — содержание хлорофилла в полученном объеме вытяжки, мг; H — масса навески (сухой или сырой), мг.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Засоление, индуцированное NaCl, вызывает ряд специфических реакций на прорастающие семена. Нарушения могут сказываться в ингибировании набухания, нарушении наклевывания семян, а также на более поздних этапах вызывать изменение роста первичного корня, боковых корней, колеоптиля или побега. Известно, что максимальная чувствительность сортов яровой пшеницы к воздействию стрессового фактора проявляется на этапах прорастания семян и развития проростков (до 7-х сут.), в дальнейшем (на 10-е сут.) различия между хлоридным и сульфатным засолением менее выражены [4]. Это согласуется с нашими данными (не опубликовано), по этой причине мы исследовали шестисуточные проростки.

Начальные стадии развития пшеницы: на стадии набухания (рис. 1 а—б), наклёвывания (рис.1 в) и формирования проростка (рис. 1 г). На стадии проростка растения можно разделить (по биометрическим показателям) на 4 группы (рис. 1 д—з): 1 — сорта с ингибированием роста корня и незначительным снижением роста побега; 2 — сорта с ингибированием роста побега и незначительным снижением роста корня; 3 — сорта с ингибированием роста побега и корня; 4 — сорта с незначительным снижением роста побега и корня.

Реакция каждого сорта на засоление имеет индивидуальные сортовые особенности. На фотографии (рис. 2) приведены 4 типа реакции, которые демонстрируют ингибирование роста отдельных вегетативных органов пшеницы и соответствуют представленной схеме: к первому типу с мы отнесли сорта Агата, Варяг, Московская 39, Оренбургская 10; Оренбургская 21 и Оренбургская 233; ко второму — сорта Лиза и Калач; к 3 — сорта Оренбургская 22 и Учитель; к 4 — сорта Дарья, Жемчужина Поволжья, Злата, Оренбургская 13 и Эстер.

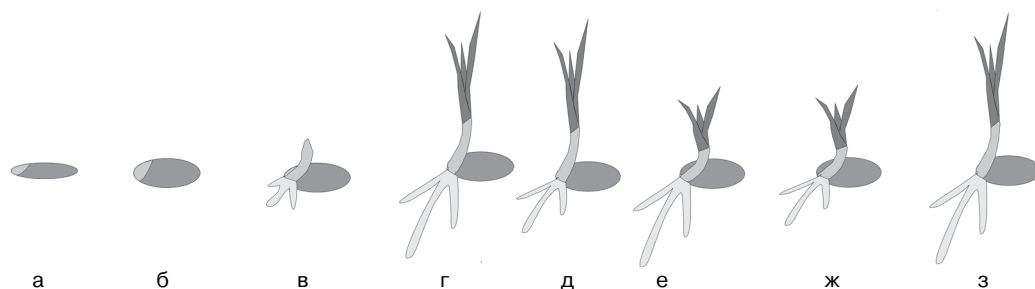


Рис. 1. Начальные стадии развития пшеницы: стадия набухания (а—б), наклёвывания (в) и формирования проростка (г).
Типы солеустойчивости проростков пшеницы (д—з).

Fig. 1. The initial stages of wheat development: swelling stage (a, b), seed germination (c) and sprout formation (d).
Types of salt tolerance in wheat seedlings (dz).

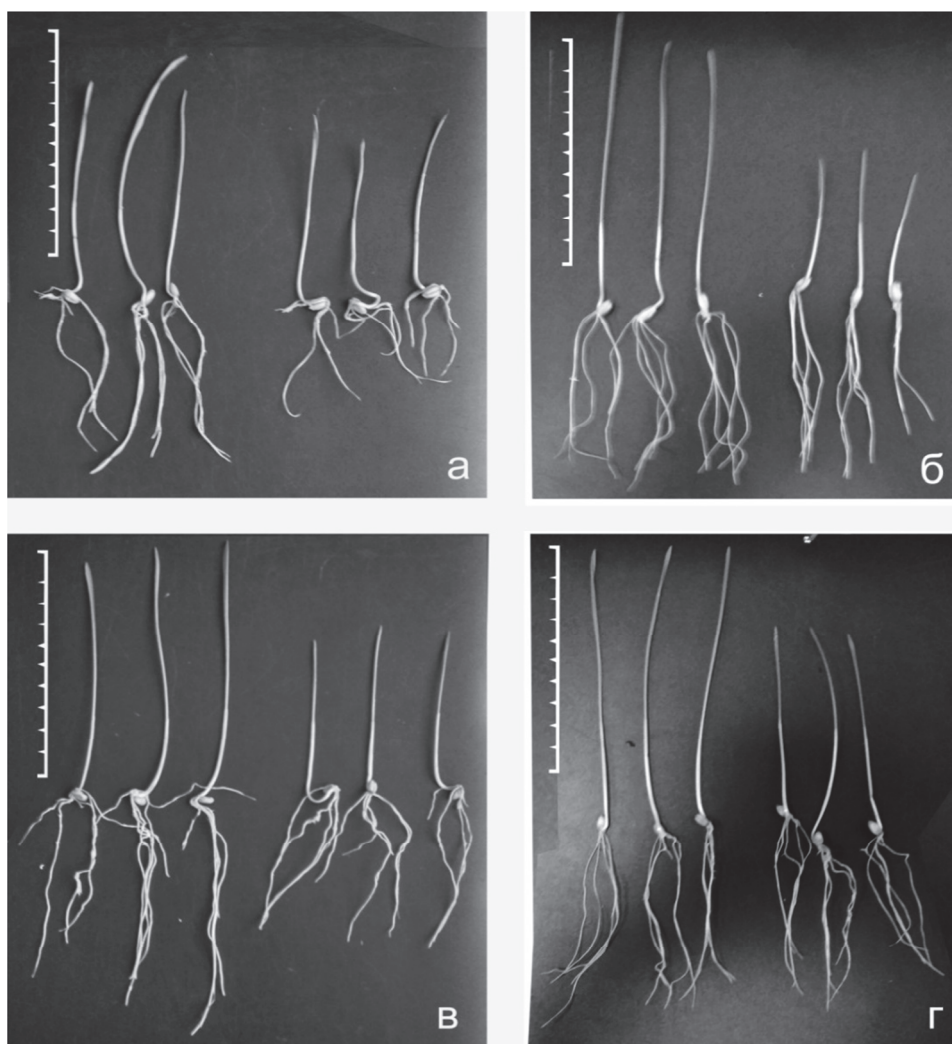


Рис. 2. Типы солеустойчивости проростков пшеницы (а—г).
Fig. 2. Types of salt tolerance in wheat seedlings.

Эксперименты на чашках Петри по определению всхожести разных сортов пшеницы в присутствии соли показали, что всхожесть у всех сортов пшеницы уменьшается на 20—40%. Более того, скорость всхожести замедляется на 10—24 часа. Однако в некоторых случаях скорость роста пшеницы в условиях засоления увеличивается, компенсируя вызванное NaCl отставание роста, и соответствует показателям контрольного варианта. Более подробное описание характеристики влияния соли на рост и развитие 6-дневных проростков пшеницы разных сортов представлены ниже (табл. 1, рис. 3 и 4). В работе [4] также отмечен подобный эффект. Кроме того, было установлено, что засоление субстрата приводит к значительному снижению всхожести семян, длины и массы побегов, длины и массы корней, площади листьев (на 13,8—97,4%).

Таблица 1 / Table 1

**Морфометрические характеристики сортов пшеницы при действии NaCl /
Morphometric characteristics of wheat varieties under NaCl treatment**

№	Вид		Сорт	Вариант	Высота побега, мм	Длина корневой системы, мм	Сырая масса, мг	Сухая масса, мг	Содержание сухого вещества, %
1	Пшеница мягкая	яровая	Агата	контр	109,5 ± 5,5	98,5 ± 4,9	191 ± 9,6	24 ± 1,3	12,6 ± 0,5
				соль	76,6 ± 3,9	91,2 ± 4,6	175 ± 8,4	24 ± 1,2	13,7 ± 0,6
2	<i>Triticum aestivum</i> Host		Варяг	контр	121,2 ± 6,1	87,4 ± 3,7	596 ± 29,5	45 ± 2,1	7,6 ± 0,4
				соль	74,7 ± 3,7	78,9 ± 4,2	345 ± 17,2	51 ± 1,8	14,8 ± 0,7
3			Дарья	контр	100,2 ± 4,8	105,1 ± 4,4	197 ± 10,4	21 ± 1,4	10,7 ± 0,6
				соль	68,2 ± 3,5	87,7 ± 4,1	137 ± 6,9	19 ± 1,3	13,9 ± 0,7
4			Злата	контр	108,3 ± 5,4	101,2 ± 5,3	198 ± 11,0	22 ± 1,5	11,1 ± 0,5
				соль	67,6 ± 3,3	80,0 ± 4,5	140 ± 7,2	21 ± 2,0	15,0 ± 1,1
5			Лиза	контр	91,3 ± 3,9	111,5 ± 6,0	225 ± 11,4	25 ± 1,4	11,1 ± 0,7
				соль	68,3 ± 3,5	85,2 ± 4,0	203 ± 10,1	28 ± 1,7	13,8 ± 0,9
6			Оренбургская — 13	контр	121,4 ± 5,6	96,6 ± 4,7	393 ± 19,8	46 ± 1,9	11,1 ± 0,7
				соль	90,0 ± 5,0	71,5 ± 3,6	354 ± 17,9	39 ± 1,8	18,7 ± 1,2
7			Оренбургская — 22	контр	91,0 ± 4,3	67,4 ± 3,5	372 ± 18,6	44 ± 2,0	15,0 ± 1,1
				соль	83,8 ± 4,2	53,3 ± 2,7	264 ± 13,2	28 ± 1,7	18,6 ± 0,9
8			Оренбургская — 233	контр	125,7 ± 6,3	92,9 ± 4,6	377 ± 18,6	42 ± 1,9	11,1 ± 0,9
				соль	81,9 ± 3,9	80,0 ± 4,6	361 ± 17,8	44 ± 2,1	12,2 ± 0,6
9			Учитель	контр	107,7 ± 5,3	77,6 ± 4,0	463 ± 22,5	54 ± 2,2	15,8 ± 1,0
				соль	79,0 ± 3,7	67,6 ± 4	420 ± 21,0	45 ± 1,8	18,8 ± 1,3
10			Эстер	контр	118,2 ± 6,0	90,7 ± 4,4	182 ± 9,1	22 ± 1,1	12,1 ± 0,7
				соль	67,8 ± 3,2	70,8 ± 3,1	146 ± 8,2	23 ± 1,4	15,8 ± 0,9
11		озимая	Жемчужина Поволжья	контр	118,8 ± 5,6	110,5 ± 5,4	663 ± 31,5	81 ± 3,8	12,2 ± 0,5
				соль	70,7 ± 3,6	90,6 ± 4,7	348 ± 18,1	81 ± 3,4	13,3 ± 0,6
12			Калач	контр	87,1 ± 4,4	78,8 ± 3,8	212 ± 10,6	17 ± 0,9	8,0 ± 0,4
				соль	62,7 ± 2,9	62,8 ± 3,2	150 ± 8,0	17 ± 1,2	11,3 ± 0,5
13			Мионовская — 808	контр	85,7 ± 4,3	59,0 ± 3,1	154 ± 7,7	13 ± 0,6	8,4 ± 0,5
				соль	64,1 ± 3,2	48,5 ± 2,5	89 ± 5,4	12 ± 0,8	13,5 ± 0,6
14			Московская — 39	контр	102,1 ± 5,2	86,5 ± 4,7	279 ± 14,3	30 ± 1,8	10,8 ± 0,5
				соль	69,8 ± 3,1	75,5 ± 3,4	210 ± 10,4	27 ± 1,6	12,9 ± 0,8
15	Пшеница твердая	яровая	Оренбургская — 10	контр	117,9 ± 5,2	80,0 ± 4,0	560 ± 28,1	73 ± 3,0	15,4 ± 0,8
				соль	63,3 ± 3,1	72,8 ± 3,7	267 ± 15,3	40 ± 1,5	18,0 ± 0,9
16	<i>Triticum durum</i> Desf		Оренбургская — 21	контр	110,6 ± 5,0	92,7 ± 4,5	407 ± 20,5	39 ± 1,4	9,6 ± 0,5
				соль	76,6 ± 3,6	80,1 ± 4,2	301 ± 13,9	39 ± 1,6	13,0 ± 0,7

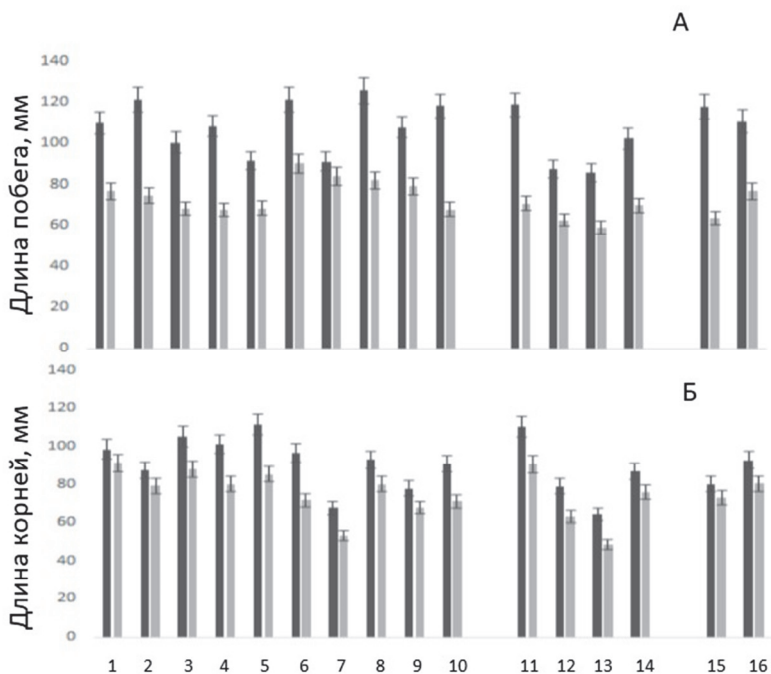


Рис. 3. Биометрические данные длины побега (А) и длины корня (Б) пшеницы.

Черные столбцы — контроль, серые столбцы — 150 мМ NaCl. Сорта пшеницы: 1 — Агата, 2 — Варяг, 3 — Дарья, 4 — Злата, 5 — Лиза, 6 — Оренбургская 13, 7 — Оренбургская 22, 8 — Оренбургская 233, 9 — Учитель, 10 — Эстер, 11 — Жемчужина Поволжья, 12 — Калач, 13 — Мироновская 808, 14 — Московская 39, 15 — Оренбургская 10, 16 — Оренбургская 21

Fig. 3. Shoot (A) and root (B) length of wheat.

Black columns — control, gray columns — 150 mM NaCl. Wheat varieties: 1 — Agata, 2 — Varyag, 3 — Dar'ya, 4 — Zlata, 5 — Liza, 6 — Orenburgskaya 13, 7 — Orenburgskaya 22, 8 — Orenburgskaya 233, 9 — Uchitel', 10 — Ester, 11 — Zhemchuzhina Povolzh'ya, 12 — Kalach, 13 — Mironovskaya 808, 14 — Moskovskaya 39, 15 — Orenburgskaya 10, 16 — Orenburgskaya 21

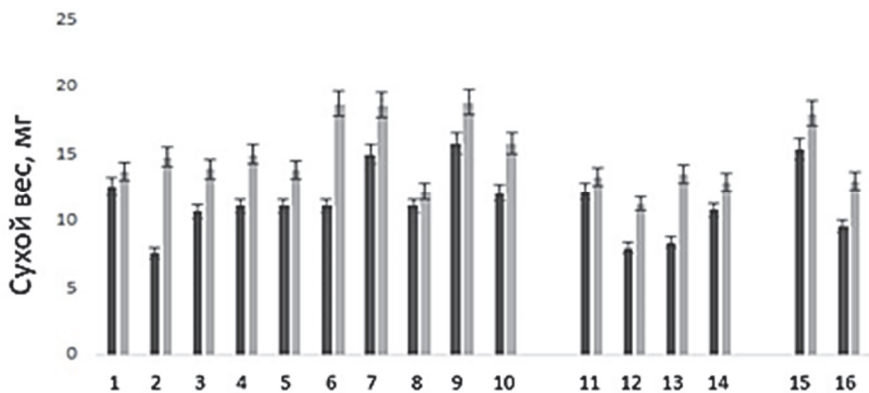


Рис. 4. Изменение сухого веса у разных сортов пшеницы при засолении.

Черные столбцы — контроль, серые столбцы — 150 мМ NaCl.
Номера сортов как на рис. 3.

Fig. 4. Changes in dry weight of different wheat varieties during salinization.

Black columns — control, gray columns — 150 mM NaCl.
Variety numbers are as in Fig. 3.

Одним из видимых симптомов воздействия засоления является нарушение роста проростков. Несмотря на разную степень воздействия на различные процессы роста, результатом во всех случаях будет в конечном счете ингибирование роста корня и побега, по силе проявления этих показателей можно судить о токсичности соли.

Действие засоления у всех изученных образцов вызывало значительное уменьшение роста как корневой системы, так и надземных органов. Как видно из таблицы 1, наибольшей устойчивостью по высоте надземной массы обладал сорт Оренбургская 22, данный показатель снизился всего на 7,9% в варианте с солью по сравнению с контролем. По длине корневой системы наименьший разрыв между вариантами был у сортов Агата и Варяг — 7,4% и 10,0% соответственно.

При рассмотрении отдельно по сухому весу проростков все сорта пшеницы можно разделить на 3 группы — сорта с высокой чувствительностью к ионам натрия и хлора (Варяг, Оренбургская 13), устойчивые сорта (Агата, Жемчужина Поволжья, Лиза, Московская 39, Оренбургская 10, Оренбургская 233) и сорта с промежуточными параметрами чувствительности (Дарья, Злата, Калач, Оренбургская 21, Оренбургская 22, Учитель, Эстер (рис. 4).

Хлорофилл обеспечивает важнейшие реакции преобразования электромагнитного излучения (света) в свободную энергию химических связей, включает поглощение фотонов свето-собирающими комплексами (антеннами), связанными с ФС I и ФС II.

Известно несколько форм хлорофиллов, различающихся по химическому строению.

Спектр поглощения различных форм хлорофиллов охватывает видимую, ближнюю ультрафиолетовую и ближнюю инфракрасную области спектра (у высших растений от 350 до 700 нм) и является важнейшим компонентом фотосинтетического аппарата тилакоидных мембран листьев растений. Содержание хлорофиллов обусловлено генетической природой растения, поэтому их содержание в культуре может быть использовано в качестве физиолого-биохимического маркера. Содержание хлорофилла специфично для листьев каждого вида и сорта растений и существенно изменяется в зависимости от освещения, минерального питания, возраста листьев и других условий. Было показано на обширном фактическом материале с использованием большого числа видов сельскохозяйственных растений (пшеница, рожь, ячмень, просо, гречиха, горох, картофель и др.), что индексы и фотосинтетические потенциалы хлорофилла тесно коррелируют с биологическими параметрами и показателями урожая [14].

Особую важность приобретает определение фотосинтетических потенциалов хлорофиллов и их структуры у растений, подвергающихся действию различных экстремальных факторов. Известно, что эти факторы вызывают, с одной стороны, интенсивную деградацию фотосинтетических пигментов, с другой, — замедляют их синтез, в результате у таких растений может значительно измениться как содержание хлорофиллов, так и его структура (за счет, в первую очередь, листьев, особенно нижних) [15].

Для определения концентрации хлорофилла используют хроматографические и спектрофотометрические методы. При проведении фотометрического определения содержания хлорофилла в листьях растений в качестве стандартного раствора для построения калибровочного графика применяют раствор хлорофилла. Выбор длины волны, при которой проводится спектрофотометрирование, позволяет отдельно определить содержание хлорофиллов разного типа.

Для извлечения хлорофилла из листьев применяют как полярные, так и неполярные органические растворители. Наиболее часто используются этанол и ацетон как в чистом виде, так и в растворах, а также 80%-й раствор ацетона по модификации Вернона и 85%-й раствор по модификации Реббелена, так как небольшое количество воды необходимо для гидролиза хлорофилл-белкового комплекса, что способствует более полному извлечению хлорофилла при экстракции.

Для экспресс-анализа мы использовали экстракцию чистым ацетоном и спектрофотометрическим методом оценки содержания хлорофилла в различных сортах пшеницы, выращенных в условиях засоления.

Согласно данным таблицы 2 и рисунка 5, содержание хлорофилла Ca сильно варьирует в зависимости от сорта пшеницы. Наибольшее содержание хлорофилла Ca/мл наблюдалось в озимых сортах Жемчужина Поволжья и Калач. Наименьшее — в сорте Мироновская 808, которая также является озимым сортом, а также в сорте яровой пшеницы Оренбургская 233. Содержание хлорофилла Ca в пшенице, выращенной в условиях повышенного засоления, может как увеличиваться по сравнению с контролем, так и уменьшаться или оставаться практически без изменения.

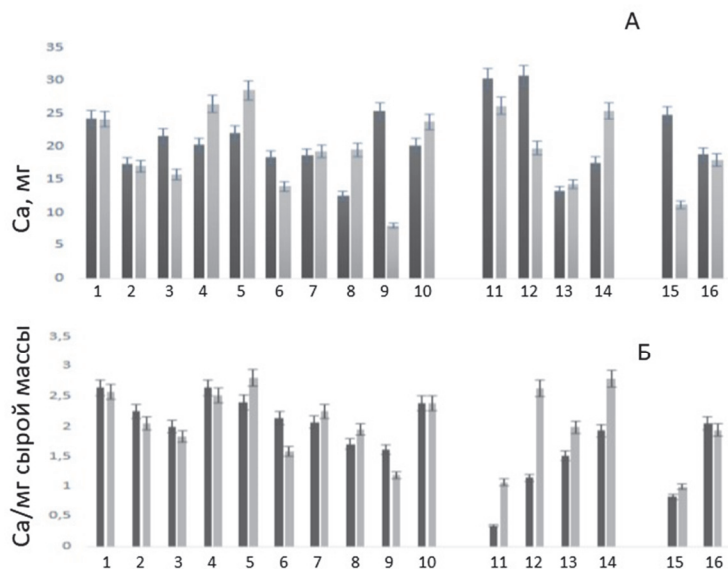


Рис. 5. Содержание хлорофилла А (Ca/мл экстракта) в пшенице (А).
Содержание хлорофилла А (Ca/мг сырой массы побега пшеницы) (Б).

Черные столбцы — контроль, серые столбцы — 150 мМ NaCl. Номера сортов как на рис. 3.

Fig. 5. Chlorophyll A content (Ca/ml extract) in wheat (A).
Chlorophyll A content (Ca/mg wet weight of wheat shoot) (B).

Black columns — control, gray columns — 150 mM NaCl. Variety numbers are as in Fig. 3.

Таблица 2 / Table 2

Содержание хлорофилла Са и Сб в разных сортах пшеницы, выращенных в условиях засоления и без. Процент отклонения составлял 4–5% / Chlorophyll content in different wheat varieties grown under salinization and without salinization. The percentage of deviation was 4–5%

Сорт			Условия выращивания	Са, мг/мл	Сб, мг/мл	Са / Сб	Са / сухой вес	Са / сырой вес	Сб / сухой вес	Сб / сырой вес	
Пшеница мягкая <i>Triticum aestivum</i> Host	яровая	Агата	контр	24,27	2,21	10,98	1,04	0,127	0,092	0,011	
			соль	24,17	1,98	12,21	1,01	0,138	0,082	0,011	
		Варяг	контр	17,39	7,53	2,31	0,39	0,029	0,17	0,012	
			соль	16,98	4,39	3,87	0,33	0,049	0,09	0,012	
		Дарья	контр	21,49	1,88	11,43	1,02	0,109	0,09	0,009	
			соль	15,69	1,78	8,81	0,82	0,114	0,09	0,013	
		Злата	контр	20,17	2,06	9,79	0,92	0,101	0,09	0,104	
			соль	26,47	3,19	8,3	1,26	0,189	0,15	0,023	
		Лиза	контр	22	2,08	10,58	0,88	0,098	0,08	0,009	
			соль	28,53	3,53	8,08	0,98	0,14	0,13	0,017	
		Оребургская 13	контр	18,4	14,86	1,24	0,4	0,047	0,323	0,038	
			соль	13,95	6,9	2,02	0,357	0,039	0,176	0,019	
		Оребургская 22	контр	18,6	11,52	1,61	0,42	0,05	0,261	0,031	
			соль	19,2	11,6	1,65	0,68	0,072	0,41	0,044	
	Оребургская 233	контр	12,58	8,26	1,52	0,3	0,033	0,2	0,022		
		соль	19,46	10,73	1,81	0,32	0,054	0,24	0,03		
	Учитель	контр	25,37	3,21	7,9	0,47	0,055	0,059	0,007		
		соль	8,11	3,76	2,16	0,18	0,019	0,083	0,009		
	Эстер	контр	20,11	2,09	9,62	0,91	0,11	0,095	0,011		
		соль	23,72	2,29	10,36	1,03	0,162	0,1	0,016		
озимая	Жемчужина Поволжья	контр	30,39	1,24	24,51	0,375	0,088	0,015	0,003		
		соль	26,16	5,6	4,67	0,32	0,039	0,069	0,008		
	Калач	контр	30,72	6,57	4,67	1,8	0,145	0,39	0,031		
		соль	19,71	6,38	3,09	1,16	0,131	0,375	0,042		
	Мионовская 808	контр	13,31	8,05	1,65	1,02	0,086	0,62	0,052		
		соль	14,3	7,47	1,91	1,91	0,16	0,62	0,083		
	Московская 39	контр	25,4	16,46	1,54	0,94	0,12	0,61	0,078		
		соль	18,6	11,52	1,61	0,42	0,05	0,261	0,031		
	Пшеница твердая <i>Triticum durum</i> Desf	яровая	Оребургская 10	контр	24,88	2,98	9,35	0,34	0,044	0,041	0,005
				соль	11,22	1,98	5,97	0,28	0,042	0,049	0,007
Оребургская 21		контр	17,89	13,2	1,35	0,39	0,059	0,287	0,036		
		соль	18,4	14,86	1,24	0,4	0,047	0,323	0,038		

На наш взгляд, наиболее достоверными данными являются относительное содержание хлорофилла Са на вес проростков пшеницы (рис. 5, табл. 2). Мы полагаем, что содержание Са в 1 мг сырой массы наиболее точно отражает характеристику сорта и условия выращивания пшеницы. Взятые нами для исследования

яровые сорта пшеницы (твердые и мягкие) оказались устойчивыми к засолению при рассмотрении параметра содержания Са/мг сырой массы, как одного из биохимических показателей сорта, т.е. изменения этого параметра в яровых сортах пшеницы оказались незначительными, отклонения составляли от 5 до 20%. В отличие от яровых сортов пшеницы содержание Са/мг сырой массы сильно зависело от условий выращивания, увеличение соли в среде сопровождалось значительным увеличением хлорофилла Са. По типу изменения хлорофилла выращенных в условиях засоления целесообразно разделить их на три типа. В первом типе не меняется концентрация хлорофилла на миллиграмм сырой массы у следующих сортов: Агата, Варяг, Дарья, Злата, Оренбургская 22, Оренбургская 10, Оренбургская 21. Увеличение количества хлорофилла при действии NaCl наблюдали у следующих сортов: Лиза, Жемчужина Поволжья, Калач, Мироновская 808, Московская 39. Уменьшение показателя отмечали у сортов Оренбургская 13 и Учитель. Такая зависимость содержания Са в 1 мг сырой массы может быть использована как маркер для характеристики сорта пшеницы и условий ее выращивания. Однако хлорофилл Са быстро окисляется и переходит в форму Сб. Скорость окисления зависит не только от сорта и условий выращивания растений, но и от метода его экстракции, температуры, времени и метода определения хлорофилла. Поэтому этот метод необходимо рассматривать как характеристику сорта и условия выращивания только в комплексе с другими биохимическими и биометрическими методами.

Деградация нуклеиновых кислот — составной элемент процесса отмирания растения на завершающих стадиях онтогенеза — имеет массивный характер и сопровождается разрушением основной массы РНК и ДНК [16, 17]. Именно на модели стареющего листа [18] было получено первое доказательство существования активной программы гибели клеток у растений, которое сопровождается деструкцией ядерного материала клеток листа при старении.

Проростки злаков оказались уникальной и очень удобной моделью для изучения ПКГ у растений. Во-первых, их рост и развитие могут быть легко синхронизированы [19], что немаловажно при исследовании динамики многих биохимических процессов, а во-вторых, отдельные их органы подвержены органоптозу [20]. Так, колеоптиль злаков функционирует относительно короткое время и быстро погибает по мере формирования и роста проростка. Несмотря на то, что ПКГ довольно жестко запрограммирован в онтогенезе растения, он может индуцироваться или модулироваться различными факторами или агентами среды, включая различные инфекции и стрессовые воздействия абиогенной природы (гипоксия, кислородный стресс и другие) [21].

Колеоптиль злаков — это первый зародышевый (бесцветный, зеленый или красноватый) лист злаков, не имеющий листовой пластинки и представляющий собой замкнутую трубку. Он обладает защитными свойствами для последующих листьев. Колеоптиль злаков функционирует относительно короткое время и быстро погибает по мере формирования и роста проростка.

В стареющих колеоптилях проростков пшеницы были обнаружены необычные структуры [22].

В вакуолях этих клеток были обнаружены многочисленные, различного размера участки цитоплазмы, окруженные замкнутой мембраной и содержащие одну или несколько митохондрий, фрагменты мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума и полирибосомные комплексы. Эти структурные образования представляют собой изолированные цитоплазматические структуры, не связанные с основной цитоплазмой клетки. Они структурно отличаются от всех известных — цитоплазма в обнаруженных везикулах не имеет никаких признаков деструкции, в отличие от содержимого окружающей их вакуоли.

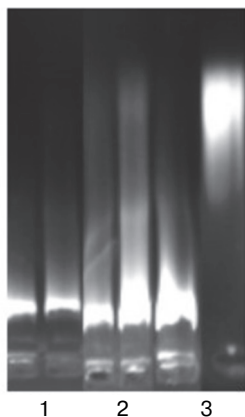


Рис. 6. Электрофорез в агарозе образцов ДНК, отличающиеся по степени деградации.

Слева — контроль, справа — 150 мМ NaCl.

Fig. 6. Electrophoresis in agarose of DNA samples, differing in degradation degree.

On the left — the control, on the right — 150 mM NaCl

Другим характерным маркером отмирающих клеток у животных является межнуклеосомная фрагментация ядерной ДНК. Однако в растениях сложно обнаружить четкую картину фрагментации ядерной ДНК из-за некоторых особенностей клеточной структуры и ядерного хроматина. Обнаружено, что разрушение ДНК в колеоптиле пшеницы на 6-й день происходит в виде набора олигонуклеотидов. Этот набор зависит от устойчивости сорта пшеницы к действию высокой концентрации соли (рис. 6). На рисунке 4 представлены данные электрофореза в агарозе 3-х вариантов ДНК из разных сортов пшеницы и выращенных в разных условиях (контроль, соль). Контрольные образцы всех сортов пшеницы содержат высокомолекулярную ДНК. К первому варианту относятся образцы ДНК, которая не деградирована в условиях засоления, это сорта: Агата, Дарья, Злата, Оренбургская 21, 22 и 233, а также сорта Лиза, Эстер, Московская 39 и Мионовская 808. Далее в некоторых сортах, таких как

Учитель, Варяг и Калач, происходит интенсивная деградация ДНК. И, наконец, в таких сортах, как Жемчужина Поволжья и Оренбургская 10, вся ДНК колеоптиля пшеницы, выращенной в присутствии соли, деградирована до олигонуклеотидов. Таким образом, ДНК колеоптиля может служить хорошим маркером для характеристики чувствительности пшеницы к условиям засоления. Эти данные коррелируют с полученными ранее данными о высокой чувствительности колеоптиля к абиотическим стрессам [23].

Первой проблемой анализа ПКГ в клеточных культурах является количественная оценка жизнеспособности/гибели клеток с течением времени [24]. Для идентификации количества отмерших клеток во всех сортах пшеницы проводили прижизненное окрашивание колеоптиля трипановым синим, проникающим через мембрану мертвых клеток, как тест на выявление степени повреждения тканей при засолении (рис. 7).

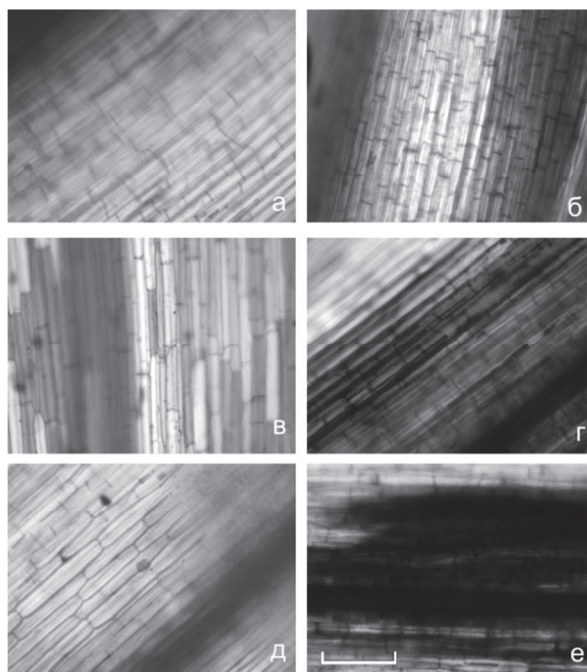


Рис. 7. Окраска трипановым синим образцов гипокотыля, отличающихся по количеству погибших клеток.

Слева — контроль (а, в, д), справа — 150 мМ NaCl (б — до 20% погибших клеток, г — до 50% погибших клеток, е — свыше 50% погибших клеток).
Масштабный отрезок 400 мкм

Fig. 7. Trypan blue staining of hypocotyl samples differing in number of dead cells.

On the left — control (a, b, d), on the right — 150 mM NaCl (b — up to 20% of dead cells, г — up to 50% of dead cells, e — over 50% of dead cells).
Scale cut — 400 microns

В контроле видимых изменений в колеоптиле почти не наблюдалось, в то время как в присутствии хлорида натрия наблюдали, в некоторых случаях, достаточно сильные повреждения ткани.

Согласно полученным данным, по воздействию соли на колеоптиль сорта разделили на три группы: а — устойчивые, в которых окрашивались трипановым синим единичные погибшие клетки; б — промежуточные, в которых количество и распределение гибнущих клеток было от 20 до 50%, в — чувствительные сорта, в которых количество погибших клеток было более 50% (рис. 7). Эти результаты согласуются с данными, полученными при анализе процессов деградации ДНК колеоптиля (рис. 6). Таким образом, NaCl может вызывать замедление гибели клеток и деградации ДНК, в то же время у ряда сортов наблюдается усиление гибели клеток колеоптиля при действии солей относительно контроля, что свидетельствует о наличии разных механизмов чувствительности и устойчивости ПКГ у разных сортов пшеницы, которые в настоящее время остаются неясными.

Одним из критериев оценки окислительного статуса клеток растений, является детекция активных форм кислорода (АФК) с помощью реагента Carboxy-H2DFFDA. Известно, что АФК выполняют как сигнальную, так и регуляторную

функции в клетках растений при засолении [25]. Они образуются в различных компартментах клетки: в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, плазматической мембране, цитозоле, клеточной мембране [26]. Окрашивание колеоптиля пшеницы флуоресцентным красителем на АФК показало, что при засолении АФК детектируется в клетках колеоптиля (в контроле — единичные окрашенные клетки). После инкубации с маркером АФК Carboxy-H2DFFDA у контрольных растений пшеницы наблюдали незначительную флуоресценцию клеток колеоптиля (рис. 8). NaCl часто считается чрезвычайно токсичным действием для растений. Измененный статус воды, дисбаланс ионов и гиперосмотического стресса, вызванного обработкой NaCl, вызывают дальнейшее ингибирование роста и молекулярное повреждение при образовании реактивных форм кислорода [27—29].

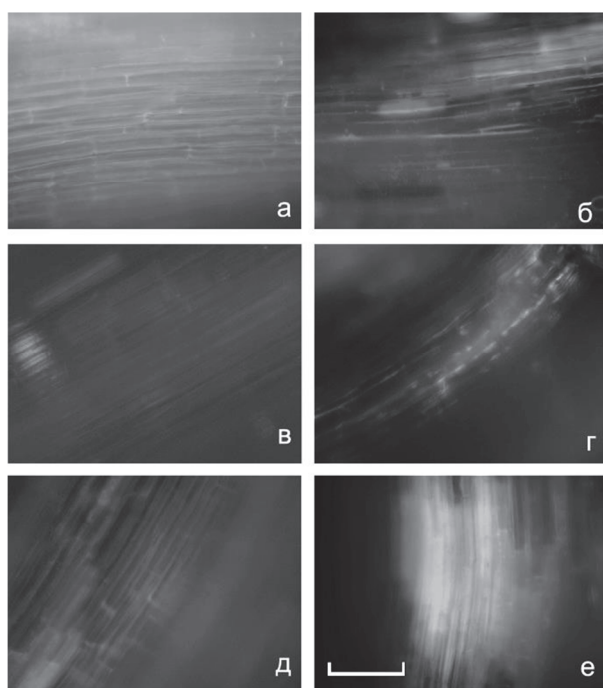


Рис. 8. Окрашивание колеоптиля пшеницы флуоресцентным маркером АФК Carboxy-H2DFFDA.

Слева — контроль (а, в, д), справа — 150 мМ NaCl (б — единичное содержание погибших клеток, г — до 50% погибших клеток, е — максимальное содержание погибших клеток).
Масштабный отрезок 400 мкм

Fig. 8. Staining of wheat coleoptile with AFC Carboxy-H2DFFDA fluorescent marker.

Left — control (a, b, d), right — 150 mM NaCl (b — single content of dead cells, d — up to 50% of dead cells, e — maximum content of dead cells).
Scale cut 400 microns

При воздействии NaCl маркер АФК Carboxy-H2DFFDA наблюдали в колеоптиле гораздо чаще по сравнению с контролем, причем преобладала более интенсивная флуоресценция, что указывает на повышение содержания в этих клетках уровня выработки АФК и активацию окислительного стресса. Накопление флюо-

ресцентного маркера АФК Carboxy-H2DFFDA в клетках колеоптиля при действии абиотических стрессовых факторов (в данном случае — засолении) указывает на то, что в данных клетках нарушается гомеостаз АФК, что может привести к запуску ПКГ. Следовательно, определение функционального состояния клеток с помощью прижизненных маркеров в дальнейшем может быть эффективно использовано для экспресс-оценки окислительного статуса клеток колеоптиля растений, выращиваемых под действием различных стрессовых факторов. Точное фенотипирование является ключом к поиску и внедрению новых генов для солеустойчивости в культурные растения [30, 31].

Таблица 3 / Table 3

**Солеустойчивость разных сортов пшеницы
по морфологическим и биохимическим показателям /
Salt tolerance of different wheat varieties by morphological and biochemical parameters**

			Дли- на побе- га	Дли- на корня	Су- хой вес	Са	Са / сы- рой вес	ДНК	АФК	Коли- че- ство мерт- вых кле- ток	
1	Пшеница мягкая <i>Triticum aestivum</i> Host	яровая	Агата	Б	А	А	А	А	А	А	
2			Варяг	В	А	В	А	А	Б	Б	Б
3			Дарья	В	Б	А	Ум	А	А	Б	Б
4			Злата	В	В	Б	Ув	А	А	Б	Б
5			Лиза	Б	В	Б	Ув	Ув	Б	А	А
6			Оренбург- ская 13	Б	В	В	Ум	Ум	Б	Б	Б
7			Оренбург- ская 22	А	В	Б	А	А	А	А	А
8			Оренбург- ская 233	В	Б	А	Ув	А	А	А	А
9			Учитель	В	Б	А	Ум	Ум	Б	Б	Б
10			Эстер	В	В	Б	Ув	А	Б	Б	Б
11		озимая	Жемчужина Поволжья	В	Б	А	Ум	Ув	В	Б	Б
12			Калач	Б	В	В	Ум	Ув	Б	Б	Б
13			Миронов- ская 808	Б	Б	В	А	Ув	Б	Б	Б
14			Москов- ская 39	В	Б	А	Ум	Ув	Б	А	А
15	Пшеница твердая <i>Triticum durum</i> Desf	яровая	Оренбург- ская 10	В	А	А	Ум	А	В	В	В
16			Оренбург- ская 21	В	Б	Б	А	А	А	Б	Б

В своем исследовании мы столкнулись с проблемой, что один и тот же сорт пшеницы по одним показателям может быть отнесен к солеустойчивому сорту, а по другим — как к чувствительному, к неустойчивому сорту. Для более нагляд-

ного представления полученных результатов мы все характеристики сортов пшеницы представили в таблице 3. В этой таблице все сорта пшеницы разделены на три группы по изменению длины побега, длины корня и сухого веса показателей в результате воздействия хлористого натрия: устойчивые или практически равные контрольным образцам (А), среднеустойчивые (Б) и неустойчивые (В). По содержанию хлорофилла а (Са)/мл экстракта и Са/мг сырой массы все сорта пшеницы также разделены на три группы: концентрация Са практически не изменяется при засолении (А), увеличивается (Ув) и уменьшается (Ум). Согласно данным рис. 4, где представлены данные электрофореза ДНК, все сорта пшеницы были разделены на три группы: ДНК практически не деградирует под действием соли (А), следующая группа, в которой происходит деградация ДНК (Б), и в третьей группе ДНК разрушена до низкомолекулярных олигонуклеотидов (В).

Данные по АФК в разных сортах пшеницы под действием соли также можно представить в виде трех типов: без изменения (А), средние показатели (Б) и высокие значения (В). В последней графе таблицы 3 представлены данные по всем сортам пшеницы, также разделенные на три группы на устойчивость клеток колесоптила к действию соли: устойчивые (А), среднеустойчивые (Б) и неустойчивые (В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании совокупности всех данных таблицы 3 можно идентифицировать сорта Агата и Оренбургская 22 как наименее чувствительные к негативному действию NaCl и потенциально более устойчивые. Наиболее чувствительные и потенциально менее устойчивые Жемчужина Поволжья, Учитель.

Таким образом, нами было показано, что для характеристики солеустойчивости разных генотипов пшеницы необходимо всестороннее изучение как морфометрических, так и биохимических показателей солеустойчивости. В дальнейшем мы планируем расширить список биохимических показателей для характеристики солеустойчивости сортов пшеницы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-016-00150 А.

© Н.В. Кононенко, Т.А. Диловарова, Р.В. Канавский,
С.В. Лебедев, Е.Н. Баранова, Л.И. Федореева, 2019.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] *Balandrán-Quintana R.R., Mercado-Ruiz J.N., Mendoza-Wilson A.M.* Wheat bran proteins: a review of their uses and potential // *Food Reviews International*. 2015. Vol. 31. №. 3. P. 279—293.
- [2] *Ковригина Л.В., Заушицкая А.В., Петункина Л.О.* Сравнительная оценка солеустойчивости сортов ячменя в лабораторных условиях // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2006. Т. 162. С. 44—49.
- [3] *Удовенко Г.В., Гончарова Э.А.* Влияние экстремальных условий среды на структуру урожая сельскохозяйственных растений. Л.: Гидрометеиздат, 1982. 215 с.

- [4] Белозерова А.А., Боле Н.А. Изучение реакции яровой пшеницы на засоление по изменчивости морфометрических параметров проростков // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 12—2. С. 300—306.
- [5] Maas E.V., Grieve C.M. Spike and leaf development of sal-stressed wheat // *Crop Science*. 1990. Vol. 30. №. 6. P. 1309—1313.
- [6] Maas E.V., Lesch S.M., Francois L.E., Grieve C.M. Tiller development in salt-stressed wheat // *Crop science*. 1994. Vol. 34. № 6. P. 1594—1603.
- [7] Turki N., Harrabi M., Okuno K. Effect of salinity on grain yield and quality of wheat and genetic relationships among durum and common wheat // *J Arid Land Studies*. 2012. Vol. 22. №. 1. P. 311—314.
- [8] Houshmand S., Arzani A., Mirmohammadi-Maibody S.A.M. Effects of salinity and drought stress on grain quality of durum wheat // *Communications in soil science and plant analysis*. 2014. Vol. 45. №. 3. P. 297—308.
- [9] Бойко Л.А. Физиология корневой системы растений в условиях засоления. Л.: Наука. 1969. 164 с.
- [10] Colmer T.D., Flowers T.J., Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat // *Journal of Experimental Botany*. 2006. Vol. 57. №. 5. P. 1059—1078.
- [11] Баранова Е.Н., Гулевич А.А. Проблемы и перспективы генно-инженерного подхода в решении вопросов устойчивости растений к засолению (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. 2006. Т. 41. № 1. С. 39—56.
- [12] Munns R., James R.A., Gilliham M., Flowers T.J., Colmer T.D. Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops // *Functional Plant Biology*. 2016. Vol. 43. № 12. P. 1103—1113.
- [13] Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука. 1968. 226 с.
- [14] Сидько А.Ф., Ботвич И.Ю., Письман Т.И., Шевырнов А.П. Оценка содержания хлорофилла и урожайности зерновых культур по хлорофилльному потенциалу // *Биофизика*. 2017. Т. 62. № 3. С. 565—569.
- [15] Sun Z., Liu S., Fan J., Li Q., Wang K., Guo M., Zhang G., Ren L., Zheng G., Ma T., Pu H., Cai J., Jiang D., Chen F., Li X. Performance index derived from chlorophyll A fluorescence induction curve indicates the salt induced grain yield loss in wheat // *JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences*. 2018. Vol. 28. № 3. P. 837—844.
- [16] Farkas G.L. Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. In: Parthier D., Boulter D. (eds.) *Nucleic Acids and Proteins in Plants II*. Encyclopedia of Plant Physiology. Berlin, Heidelberg: Springer; 1982. P. 224—262.
- [17] Fukuda H., Komamine A. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans* // *Plant Physiology*. 1980. Vol. 65. № 1. P. 57—60.
- [18] van Doorn W.G., Woltering E.J. Senescence and programmed cell death: substance or semantics? // *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. № 406. P. 2147—2153.
- [19] Кирнос М.Д., Волкова С.А., Ганичева Н.И., Кудряшова И.Б., Ванюшин Б.Ф. Синхронный синтез ДНК в колеоптиле и первом листе развивающихся этиолированных проростков пшеницы. Природа и соотношение синтезов ядерной и митохондриальной ДНК // *Биохимия*. 1983. Т. 48. № 10. 1587—1595.
- [20] Кирнос М.Д., Александрушкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. Апоптоз в клетках первого листа и колеоптиля проростков пшеницы: межнуклеосомная фрагментация генома и синтез тяжелых олигонуклеосомного размера фрагментов ДНК // *Биохимия*. 1997. Т. 62. № 8. 1008—1014.
- [21] Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // *Успехи биологической химии*. 2001. Т. 41. № 1. С. 3—38.

- [22] *Bakeeva L.E., Kirnos M.D., Aleksandrushkina N.I., Kazimirchuk S.B., Shorning B.Yu., Zamyatnina V.A., Yaguzhinsky L.S., Vanyushin B.F.* Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles // *FEBS Letters*. 1999. Vol. 457. № 1. P. 122—125.
- [23] *Vanyushin B.F., Bakeeva L.E., Zamyatnina V.A., Aleksandrushkina N.I.* Apoptosis in plants: Specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents // *Int. Rev. Cytol.* 2004. Vol. 233. P. 135—179.
- [24] *Cimini S., Ronci M.B., Barizza E., de Pinto M.C., Locato V., Schiavo F.L., De Gara L.* Plant Cell Cultures as Model Systems to Study Programmed Cell Death. In: *Plant Programmed Cell Death* (pp. 173—186). Humana Press, New York, NY, 2018.
- [25] *Gibson S.W., Todd C.D.* Arabidopsis AIR12 influences root development // *Physiol Mol Biol Plants*. 2015. Vol. 21. № 4. P. 479—489.
- [26] *Foyer C.H., Noctor G.* Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11. № 1. P. 861—905.
- [27] *Munns R., Tester M.* Mechanisms of salinity tolerance // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. Vol. 59. P. 651—681.
- [28] *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В.* Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений // *Ukrainian biochemical journal*. 2014. Т. 86. № 4. С. 18—35.
- [29] *Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В.* Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. С. 163—178.
- [30] *Munns R., James R.A., Läuchli A.* Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals // *Journal of experimental botany*. 2006. Vol. 57. № 5. P. 1025—1043.
- [31] *Луценко Э.К., Марушко Е.А., Кононенко Н.В., Леонова Т.Г.* Влияние фузикокина на ранние этапы роста сорго при высоких концентрациях NaCl // *Физиология растений*. 2005. Т. 52. № 3. С. 378—383.

Сведения об авторах:

Кононенко Неонила Васильевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: nilava@mail.ru

Диловарова Татьяна Анатольевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы геномной модификации ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: dilovarova@yandex.ru

Канавский Роман Валерьевич — студент Российского государственного аграрного университета; e-mail: rkanav@yandex.ru

Лебедев Святослав Валерьевич — доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры Оренбургского государственного университета

Баранова Екатерина Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: greenpro2007@ Rambler.ru

Федореева Лариса Ивановна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник группы геномной модификации ФГБНУ Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии; e-mail: fedlara@inbox.ru

Для цитирования:

Кононенко Н.В., Диловарова Т.А., Канавский Р.В., Лебедев С.В., Баранова Е.Н., Федореева Л.И. Оценка морфологических и биохимических параметров устойчивости различных генотипов пшеницы к хлоридному засолению // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство*. 2019. Т. 14. № 1. С. 18—39. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-18-39.

EVALUATION OF MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESISTANCE PARAMETERS TO CHLORIDE SALINATION IN DIFFERENT WHEAT GENOTYPES

Neonila V. Kononenko¹, Tat'yana A. Dilovarova¹, Roman V. Kanavsky^{1,2},
Svyatoslav V. Lebedev^{3,4}, Ekaterina N. Baranova¹,
Larisa I. Fedoreeva^{1,5}

¹Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences
Moscow, 127550, Russian Federation

²Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy
Moscow, 127550, Russian Federation

³Orenburg State University
Orenburg, 460018, Russian Federation

⁴Federal Research Center of Russian Academy of Sciences
Orenburg, 460000, Russian Federation

⁵Lomonosov Moscow State University
Moscow, 119192, Russian Federation

Abstract. Determining salt tolerance potential in wheat is one of the most important problems in breeding practice for areas with primary and secondary salinity. Presence of large areas of saline soils results in inhibition of growth, development and stability in obtaining high yields of agricultural plants. Therefore, there is a need for a comprehensive studying and improving of diagnostic methods during early growth stages. Different genotypes of wheat *Triticum aestivum* Host. and *Triticum durum* Desf. were used to identify salt tolerance markers. Both morphometric and some biochemical indicators of wheat varieties were used as salt tolerance markers. At this stage, it was shown that a comprehensive description of wheat varieties is needed to assess resistance of wheat varieties to chloride salinity.

Key words: wheat, NaCl, tolerance, roll crop, phenotypic and biochemical markers

REFERENCES

- [1] Balandrán-Quintana RR, Mercado-Ruiz JN, Mendoza-Wilson AM. Wheat bran proteins: a review of their uses and potential. *Food Reviews International*. 2015; 31(3):279—293. Available from: doi: 10.1080/87559129.2015.1015137.
- [2] Kovrigina LV, Zaushintseva AV, Petunkina LO. Laboratory-based comparative assessment of salt-tolerance in barley cultivars. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2006; 162:44—49. (In Russ).
- [3] Udovenko GV, Goncharova ÉA. *Effect of extreme environmental conditions on yield structure of agricultural plants*. Leningrad: Gidrometeoizdat Publ.; 1982. (In Russ).
- [4] Belozerova AA, Bome NA. Study of spring wheat reaction to salinity on the variability of sprouts morphometric parameters. *Fundamental research*. 2014; (12—2):300—306. (In Russ).
- [5] Maas EV, Grieve CM. Spike and leaf development of sal-stressed wheat. *Crop Science*. 1990; 30(6):1309—1313. Available from: doi: 10.2135/cropsci1990.0011183X00300060031x.
- [6] Maas EV, Lesch, SM, Francois LE, Grieve CM. Tiller development in salt-stressed wheat. *Crop science*. 1994; 34(6):1594—1603. Available from: doi: 10.2135/cropsci1994.0011183X00340060032x.

- [7] Turki N, Harrabi M, Okuno K. Effect of salinity on grain yield and quality of wheat and genetic relationships among durum and common wheat. *J Arid Land Studies*. 2012; 22(1):311—314.
- [8] Houshmand S, Arzani A, Mirmohammadi-Maibody SAM. Effects of salinity and drought stress on grain quality of durum wheat. *Communications in soil science and plant analysis*. 2014; 45(3):297—308. Available from: doi: 10.1080/00103624.2013.861911.
- [9] Boiko LA. *Physiology of plant root system under soil salinization condition*. Leningrad: Nauka Publ.; 1969. (In Russ).
- [10] Colmer TD, Flowers TJ, Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2006; 57(5):1059—1078. Available from: doi: 10.1093/jxb/erj124.
- [11] Baranova EN, Gulevich AA. Problems and perspectives of genetic engineering approach to the resolving of the tasks of plant resistance to salinity. *Agricultural Biology*. 2006; 41(1):39—56. (In Russ).
- [12] Munns R, James RA, Gilliham M, Flowers TJ, Colmer TD. Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biology*. 2016; 43(12):1103—1113. Available from: doi: 10.1071/FP16187
- [13] Zhurbitskii ZI. *Theory and practice of vegetation method*. Moscow: Nauka Publ.; 1968. (In Russ).
- [14] Sid'ko AF, Botvich IY, Pis'man TI, Shevymogov AP. Estimation of the chlorophyll content and yield of grain crops via their chlorophyll potential. *Biophysics*. 2017; 62(3):565—569. (In Russ). Available from: doi: 10.1134/S0006350917030198.
- [15] Sun Z, Liu S, Fan J, Li Q, Wang K, Guo M, Zhang G, Ren L, Zheng G, Ma T, Pu H, Cai J, Jiang D, Chen F, Li X. Performance index derived from chlorophyll A fluorescence induction curve indicates the salt induced grain yield loss in wheat. *JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences*. 2018; 28(3):837—844.
- [16] Farkas GL. Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. In: Parthier D, Boulter D. (eds.) *Nucleic Acids and Proteins in Plants II. Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1982. p. 224—262. Available from: doi: 10.1007/978-3-642-68347-3_8.
- [17] Fukuda H, Komamine A. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant physiology*. 1980; 65(1):57—60. Available from: doi: 10.1104/pp.65.1.57.
- [18] van Doorn WG, Woltering EJ. Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *Journal of Experimental Botany*. 2004; 55(406):2147—2153. Available from: doi: 10.1093/jxb/erh264.
- [19] Kirnos MD, Volkova SA, Ganicheva NI, Kudryashova IB, Vanyushin BF. Synchronous DNA synthesis in coleoptile and initial leaf of developing etiolated wheat seedlings: nature and correlation of nuclear and mitochondrial DNA synthesis. *Biochemistry*. 1983; 48(10): 1587—1595. (In Russ).
- [20] Kirnos MD, Alexandrushkina NI, Vanyushin BF. Apoptosis in cells of the initial leaf and coleoptile of wheat seedlings: internucleosomal fragmentation of genome and synthesis of “heavy” oligonucleosome-size DNA fragments. *Biochemistry*. 1997; 62 (8):1008—1014. (In Russ).
- [21] Vanyushin BF. Apoptosis in plants. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 2001; 41(1):3—38. (In Russ).
- [22] Bakeeva LE, Kirnos MD, Aleksandrushkina NI, Kazimirchuk SB, Shorning BY, Zamyatnina VA, Yaguzhinsky LS, Vanyushin BF. Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles. *FEBS Letters*. 1999; 457(1):122—125. (In Russ).
- [23] Vanyushin BF, Bakeeva LE, Zamyatnina VA, Aleksandrushkina NI. Apoptosis in plants: Specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *Int. Rev. Cytol*. 2004; 233:135—179. (In Russ).
- [24] Cimini S, Ronci MB, Barizza E, de Pinto MC, Locato V, Schiavo FL, De Gara L. Plant cell cultures as model systems to study programmed cell death. In: De Gara L, Locato V. (eds) *Plant Programmed Cell Death. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2018. p. 173—186. Available from: doi: 10.1007/978-1-4939-7668-3_16.

- [25] Gibson SW, Todd CD. Arabidopsis AIR12 influences root development. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015; 21(4):479—489. Available from: doi: 10.1007/s12298-015-0323-1.
- [26] Foyer CH, Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2009; 11(4):861—905. Available from: doi: 10.1089/ars.2008.2177.
- [27] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008; 59:651—681. Available from: doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- [28] Kolupaev IE, Karpets IV. Reactive oxygen species and stress signaling in plants. *Ukrainian biochemical journal*. 2014; 86(4):18—35. (In Russ).
- [29] Kreslavski VD, Los DA, Allakhverdiev SI, Kuznetsov VV. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012; 59(2):163—178. (In Russ).
- [30] Munns R, James RA, Läuchli A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of experimental botany*. 2006; 57(5):1025—1043. Available from: doi: 10.1093/jxb/erj100.
- [31] Lutsenko EK, Marushko EA, Kononenko NV, Leonova TG. Effects of fusicoccin on the early stages of sorghum growth at high NaCl concentrations. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2005; 52(3):378—383. (In Russ).

For citation:

Kononenko N.V., Dilovarova T.A., Kanavsky R.V., Lebedev S.V., Baranova E.N., Fedoreeva L.I. Evaluation of morphological and biochemical resistance parameters to chloride salination in different wheat genotypes. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 2019, 14 (1), 18—39. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-18-39.



DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-40-48

FORMATION OF PLUM SEEDLINGS UNDER DRIP IRRIGATION IN CENTRAL NON-BLACK SOIL REGION OF RUSSIA

**Nikolai N. Dubenok, Aleksandr V. Gemonov,
Aleksandr V. Lebedev, Elena V. Glushenkova**

Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy
Moscow, 127550, Russian Federation
ndubenok@mail.ru

Abstract. The article presents the results of studying formation of plum seedlings under drip irrigation in conditions of the Central Non-Black Soil Region of Russia. Field research was carried out on the territory of the training and experimental farming, fruit-growing laboratory “Michurinsky Garden” of the Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy. The factors studied were soil irrigation regimes (60—80, 70—90, 80—100% of the lowest moisture capacity) and plum varieties (“Utro” and “Mashenka”). The results of the experiment showed that plum seedlings grown under conditions of insufficient and uneven moistening were characterized by the lowest biometric indices. The most severe lack of soil moisture was observed during intensive growth (May — early June). Insufficient and uneven moistening with intervals of reduced moistening leads to several growth waves in plants. In the seedlings grown under drip irrigation the second and third waves of growth were not observed. In irrigation variants, the root system of seedlings was mainly located in the upper arable layer of the soil which was best supplied with nutrients, had the lowest density and favorable air regime. Location of root system along the drip line and at the depth of 30 cm facilitated transferring seedlings to nurseries and ensured less damage to them during transplantation.

Key words: drip irrigation, irrigation regime, seedlings, plum

INTRODUCTION

Despite potential opportunities, gardening in Russia is not able to meet the population’s requirements of fruit and berry products within the recommended annual physiological rate of 90—100 kg per person [1—3]. Russia is among the top ten countries in terms of consumption of fruit and berry products being also one of their major importers in the world. With the annual consumption of plum being about 180 thousand tons, the share of imports is 25—35%.

Today, most of the imported fruit adapted to the climatic conditions of Russia, can be replaced with Russian substitutes. Despite the fact that in recent years much attention has been paid to horticulture, it is quite difficult for producers to achieve sustainable indicators in the market and to increase the economic efficiency of production. According to the Federal State Statistics Service, the area under the perennial plantations of fruit and berry crops annually declines by 5—10 thousand hectares, which is due to the extermination of extensive gardens made in the XX century and no longer meeting modern requirements. Gardens of intensive type occupy about 10% of the area [4].

On August 7, 2014, according to the Decree of the President of the Russian Federation No. 560 of August 6, 2014, a number of goods were banned from being imported into Russia from the United States of America, all countries of the European Union, Canada, Australia and Norway. In 2010—2014, before the ban was imposed, the share of plum imports from the countries of the European Union was approximately 25% of the total volume of imported products. No fruit imports create opportunities for Russian agricultural producers to fill the niche in the market.

At present, the problem of food security is actively discussed by public authorities of all levels. According to V.A. Dadalko [5], food security should be considered as an opportunity of the government and the ability of the domestic agribusiness to produce and supply the domestic market and state food reserves with food resources in the required assortment, sufficient quantities and of proper quality. In accordance with the federal target programs “Development of agricultural land reclamation in Russia for 2014—2020” and “Development of horticulture and nurseries in the Russian Federation for 2012—2014 with the continuation of activities until 2020” areas of horticultural facilities are to be expanded, which will contribute to solving the problem of the country’s food security.

One of the ways to intensify agricultural production in horticulture and plant growing is to increase the efficiency of nature management through resource-saving technologies [6, 7]. One of such technologies is drip irrigation, which allows improving quality and yield of farm crops [8—10]. At present, there are no scientific based resource-saving technologies for growing plum seedlings in nurseries of the Non-Black Soil Region of Russia. Therefore, the aim of the study was to determine influence of variations of soil moisture availability on the growth and development of plum seedlings and to develop effective regime for nursery moistening in the Non-Black Soil Region.

MATERIALS AND METHODS

Drip irrigation refers to resource-saving methods of watering farm crops. It is widespread in arid zones but is also relevant in areas with excessive moisture where precipitation is unevenly throughout the year, especially during plant growing season. Drip irrigation is possibility to irrigate in accordance with biological characteristics of water consumption in irrigated crops and maintain soil moisture in optimal range.

Field research was carried out on the territory of the training and experimental the fruit growing laboratory “Michurinsky Garden” of the Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy. Despite the geographical position, the natural and climatic conditions are close to the average values for the Non-Black Soil Region. Two-factorial experiment was carried out there in spring 2016 to study the effect of different moistening on formation of two plum seedlings varieties. The scheme of the experiment (Figure 1) included four variants (factor A) for the regime of soil moistening:

- ◆ maintaining humidity 60—80% of the lowest moisture capacity;
- ◆ maintaining humidity 70—90% of the lowest moisture capacity;
- ◆ maintaining of humidity 80—100% of the lowest moisture capacity;
- ◆ control (without irrigation).

The proposed irrigation regimes, where the soil moisture content is maintained in a narrow range, allow not only to increase the efficiency of irrigation water use and to reduce the water consumption, but also maintain a more optimal water and air regimes. Moreover, the design features of drip irrigation allow to maintaining soil moisture in small ranges through increase in frequency of irrigation with small amounts of water in accordance with crop biological needs.

The second factor was plum varieties — “Mashenka” and “Utro” (factor B). Planting of seedlings was carried out according to the scheme of 0.9 × 0.33 m, i.e. the distance between the rows of one variant was 90 cm, and the distance between the plants in the row was 33 cm, while the distance between adjacent rows of different variants was 1 m. This scheme provides planting density of 33.5 thousand plants per ha.

All variants of the experiment had 3-fold replication with a systematic arrangement of the plots. The plot area was 40 m², 30 seedlings of each variety were planted in each replication. The total area of the pilot site was 930 m². The total number of plum trees planted was 1080. For carrying out biometric measurements and phenological observations, 24 countable plants and 6 protective plants, 1 plant at the beginning and end of the row, were isolated on each plot.

Productivity assessment of non-fruiting plants was impossible, the main biological indicators characterizing growth of seedlings (diameter of the stem, height of plants, leaf area of one seedling) were measured to determine the optimal irrigation regime.

The experimental site is located on sod-podzolic, cultivated, soil-gley, deep-till, medium loamy soil on moraine loam lined at the depth of 150—170 cm by submerged sands.

During the research, there were used data of Mikhelson Meteorological Observatory of the Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, which is located in close proximity to the experimental site.

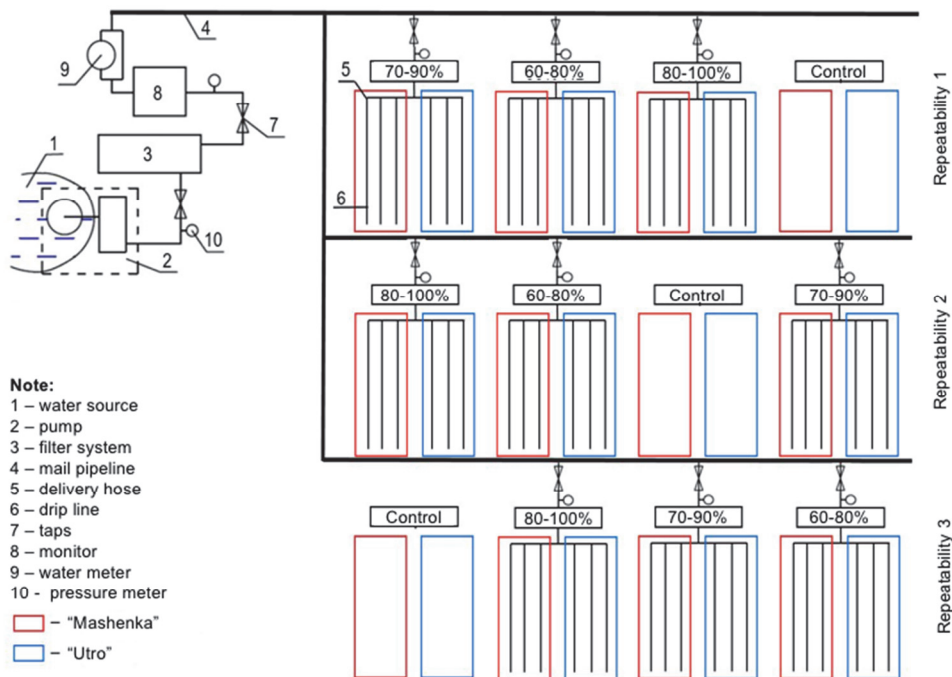


Fig. 1. The scheme for setting up a two-factor experiment

For irrigation there was used a perennial drip line, equipped with built-in droppers with an autocompensation system, i.e., with a change in working pressure due to the silicone membrane, a constant flow rate of 3.8 l/h was maintained. The moisture content of the soil was monitored with the help of tensiometers calibrated depending on the data of the thermostatic-weight method.

RESULTS AND DISCUSSION

The choice of irrigation regime (frequency of irrigation, irrigation rate) was affected by actual soil moisture depended on climatic parameters such as air temperature and precipitation. The vegetation season of 2016 was characterized by uneven precipitation: precipitation deficit of 32.9% of the long-term value was observed in June, excess of precipitation over the long-term value in August was 94.9%. The summer months of 2016 were 8.3—17.5% warmer than the average values.

Maximum irrigation rates are typical of the most moisturized options, but the irrigation rate in 2017 was higher than in 2016. This was due to the climatic features of the years: the year 2016 turned out to have a more uneven precipitation than 2017. The analysis of the data (Table 1) reveals that increased soil moisture leads to greater water consumption, and, consequently, flow of water to maintain such a level of moistening increases. Irrigation rates in such variants increased due to the increase in frequency of irrigation. Frequent waterings make it possible to avoid dramatic fluctuations in soil moisture, and plants were not subjected to periodic stresses caused by moisture deficit. In 2017, irrigation rates were 10—20% lower compared to the previous year.

Table 1

Characteristics of irrigation regimes in 2016—2017

Index	Irrigation option, percent of the lowest moisture capacity							
	60—80%		70—90%		80—100%		Control	
	2016 year	2017 year	2016 year	2017 year	2016 year	2017 year	2016 year	2017 year
Irrigation rate, m ³ /ha	1473	985	1574	890	1397	1242	x	x
Average irrigation rate, m ³ /ha	47.5	39.4	46.3	37.5	38.8	44.4	x	x
Number of waterings	31	25	34	25	36	29	x	x

Biennial seedlings are not fertile, so there is no possibility of assessing their productivity through the yield indicator. V.I. Maidebur, V.M. Vasyuta, I.M. Merezhko, V.V. Burkovsky [9] point out that it is necessary to select high-quality seedlings with vigorous growth for planting in a garden, focusing on such parameters as stem diameter, branching, plant height, annual shoots growth, leaf surface area, quality of the root system. Many authors have shown that the diameter of the seedlings is an indicator that allows the most accurate assessment of the quality of the planting material [1, 10].

According to the results of the experiment, the maximum seedling stem diameter was obtained in the most moistened variants of the experiment: while maintaining humidity in the range of 80—100% of the lowest moisture capacity and 70—90% of the lowest moisture capacity. Both plum varieties “Mashenka” and “Utro” were responsive to soil moisture increasing, since plum is a moisture-requiring fruit crop. Comparing with the control variant without irrigation stem diameter in variants with irrigation was 15—25% larger. Thus, seedlings grown under drip irrigation had the best quality of planting material.

Two-year-old seedlings of variety “Utro” were 15—20% higher than that of “Mashenka”. One-year-old seedlings were more sensitive to irrigation. Here the differences with the control variant reached 35%, and in the two-year-old seedlings — 30%. In 2016, the greatest increase in height had the most moistened variants of the experiment. In 2017, due to the cold summer, there were no clear differentiation of the annual growth in height among variants with irrigation. Plants grown under irrigation had increase in growth of 5—15% more than plants in the control grown without irrigation.

Leaf surface area which determines the photosynthetic potential of plants is an indicator of quality and productivity of seedlings. The largest leaf surface area is formed in the most moistened irrigation variants. Leaf surface area of two-year “Utro” seedlings was larger than in “Mashenka” plants. In the variant with maintenance of soil moisture at the level of 80—100% of the lowest moisture capacity, the area of the leaf surface of one “Utro” plant was 635 cm², and in “Mashenka” plant — 576 cm².

An important indicator that determines quality of planting material of fruit crops is its age. Currently, among gardeners there is no single scientifically based opinion on the recommended age of planting material. Two-year-old seedlings seem to be preferred [14]. Thus, results of the experiment for the annual and biennial seedlings have shown that the most optimal conditions were while maintaining the soil moisture in the range of 80—100% of the lowest moisture capacity.

Table 2

Morphometric indices of plum seedlings depending on the variants and research years

Experiment options	Stem diameter, mm			Height of plants, cm			Annual growth of shoots, cm			The leaf area of one seedling, cm ²		
	Variety “Mashenka”	Variety “Utro”	Mean values	Variety “Mashenka”	Variety “Utro”	Mean values	Variety “Mashenka”	Variety “Utro”	Mean values	Variety “Mashenka”	Variety “Utro”	Mean values
2016 year												
Control	8.3	8.7	8.5	26.7	28.1	27.4	15.6	17.4	16.5	135	131	133
60—80%	9.2	9.4	9.3	27.4	29.3	28.35	17.2	18.3	17.75	153	166	159.5
70—90%	10.7	11.5	11.1	33.5	34.3	33.9	24.3	25.6	24.95	174	181	177.5
80—100%	12.3	12.1	12.2	35.4	36.7	36.05	25.8	27.4	26.6	188	192	190
Average	10.1	10.4	x	30.8	32.1	x	20.7	22.2	x	162.5	167.5	x
LSD _{0.05} for private differences			1.0	3.07			2.2			18.9		
LSD _{0.05} (irrigation regime)			0.9	2.8			2.0			16.4		
LSD _{0.05} (variety)			0.4	1.3			0.8			9.3		
2017 year												
Control	10.5	11.2	10.9	63.9	74.3	69.1	37.2	46.2	41.7	356	378	367
60—80%	12.3	13.1	12.7	71.4	78.1	74.75	44.0	48.8	46.4	395	452	423.5
70—90%	12.8	13.4	13.1	75.3	82.1	78.7	41.8	47.8	44.8	483	534	508.5
80—100%	13.0	13.5	13.3	76.4	85.3	80.85	41.0	48.6	44.8	576	635	605.5
Average	12.2	12.8	x	71.8	80.0	x	41.0	47.9	x	452.5	499.8	x
LSD _{0.05} for private differences			1.3	7.8			4.8			51.1		
LSD _{0.05} (irrigation regime)			1.1	7.2			4.2			46.8		
LSD _{0.05} (variety)			0.6	3.2			2.3			20.4		

The degree of soil moistening and the distribution of moisture along the profile had a significant effect on growth rates of seedling root system. The effect of irrigation regimes on development of root system is shown in Table 3. The largest mean values of root volume, number of roots and average root length were obtained in the variant with maintaining soil moisture in the range of 80—100% of the lowest moisture capacity. In the first year of this variant of experiment, the root volume was 154 ml (285.2% more than in control), the number of roots —21 (300.0% more than in control) and an average root length of 24.9 cm (162.7% more than in control). In the second year of experience, the volume of roots was 354 ml (292.6% more than in control), the number of roots — 47 (247.4% more than control) and the average length of the root — 26.9 cm (146.2% more than in control).

It is important to note that the root system in the variants of the irrigation experiment was mainly located in the upper arable layer of soil which was best provided with nutrients, had the lowest density and favorable air regime. In addition, this horizon warms up quickly, resulting in optimal conditions for the development of seedlings.

Table 3

Basic indicators of root system growth of plum seedlings

Irrigation regime	Volume of roots		Number of roots		Average root length	
	cm ³	% to control	number	% to control	cm	% to control
2016 year						
Control	54	100.0	7	100.0	15.3	100.0
60—80%	104	192.6	12	171.4	17.4	113.7
70—90%	143	264.8	16	228.6	21.8	142.5
80—100%	154	285.2	21	300.0	24.9	162.7
LSD _{0.05}	36.5	—	3	—	3.1	—
2017 year						
Control	121	100.0	19	100.0	18.4	100.0
60—80%	243	200.8	28	147.4	23.2	126.1
70—90%	295	243.8	36	189.5	22.9	124.5
80—100%	354	292.6	47	247.4	26.9	146.2
LSD _{0.05}	95.5	—	7	—	5.3	—

Root system of seedlings formed conical shape in the control variant without irrigation. The major direction of root growth was downward toward the more humid layers, breaking through the compacted sub-plow horizon. In variants with irrigation, root system spread in the upper 30 cm layer and extended along the drop line. This arrangement facilitated transplanting of seedlings to nurseries and led to less damage during transplantation.

CONCLUSIONS

1. The results of the experiment showed that plum seedlings grown under conditions of insufficient and uneven moistening were characterized by the lowest biometric indices. Biometric indices of plants allowed us to conclude that the most optimal variant was drip irrigation regime with maintaining soil moisture in the range of 80—100% of the lowest moisture capacity.

2. The most severe scarcity of soil moisture was observed during the period of intensive growth (May — early June). Insufficient and uneven moistening with intervals of reduced moistening caused several growth waves in seedlings grown under drip irrigation, the second and third waves of growth were not observed.

3. The most intensive development of the root system of plum seedlings was in the variant with a constant maintenance of soil moisture in the range of 80—100% of the lowest moisture capacity. Drip irrigation contributed to the constant provision of seedlings with sufficient amount of available moisture with dissolved nutrients in the root zone.

4. In irrigated plants, the root system of seedlings was mainly located in the upper arable layer of the soil, provided with nutrients, had the lowest density and favorable air regime. The location of the root system along the drip line and at the depth of 30 cm facilitated transplanting seedlings to nurseries and led to their less damage during transplantation.

©N.N. Dubenok, A.V. Gemonov, A.V. Lebedev, E.V. Glushenkova, 2019.

REFERENCES

- [1] Kravtsov SA. Role of the government in development of horticulture in Russia. *Horticulture and Viticulture*. 2010; (5):14—19. (In Russ).
- [2] Trunov YV, Medvedev SM. The state and prospects for the development of gardening in the Central Federal District. *Horticulture and Viticulture*. 2009; (5):16—17. (In Russ).
- [3] Chekmarev PA. The state and prospects of development of vegetable growing and gardening in the Russian Federation. *Horticulture and Viticulture*. 2010; (3):5—14. (In Russ).
- [4] Trunov YV, Solov'ev AV. The state and prospects of development of gardening in Russia. Technological features of modern gardening. *Bulletin of Michurinsk State Agrarian University*. 2012; (3):42—49. (In Russ).
- [5] Dadalko VA. Food security as a component of national and state economic security. *Vestnik UGATU*. 2013; 17(7):17—25. (In Russ).
- [6] Kulikov IM, Minakov IA. The development of horticulture in Russia: trends, problems, prospects. *Agricultural Science Euro-North-East*. 2017; (1):9—15. (In Russ).
- [7] Kulikov IM, Minakov IA. The status and effectiveness of the intensification of horticulture. *AIC: economics, management*. 2017; (4):4—15. (In Russ).
- [8] Dubenok NN, Borodychev VV, Lytov MN, Belik OA. Special features of soil water regime with trickle irrigation of crops. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2009; (4):22—25. (In Russ).
- [9] Dubenok NN, Borodychev VV, Shentseva EV, Strizhakova EA, Shumakova KB. Growing eggplant under drip irrigation using the tunnel shelter for early production. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2012; (9):38—42. (In Russ).
- [10] Dubenok NN, Borodychev VV, Bogdanenko MP, Vybornov VV, Shumakova KB. *Tekhnologiya vozdehlyvaniya rannego repchatogo luka pri kapel'nom oroschenii* [Cultivation technology of early onion under drip irrigation]. Moscow: Prospekt Publ.; 2016. (In Russ).
- [11] Buntsevich LL, Shcheglov SN, Kostyuk MA, Besedina EN. Studying of growing efficiency of early maturing and high yielding apple saplings on the rootstocks of “super-standard” category. *Fruit growing and viticulture of South Russia*. 2014; 26(2):12—20. (In Russ).
- [12] Maidebura VI, Vasyuta VM, Merezhko IM, Burkovskii VV. *Growing fruit and berry seedlings*. Kiev: Urozhai Publ.; 1984. (In Russ).

- [13] Merezhko IM. *Quality of planting material and productivity of fruit trees*. Kiev: Urozhai Publ.; 1991. (In Russ).
- [14] Pereira AR, Green S, Nova NAV. Penman—Monteith reference evapotranspiration adapted to estimate irrigated tree transpiration. *Agricultural water management*. 2006; 83(1—2):153—161. Available from: doi: 10.1016/j.agwat.2005.11.004.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Dubenok Nikolai Nikolaevich — Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Agricultural Sciences, Head of the Department of Agricultural Land Reclamation, Forestry and Land Management, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy; e-mail: ndubenok@mail.ru, eLibrary SPIN-code 1856-9793

Gemonov Aleksandr Vladimirovich — PhD Student, Department of Agricultural Land Reclamation, Forestry and Land Management, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy; e-mail: agemonov@yandex.ru, eLibrary SPIN-код 3293-5840

Lebedev Aleksandr Vyacheslavovich — PhD Student, Department of Agricultural Land Reclamation, Forestry and Land Management, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy; e-mail: mail@lebedev.fun, eLibrary SPIN-code 5789-5540

Glushenkova Elena Vladimirovna — Candidate of Philological Sciences, Associate Professor, Department of Foreign Languages Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy; e-mail: agemonov@yandex.ru.

For citation:

Dubenok N.N., Gemonov A.V., Lebedev A.V., Glushenkova E.V. Formation of plum seedlings under drip irrigation in Central Non-Black Soil Region of Russia. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 2019, 14 (1), 40—48. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-40-48.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-40-48

ФОРМИРОВАНИЕ САЖЕНЦЕВ СЛИВЫ ПРИ КАПЕЛЬНОМ ОРОШЕНИИ В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОГО НЕЧЕРНОЗЕМЬЯ

Н.Н. Дубенок, А.В. Гемонов, А.В. Лебедев,
Е.В. Глушенкова

Российский государственный аграрный университет —
Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева
Москва, Российская Федерация, 127550

Аннотация. В статье представлены результаты изучения формирования саженцев сливы при капельном орошении в условиях Центрального Нечерноземья. Полевые исследования проводились на территории учебно-опытного хозяйства, лаборатории плодоводства «Мичуринский сад» Российского государственного аграрного университета — МСХА имени К.А. Тимирязева. В качестве изучаемых факторов выступали режимы орошения почвы (60—80, 70—90, 80—100% наименьшей влагоемкости) и сорта («Утро» и «Машенька»). Результаты опыта показывают, что саженцы сливы, выращиваемые в условиях недостаточного и неравномерного увлажнения, характеризуются наименьшими биометрическими показателями. Наиболее сильно дефицит почвенной влаги проявляется в период интенсивного роста (май — начало июня). Недостаточное и неравномерное увлажнение

с промежутками пониженного увлажнения приводит к появлению у растений нескольких волн роста. У саженцев, которые выращиваются при капельном орошении, второй и третьей волн роста не наблюдается. В вариантах с орошением корневая система саженцев преимущественно расположена в верхнем пахотном слое почвы, который лучше всего обеспечен питательными элементами, имеет наименьшую плотность и благоприятный воздушный режим. Расположение корневой системы вдоль капельной линии и на глубине до 30 см облегчает выкопку саженцев в питомниках и приводит к их меньшему повреждению при пересадке.

Ключевые слова: капельное орошение, режим орошения, саженцы, слива

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] *Кравцов С.А.* Роль государства в развитии садоводства России // Садоводство и виноградарство. 2010. № 5. С. 14—19.
- [2] *Трунов Ю.В., Медведев С.М.* Состояние и перспективы развития садоводства в Центральном Федеральном округе // Садоводство и виноградарство. 2009. № 5. С. 16—17.
- [3] *Чекмарев П.А.* Состояние и перспективы развития овощеводства и садоводства в Российской Федерации // Садоводство и виноградарство. 2010. № 3. С. 5—14.
- [4] *Трунов Ю.В., Соловьев А.В.* Состояние и перспективы развития садоводства в России. Технологические особенности современного садоводства // Вестник МичГАУ. 2012. № 3. С. 42—49.
- [5] *Дадалко В.А.* Продовольственная безопасность как составляющая национальной и экономической безопасности государства // Вестник УГАТУ. 2013. Т. 17. № 7. С. 17—25.
- [6] *Куликов И.М., Минаков И.А.* Развитие садоводства в России: тенденции, проблемы, перспективы // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2017. № 1. С. 9—15.
- [7] *Куликов И.М., Минаков И.А.* Состояние и эффективность интенсификации садоводства // АПК: Экономика, управление. 2017. № 4. С. 4—15.
- [8] *Дубенок Н.Н., Бородычев В.В., Лытов М.Н., Белик О.А.* Особенности водного режима почвы при капельном орошении сельскохозяйственных культур // Достижения науки и техники АПК. 2009. № 4. С. 22—25.
- [9] *Дубенок Н.Н., Бородычев В.В., Шенцева Е.В., Стрижакова Е.А., Шумакова К.Б.* Выращивание баклажан при капельном орошении с использованием тоннельных укрытий для получения ранней продукции // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 9. С. 38—42.
- [10] *Дубенок Н.Н., Бородычев В.В., Богданенко М.П., Выборнов В.В., Шумакова К.Б.* Технология возделывания раннего репчатого лука при капельном орошении. М.: Проспект, 2016. 176 с.
- [11] *Бунцевич Л.Л., Щеглов С.Н., Костюк М.А., Беседина Е.Н.* Изучение эффективности выращивания скороплодных высокоурожайных саженцев яблони на подвоях категории «супер-стандарт» // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2014. Т. 26. № 22. С. 12—20.
- [12] *Майдебур В.И., Васюта В.М., Мережко И.М., Бурковский В.В.* Выращивание плодовых и ягодных саженцев. Киев: Урожай. 1984. 232 с.
- [13] *Мережко И.М.* Качество посадочного материала и продуктивность плодовых насаждений. Киев: Урожай, 1991. 152 с.
- [14] *Pereira A.R., Green S., Nova N.A.V.* Penman—Monteith reference evapotranspiration adapted to estimate irrigated tree transpiration // Agricultural water management. 2006. Vol. 83. № 1—2. P. 153—161.



БОТАНИКА

УДК 630:181.1

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-49-56

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКОЛОГО-ФИТОЦЕНОТИЧЕСКОЙ ПРИУРОЧЕННОСТИ РОЗЫ ИГЛИСТОЙ (*ROSA ACICULARIS* L.) В ЛЕСОПАРКОВОЙ ЗОНЕ г. ЕКАТЕРИНБУРГА

Е.А. Тишкина^{1,2}, А.И. Чермных¹

¹Уральский государственный лесотехнический университет
Екатеринбург, Российская Федерация, 620100

²Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук
Екатеринбург, Российская Федерация, 620144

elena.mlob1@yandex.ru

Аннотация. На основе базы данных ГИС программы АРМ Лесфонд произведен анализ лесных площадей лесопарков г. Екатеринбург. Составлена база данных распределения подлесочных видов на территории лесопарков. Произведен анализ полученной базы данных с использованием табличного редактора Microsoft Excel. Определены закономерности распространения подлесочных видов местного и интродукционного происхождения в сосновых насаждениях лесопарковой зоны г. Екатеринбург. Установлена площадь сосновых насаждений с подлеском из двенадцати аборигенных, двух инвазионных видов и десяти видов в искусственных посадках в шести лесопарках г. Екатеринбург — Калиновском, Московском, Южном, Нижнеисетском, Шувакишском и им. Лесоводов России. Анализ материалов показал, что площадь насаждений с участием розы иглистой в составе подлеска составляет 811,4 га из 9848,45 га, однако распространение ее по лесопарковой территории крайне неоднородно. Роза иглистая встречается в Нижнеисетском лесопарке чаще, чем в других лесопарках (273,1 га). Данный вид произрастает в девяти типах леса, его экологическим и фитоценотическим оптимумом распространения является тип леса сосняк ягодниковый с полной древостоя 0,6—0,9. Наличие в подлеске данного вида и состояние его ценопопуляций свидетельствуют о типичном составе растений лесопарковой зоны г. Екатеринбург. В исследуемых лесопарках роза иглистая является одним из созидификаторов коренных типов леса наряду с рябиной обыкновенной, малиной обыкновенной, черемухой обыкновенной, ивой козьей, раkitником русским. Приведенные данные по учету лесных площадей с розой иглистой являются базой для инвентаризации ценного лекарственного сырья.

Ключевые слова: роза иглистая, *Rosa acicularis* L., лесопарк, подлесок

ВВЕДЕНИЕ

Среди подлесочных древесных видов Свердловской области роза иглистая занимает особое место, так как вид является ценным лекарственным растением. Кроме того, роза является ценным лесомелиоративным и декоративным кустарником [1—3]. В Свердловской области произрастают 2 вида — Роза иглистая —

R. acicularis Lindl и Роза майская — *R. Majalis* Herrm (*R. cinnamomea* auht., non Lindl), которые, несмотря на широкий ареал, изучены все еще недостаточно [4]. Выявление эколого-фитоценотической приуроченности данного вида и учет местобитаний его как лекарственного вида служат основой рационального использования растительных ресурсов [5]. Кроме того, роза иглистая имеет многочисленные садовые формы, которые широко используются для селекции морозостойких и теневыносливых садовых роз. Более того, это растение хорошо переносит стрижку, что дает ей дополнительное преимущество для широкого использования, разведения в садах и парках, для создания живых изгородей, групп и опушек, создания подлеска в лесопарке, а также иногда с целью подвоя для культурных роз и т.д. [6].

ЦЕЛЬ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Целью исследования является установление площади, занятой ценопопуляциями подлесочных видов, выявление эколого-фитоценотической приуроченности розы иглистой в шести лесопарках г. Екатеринбурга.

Исследования проведены в шести лесопарках г. Екатеринбурга: Шувакишском, им. Лесоводов России, Нижнеисетском, Южном, Калиновском и Московском на площади 9848,45 га на основе базы данных программы АРМ Лесфонд. Нами определены закономерности распространения подлесочных видов местного и интродукционного происхождения в сосновых насаждениях лесопарковой зоны г. Екатеринбурга. При анализе базы данных были установлены площади сосновых насаждений с подлеском из аборигенных, инвазионных видов и искусственных посадок.

База данных программы АРМ Лесфонд состоит из объединенных картографических материалов и таксационных описаний последнего актуального тура лесоустройства по территории исследования. В процессе анализа базы данных АРМ Лесфонд настраивались тематические карты пространственного расположения изучаемых видов подлеска в насаждениях лесопарковой зоны. Производилась конвертация таксационного описания из данных программы в табличный редактор Microsoft Office Excel. После визуальной идентификации данных в программе АРМ Лесфонд производился анализ таксационного описания в табличном редакторе посредством формирования сводных таблиц и использования функции «Автофильтр».

Структура таблицы базы данных на основе таксационного описания позволила получить исчерпывающую информацию о таксационной характеристике произрастающего древостоя. Согласно действующей Лесостроительной инструкции, утвержденной приказом Минприроды России от 29.03.2018 г. № 122, при таксации лесного фонда определяется информация по каждому выделу о количестве подлеска в тысячах штук на гектар, три наиболее встречающихся подлесочных породы, площадь занятая данным выделом. Использование таксации 2016—2017 года позволило получить достоверные данные о зависимости распространения розы от таксационного описания преобладающего древостоя на территории лесопарковой зоны.

Данное исследование проводилось на основе программы АРМ Лесфонд, но ранее мы проводили подобный анализ с помощью SQL-запросов в программе ГИС MapInfo [7, 8]. Методика анализа в ГИС MapInfo аналогична описанной, за исключением замены запросов в табличном редакторе на SQL-запросы в ГИС. Использование программы АРМ Лесфонд совместно с табличным редактором Microsoft Office Excel позволило увеличить скорость обработки базы данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В Калиновском лесопарке площадь, занимаемая подлеском, составляет 1092,7 га (69,7%), Московском — 713 га (50,1%), Шувакишском — 1007 га (48%), им. Лесоводов России — 811,5 га (88,8%), Нижнеисетском — 1251,1 га (74,9%) и Южном — 1922,2 га (88,3%). Количество подлесочных видов в лесопарках представлено: Московском — 10 видов, Шувакишском — 15, им. Лесоводов России — 17, Калиновском — 15, Южном — 16 и Нижнеисетском — 20. По видовому составу наиболее беден Московский лесопарк.

Созидификаторами коренных типов леса в шести лесопарках являются рябина обыкновенная, малина обыкновенная, черемуха обыкновенная, ива козья, ракитник русский, роза иглистая. Все виды встречаются в любом рассматриваемом лесопарке. Преобладают ценопопуляции рябины обыкновенной (от 32,57% до 45,16% лесопокрытой площади), исключением является Южный лесопарк, где долевое участие рябины составляет 18,78%. Сильное варьирование по площади установлено у ракитника русского от 0,22% до 50,54% в зависимости от лесопарка. Минимальную площадь занимает черемуха обыкновенная (0,5—8%). Из искусственных посадок жимолость татарская присутствует во всех лесопарках. Боярышник кроваво-красный, спирея средняя, карагана древовидная, кизильник черноплодный произрастают в пяти лесопарках, кроме Московского.

Лесопарк Калиновский расположен в северо-восточной части города. Рельеф неоднороден: в северной части чередуются заболоченные понижения и небольшие возвышенности, в южной наблюдается сильная расчлененность рельефа — возвышения в виде холмов и грив сменяются некоторыми понижениями. По территории лесопарка протекает небольшая речка Калиновка, правый приток р. Пышмы. Здесь же находятся небольшие живописные прудики, возникшие на местах затопленных шахт, где старатели в XIX в. добывали золото. Древостой состоит из сосны обыкновенной и березы повислой, реже — лиственницы сибирской, осины, ольхи серой [9]. Насаждения Калиновского лесопарка представлены спелыми высокополнотными сосняками II—III классов бонитета. Нами установлен состав подлеска данного лесопарка, состоящий из 15 видов, в том числе 8 подлесочных — рябина обыкновенная, малина обыкновенная, ива козья, роза иглистая, ракитник русский, можжевельник обыкновенный, черемуха обыкновенная и липа мелколистная, 1 инвазионный вид (клен ясенелистный) и 6 видов, возникших в результате посадок (кизильник черноплодный, барбарис обыкновенный, карагана древовидная, жимолость татарская, боярышник кроваво-красный и спирея средняя) (рис. 1). В подлеске наиболее распространены: рябина обыкновенная 376,6 га (34,5%), малина обыкновенная 211,7 га (19,4%), ива козья 156,7 га (14,3%), роза иглистая 124,1 га (11,4%) и ракитник русский 103,3 га (9,5%). Все остальные виды занимают меньше 3% лесопокрытой площади.

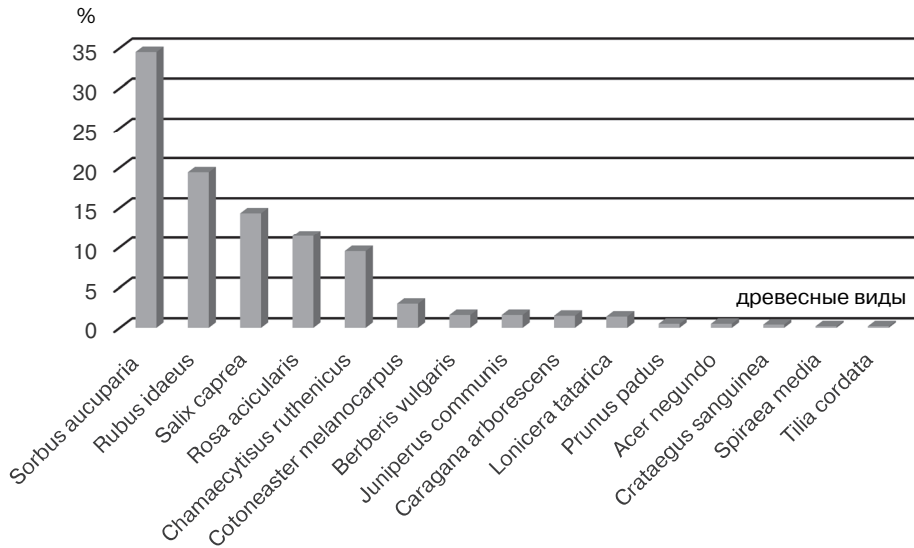


Рис. 1. Состав подлесочных видов в Калиновском лесопарке

Лесопарк Московский, вытянулся узкой полосой с Востока на Запад вдоль Московского тракта. Рельеф слегка волнистый, в западной части — волнисто-бугристый. Живописных участков мало, растительность представлена в основном чистыми сосновыми лесами. Местами (особенно в западной части) с сосной обыкновенной встречается береза повислая и лиственница сибирская.

В лесопарке в спелом и средневозрастном древостое I—II класса бонитета видовой состав представлен 10 видами, в том числе 9 — подлесочных — рябина обыкновенная, ива козья, черемуха обыкновенная, ракитник русский, роза иглистая, малина обыкновенная, можжевельник обыкновенный, ольха серая и ольха черная и из искусственных посадок — жимолость татарская (рис. 2).

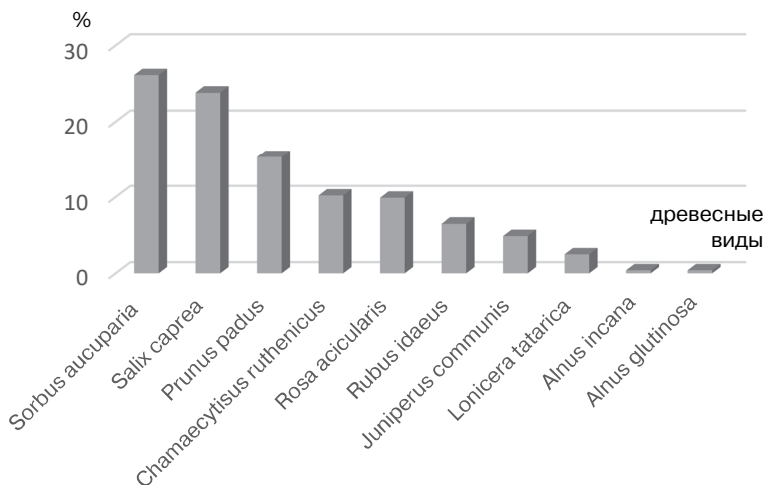


Рис. 2. Древесные виды в Московском лесопарке

Как и в Калиновском, в данном лесопарке преобладает рябина обыкновенная — 186,3 га (26,1%), затем следуют ива козья — 169,9 га (23,8%), черемуха обыкновенная — 109,4 га (15,3%), ракитник русский — 73 га (10,2%), роза иглистая — 70,4 га (9,9%), далее располагаются виды, которые меньше 7%.

Роза иглистая произрастает во всех изучаемых лесопарках. Минимальную площадь занимает данный вид в лесопарке им. Лесоводов России (3,67%), а максимальную — в Нижнеисетском (21,83%). Она встречается исключительно как подлесочный вид в составе определенного типа леса в качестве лесного микроландшафта, но чаще всего роза иглистая встречается в сосняках ягодниковых и разнотравных (табл. 1).

Таблица 1

**Площадь, занимаемая розой иглистой
в различных типах леса в лесопарковой зоне г. Екатеринбург**

№	Типы леса	Лесопарки											
		Калиновский		Шува-кишский		Московский		им. Лесоводов России		Южный		Нижнеисетский	
		площадь, га	%	площадь, га	%	площадь, га	%	площадь, га	%	площадь, га	%	площадь, га	%
1	Сосняк ягодниковый	99,2	79,9	72,2	91,4	56,5	80,3	1,7	5,7	106	45,1	171	62,6
2	Сосняк липняково-брусничный	3,6	2,9	—	—	—	—	—	—	3,6	1,5	—	—
3	Сосняк брусничный	4,1	3,3	—	—	—	—	—	—	1,4	0,7	5,3	1,9
4	Сосняк разнотравный	7,9	6,4	6,6	8,3	13,3	18,9	12,9	43,3	68,4	29,1	81,8	30
5	Сосняк орляковый	9,3	7,5	0,2	0,3	0,1	0,1	—	—	55,5	23,6	7,1	2,6
6	Ельник — сосняк травяной	—	—	—	—	0,5	0,7	—	—	—	—	1	0,7
7	Сосняк травяно-липняковый	—	—	—	—	—	—	0,8	2,7	—	—	—	—
8	Ельник-сосняк зеленомошно-ягодниковый	—	—	—	—	—	—	14,4	48,3	—	—	3,4	1,2
9	Сосняк ягодниково-липняковый	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,6	1,3

Большая приуроченность ценопопуляций розы иглистой к соснякам ягодниковым свыше 45,1 до 91,4% (за исключением лесопарка им. Лесоводов России — 5,7%) лесопокрытой площади позволяет считать ее экологическим оптимумом для существования. Данный тип леса является его фитоценотической защитой — регулятором светового, водного режимов и почвенного питания. Кроме того, данный вид распространен и в других типах леса: сосняке разнотравном (6,4—43,3%), сосняке липняково-брусничном (1,5—2,9%), сосняке брусничном (0,7—3,3%), сосняке орляковом (0,1—23,6%), ельнике — сосняке травяном (0,7%), сосняке

травяно-липняковом (2,7%), ельнике — сосняке зеленомошно-ягодниковом (1,2—48,3%) и сосняке ягодниково-липняковом (1,3%). Местообитания розы иглистой в сосняках ягодниковом и разнотравном отмечаются во всех лесопарках г. Екатеринбурга. Она редко встречается в сосняке липняково-брусничном, сосняке брусничном, ельнике-сосняке травяном, сосняке травяно-липняковом и сосняке ягодниково-липняковом.

Одной из биоэкологических особенностей розы иглистой является ее высокая теневыносливость. Предпочтительно она встречается при полноте соснового древостоя 0,6—0,9 (табл. 2). При полноте 0,3—0,5 количество особей на единицу площади уменьшается, а при 0,1—0,2 она исчезает совсем.

Таблица 2

Характер распространения розы иглистой в зависимости от полноты древостоя

Полнота древостоя	Лесопарки											
	Калиновский		Шувакишский		Московский		им. Лесоводов России		Южный		Нижнеисетский	
	площадь, га	%	площадь, га	%	площадь, га	%	площадь, га	%	площадь, га	%	площадь, га	%
0	1,1	0,9	1	1,3	—	—	3,8	12,8	0,1	0,1	3,5	1,3
0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,8	0,2
0,3	—	—	1,6	2	—	—	0,3	0,8	—	—	—	—
0,4	0,4	0,2	0,6	0,7	—	—	0,3	0,8	1,2	0,5	2,3	0,8
0,5	2,2	1,8	1,9	2,4	1,7	2,4	0,3	0,8	5,2	2,2	6	2,2
0,6	9,2	7,4	15,3	19,4	6,3	8,9	0,8	2,7	43,6	18,6	37,1	13,6
0,7	35	28,2	29,4	37,2	16,7	23,7	1,5	5	96,3	41	102,2	37,4
0,8	51	41,1	17,1	21,6	19,2	27,3	18,4	61,7	61,2	26,1	105,9	38,8
0,9	21,1	17	10,2	12,9	14	19,9	4,6	15,4	22,2	9,4	9,8	3,6
1	4,2	3,4	2	2,5	12,5	17,8	—	—	4,9	2,1	5,6	2,1

ВЫВОДЫ. РЕКОМЕНДАЦИИ

Видовое разнообразие в изучаемых лесопарках г. Екатеринбурга варьирует от 10 до 20 древесных видов. Созидификаторами коренных типов леса любого лесопарка являются рябина обыкновенная, малина обыкновенная, черемуха обыкновенная, ива козья, ракитник русский, роза иглистая, а из искусственных посадок — жимолость татарская. Инвазионные и искусственно внедренные виды не составляют конкуренции естественным подлесочным видам.

В лесных экосистемах г. Екатеринбурга ценопопуляции розы можно встретить в девяти типах леса. Эколого-фитоценологических оптимум данного вида заключается в произрастании в сосняке ягодниковом при полноте древостоя 0,6—0,9.

Работа выполнена по теме «Исследование и охрана фенотипического и генетического биологического разнообразия флоры и растительности России» № госрегистрации АААА-А17-117072810011-1.

© Е.А. Тишкина, А.И. Чермных, 2019.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] Павлова Е.П. Влияние эколого-фитоценологических факторов на накопление биологически активных веществ в плодах *Rosa acicularis* Lindley и *Rosa davurica* Pallas (Западное Забайкалье): автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ, 2009. 20 с.
- [2] Пайбердин М.В. Шиповник. М.: Гослесбуиздат, 1963. 87 с.
- [3] Muller K.D. Untersuchungen zum Pflanzschnitt bei Sanddorn // Gartenbau. 1990. № 37. 208—210.
- [4] Куликов П.В. Определитель сосудистых растений Челябинской области. Екатеринбург: УрО РАН, 2010. 970 с.
- [5] Артамонов В. Шиповник // Наука и жизнь. 1990. № 6. С. 158—160.
- [6] Кудайбергенова А.К. Биологические особенности *Rosa acicularis* Lindl. в условиях Иссык-Кульской области Кыргызстана: дис. ... канд. биол. наук. Бишкек, 2012. 141 с.
- [7] Чермных А.И., Оплеаев А.С., Залесов С.В. Возобновительные процессы под пологом лиственничников в лесах ХМАО-Югры // Актуальные проблемы лесного комплекса. 2012. № 31. С. 78—82.
- [8] Чермных А.И., Оплеаев А.С. Анализ выделенной геобазы с использованием SQL-запросов для определения статистически достоверной информации на примере ГИС MapInfo // Леса России и хозяйство в них. 2013. № 1 (44). С. 53—54.
- [9] Кожевников А.П., Кожевникова Г.М., Капралов А.В. Лесные ресурсы Урала для рекреации и познавательного туризма. Екатеринбург: Урал. гос. лесотехн. ун-т, 2009. 156 с.

Сведения об авторах:

Тишкина Елена Александровна — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры экологии, природопользования и защиты леса Уральского государственного лесотехнического университета; e-mail: elena.mlob1@yandex.ru

Чермных Артем Игоревич — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесоводства Уральского государственного лесотехнического университета; e-mail: chermnykh_artem@mail.ru

Для цитирования:

Тишкина Е.А., Чермных А.И. Исследование эколого-фитоценологической приуроченности розы иглистой (*Rosa acicularis* L.) в лесопарковой зоне г. Екатеринбурга // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2019. Т. 14. № 1. С. 49—56. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-49-56.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-49-56

ECOLOGICAL AND PHYTOCENOTIC CHARACTERISTICS OF *ROSA ACICULARIS* L. IN EKATERINBURG FOREST PARK ZONE

Elena A. Tishkina^{1,2}, Artem I. Chermnykh¹

¹Ural State Forest Engineering University
Ekaterinburg, 620100, Russian Federation

²Botanical Garden of Ural Branch of Russian Academy of Sciences
Ekaterinburg, 620144, Russian Federation

Abstract. Analysis of forest areas in forest parks of Ekaterinburg was carried out based on GIS database of AWP Lesfond program. A database of distribution of undergrowth species in forest parks was formed and then analyzed with Microsoft Excel. Regularities in the distribution of local and introductory

undergrowth species in pine forests of Ekaterinburg were determined. The area of pine forests having undergrowth of twelve aboriginal, two invasive species and ten species in artificial plantings in six forest parks of Ekaterinburg — Kalinovsky, Moskovsky, Yuzhny, Nizhneisetsky, Shuvakishsky and im. Lesovodov Rossii — was determined. Analysis of the data showed that the area covered with prickly wild rose (*Rosa acicularis*) constituted 811.4 hectares of all the undergrowth territory (9848.45 hectares), but its distribution in forest park was extremely heterogeneous. *Rosa acicularis* occurs in the Nizhneisetskiy forest park more often than in other forest parks (273.1 ha). This species is common in nine types of forest, its ecological and phytocenotic distribution optimum is berry pine forest with 0.6—0.9 stand of trees. Presence of prickly wild rose in undergrowth and condition of its cenopopulations indicate a typical composition of plants in the forest park zone of Ekaterinburg. In the forest parks studied, *Rosa acicularis* is one of the co-edificators in indigenous forest types, along with *Sorbus aucuparia*, *Rubus idaeus*, *Prunus padus*, *Salix caprea*, *Chamaecytisus ruthenicus*, *Rosa acicularis*. The data given on the calculation of forest areas with prickly wild rose are the basis for inventory of valuable medicinal raw materials and ready-made decorative forms for the introduction of urban landscaping.

Key words: *Rosa acicularis* L., forest park, undergrowth

REFERENCES

- [1] Pavlova EP. *Influence of ecological and phytocenotic factors on accumulation of biologically active substances in the fruits of Rosa acicularis Lindley and Rosa davurica Pallas (Western Transbaikalia)* [Dissertation] Ulan-Ude; 2009. (In Russ).
- [2] Paiberdin MV. *Rosehips*. Moscow: Goslesbumizdat Publ.; 1963. (In Russ).
- [3] Müller KD. Untersuchungen zum Pflanzschnitt bei Sanddorn. *Gartenbau*. 1990; (37):208—210.
- [4] Kulikov PV. *Identification guide of vascular plants for Chelyabinsk region*. Ekaterinburg: USFEU Publ.; 2010. (In Russ).
- [5] Artamonov V. *Rosehips*. *Nauka i Zhizn'*. 1990; (6):158—160. (In Russ).
- [6] Kudaibergenova AK. *Biological features of Rosa acicularis Lindl. in conditions of Issyk-Kul region of Kyrgyzstan* [Dissertation] Bishkek; 2012. (In Russ).
- [7] Chermnykh AI, Opletaev AS, Zalesov SV. The renewable processes under the canopy of larch forests in the Khanty-Mansiysk—Ugra. *Aktual'nye problemy lesnogo kompleksa*. 2012; (31): 78—82. (In Russ).
- [8] Chermnyuh AI, Opletaev AS. Forest data-base analysis with SQL-question for investigate statistic true information in GIS-MapInfo. *Lesn Rossii i khozyaistvo v nikh*. 2013; (1):53—54. (In Russ).
- [9] Kozhevnikov AP, Kozhevnikova GM, Kapralov AV. *Forest resources of Ural region for recreation and cognitive tourism*. Ekaterinburg: USFEU Publ.; 2009. (In Russ).

For citation:

Tishkina E.A., Chermnykh A.I. Ecological and phytocenotic characteristics of *Rosa acicularis* L. in Ekaterinburg forest park zone. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 2019, 14 (1), 49—56. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-49-56.

ВЕТЕРИНАРИЯ

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-57-65

ОЦЕНКА УРОВНЯ НИТРИТА — МЕТАБОЛИТА ОКСИДА АЗОТА — У ЛОШАДЕЙ С СИМПТОМОКОМПЛЕКСОМ КОЛИК МЕТОДОМ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

З.С. Артюшина¹, П.Н. Абрамов¹, Н.Б. Полянский²,
Н.А. Ткачев³, В.А. Сереженков³

¹Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени К.И. Скрябина
Москва, Российская Федерация, 109472

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Москва, Российская Федерация, 119334

³Институт химической физики имени Н.Н. Семенова РАН
Москва, Российская Федерация, 119991
artyshina.zinaida@yandex.ru

Аннотация. Патогенез заболеваний пищеварительного тракта лошадей, сопровождаемых развитием воспаления и окислительного стресса, может быть связан с недостатком монооксида азота (NO), управляющего множеством сигнальных путей в организме. Монооксид азота (NO) принимает участие в работе иммунной и нервной систем, его уровень непосредственно определяет тонус всех сосудов и течение многих патологических процессов, NO следует отнести к числу наиболее важных факторов защиты слизистой желудка и кишечника. В работе подробно освещена методика определения уровня нитрита — метаболита оксида азота — при заболеваниях лошадей с симптомокомплексом истинных коликов, а также приведены результаты измерений нитрита в сыворотке здоровых животных двух возрастных групп: 1—5 лет и 6—25 лет и животных с патологией. Концентрация нитрита в сыворотке крови у лошадей возрастной группы 6—25 лет составила $3,42 \pm 4,22$ мкМ, при этом у молодых животных (1—5 лет) уровень этого показателя был $8,24 \pm 5,42$ мкМ, что в 2,4 раза выше. Резкое снижение нитрита отмечено у всех лошадей с заболеваниями кишечника $2,07 \pm 0,90$ мкМ, особенно при метеоризме $0,6 \pm 0,4$ мкМ и спастических коликах $1,78 \pm 0,5$ мкМ. Данные факты обуславливают диагностическую и прогностическую ценность оксида азота как биомаркера регуляции перистальтики кишечника в норме и при патологии.

Ключевые слова: лошадь, колики, ЭПР-спектроскопия, нитрит, оксид азота, нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа, нитрозогемоглобин

Актуальность. Диагностика, профилактика и лечение заболеваний лошадей, протекающих с симптомокомплексом истинных коликов — одна из актуальных проблем ветеринарной медицины, поскольку они сопровождаются высокой смертностью животных и наносят значительный экономический ущерб.

Широкая распространенность заболеваний желудка и кишечника у лошадей, сложность и многогранность патогенеза, а также недостаточная освещенность вопросов дифференциальной диагностики актуализируют данную тему, требу-

ющую дальнейшего изучения, обуславливая ее высокую практическую и теоретическую значимость.

Введение. Заболевания пищеварительного аппарата лошадей имеют острый характер течения, обусловленный скрыто протекающими процессами (воспалительные явления, и как результат — развитие окислительного стресса — гиперпродукции активных форм кислорода), по причине возраста, физических нагрузок, кормления, наследственных факторов конкретного животного. По мнению ряда исследователей, в процессе патогенеза может снижаться уровень оксида азота, необходимого для нормальной работы как эндотелия сосудов и сфинктеров, так и органов в целом.

Монооксид азота (NO) наряду с двумя другими газообразными мессенджерами (CO и H₂S) принимает участие в работе иммунной и нервной систем, его уровень непосредственно определяет тонус сосудов и течение многих патологических процессов в организме. Особые физико-химические свойства данной молекулы определили способ ее транспортировки — в форме нитрозильных комплексов с гемовым железом, нитрозотиолов RSNO, а также высоко- и низкомолекулярных комплексов с негемовым железом с тиоловыми лигандами [1]. Это так называемые «комплексы 2.03» — моно- и биядерные динитрозильные комплексы (ДНКЖ).

NO синтезируется *in vivo* из L-аргинина под действием NO-синтетазы (NOS). NO модулирует активность белков посредством S-нитрозилирования: воздействию (NO⁺) подвергаются цистеиновые остатки. Синтез нитрозотиолов (RSNO) — регулируемая посттрансляционная модификация белка. Образование белковых динитрозильных комплексов при связывании тиоловыми группами железа (II) с NO также представляет собой форму посттрансляционного регулирования их активности. Один из наиболее распространенных методов при оценке степени воспалительного процесса — измерение уровня нитрата с использованием так называемого реактива Грисса — нельзя считать корректным, поскольку нитрат имеет различные источники происхождения в организме. В литературе также имеются данные об измерении концентрации нитрозотиолов (RSNO) [2].

Этот подход еще более спорный, в связи с большими методологическими трудностями их измерений, что приводит к разбросу данных в физиологических жидкостях и тканях здоровых животных до 10000 раз (от 1 нМ до 7 мкМ). В доступной литературе мы нашли публикации, связанные с измерением нитрата в сыворотке лошадей для оценки степени тяжести заболеваний [3].

Несмотря на очевидные показатели заболеваний у животных, оценка уровня нитрата не позволяла дифференцировать норму от патологии даже в случае исследования больших выборок животных [4]. Наиболее корректной оценкой уровня оксида азота в организме как в норме, так и при патологических состояниях следует считать измерение продукта его метаболизирования — нитрита [5, 6].

Поэтому целью нашей работы, исходя из анализа литературных сведений о возможной связи уровня оксида азота в сыворотке крови у лошадей с симптомокомплексом колик и характером патологических изменений функций пищеварительного аппарата в целом стало измерение уровня метаболита NO — нитрита методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием спиновых ловушек [7].

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили лошади в количестве 38 голов, при клиническом исследовании которых 8-ми был поставлен диагноз: катаральный спазм, закупорка большой ободочной кишки, колит, перемещение большой ободочной кишки, метеоризм.

С железом гемоглобина NO образует долгоживущие комплексы, позволяющие определять его непосредственно в образцах крови методом ЭПР. Для определения NO сыворотке мы использовали метод спиновых ловушек, основанный на применении дитиокарбамата и железа (II).

Для исследования брали кровь из яремной вены в пробирки с гепарином и центрифугировали в течение 10 минут на центрифуге модели CN80-2S «Armed» со скоростью 3000 об/мин для осаждения эритроцитов. После чего образцы сыворотки хранили в жидком азоте ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для измерения концентрации нитрозо-гемоглобина была использована цельная кровь. Сигналы ЭПР регистрировали на спектрометре фирмы «Брукер» (ФРГ) ECS-106.

Метод определения NO, используемый в данной работе, основан на реакции образования нитрозоиола — нитрозоцистеина (RSNO) в кислой среде ($\text{pH} = 3,5$) из аниона нитрита NO_2^- и гидрохлорида цистеина. Затем нитрозоцистеин в присутствии железа (2+) и N-метил-D,L-глуктамин дитиокарбамата (МГД) (ловушка) образует водорастворимый парамагнитный мононитрозильный комплекс железа МНКЖ МГД-Fe-NO. Определение аниона нитрита NO_2^- проводили следующим образом: белки сыворотки после разморозки удаляли фильтрованием через фильтр Microcon, Millipore Corporation, USA в течение 20 минут при 14 500 об/мин на центрифуге Mini Spin plus, Eppendorf.

Разработанный нами метод позволяет, во-первых, контролировать влияние белков сыворотки на реакцию образования МНКЖ МГД; и, во-вторых, учесть вклад высокомолекулярных RSNO как дополнительного источника нитрита.

К 50 мкл цистеина концентрацией 400 мМ добавляли 10—120 мкл сыворотки, pH раствора доводили до 3,5 добавлением 0,01 мМ HCl. Спустя 5 минут добавляли 50 мкл 40 мМ сульфата железа (II), 200 мкл 400 мМ буфера (Трис или HEPES) и 200 мкл МГД концентрацией 250 мМ. Затем pH раствора повышали до 7,6 0,06%-ным раствором NaOH. В этих условиях образуется МНКЖ МГД-Fe-NO.

Для построения калибровочной кривой к 50 мкл цистеина гидрохлорида концентрацией 400 мМ добавляли раствор нитрита натрия концентрацией 480 мкМ разного объема (2—40 мкл), pH раствора доводили до 3,5 добавлением 0,01 мМ HCl. Спустя 5 минут добавляли 50 мкл 40 мМ железа сульфата, 200 мкл 200 мМ (Трис или HEPES), 200 мкл 250 мМ МГД, pH доводили до 7,6 0,06%-ным раствором NaOH. Через 10 мин записывали ЭРО спектр МНКЖ МГД-Fe-NO. Оценку концентрации нитрита в образце производили методом двойного интегрирования и сопоставления площадей ЭПР-сигналов исследуемого и стандартного образца. В качестве последнего использовали синтезированный комплекс МГД с железом (2+) и оксидом азота: МНКЖ МГД-Fe-NO. На рис. 1 представлена зависимость интенсивности ЭПР-сигнала от концентрации нитрита $[\text{C}] = 0,134 \text{ I} - 0,024$. Коэффициент корреляции $r = 0,984$ (метод Спирмена). Расчеты производились с помощью программного обеспечения ЭПР-спектрометра Bruker ECS-106.

Результаты. На рис. 1 показана зависимость интенсивности ЭПР-сигнала (площадь подынтегральной кривой) от концентрации нитрита в диапазоне 0,3—1,6 мкМ в образце после удаления сывороточных белков центрифугированием.

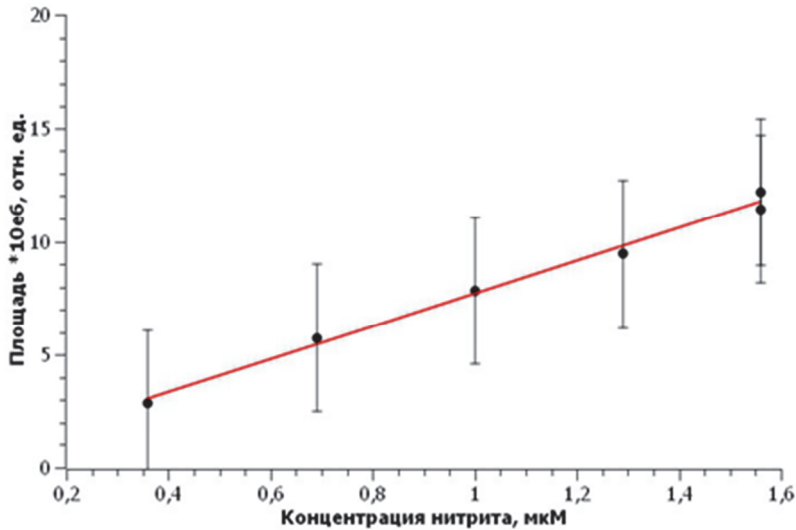


Рис. 1. Зависимость интенсивности ЭПР-сигнала (площадь подынтегральной кривой) от концентрации нитрита /
Fig. 1. Dependence of the intensity of the EPR signal (area of the integrand curve) on the concentration of nitrite

Используя построенную калибровочную кривую, были проведены измерения содержания нитрита в образцах сыворотки животных, что отражено в табл. 1.

Таблица 1 / Table 1

**Концентрация нитрита в сыворотке и нитрозогемоглобина в цельной крови лошади /
 Concentration of nitrite in serum and nitrosohemoglobin in whole horse blood**

№	Группы животных	Концентрация нитрозогемоглобина, мкМ, М ± m	Концентрация нитрита в сыворотке, мкМ, М ± m
1	Здоровые лошади, возраст от 1 года до 5 лет, n = 11	0,1 ± 0,1	Мин 0,63 ± 0,3 макс 18,9 ± 0,6
2	Здоровые лошади, возраст от 6 до 25 лет, n = 19	0,15 ± 0,1	Мин 0,30 ± 0,2 макс 15,4 ± 0,5
3	Закупорка большой ободочной кишки, 13,5 года	*	2,38 ± 0,70
4	Метеоризм, 7 лет	*	0,60 ± 0,40
5	Закупорка слепой кишки, 14 лет	*	2,41 ± 0,70
6	Перемещение большой ободочной кишки, 8 лет	0,3 ± 0,10	2,42 ± 1,30
7	Колит, 18 лет	*	2,47 ± 0,60
8	Хронические сезонные колики, закупорка тазового изгиба, 3,5 года	—	2,31 ± 0,60
9	Спастические колики, 6,5 лет	0,21 ± 0,10	1,78 ± 0,50
10	Колит (периодами), 3 года	—	6,12 ± 2,11

В таблице 1 приведены результаты измерений нитрита в сыворотке здоровых животных 2 возрастных групп 1—5 лет и 6—25 лет, а также 8 животных с патологией. Результаты статистической обработки полученных данных приведены в табл. 2.

Таблица 2 / Table 2

**Статистические показатели /
Statistical data**

	Молодые 1—5 лет	Возрастные 6—25 лет	Больные
Среднее ± ст. откл., мкМ	8,24 ± 5,42	3,42 ± 4,22	2,07 ± 0,90
Медиана, мкМ	8,7	1,5	2,4
Нормальное распределение тест Шапиро—Уилка, p	0,79	7*10 ⁻⁵	0,4274
	молодые / возрастные	молодые / больные	возрастные / больные
Форма распределения тест Колмогорова, p	0,0484	0,0074	0,6547
Медиана тест Манна—Уитни, p	0,0108	0,0391	0,2500
Среднее тест Стьюдента, p	0,0211	0,0036	0,1990

Для оценки степени различия использовали анализ формы распределения (тест Колмогорова) и сравнение медианы и среднего (тест Манна—Уитни и тест Стьюдента соответственно). Анализ показал значимые отличия по всем исследованным параметрам для возрастных и болеющих лошадей от молодых ($p = 0,0484$ и $0,0108$; $0,0074$ и $0,0391$), тогда как между выборками возрастных и болеющих различия незначимы ($p = 0,6547$ и $0,2500$).

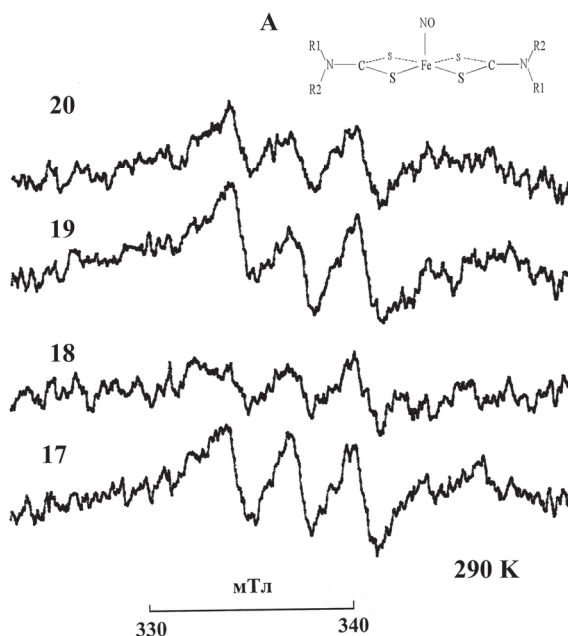


Рис. 2. Спектры ЭПР комплекса N-метил-D, L-глюкамин дитиокарбамата (МГД) с железом (2+) и оксидом азота МНКЖ МГД FeNO в сыворотке лошадей:

№ 17 — закупорка большой ободочной кишки, № 18 — метеоризм, № 19 — закупорка слепой кишки, № 20 — спастические колики. Вставка А — структурная формула парамагнитного комплекса МНКЖ МГД FeNO
Условия записи спектров: X-диапазон, центр поля 334 мТ, развертка 10 мТ, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20 мВт. Усиление $1 \cdot 10^5$, 1 накопление, температура 293 К

Fig. 2. EPR spectra of the N-methyl-D complex, L-glucamine dithiocarbamate (MGD) with iron (2+) and nitric oxide MNCJMGD FeNO in the horse sera:

No. 17 — congestion of the large colon, No. 18 — flatulence, No. 19 — blockage of the cecum, No. 20 — spastic colic. Insert A is the structural formula of the paramagnetic complex of the MNCJMGD FeNO

ОБСУЖДЕНИЕ

NO следует отнести к числу наиболее важных факторов защиты слизистой ЖКТ [8]. Известна роль NO как нейромедиатора в неадренергических/нехолинергических нейронах (NANC-нейроны), которые, наряду с холин- и норадренергическими проводниками автономной нервной системы, составляют третий тип автономной нервной системы [9, 10]. У лошадей имеются три автономных центра регуляции перистальтики, связанных с интерстициальными клетками Кахала: гастродуоденальный центр, подвздошно-слепокишечный центр и центр тазового изгиба [10, 11].

Автономная нервная система кишечника использует в качестве нейромедиаторов вазоактивный интестинальный пептид (VIP) и NO [11, 12]. Установлено, что оксиду азота принадлежит существенная роль в активации синтеза бикарбонатов, регуляции кровотока и моторики ЖКТ. Показано участие NO в патологических процессах, протекающих в толстом кишечнике. Эти изменения могут способствовать нарушению моторики и абсорбции в кишечнике.

Полученные нами данные согласуются с представлениями о снижении уровня NO в случае наблюдения патологических изменений функций. Концентрация нитрита (табл. 1) в сыворотке крови у лошадей возрастной группы 6—25 лет составила $3,42 \pm 4,22$ мкМ, при этом у молодых животных (1—5 лет) уровень этого показателя был $8,24 \pm 5,42$ мкМ, что в 2,4 раза выше. Резкое снижение нитрита отмечено у всех лошадей с заболеваниями кишечника $2,07 \pm 0,90$ мкМ, особенно при метеоризме $0,6 \pm 0,4$ мкМ и спастических коликах $1,78 \pm 0,5$ мкМ.

Уровень нитрозогемоглобина (табл. 1) в цельной крови здоровых ($0,1 \pm 0,1$ мкМ и $0,15 \pm 0,1$ мкМ) и больных животных ($0,3 \pm 0,10$ мкМ и $0,21 \pm 0,10$ мкМ) соответствующих возрастных групп имеет отличия в величине среднего, но различия статистически незначимы.

Данные факты обуславливают диагностическую и прогностическую ценность оксида азота как биомаркера регуляции перистальтики кишечника в норме и при патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень производного оксида азота — нитрита в крови больных лошадей имеет характерную тенденцию к понижению относительно здоровых лошадей.

На определенных этапах заболевания ЖКТ возникает дефицит NO, хотя вырабатываемого посредством eNOS, iNOS и nNOS оксида азота много, но его действие в качестве мессенджера недостаточно и, таким образом, сниженная биодоступность NO обуславливает нарушение функций ЖКТ у лошадей.

Исследования по оценке уровня оксида азота и его метаболита в крови, а также других показателей воспаления необходимо продолжить на большей выборке животных для получения более полной картины протекающих процессов при симптомокомплексе истинных колик у лошадей.

Информация о конфликте интересов: Нет.

Информация о финансировании. Тема Государственной Программы 0082-20140-001 № АААА-Ф17-117040610310-6.

Благодарности: Профессору Др. Миломиру Ковачу — DVM, MSc, PhD, а также сотрудникам ветеринарной клиники «Новый век». Доктору биологических наук К.О. Муранову за помощь при разработке методики.

Участие авторов: авторы имеют равноценный вклад в данной работе.

© **З.С. Артюшина, П.Н. Абрамов, Н.Б. Полянский,
Н.А. Ткачев, В.А. Сереженков, 2019.**

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] *Mokh V.P., Poltorakov A.P., Serezhenkov V.A., Vanin A.F.* On the nature of a compound formed from dinitrosyl-iron complexes with cysteine and responsible for a long-lasting vasorelaxation // *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 22. № 4. P. 266—274.
- [2] *Rocks S.A., Davies C.A., Hicks S.L., Webb A.J., Klocke R., Timmins G.S. et al.* Measurement of S-nitrosothiols in extracellular fluids from healthy human volunteers and rheumatoid arthritis patients, using electron paramagnetic resonance spectrometry // *Free Radical Biology & Medicine*. 2005. Vol. 39. № 7. P. 937—948.
- [3] *Galvin N., Dillon H., McGovern F.* Right dorsal colitis in the horse: minireview and reports on three cases in Ireland // *Irish Veterinary Journal*. 2004. Vol. 57. № 8. P. 467—473.
- [4] *Mirza M.H., Seahorn T.L., Oliver J.L., Hosgood G., Moore R.M.* Detection and comparison of nitric oxide in clinically healthy horses and those with naturally acquired strangulating large colon volvulus // *Can J Vet Res*. 2005. Vol. 69. P. 106—115.
- [5] *Kleinbongard P., Dejam A., Lauer T., Rassaf T., Schindler A., Picker O. et al.* Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals // *Free Radic Biol Med*. 2003. Vol. 35. № 7. P. 790—796.
- [6] *Tsikas D.* A critical review and discussion of analytical methods in the L-arginine/nitric oxide area of basic and clinical research // *Anal Biochem*. 2008. Vol. 379. № 2. P. 139—216.
- [7] *Jackson S.K., Thomas M.P., Smith S., Madhani M., Rogers S.C., James P.E.* In vivo EPR spectroscopy: biomedical and potential diagnostic applications // *Faraday Discuss*. 2004. Vol. 126. P. 103—117.
- [8] *Дроздов В.Н.* НПВП с собственным механизмом защиты желудка — реально ли это? // *Русский медицинский журнал, Медицина и здравоохранение*. 2013. Т. 21. № 30. С. 1596—1599.
- [9] *Dijkstra G., van Goor H., Jansen P.L., Moshage H.* Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract // *Cur Opin Invest Drugs*. 2004. Vol. 5. № 5. P. 529—536.
- [10] *Ковач М.* Колики лошади. Причины. Диагноз. Лечение. М.: Королевский издательский дом, 2010. 120 с.
- [11] *White N.A., Edwards B.* *Hanbook of Equine Colic*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001.
- [11] *Робинсон Э.Ю.* *Болезни лошадей. Современные методы лечения*. М.: Аквариум-Принт, 2007. 1008 с.

Сведения об авторах:

Артюшина Зинаида Сергеевна — аспирант кафедры диагностики болезней, терапии, акушерства и биотехники размножения Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина; e-mail: artushina.zinaida@yandex.ru.

Абрамов Павел Николаевич — кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры диагностики болезней, терапии, акушерства и биотехники размножения Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина; e-mail: Abramov_P@inbox.ru.

Полянский Николай Борисович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции клеточного метаболизма Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; e-mail: npolinski@mail.ru.

Серезженков Владимир Анатольевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физической химии биополимеров Института химической физики имени Н.Н. Семенова РАН; e-mail: serezhnikov@yandex.ru.

Ткачев Николай Анатольевич — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физической химии биополимеров Института химической физики имени Н.Н. Семенова РАН; e-mail: nitkachev@yandex.ru.

Для цитирования:

Артюшина З.С., Абрамов П.Н., Полянский Н.Б., Ткачев Н.А., Серезженков В.А. Оценка уровня нитрита — метаболита оксида азота — у лошадей с симптомокомплексом колик методом ЭПР-спектроскопии // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2019. Т. 14. № 1. С. 57—65. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-57-65.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-57-65

**ASSESSMENT OF NITRITE LEVEL —
NITRIC OXIDE DERIVATIVE — IN HORSES
WITH INTESTINAL COLIC BY ESR SPECTROSCOPY**

**Zinaida S. Artyushina¹, Pavel N. Abramov¹, Nikolai B. Polyansky²,
Nikolai A. Tkachev³, Vladimir A. Serezhnikov³**

¹Moscow state academy of veterinary medicine
and biotechnology named K.I. Skryabin
Moscow, 109472, Russian Federation

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Moscow, 119334, Russian Federation

³Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences
Moscow, 119991, Russian Federation

Abstract. The pathogenesis of diseases of the digestive tract of horses, accompanied by the development of inflammation and oxidative stress, can be associated with a lack of nitrogen monoxide, which controls a variety of signaling pathways in the body. Nitrogen monoxide (NO) takes part in the work of the immune and nervous systems, its level directly determines the tone of all blood vessels and the course of many pathological processes. NO should be considered as one of the most important factors in the protection of the gastric and intestinal mucosa. The article describes in detail the method for determining the level of nitrite-nitric oxide metabolite — in diseases of horses with the symptom complex of “true” colic, and also presents the results of measurements of nitrite in the serum of healthy animals of two age groups: 1—5 years and 6—25 years and animals with pathology. The concentration of nitrite in blood serum in horses of the age group of 6—25 years was $3.42 \pm 4.22 \mu\text{M}$, while in young animals (1—5 years) the level of this indicator was $8.24 \pm 5.42 \mu\text{M}$, which is 2,4 times higher. A sharp decrease of nitrite was noted in all horses with intestinal diseases of $2.07 \pm 0.9 \mu\text{M}$, especially with meteorism $0.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ and spastic colic $1.78 \pm 0.5 \mu\text{M}$. These facts determine the diagnostic and prognostic value of nitric oxide as a biomarker for the regulation of intestinal motility in normal and pathological conditions.

Key words: horse, intestinal colic, ESR-spectroscopy, nitrite, nitric oxide, nitrosothiols, dinitrosyl, iron complexes, nitrosyl hemoglobin

REFERENCES

- [1] Mokh VP, Poltorakov AP, Serezhenkov VA, Vanin AF. On the nature of a compound formed from dinitrosyl-iron complexes with cysteine and responsible for a long-lasting vasorelaxation. *Nitric Oxide*. 2010; 22(4):266—274. Available from: doi:10.1016/j.niox.2010.01.002.
- [2] Rocks SA, Davies CA, Hicks SL, Webb AJ, Klocke R, Timmins GS et al. Measurement of S-nitrosothiols in extracellular fluids from healthy human volunteers and rheumatoid arthritis patients, using electron paramagnetic resonance spectrometry. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005; 39(7):937—948. Available from: doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.007.
- [3] Galvin N, Dillon H, McGovern F. Right dorsal colitis in the horse: minireview and reports on three cases in Ireland. *Irish Veterinary Journal*. 2004; 57(8):467—473. Available from: doi: 10.1186/2046-0481-57-8-467.
- [4] Mirza MH, Seahorn TL, Oliver JL, Hosgood G, Moore RM. Detection and comparison of nitric oxide in clinically healthy horses and those with naturally acquired strangulating large colon volvulus. *Can J Vet Res*. 2005; 69:106—115.
- [5] Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(7): 790—796. Available from: doi: 10.1016/S0891-5849(03)00406-4.
- [6] Tsikas D. A critical review and discussion of analytical methods in the L-arginine/nitric oxide area of basic and clinical research. *Anal Biochem* 2008; 379(2):139—216. Available from: doi: 10.1016/j.ab.2008.04.018.
- [7] Jackson SK, Thomas MP, Smith S, Madhani M, Rogers SC James PE. In vivo EPR spectroscopy: biomedical and potential diagnostic applications. *Faraday Discuss*. 2004; 126: 103—117. Available from: doi: 10.1039/B307162F.
- [8] Drozdov VN. NSAIDs with their own mechanism of protection of the stomach — is it real? *Russian Medical Journal*. 2013; 21(30):1596—1599. (In Russ)
- [9] Dijkstra G, van Goor H, Jansen PL, Moshage H. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Cur Opin Invest Drugs*. 2004; 5(5):529—36.
- [10] Kovach M. Colic in horses. Causes. Diagnosis. Treatment. Moscow: Korolevskii Izdatel'skii Dom Publ.; 2010. (In Russ).
- [11] White NA, Edwards B. Handbook of Equine Colic. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2001.
- [12] Robinson NE. Current Therapy in Equine Medicine. 5th Edition. Saunders; 2003.



УДК: 636.225.1.082.454
DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-66-72

THE RESULTS OF THE EMBRYO TRANSFER TO HEIFERS FROM THE AYRSHIRE BREED

Constantin Nimbona¹, Nadezhda I. Kulikova¹,
Joseph Butore², Melance Ntunzwenimana²

¹Kuban State Agrarian University
Krasnodar, 350044, Russian Federation

²University of Burundi
Bujumbura, 1233, Burundi
cosnim120@yahoo.fr

Abstract. Dairy cattle's breeding is an important industry, since it is providing milk and meat to population. Modern cows are significantly different from their ancestors in biology, behavior and in productivity. The scientific approach to feeding, condition of content and formation of focused heredity contributed to increasing the cows' productivity. During the mammary gland formation and sexual cycles manifestation, puberty occurs, which makes it possible to obtain offspring and secretion of milk for feeding calves. The modern cows are capable of producing milk for their calves and for feeding people. The appearance of record cows, giving about 100 kg per day, and during lactation more than 32 tons of milk serves as an example for achieving such indicators of production. There are negative effects in reproduction biology, which takes place in modern cattle breeding. In order to breed highly productive cows, it is important to increase their livestock by intensive selection. Modernity is such that fertility is reduced due to cows' reproductive functions inhibition. Modern practice shows that it is possible to introduce methods of obtaining several calves from one cow. It is generally accepted for this purpose use new reproduction methods, for example transplantation of embryos with high genetic potential. This technique is widely used in biotechnology of cows breeding. We have tested the method of preparing and conducting embryo transfer to heifers from 13 to 16 months old in the Kuban Agro-Association.

The article presents indicators of heifer. It was revealed that not all animals reacted positively to superstimulation. Embryo transplantation showed that 35.1% of embryos survived after embryo transfer. Economic calculations have shown that for the rapid formation of a highly productive herd on the farm, it is advisable to use Ayrshire breed heifers capable of raising embryos and giving birth to healthy calves as recipients.

Key words: heifer, recipient, hormones, stimulation, embryo, transplantation, embryo survival, calf

INTRODUCTION

A significant increase in milk production of cows affects the formation of lactation dominant, which suppresses the intensity of the manifestation of the reproductive functions and fertility of animals [1]. The inverse relationship between the physiology of cows and heifers between the production of calves and the increase in milk productivity is caused by the development of biotechnology, which allows for the rapid reproduction of highly productive herds of cows [2]. The beginning of the biotechnology was developed in the UK, methods for obtaining and freezing mouse embryos, and then from

40 species of mammals [3, 4]. The cattle embryo transplantation technique developed in the past is now widely used in many countries. This allowed us to quickly create whole herds of highly productive cows.

Currently, in some farms of the Krasnodar region, for reproduction of highly productive cows, they have mastered and are implementing methods for embryo transplantation, the highest Holstein cattle breed in the world, and heifers were used as recipients [4, 5].

The purpose of our research was to study and master the method of embryo transfer and analyze the results of their survival rate in Ayrshire heifers.

MATERIAL AND METHODS

We have carried out studies on dairy farms ‘AgroAssociation’. For our research, Ayrshire heifer breeds selected on farms were used for farming, taking into account their breed, origin and level of productivity of the cows, as well as health and reproductive functions.

The general purpose of research is studying and mastering the methods of selection, preparation of recipients and transplantation of embryos to Ayrshire calves. To carry out the scientific experience, 2 groups of Ayrshire breed were formed: 1st control group that includes animals without hormonal stimulation and 2nd experimental group of heifers, which have been stimulated for superovulation (Table 1).

Table 1

Scheme of experiment

№№ experimental groups	Experimental animals Ayrshire breed	The number of animals, heads	Hormonal stimulation
I control	heifers	20	without stimulation
II experimental	heifers	17	hormone stimulation

Recipients were selected in 2 stages. At the first stage, Ayrshire breed heifers were selected according to age from 14th to 16th months, at the second stage by external exterior features, level of health, physiological condition of the animal.

The criterion for the selection of recipients heifers were taken into account the requirements for mothers’ milk production less than 6,000 kg for 305 days of lactation; with strong constitution, an exterior of the milk-like animal, a live weight around 400 kg or more, the metabolic activity of potential recipients, a positive reaction to hormonal scheme, maternal insemination index 1.5 and at his 3rd sexual cycles or more. The recipient must be a physiologically healthy animal: the uterus is located in the pelvic cavity, the cervix is clearly expressed, the length of the horns of the uterus is 20—35 cm, without adhesions and tumors, an active corpus luteum of the ovary, measuring 1—1.5 cm. We did not use heifers as recipients when there were both a corpus luteum and a follicle. Clinically healthy animals: score body — 2.75—3.50 points, without lameness and gastrointestinal tract, and the respiratory and digestive organs lesions. The first group of the control group did not perform hormonal stimulation until embryo transfer at the 16th day. Animals of the experimental group from the first to 16th days were carried out according to the superovulation program, and 1 ml of Fertagyl was administered to the animals of the control group before embryos transplantation (Table 2).

Table 2

Scheme of stimulation of Ayrshire breed recipients for embryo grafting

Drug administration time	Groups of recipients who received drugs	
	1 control group (heifers)	2 experimental (heifers)
1 st day 7 ⁰⁰	not stimulated	Fertagyl + CIDR
7 th day 7 ⁰⁰	not stimulated	remove CIDR + Dinolytic — 5 ml
9 th day 7 ⁰⁰	not stimulated	Fertagyl — 1 ml
16 th day 7 ⁰⁰	Fertagyl 1 ml + embryo transplantation	Fertagyl 1 ml + embryo transplantation

Embryo transfer to recipients was performed only to animals that responded positively to the introduction of hormones. The process of embryo transplantation was performed together with inseminator specialists and fresh embryos were used.

RESULTS OF RESEARCH**Characteristics of Ayrshire calves (recipients)**

For embryo transplantation, 37 animals of the Ayrshire breed were selected. The selected heifers — recipients were 12.9—15.6 months old. The heifers of both experimental groups had well-defined status characteristic of highly dairy animals: the head and neck were light, the neck had of medium length, gradually turning into shoulders, deep, but moderately wide chest, flat, straight back, well developed body muscles, strong legs and straight limbs.

We studied the survival rate of embryos in recipient heifers of 1st and 2nd groups. An important step in the transplantation process is the selection, assessment of the state of health and timely introduction of embryos to recipients. In order to determine the optimization of the transplantation technique, we first carried out the embryo transfer of the heifers that have not received the hormonal stimulation (1st control group), and then we transferred the embryos using the same technique to the recipients, who had hormonal treatment in order to prepare them for the embryo transplantation (2nd experimental group). After embryo transfer, recipients of both groups were constantly monitored to evaluate embryonic survival and development stage of embryos. Pregnancy status was determined for the first time by ultrasound, 31 days after embryo transplantation, and by transrectal palpation of the uterus 60 days after embryo transplantation.

A trans-rectal examination of the uterus for pregnancy diagnosis allowed confirming or not the status and stage of pregnancy, check the viability of the fetus, and confirm the normal topography of the uterus to diagnose various pathologies of pregnancy. Rectal examination distinguished the characteristic features of the uterus: fluctuation of pregnancy, palpation of embryonic membranes, palpation of the embryo and fetus, palpation of the cotyledon and uterine artery. Ultrasound diagnosis of pregnancy allowed us to visualize the front and back of the embryo on the 31st day of pregnancy. After 60 days of pregnancy, we considered the development of the spinal column of the orbital cavity of the fetus, the formation of the bones of the head, mouth and skull. According to statistics, the early definition of pregnancy in heifers — recipients was evaluated at 46.1% of animals.

As a result of research, the survival rates of embryos in recipients were determined. A total of 37 embryos were transplanted to 37 heifers — recipients of Ayrshire breed. Survival rate of embryos in females that have not undergone superovulation (1st group) was 20.0%. In heifers that exposed to hormonal stimulation before embryo transfer, the survival rate was higher by 32.9% (Table 3).

The results allow us to conclude that it is not advisable to use heifers as recipients without hormonal stimulation, as proved that only 4 heifers (20.0%) were pregnant in the control group, between 14 and 15.8 months old (the average was 14.95 months). In the heifers of the experimental group — from 13.3 — 16.5 months old (on average — 15.53 months) — 9 embryos survived (52.9% of pregnancy).

Table 3

Results of embryonic survival in heifers Ayrshire breed

Animal groups	Indicators		
	transferred embryos, nbr.	pregnant recipients, heads	embryonic survival rate, %
1 control, heifer recipients without stimulation	20	4	20.0
2 experimental, heifers — recipients, with hormon stimulation	17	9	52.9
Total	37	13	35.1

It is important to note that recipient heifers must be physically developed. Analysis showed that animal body weight of group control ranged from 416 to 469 kg, with an average of 448.5 kg, while the recipient heifers from experimental group varied from 437 to 470 kg (average — 452.3 kg).

Cost-effectiveness of embryo transfer to heifers — Ayrshire breed recipients

The use of embryo transfer techniques in dairy cattle breeding allowed to increase significantly and quickly the milk yield of cows on all continents. In terms of the number of transplanted embryos in dairy cattle breeding, the countries of Europe and North America are leaders (151,257 collected and 111,575 embryos transplanted). The cost of selling semen bioproducts and embryos from outstanding animals in genetics is very high. In Russia, embryo transfer in cattle breeding is being introduced in farms with high production efficiency, as this is an economically costly technique.

We have evaluated the economic efficiency of embryo transplantation in the Kuban Agricultural Association. The costs of the embryo transplantation process consist of the costs of a hormonal scheme — stimulation of ovulation in recipients and processing of embryos transfer. The cost of the calf embryo will depend on the reproductive functions of the recipients, their preparation, as well as on the professionalism of embryo transplantation specialists. Total costs for embryo transfer are higher in the experimental group due to the high cost (3600 rub/head) of hormonal stimulation. The total costs per recipient of the control group amounted to — 8,000 rubles (without stimulation),

in the experimental group — 11,600 rubles. Evaluation of embryo survival in recipients showed that in the control group (without hormonal stimulation) 20.0% of the recipients were pregnant, and in the experimental group (hormonally stimulated) — 52.9%. The difference in survival rate of embryos was 2.6 times higher in hormone-stimulated heifers, compared with non-stimulated ones.

Calves from heifers that did not receive stimulation are more expensive in comparison with heifers stimulated by hormones due to high rate of pregnancy and calving from them. However, an economic assessment show that for larger quantities of embryos obtained from animals have more highly advisable to use hormonal stimulation of the heifers — recipients before embryo transfer by the proposed method.

CONCLUSIONS

Based on the data obtained as a result of research, the following conclusions can be made:

The farm breeds cattle of Holstein and Ayrshire. Prolonged use of Holstein bulls with high genetic potential of milk production: milk yield from 13,692 to 14,925 kg of milk, fat content from 3.73 to 4.55%, protein from 3.10—3.23% in milk made it possible to achieve milk production in cows Holstein breed more than 10,000 kg of milk, 3.79% fat and 3.57% protein;

It is known that the increase in milk productivity of cows reduces the ability of animals to reproduce, and also reduces productive longevity in the current technological conditions. For the purpose of rapid reproduction of the livestock of highly productive livestock in the farm, a decision was made to introduce the method of embryo transplantation from highly productive animals. In 2014, a laboratory was set up and equipped to prepare donors and recipients, and a method was tested for obtaining embryos from donors and transfer them to recipients. With it, the solutions are: to use Holstein heifers as donors, and Ayrshire heifers as recipients.

© Nimbona C, Kulikova NI, Butore J, Ntunzwenimana M., 2019.

REFERENCES

- [1] Nimbona K, Kulikova NI, Mehonoshin MV. Selection and superovulation of cows of donors and recipients during embryo transplantation. In: Innovation in increasing the productivity of farm animals. *Collection of articles on the materials of the international scientific-practical conference*. Krasnodar, 19 October 2017. Krasnodar: KubGau Publ.; 2017. p. 129—135. (In Russ).
- [2] Nimbona K, Kulikova NI. Planning the study of the formation of a selection group of cows in breeding farms using embryo transplantation. In: *Collection of articles on the materials of the X All-Russian Conference of Young Scientists dedicated to the 120th anniversary of I.S. Kosenko 24—30 November 2016. Scientific support of the agro-industrial complex*. Krasnodar: KubGau Publ.; 2017. p. 252—253. (In Russ).
- [3] Roper DA, Schrick FN, Edwards JL, Hopkins FM, Prado TM, Wilkerson JB, Saxton AM, Young CD, Smith WB. Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals. *Animal Reproduction Science*. 2018; 199:79—83. Available from: doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.11.001.

- [4] Shcherbak OV, Zyuzuyn AB, Kovtun SI. Cryopreservation of embryos as a method of preserving the gene pool of white-headed Ukrainian cattle breed. *Dairy and Beef Cattle*. 2017; (2):21—23. (In Russ).
- [5] Lim HJ, Yoon HB, Im SK. Relationship between growth pattern, age at first calving and next reproduction in Holstein heifers. *J. Emb. Trans.* 2015; 30(4):265—270. Available from: <http://db.koreascholar.com/article.aspx?code=311768>.
- [6] Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 2002; 57(1):53—72. Available from: doi: 10.1016/S0093-691X(01)00657-4.
- [7] Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ, Ambrose DJ. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology*. 2009; 72(2):262—270. Available from: doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.02.017.
- [8] Nabenishi H, Sugino F, Konaka R, Yamazaki A. Conception rate of Holstein and Japanese Black cattle following embryo transfer in southwestern Japan. *Animal Science Journal*. 2018; 89(8):1073—1078. Available from: doi: 10.1111/asj.13042.

Information about authors

Nimbona Constantin — DVM, M.Sc., PhD student, Department of Private Zootechnics and Pig farming, Faculty of Zootechny, Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russian Federation; e-mail: conim120@yahoo.fr

Kulikova Nadezhda Ivanovna — Dr. of Agr. Sc., Professor, Department of Private Zootechny and pig farming, Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russian Federation; e-mail: kulikova_ni@bk.ru

Butore Joseph — DVM, PhD, Department of Agronomy and Bio-engineering, University of Burundi, Bujumbura, Burundi; e-mail: butojo07@yahoo.fr

Ntunzwenimana Melance — DVM, PhD, Department of Agronomy and Bio-engineering, University of Burundi, Bujumbura, Burundi; e-mail: ntunzwe@yahoo.fr

For citation:

Nimbona C, Kulikova NI, Butore J, Ntunzwenimana M. The results of the embryo transfer to heifers from the Ayrshire breed. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 2019, 14 (1), 66—72. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-66-72.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-66-72

РЕЗУЛЬТАТЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТЕЛКАМ ЭМБРИОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ АЙРШИРСКОЙ ПОРОДЫ

**К. Нимбона¹, Н.И. Куликова¹,
Ж. Буторе², М. Нтунвенимана²**

¹Кубанский государственный аграрный университет
Краснодар, Российская Федерация, 350044

²Университет Бурунди
Бужумбура, Бурунди, 1233

Аннотация. Молочное скотоводство — важная отрасль, так как ее основная задача — обеспечить молоком и мясом население. Методически в процессе длительного использования коров человек научился ухаживать, кормить и получать потомство от них. Современные коровы существ-

венно отличаются от своих предков, не только по биологии, поведением, но и продуктивностью. Научный подход к кормлению, условиям содержания и целенаправленному формированию наследственности способствовали повышению продуктивности коров. При формировании молочной железы у молодых телок и проявлении половых циклов наступает половое созревание, которое дает возможность получения потомства и секрецию молока для выкармливания телят. Коровы современной генетики способны давать молоко не только для своих телят, но и для питания людей. Появление коров-рекордисток, дающих в сутки около 100 кг, а за лактацию более 32 т молока, служит примером для достижения таких показателей в условиях производства. Достичь рекордных удоев сложно, не возможно. При этом проявляются негатив в биологии размножения, что имеет место в современном скотоводстве. С целью разведения высокопродуктивных коров важно увеличить их поголовье, для интенсивного отбора и подбора животных. Современность такова, что снижается плодовитость за счет угнетения воспроизводительных функций коров при высокой лактации. Современные походы науки и практики свидетельствуют о том, что возможен для внедрения в производство способ получения нескольких телят от одной коровы. Общепринято для этого применять новые биотехнологии методы воспроизводства, например трансплантацию эмбрионов с высокой генетикой.

Такая методика достаточно широко используется в биотехнологии размножения коров путем трансплантации эмбрионов. Нами апробирована методика подготовки и проведения трансплантации эмбрионов телкам-реципиентам в возрасте от 13 до 16 месяцев в предприятии «Агрообъединение Кубань». В статье представлены показатели генотипа телок-реципиентов. Выявлено, что в процессе подготовки реципиентов не все животные положительно отреагировали на гормональную стимуляцию овуляции. Трансплантация эмбрионов показала, что прижились эмбрионы у 35,1% телок-реципиентов. Экономические расчеты показали, что для быстрого формирования высокопродуктивного стада в хозяйстве целесообразно использовать в качестве реципиентов телок айрширской породы, способных вырастить эмбрионы и родить здоровых телят.

Ключевые слова: телка, реципиент, гормоны, стимуляция, эмбрион, трансплантация, приживаемость, теленок

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] Нимбона К., Куликова Н.И., Мехоношин М.В. Отбор и суперовуляция коров доноров и реципиентов при трансплантации эмбрионов // *Инновации в повышении продуктивности сельскохозяйственных животных*. 2017. С. 129—135.
- [2] Нимбона К., Куликова Н.И. Планирование изучения формирования селекционной группы коров в племенном хозяйстве при использовании трансплантации эмбрионов // *Научное обеспечение агропромышленного комплекса*. 2017. С. 252—253.
- [3] Roper D.A., Schrick F.N., Edwards J.L., Hopkins F.M., Prado T.M., Wilkerson J.B., Saxton A.M., Young C.D., Smith W.B. Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals // *Animal reproduction science*. 2018. Т. 199. С. 79—83.
- [4] Щербак О.В., Зюзюн А.Б., Ковтун С.И. Криоконсервация эмбрионов как метод сохранения генофонда белоголовой украинской породы крупного рогатого скота // *Молочное и мясное скотоводство*. 2017. № 2. С. 21—23.
- [5] Lim H.J., Yoon H.B., Im S.K. Relationship between growth pattern, age at first calving and next reproduction in Holstein heifers // *Journal of Embryo Transfer*. 2015. Т. 30. № 4. С. 265—270.
- [6] Bó G.A., Baruselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tribulo R., Tribulo H., Mapletoft R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle // *Theriogenology*. 2002. Т. 57. № 1. С. 53—72.
- [7] Colazo M.G., Gordon M.B., Rajamahendran R., Mapletoft R.J., Ambrose D.J. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone // *Theriogenology*. 2009. Т. 72. № 2. С. 262—270.
- [8] Nabenishi H., Sugino F., Konaka R., Yamazaki A. Conception rate of Holstein and Japanese Black cattle following embryo transfer in southwestern Japan // *Animal Science Journal*. 2018. Т. 89. № 8. С. 1073—1078.



УДК 636.7:611/612
DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-73-80

АНАЛИЗ КОЖНЫХ УЗОРОВ НОСОВОГО ЗЕРКАЛЬЦА НЕМЕЦКОЙ ОВЧАРКИ В СРАВНИТЕЛЬНОМ АСПЕКТЕ

С.Е. Споткай, Л.Ю. Лыхина

¹Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина
Бишкек, Кыргызская Республика, 720005
svetavet@mail.ru

Аннотация. Популярность породы немецкая овчарка и ее применение во многих областях жизни человека создает необходимость поиска новых методов идентификации для установления собственности. Имеющиеся методы идентификации, такие как чипирование и клеймение, имеют ряд недостатков. Метод идентификации собак по оттиску носового зеркальца сравнительно дешев и достоверен. Папиллярные узоры, отображающиеся на оттисках носового зеркальца относительно постоянны, имеют общие и частные признаки отличий, которые позволяют отличить отпечаток одной собаки от другой. Собаки одной породы имеют установленный стандартом экстерьер, то есть схожесть по внешним признакам, что дает основание предположить наличие сходства общих и частных признаков внутри одной породы. Установлено, что оттиски носового зеркальца собак породы немецкая овчарка, полученные у представителей породы, имеющих разное происхождение, условия содержания и кормления, имеют общие признаки папиллярных узоров, характерные для данной породы. Представленные результаты сравнения кожных узоров носового зеркальца, показывают, что для данной породы характерны прямая, прямая круглоконечная и клиновидная формы линии симметрии носа, у большинства представителей породы оттиски сильно испещрены линиями и, как правило, имеют 2 ветви линии симметрии, что доказывает наличие породных особенностей и дает возможность использования оттисков в криминалистической и судебно-ветеринарной идентификации собак.

Ключевые слова: биометрическая идентификация собак, оттиски носового зеркальца, папиллярные узоры, форма линии симметрии носа, немецкая овчарка

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время собаки, с правовой точки зрения, являются имуществом граждан, учреждений и организаций, что приводит к необходимости их идентификации. Клеймение и электронное чипирование, методы идентификации, ставшие «классическими», к сожалению, не могут обеспечить достоверное отождествление конкретного животного. Помимо прочего, эти методы имеют ряд недостатков, связанных с болезненностью процедуры, возможностью проявления побочных явлений в виде аллергических реакций, абсцессов. С течением времени многие татуировки становятся нечитаемыми, имеются данные о миграции микрочипов и их неисправности. Вместе с тем имеются данные о том, что внедрение микрочипа может стать причиной возникновения онкологических заболеваний [1–3]. В связи с этим возникает необходимость в альтернативном методе биометрической иден-

тификации, который будет безболезненным и безвредным для животного и дешевым для владельца, каким является метод идентификации собак по папиллярным узорам носового зеркала. Возможность использования папиллярных узоров в целях идентификации собак описана в работах «Anatomy of the dog» профессора Klaus Dieter Budras и соавт. [4], «Introduction to veterinary Anatomy and Physiology» Victoria Aspinall и Melanie Cappello [5], «Анатомия собаки и кошки» Бернда Фольмерхауса и Йозефа Фревейна [6].

Также Е.С. Хламова в статье «Применение фенетического анализа признаков в кинологии» [7] приводит описание дерматоглифов носового зеркала собак с точки зрения фенетики и делает заключение о том, что метод позволяет идентифицировать собак по оттиску носового зеркала.

Идентификация собак по узору носового зеркала, как и любая другая криминалистическая идентификация, проводится по комплексу общих и частных признаков отличий, присущих каждому отдельному объекту идентификации. Подходя к идентификации собак с точки зрения индуктивного метода, было сделано предположение о том, что среди оттисков носового зеркала собак одной породы будет наблюдаться комплекс признаков, характерный именно для данной породы. Ранее были изучены особенности кожных узоров собак породы лабрадор ретривер [8].

Целью настоящего исследования было изучить особенности папиллярных узоров носового зеркала собак породы немецкая овчарка и выделить комплекс признаков, присущий данной породе.

Выбор породы для исследований не случаен. Одна из самых любимых пород собак не только в нашей стране, но и во всем мире — это немецкая овчарка. Несмотря на постоянно меняющуюся моду на домашних любимцев, собаки этой породы остаются вне конкуренции.

Немецкая овчарка — универсальная порода. Популярность ее на сегодняшний день не случайна. Секрет заключается в ее работоспособности, психических свойствах, особенностях характера, внешней красоте и механике движения [9]. У них спокойный нрав, они легко усваивают новые навыки, готовы защищать хозяина и других членов семьи, не проявляют особой агрессивности в отношении незнакомых людей и других собак [10], что с успехом позволяет использовать их в разных направлениях: для службы в кинологических подразделениях силовых структур, для поисково-спасательных работ, в спорте и как домашних любимцев.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования для идентификации по узору носового зеркала послужили оттиски носовых зеркалец 30 собак породы «немецкая овчарка».

В исследовании приняли участие 12 кобелей и 18 сук в возрасте от 4 месяцев до 10 лет, разного происхождения, с различным рационом кормления и содержанием.

Сбор материала проводился в питомниках, общественных организациях, благотворительных фондах и у частных владельцев на выставках собак.

Оттиски получали с предварительно высушенного, очищенного и окрашенного носового зеркала на бланк формата А5 с указанием клички, пола, возраста, породы, окраса собаки и данных о владельце, по желанию владелец получал второй экземпляр такой идентификационной карты в бумажном или электронном виде.

Результаты и обсуждение. Изучив папиллярные узоры, встречающиеся у собак разных пород, была сформирована таблица (рис. 1), в которой схематически представлены общие признаки идентификации.



















<p>Форма оттиска носового зеркала <i>Forms of nose's pattern</i></p>			
			
<p>вытянутый по горизонтали овал horizontally elongated oval</p>		<p>овал с тупым углом в нижней части oval with obtuse angle at the bottom</p>	
<p>Форма линии симметрии носа <i>Form of nose's symmetry line</i></p>			
			
<p>прямая straight</p>	<p>веретенообразная fusiform</p>	<p>клиновидная wedge-shaped</p>	<p>прямая круглоконечная straight round-end</p>
			
<p>круглоконечный клин round-end wedge</p>	<p>сложная complex form</p>	<p>прерванная disturbed</p>	<p>перевернутый клин V-type form</p>
<p>Наличие ветвей линии симметрии <i>Presence of symmetry line branches</i></p>			
			
<p>одна one</p>	<p>две two</p>	<p>три three</p>	<p>нет ветвей no branches</p>
<p>Испещренность линиями <i>Availability of lines</i></p>			
			
<p>неиспещрен no lines</p>	<p>слабо испещрен slightly lines (<3)</p>	<p>сильно испещрен strongly liny</p>	
<p>Заполненность узором <i>Pattern density</i></p>			
			
<p>плотная closely-grouped</p>	<p>рыхлая disperse</p>		

Рис. 1. Сводная таблица-схема общих признаков папиллярных узоров носового зеркала собаки /

Fig. 1. Summary table-diagram of common features of papillary patterns of the rhinarium of a dog

В результате проведенных исследований оттисков собак породы «немецкая овчарка» было отмечено, что размер исследованных оттисков варьировал от 36 мм до 48 мм. По форме оттиски носового зеркальца выделяются в 2 типа: вытянутый по горизонтали овал и овал, формирующий в нижней части тупой угол. На исследованных оттисках оба типа встречаются с равной частотой.

Сагиттальная борозда, расположенная в большинстве случаев по центру носа, на оттиске образует линию симметрии носа. Она может быть хорошо и слабо выражена. Линия симметрии носа собак по внешнему виду разделяется на следующие подтипы: прямая, веретенообразная, клиновидная, прямая круглоконечная, круглоконечный клин, сложной формы, прямая прерванная и перевернутый клин (см. рис. 1).

В ходе сравнительного анализа оттисков носового зеркальца собак породы «немецкая овчарка» выяснено, что линия симметрии носа хорошо выражена у 28 собак (93,3% от исследованного поголовья), форма линии симметрии носа представлена пятью подтипами: прямая, веретенообразная, клиновидная, прямая круглоконечная и круглоконечный клин.

Основными подтипами являются прямая (26,7%), клиновидная (30%) и прямая круглоконечная (30%) формы линии симметрии носа, круглоконечный клин выявлен у 3 собак (10%), веретенообразная форма отмечена у 1 собаки (3,3%) (рис. 2). Сложная, прерванная линии симметрии носа, а также перевернутый клин у участвовавших в исследовании собак породы немецкая овчарка не встречались.

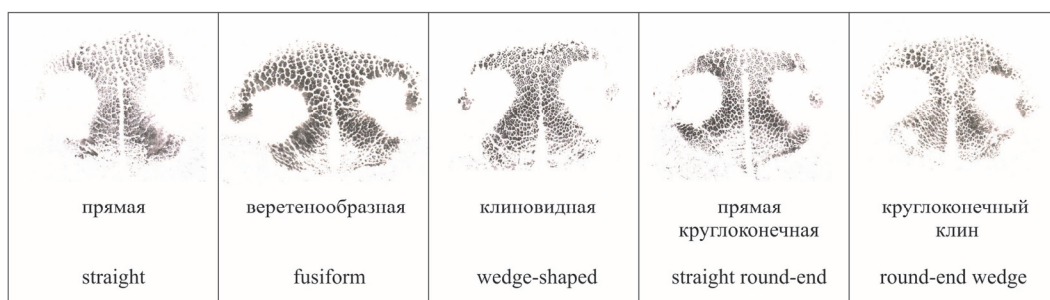


Рис. 2. Формы линии симметрии носа немецкой овчарки /
Fig. 2. German Shepherd nose's symmetry line forms

В нижней части оттиска от линии симметрии у разных особей могут визуализироваться 1, 2, 3 ветви, но также они могут и отсутствовать вовсе (рис. 1).

У 15 собак (50%) на оттиске визуализируются 2 линии симметрии, у 12 собак (40%) линии симметрии отсутствуют и у 3 собак (10%) встречается 1 ветвь линии симметрии носа (рис. 3).

Было обнаружено, что гребни кожи могут образовывать различной конфигурации группы, отделенные от остального массива более глубокими бороздами, которые создают на оттисках более тонкие, но не менее выраженные линии, чем линия симметрии и ее ветви. Это позволило разделить оттиски на неиспещренные линиями, слабо испещренные (до трех линий) и сильно испещренные (более 3 линий) (см. рис. 1).



Рис. 3. Наличие ветвей линии симметрии /
Fig. 3. Presence of symmetry line branches

Для исследованных собак породы немецкая овчарка установлено, что сильная испещренность наблюдается у 15 особей (50% от общего числа), слабая испещренность — у 6 особей (20%), неиспещрены отпечатки у 9 особей (30%). При этом интенсивность испещренности не зависит от пола и возраста и имеет строго индивидуальный характер.

Также отпечатки носового зеркала по заполненности узором можно разделить на плотные и рыхлые (рис. 1). На плотность узора в отпечатке влияют количество, высота и площадь гребней на поверхности носа. Количественно плотность узора выражается в индексе гребневого счета. Согласно ранее проведенным сравнительным исследованиям, в отличие от других пород, среди особей породы немецкая овчарка встречаются представители как с низкой, так и с высокой плотностью [11], преобладающим является плотный подтип (96,7%). Вариативность показателей индекса гребневого счета проанализированных отпечатков составляет от 29 до 61.

Заключение. Обобщая полученный в результате научных исследований и практической работы материал, можно сделать заключение, что для исследованных отпечатков отпечатки носа собак породы немецкая овчарка характерна хорошая выраженность линии симметрии носа, преобладающими формами линии симметрии носа являются клиновидная, прямая круглоконечная, прямая. Обнаружено, что доминируют сильно испещренные линиями отпечатки и отпечатки с двумя линиями симметрии носа.

Таким образом, можно сделать вывод, что исследованные отпечатки обладают внутривидовым комплексом общих признаков папиллярных узоров. Полученные данные и проведенный их анализ также свидетельствуют о том, что использование отпечатков носового зеркала в качестве объектов исследования сможет значительно расширить возможности биометрической идентификации собак в мировой практике.

Информация о конфликте интересов. Конфликта интересов в материалах, изложенных в статье, не имеется.

Информация о финансировании. Финансирование проекта проводилось за счет средств авторов.

Благодарности. Авторский коллектив выражает благодарность Олегу Сергеевичу Степанову, студенту ветеринарного отделения Агротехнического колледжа Кыргызского национального университета им. К.И. Скрябина.

Участие авторов: Споткай С.Е. — сбор, обработка и анализ материалов для исследования, подготовка иллюстративного материала; Лыхина Л.Ю. — концепция и дизайн исследования; Степанов О.С. — техническая помощь в процессе сбора материала для исследований.

© С.Е. Споткай, Л.Ю. Лыхина, 2019.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] *Vascellari M., Mutinelli F., Cossetini R., Altinier E.* Liposarcoma at the site of an implanted microchip in a dog // *The Veterinary Journal*. 2004. Т. 168. № 2. P. 188—190.
- [2] *Willia J.* Implanted Microchips Cause Cancer // *Dogs naturally*. Режим доступа: <http://www.dogsnaturallymagazine.com/implanted-microchips-cause-cancer/>. Дата обращения: 04.07.2018.
- [3] *Albrecht K.* Microchip-Inducted Tumors in Laboratory Rodents and Dogs: A Review of the Literature 1990—2006 // 2010 IEEE International Symposium on Technology and Society, 7—9 June 2010, Wollongong, NSW, Australia. IEEE; 2010. P. 337—349.
- [4] *Budras K.D., McCarthy P.H., Horowitz A., Berg R.* Pelvic Diaphragm, Ischiorectal Fossa; Associated Arteries, Veins and Nerves // *Anatomy of the Dog: 5th, revised edition* / K.D. Budras (ed.). Hannover, Germany: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG; 2007. P. 72—75.
- [5] *Aspinall V., Cappello M.* Introduction into Veterinary Anatomy and Physiology. Textbook: 3rd edition. Edinburgh: Elsevier, 2015. 91 с.
- [6] *Фольмерхаус Б., Фревейн Й.* Анатомия собаки и кошки / Пер. с нем. Е. Болдырева, И. Кравец. М.: Аквариум Бук, 2003. 221 с.
- [7] *Хламова Е.С.* Применение фенетического анализа признаков в кинологии // Вестник Российского государственного аграрного заочного университета «Научный журнал». 2008. № 4 (9). С. 107—109.
- [8] *Споткай С.Е.* Особенности кожных узоров носового зеркальца у лабрадоров ретриверов // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. 2017. № 3 (44). С. 139—140.
- [9] *Капилюшина Т.Е.* Энциклопедия собаководов. Новосибирск: Эврика, 1993. С. 110—111.
- [10] *Мей Д.* Все о самых популярных породах собак. СПб.: Кристалл, 2005. 99 с.
- [11] *Споткай С.Е., Арбаев К.С., Лыхина Л.Ю.* Методика определения индекса гребневого счета при исследовании носового зеркальца собак. Показатели индекса гребневого счета различных пород собак // Ветеринария Кубани. 2018. № 3. С. 12—14.

Сведения об авторах:

Споткай Светлана Евгеньевна — аспирант заочного отделения кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, гистологии и патологии факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Кыргызского национального университета им. К.И. Скрябина, военнослужащая в/ч 27392; e-mail: svetavet@mail.ru. SPIN-код 3602-2024. ORCID 0000-0003-4990-4206

Лыхина Людмила Юрьевна — к.в.н., доцент кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, гистологии и патологии факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Кыргызского национального университета им. К.И. Скрябина; e-mail: ludmilaiur01@gmail.com

Для цитирования:

Споткай С.Е., Лыхина Л.Ю. Анализ кожных узоров носового зеркальца немецкой овчарки в сравнительном аспекте // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2019. Т. 14. № 1. С. 73—80. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-73-80.

ANALYSIS OF SKIN PATTERNS OF GERMAN SHEPHERD'S RHINARIUM IN COMPARATIVE ASPECT

Svetlana E. Spotkai, Lyudmila Y. Lykhina

Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Skryabin
Bishkek, 720005, Kyrgyz Republic

Abstract. The popularity of the German Shepherd breed and its use in many areas of human life creates the need to search for new identification methods to establish ownership. The identification methods available, such as chipping and marking, have several disadvantages. The method of dogs' identification by rhinarium's imprint is comparatively cheap and reliable. Papillary patterns reflected on rhinarium's imprint are relatively constant, and have common and particular signs of difference, which make it possible to distinguish the impression of one dog from another. Dogs of the same breed have a standardized exterior, that is, similarity in external characters, which suggests that there are similarities between common and particular characteristics within the same breed. It is found that imprints of the rhinarium of German shepherd breed dogs, obtained from dogs of different origin, housing and feeding conditions, have common features of papillary patterns peculiar to the given breed. The presented results of the comparison of skin patterns of the rhinarium show that this breed is characterized by a straight, straight round-pointed and V-shaped forms of the nose symmetry line, the majority of the representatives of the breed have prints heavily spotted with lines and, as a rule, have 2 branches of the line of symmetry, which proves the presence of breed characteristics and allows for the use of prints in forensic and forensic veterinary identification of dogs.

Key words: biometric identification of dogs, rhinarium's imprints, papillary patterns, form of nose's symmetry line, German shepherd

REFERENCES

- [1] Vascellari M, Mutinelli F, Cossetini R, Altinier E. Liposarcoma at the site of an implanted microchip in a dog. *The Veterinary Journal*. 2004; 168(2):188—190. Available from: doi: 10.1016/S1090-0233(03)00121-7 (In Russ).
- [2] Willia J. Implanted Microchips Cause Cancer. *Dogs naturally*. Available from: <http://www.dogsnaturallymagazine.com/implanted-microchips-cause-cancer/> [Accessed 04th July 2018].
- [3] Albrecht K. Microchip-Inducted Tumors in Laboratory Rodents and Dogs: A Review of the Literature 1990—2006. In: *2010 IEEE International Symposium on Technology and Society, 7—9 June 2010, Wollongong, NSW, Australia. IEEE*; 2010. p. 337—349. Available from: doi: 10.1109/ISTAS.2010.5514622.
- [4] Budras KD, McCarthy PH, Horowitz A, Berg R. Pelvic Diaphragm, Ischiorectal Fossa; Associated Arteries, Veins and Nerves. In: *Budras KD. (ed.) Anatomy of the Dog, 5th ed.* Hannover, Germany: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG; 2007. p. 72—75.
- [5] Aspinnall V, Cappello M. *Introduction into Veterinary Anatomy and Physiology. Textbook:* 3rd ed. Edinburgh: Elsevier; 2015.
- [6] Frewein J, Vollmerhaus B. *Anatomie von Hund und Katze*. Berlin: Blackwell-Wiss.-Verl; 1994.
- [7] Khlamova ES. Application of phenetic analysis of traits in cynology. *Herald of Russian state agrarian correspondence university*. 2008; (4):107—109. (In Russ).

- [8] Spotkai SE. Features of the skin patterns of the nasal mirror of labrador retrievers. *Bulletin of the Kyrgyz National Agrarian University n.a. K.I. Scriabin*. 2017; (3):139—140. (In Russ).
- [9] Капильюшина Т.Е. *Encyclopedia of dog breeder*. Novosibirsk: Evrika Publ.; 1993. (In Russ).
- [10] Mei G. *All about the most popular breeds of dogs*. Saint Petersburg: Kristall Publ.; 2005. (In Russ).
- [11] Spotkai SE, Arbaev KS, Lykhina LY. The method of determining the crest count index when investigating the nasal plane of dogs. Indexes of the crest count of different breeds of dogs. *Veterinarija Kubani*. 2018; (3):12—14. (In Russ).



УДК: 591.13.135:636.4

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-81-89

КОЭФФИЦИЕНТ ДЕ РИТИСА В ТКАНЯХ ЖЕЛУДКА У РАЗНОВОЗРАСТНЫХ ЧИСТОПОРОДНЫХ ПОРОСЯТ, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ РАЗНЫХ ХОЗЯЙСТВ

Д.П. Судакова¹, М.Г. Терентьева², Н.В. Мардарьева²

¹Чебоксарский техникум строительства и городского хозяйства
Чебоксары, Российская Федерация, 428017

²Чувашская государственная сельскохозяйственная академия
Чебоксары, Российская Федерация, 428003

maiya-7777@mail.ru

Аннотация. Изучен характер и интенсивность возрастных изменений коэффициента де Ритиса, или коэффициента соотношения фермента аспартатаминотрансферазы к аланинаминотрансферазе, в тканях дивертикула, кардиальной, фундальной и пилорической частей желудка у чистопородных разновозрастных поросят, выращенных в условиях разных хозяйств. Активность ферментов определена спектрофотометрическим методом в научной лаборатории ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА. Выявлено, что при четырехнедельном отъеме поросят (в условиях выращивания в свинокомплексе) характер и интенсивность возрастных изменений изучаемого показателя имеют свои особенности. Вместе с тем величина коэффициента становится более стабильной у поросят обеих хозяйств, находящихся в дефинитивной, или растительной фазе питания. Наиболее интенсивные возрастные изменения коэффициента де Ритиса у чистопородных поросят, выращенных в условиях УНПЦ «Студенческий», определяются в тканях дивертикула в первой фазе молочно-дефинитивного питания (снижается на 33,8%). В тканях кардиальной части — во второй фазе молочного питания (возрастает на 31,2%). В тканях фундальной части желудка коэффициент де Ритиса более выражено изменяется в молозивно-молочной фазе (возрастает 2,3 раза). В тканях пилорической части — в молозивно-молочной фазе питания (возрастает в 2,1 раза). Наиболее интенсивные возрастные изменения коэффициента де Ритиса у чистопородных поросят, выращенных в условиях свинокомплекса, выявляются в тканях дивертикула в первой дефинитивной фазе питания (возрастает в 1,7 раза). В тканях кардиальной части желудка — в первой дефинитивной фазе питания (увеличивается в 3,4 раза). В тканях фундальной части желудка у поросят величина коэффициента более интенсивно изменяется лишь в молозивно-молочной фазе питания (снижается на 51,4%). В тканях пилорической части желудка коэффициент де Ритиса с высокой интенсивностью изменяется во второй и третьей фазах молочного питания (возрастает в 3,0 раза).

Ключевые слова: коэффициент де Ритиса, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, желудок, поросята

ВВЕДЕНИЕ

Соотношение уровней ферментов АсАТ (аспартатаминотрансферазы) и АлАТ (аланинаминотрансферазы) принято называть коэффициентом де Ритиса. Он является наиболее информативным показателем здоровья животных и человека. Вели-

чина этого показателя свидетельствует о целостности клеток тканей висцеральных органов. В научной литературе работ по одновременному изучению возрастных изменений активности АсАТ и АлАТ в тканях внутренних органов немало [1—5]. Вместе с тем сведения по определению коэффициента де Ритиса в тканях висцеральных органов у сельскохозяйственных животных в постнатальном системогенезе [6, 7] малочисленны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проводили изучение возрастных изменений коэффициента де Ритиса в тканях дивертикула, кардиальной, фундальной и пилорической частей желудка у чистопородных разновозрастных поросят крупной белой породы, выращенных в условиях свиноводческой фермы УНПЦ «Студенческий» ФГБОУ ВО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия» (свиноферма), и у поросят, выращенных в условиях свинокомплекса ОАО «Вурнарский мясокомбинат» Вурнарского района Чувашской Республики (свинокомплекс).

В условиях свинофермы для исследований использовали поросят в возрасте 1, 10, 21, 30, 60 и 120 суток. В работе использовали хрячков с суточного по тридцатисуточный возраст и боровков, кастрированных в 33—35-суточном возрасте. Отъем поросят проводили в возрасте 2 месяцев. В свиноферме концентратно-картофельный тип кормления.

В условиях свинокомплекса для исследований использовали поросят в возрасте 1, 7, 14, 21, 28, 60 и 120 суток. В работе использовали хрячков с суточного по двухнедельный возраст и боровков, кастрированных в 11—13-суточном возрасте. Отъем поросят проводили в четырехнедельном возрасте. В свинокомплексе сухой концентратный тип кормления.

Эвтаназию поросят и все манипуляции выполняли с «правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [8]. Желудок извлекали из брюшной полости, очищали от содержимого, промывали холодным физиологическим раствором, кишку разделяли на части и пробы их тканей замораживали в жидком азоте для дальнейших исследований.

В гомогенатах тканей частей желудка определяли активности АсАТ и АлАТ колометрированием (КФК-2) и одновременно спектрофотометрированием (UV-1800) в научной лаборатории ФГБОУ ВО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия» с использованием набора реагентов компании ОАО «Витал Девелопмен Корпорэйшн» СПб. Расчет активности фермента провели по калибровочному графику.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные нами расчеты соотношения уровней АсАТ и АлАТ, или коэффициента де Ритиса, выявили специфические особенности возрастных изменений этого показателя в тканях разных частей желудка у чистопородных поросят в раннем постнатальном системогенезе, выращенных в условиях разных хозяйств.

**Возрастные изменения коэффициента де Ритиса
в тканях желудка у разновозрастных чистопородных поросят,
выращенных в условиях свинофермы**

Дивертикул. У односуточных поросят, находящихся в молозивной фазе, уровень коэффициента де Ритиса в тканях дивертикула (табл. 1) составляет $1,49 \pm 0,09$. В течение последующих десяти суток жизни поросят, в фазе молозивно-молочного питания, показатель достоверно увеличивается в 1,2 раза, $p < 0,05$, до $1,85 \pm 0,011$. У трехнедельных поросят первой фазы молочного питания коэффициент де Ритиса в тканях дивертикула падает до $1,29 \pm 0,015$, что на 30,3% ниже, $p < 0,01$, чем у десятисуточных. У месячных поросят, находящихся во второй фазе молочного питания, он сохраняется на уровне трехнедельных и составляет $1,39 \pm 0,012$. К двухмесячному возрасту, в фазе молочно-дефинитивного питания, определяемый коэффициент снова достоверно снизится на 33,8% ($p < 0,01$) до $0,92 \pm 0,008$. У четырехмесячных поросят первой фазы дефинитивного питания изучаемый показатель повышается до $1,20 \pm 0,12$, однако такое изменение недостоверно, $p > 0,05$.

Таблица 1 / Table 1

**Возрастные изменения коэффициента де Ритиса в тканях желудка
у разновозрастных чистопородных поросят (свиноферма) /
Age changes coefficient de rytis in the tissues of the stomach
of purebred different ages of pigs (pig farm)**

Часть органа	Возраст, сутки					
	1	10	21	30	60	120
Дивертикул	$1,49 \pm 0,009$	$1,85 \pm 0,011$	$1,29 \pm 0,015$	$1,39 \pm 0,012$	$0,92 \pm 0,008$	$1,20 \pm 0,011$
Кардиальная	$1,38 \pm 0,013$	$1,68 \pm 0,015$	$1,73 \pm 0,016$	$2,27 \pm 0,017$	$1,71 \pm 0,014$	$1,28 \pm 0,013$
Фундальная	$1,43 \pm 0,012$	$3,23 \pm 0,027$	$2,63 \pm 0,021$	$1,79 \pm 0,013$	$1,92 \pm 0,015$	$0,98 \pm 0,008$
Пилорическая	$1,31 \pm 0,016$	$2,73 \pm 0,023$	$1,06 \pm 0,012$	$1,83 \pm 0,015$	$2,42 \pm 0,023$	$2,57 \pm 0,029$

Кардиальная часть. У новорожденных поросят в тканях кардиальной части желудка (табл. 1), в молозивной фазе питания, коэффициент де Ритиса находится на уровне $1,38 \pm 0,013$. У десяти- и двенадцатидносуточных, или у поросят в молозивно-молочной и первой молочной фазах питания, уровень показателя выше, чем у односуточных, составляет соответственно $1,68 \pm 0,015$ и $1,73 \pm 0,013$, однако эти возрастные изменения недостоверны. К месячному возрасту поросят, во второй фазе молочного питания, изучаемый коэффициент достоверно ($p < 0,05$) возрастает на 31,2%, до $2,27 \pm 0,017$. В последующем, у двухмесячных поросят, находящихся в молочно-дефинитивной фазе питания, он достоверно снижается до $1,71 \pm 0,014$, на 24,7%, $p < 0,05$ и примерно на таком же уровне сохраняется и у поросят, находящихся в первой дефинитивной фазе питания, или у четырехмесячных — $1,28 \pm 0,013$.

Фундальная часть. Поросята рождаются с относительно низким коэффициентом де Ритиса в этой части желудка (табл. 1) — $1,43 \pm 0,012$. За последующие десять суток жизни у поросят молозивно-молочной фазы уровень коэффициента резко возрастает в 2,3 раза, $p < 0,001$, до $3,23 \pm 0,027$. В дальнейшем он снижается до $2,63 \pm 0,021$, на 12,6%, но такое возрастное изменение недостоверно, $p > 0,05$. У месячных, у поросят второй фазы молочного питания, изучаемый показатель достоверно ниже, чем у трехнедельных, на 32,0%, $p < 0,01$, и находится на уровне

$1,79 \pm 0,013$. На уровне одномесечных он сохраняется и у двухмесячных — $1,92 \pm 0,015$. К четырехмесячному возрасту поросят, в фазе первого дефинитивного питания, изучаемый показатель резко падает на 49,0%, $p < 0,001$, до $0,98 \pm 0,008$.

Пилорическая часть. У односуточных поросят в тканях пилорической части желудка (табл. 1), в молозивной фазе питания, коэффициент де Ритиса составляет $1,31 \pm 0,011$. У десятисуточных поросят, находящихся в молозивно-молочной фазе питания, он в 2,1 раза выше, $p < 0,001$, чем у односуточных, и находится на уровне $2,73 \pm 0,021$. К трехнедельному возрасту, в течение первой фазы молочного питания, величина коэффициента значительно падает, на 61,2%, $p < 0,001$, до $1,06 \pm 0,012$. У одномесечных, во второй фазе молочного питания, уровень показателя выше, чем у трехнедельных, в 1,7 раза, $p < 0,001$, достигает $1,83 \pm 0,015$. В последующем, до двухмесячного возраста поросят, коэффициент достоверно повышается — в 1,3 раза, $p < 0,001$, до $2,42 \pm 0,023$. Примерно такой же относительно высокий уровень коэффициента де Ритиса ($2,57 \pm 0,029$) обнаруживается и у четырехмесячных поросят.

Следовательно, стабилизация коэффициента де Ритиса у чистопородных поросят, выращенных в условиях свинофермы, определяется в тканях дивертикула, кардиальной и пилорической частей желудка с двухмесячного возраста. Вместе с тем стабилизация показателя в тканях фундальной части желудка в исследуемый период жизни у чистопородных поросят не происходит.

Возрастные изменения коэффициента де Ритиса в тканях желудка у разновозрастных чистопородных поросят, выращенных в условиях свинокомплекса

Дивертикул. В тканях дивертикула у молозивных односуточных чистопородных поросят свинокомплекса коэффициент де Ритиса (табл. 2) имеет относительно наибольшую величину — $1,17 \pm 0,011$. У недельных поросят, находящихся в молозивно-молочной фазе, он ниже односуточных на 50,5%, $p < 0,001$ и находится на уровне $0,58 \pm 0,006$. К двухнедельному возрасту, у поросят первой молочной фазы питания, коэффициент повышается до $0,89 \pm 0,007$, в 1,5 раза, $p < 0,01$. Повторное достоверное снижение показателя обнаруживается у трехнедельных, поросят второй молочной фазы, на 41,6%, $p < 0,01$, до $0,52 \pm 0,004$.

Таблица 2 / Table 2

**Возрастные изменения коэффициента де Ритиса в тканях желудка
у разновозрастных чистопородных поросят (свинокомплекс) /
Age changes coefficient de rytis in the tissues of the stomach
of purebred different ages of pigs (pig complex)**

Часть органа	Возраст, сутки						
	1	7	14	21	28	60	120
Дивертикул	$1,17 \pm 0,011$	$0,58 \pm 0,006$	$0,89 \pm 0,007$	$0,52 \pm 0,004$	$0,77 \pm 0,009$	$1,29 \pm 0,007$	$1,09 \pm 0,008$
Кардиальная	$1,38 \pm 0,011$	$0,78 \pm 0,005$	$1,13 \pm 0,012$	$0,83 \pm 0,007$	$0,39 \pm 0,004$	$1,35 \pm 0,012$	$0,98 \pm 0,007$
Фундальная	$2,43 \pm 0,022$	$1,18 \pm 0,017$	$1,43 \pm 0,011$	$1,46 \pm 0,013$	$1,84 \pm 0,015$	$2,11 \pm 0,018$	$1,95 \pm 0,013$
Пилорическая	$1,84 \pm 0,016$	$1,22 \pm 0,013$	$0,79 \pm 0,006$	$2,33 \pm 0,019$	$1,41 \pm 0,013$	$1,47 \pm 0,012$	$1,56 \pm 0,016$

Уровень показателя у четырехнедельных поросят молочно-дефинитивной фазы примерно одинаков с трехнедельными — $0,077 \pm 0,009$. К двухмесячному возрасту у поросят первой дефинитивной фазы питания в тканях дивертикула коэффициент де Ритиса существенно возрастает, в 1,7 раза, $p < 0,01$, до $1,29 \pm 0,007$. У четырехмесячных поросят уровень коэффициента примерно одинаков с двухмесячными — $1,09 \pm 0,008$.

Кардиальная часть. Коэффициент де Ритиса в тканях кардиальной части желудка (табл. 2) у односуточных молозивных чистопородных поросят имеет относительно самую большую величину — $1,38 \pm 0,011$. В последующие шесть суток жизни у молозивно-молочных поросят изучаемый коэффициент в тканях кардиальной части существенно снижается на 43,5%, $p < 0,01$, до $0,78 \pm 0,005$. У двухнедельных поросят первой молочной фазы он достоверно выше, чем у недельных, в 1,5 раза, $p < 0,05$, и составляет $1,13 \pm 0,012$. Возрастное снижение показателя к трехнедельному возрасту недостоверно, $p > 0,05$. У четырехнедельных, или у поросят переходной фазы питания, коэффициент де Ритиса резко падает, на 53,1%, $p < 0,01$, до $0,39 \pm 0,004$. В течение первой дефинитивной фазы питания поросят, у двухмесячных, он увеличивается в 3,4 раза, $p < 0,001$, до $1,35 \pm 0,012$. Дальнейшее снижение показателя, к четырехмесячному возрасту, в течение второй дефинитивной фазы питания поросят, также достоверно, на 27,5%, $p < 0,05$, до $0,98 \pm 0,007$.

Фундальная часть. Наивысшая величина коэффициент де Ритиса в тканях фундальной части желудка (табл. 2) определяется у односуточных молозивных поросят и составляет $2,43 \pm 0,022$. К семисуточному возрасту поросят, в течение переходной фазы от молозивного к молочному питанию, она значительно падает, на 51,4%, $p < 0,001$, до $1,18 \pm 0,011$. У двух- ($1,43 \pm 0,011$) и трехнедельных ($1,46 \pm 0,011$) поросят уровень показателя примерно равен семисуточным. У четырехнедельных поросят, находящихся в первой молочной фазе, он достоверно увеличивается, в 1,3 раза, $p < 0,05$, до $1,84 \pm 0,015$. С этого возрастного срока поросят существенных возрастных изменений величины коэффициента де Ритиса в тканях фундальной части желудка у чистопородных поросят не обнаруживается.

Пилорическая часть. В тканях пилорической части желудка (табл. 2) у односуточных молозивных поросят коэффициент де Ритиса находится на уровне $1,84 \pm 0,016$. В течение молозивно-молочной и первой молочной фазы питания поросят изучаемый показатель постепенно и достоверно уменьшается: первой недели на 33,7%, $p < 0,05$ до $1,22 \pm 0,013$; второй недели — на 35,3 $p < 0,05$, до $0,79 \pm 0,013$. К трехнедельному возрасту поросят, в течение второй молочной фазы питания, изучаемый коэффициент резко возрастает до $2,33 \pm 0,019$, в 3,0 раза, $p < 0,001$. К четырехнедельному возрасту он вновь снижется до $1,41 \pm 0,013$, на 39,7%, $p < 0,001$, и примерно на таком же уровне сохраняется и в последующие месяцы жизни поросят.

Следовательно, стабилизация коэффициента де Ритиса у чистопородных поросят свинокомплекса в тканях дивертикула обнаруживается с двухмесячного,

а фундальной и пилорической частей желудка — с четырехнедельного возрастов. В тканях кардиальной части желудка за исследуемый период жизни поросят этот показатель не стабилизируется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее интенсивные возрастные изменения коэффициента де Ритиса у чистопородных поросят, выращенных в условиях УНПЦ «Студенческий», определяются в тканях дивертикула в первой фазе молочного питания, или с десятисуточного до трехнедельного возраста, и в фазе молочно-дефинитивного питания, или с месячного до двухмесячного возраста. В тканях кардиальной части желудка у поросят интенсивность возрастных изменений изучаемого показателя наивысшая во второй фазе молочного питания, или с трехнедельного до месячного возраста и в переходной молочно-дефинитивной фазе, или с месячного до двухмесячного возраста. В тканях фундальной части желудка коэффициент де Ритиса более выражено изменяется в молозивно-молочной фазе, или с односуточного до десятисуточного возраста и в первой дефинитивной фазе, или с двухмесячного до четырехмесячного возраста.

В тканях пилорической части желудка интенсивность возрастных изменений коэффициента высокая в молозивно-молочной фазе питания, или с односуточного до десятисуточного возраста и в первой молочной фазе питания, или с десятисуточного до трехнедельного возраста.

Наиболее интенсивные возрастные изменения коэффициента де Ритиса у чистопородных поросят, выращенных в условиях свинокомплекса, выявляются в тканях дивертикула в молозивно-молочной фазе питания, или с односуточного до семисуточного возраста и в первой дефинитивной фазе питания или с четырехнедельного до двухмесячного возраста. В тканях кардиальной части желудка, как и в тканях дивертикула, интенсивность возрастных изменений изучаемого показателя более высокая в молозивно-молочной фазе питания, или с односуточного до семисуточного возраста и в первой дефинитивной фазе питания, или с четырехнедельного до двухмесячного возраста поросят.

В тканях фундальной части желудка у поросят величина коэффициента более интенсивно изменяется лишь в молозивно-молочной фазе питания, или с односуточного до семисуточного возраста. В тканях пилорической части желудка коэффициент де Ритиса с высокой интенсивностью изменяется во второй и третьей фазах молочного питания, или с двухнедельного до четырехнедельного возраста.

Таким образом, характер и интенсивность возрастных изменений коэффициента де Ритиса у чистопородных поросят в тканях разных частей желудка неодинаковые. При четырехнедельном отъеме поросят, в условиях выращивания в свинокомплексе, характер и интенсивность возрастных изменений изучаемого показателя имеют свои особенности. Вместе с тем величина коэффициента становится более стабильной у поросят обеих хозяйств, находящихся в дефинитивной или растительной фазе питания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] *Терентьева М.Г., Мардарьева Н.В.* Активность аспартатаминотрансферазы в тканях двенадцатиперстной кишки у крольчат в разные фазы постнатального онтогенеза // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. 2016. Т. 1. № 2. С. 75—78.
- [2] *Мардарьева Н.В., Нестерова О.П., Кузнецова Т.В.* Амилазная активность в тканях мышц у растущих крольчат // Продовольственная безопасность и устойчивое развитие АПК: материалы Международной научно-практической конференции. 2015. С. 441—444.
- [3] *Иванова Н.Н., Игнатьев Н.Г.* Трансферазы в тканях печени у крольчат в растительную фазу питания // Ученые записки КАВМ им Н.Э. Баумана. 2015. Т. 224. № 4. С. 79—82.
- [4] *Терентьева М.Г., Мардарьева Н.В., Кузнецова Т.В.* Амилазная и фосфатазная активность в тканях слепой кишки у растущих чистопородных и помесных поросят // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2013. № 3. С. 53—59.
- [5] *Терентьева М.Г., Мардарьева Н.В., Нестерова О.П.* Ферменты в тканях ободочной кишки у разновозрастных поросят // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2017. Т. 12. № 2. С. 149—156.
- [6] *Иванова Н.Н.* Коэффициент де Ритиса в сыворотке крови, в тканях печени и поджелудочной железы у поросят крупной белой породы в постнатальном онтогенезе // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. Т. 3. № 31-1. С. 136—138.
- [7] *Терентьева М.Г., Игнатьев Н.Г.* Коэффициент де Ритиса в тканях двенадцатиперстной кишки у разновозрастных крольчат // Пермский аграрный вестник. 2016. № 1 (13). С. 70—75.
- [8] Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных // Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР № 775 от 12.03.1977 (<http://docs.cntd.ru/document/456016716>).

Сведения об авторах:

Судакова Диана Петровна — кандидат биологических наук, преподаватель ГА ПОУ Чувашской Республики «Чебоксарского техникума строительства и городского хозяйства»; e-mail: maiya-7777@mail.ru.

Терентьева Майя Генриховна — кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологий и переработки сельскохозяйственной продукции ФГБОУ ВО Чувашской ГСХА; e-mail: maiya-7777@mail.ru.

Мардарьева Наталия Валерьевна — кандидат биологических наук, заведующий кафедрой биотехнологий и переработки сельскохозяйственной продукции ФГБОУ ВО Чувашской ГСХА; e-mail: volga480@yandex.ru.

Для цитирования:

Судакова Д.П., Терентьева М.Г., Мардарьева Н.В. Коэффициент де Ритиса в тканях желудка у разновозрастных чистопородных поросят, выращенных в условиях разных хозяйств // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2019. Т. 14. № 1. С. 81—89. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-81-89.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-81-89

DE RITIS RATIO IN STOMACH TISSUES IN MIXED-AGE PURE-BRED PIGS, GROWN UP IN THE CONDITIONS OF DIFFERENT FARMS

Diana P. Sudakova¹, Maiya G. Terentyeva²,
Nataliya V. Mardaryeva²

¹Cheboksary College of Construction and Urban Economy
Cheboksary, 428017, Russian Federation

²Chuvash State Agricultural Academy
Cheboksary, 428003, Russian Federation

Abstract. The nature and intensity of age-related changes in the De Ritis coefficient, or the ratio of the enzyme aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase, in the tissues of the diverticulum, cardiac, fundal and pyloric parts of the stomach of purebred different-age pigs grown in different farms were studied. The activity of enzymes was determined by spectrophotometric method in the scientific laboratory of the “Chuvash State Agricultural Academy”. It was revealed that during the four-week weaning of pigs (under growing conditions of the pig complex), the nature and intensity of the age-related changes of the studied indicator have their own characteristics. At the same time, the value of the coefficient becomes more stable in piglets of both farms that are in the definitive or plant phase of feeding. The most intensive age-related changes in the De Ritis coefficient of purebred piglets grown under the conditions of the Student Scientific and Production Center “Student” are determined in the tissues of the diverticulum in the first phase of the milk-definitive diet (reduced by 33.8%). In the tissues of the cardiac part, in the second phase of the milk supply (increased by 31.2%). In the tissues of the fundus of the stomach, the De Ritis coefficient is more pronouncedly changing in the milky phase (increased by 2.3 times). In the tissues of the pyloric part — in the colostrum-milky phase of nutrition (increased by 2.1 times). The most intense age-related changes in the De Ritis coefficient of purebred piglets grown under pig farm conditions are detected in the tissues of the diverticulum in the first definitive phase of nutrition (increased by 1.7 times). In the tissues of the cardiac part of the stomach — in the first definitive phase of nutrition (increased by 3.4 times). In the tissues of the fundus of the stomach in piglets, the value of the coefficient changes more intensively only in the colostrum-milky phase of the diet (decreased by 51.4%). In the tissues of the pyloric part of the stomach, De Ritis coefficient with a high intensity changes in the second and third phases of the milk supply (increased by 3.0 times).

Key words: De Ritis coefficient, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, stomach, piglets

REFERENCES

- [1] Terentyeva MG, Mardaryeva NV. Activity of aspartate aminotransferase in duodenum tissues in young rabbits in different phases of post-natal ontogenesis. *Bulletin Samara State Agricultural Academy*. 2016; 1(2):75—78. (In Russ).
- [2] Mardareva NV, Nesterova OP, Kuznetsova TV. Amylase activity in muscle tissues of growing rabbits. In: *Food safety and sustainable development of agroindustrial complex: materials of the International Scientific and Practical Conference*; Cheboksary; 2015. p. 441—444. (In Russ).
- [3] Ivanova NN, Ignatyev NG. Transferases in liver tissues at young rabbits in a plant phase of feeding. *Scientific notes of Kazan Bauman State academy of veterinary medicine*. 2015; 224(4):79—82. (In Russ).

- [4] Terentyeva MG, Mardaryeva NV, Kuznetsova TV. Amylase and phosphatase activity in the tissues of the cecum in growing purebred and crossbred piglets. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2013; (3):53—59. (In Russ).
- [5] Terentyeva MG, Mardaryeva NV, Nesterova OP. Enzymes in tissues of a colon in mixed-age pigs. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2017; 12(2):149—156. (In Russ).
- [6] Ivanova NN. Coefficient De Ritis in blood serum, in tissues of a liver and pancreas in pigs of large white breed in post-natal ontogenesis. *IZVESTIA Orenburg State Agrarian University*. 2011; 3(31—1):136—138. (In Russ).
- [7] Terentyeva MG, Ignatyev NG. Coefficient De Ritis in duodenum tissues in mixed-age young rabbits. *Perm Agrarian Journal*. 2016; 1(13):70—75. (In Russ).
- [8] *Ministry of Health of the USSR, Rules of work with use of experimental animals [The Annex to the order of the Ministry of Health of the USSR No. 775]*. 1977. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/456016716> [Accessed 25th May 2018]. (In Russ).



ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-90-98

АНАЛИЗ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ РИСКОВ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД МЕТОДОМ FMEA

В.Е. Никитченко, Е.О. Рысцова, А.Н. Чернышева

Российский университет дружбы народов
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
v.e.nikitchenko@mail.ru

Аннотация. На всех этапах производства микробиологических питательных сред производитель, а в особенности микробиологические лаборатории, изготавливающие среды на месте, сталкиваются с множеством производственных рисков. Наличие таких рисков практически в каждой критической точке производства и дальнейшей эксплуатации МПС обусловлено наличием общих основных требований для всех МПС, которые необходимо учитывать и соблюдать при их разработке и приготовлении; а также сложностью и трудоемкостью самого процесса изготовления высококачественных дифференциально-диагностических и иных питательных сред, требующего наличия всех необходимых для приготовления данных сред компонентов, оборудования, стерильных условий и квалифицированного персонала. В связи с этим возникает необходимость в поиске эффективных методов выявления и предотвращения нежелательных ситуаций, связанных с производством и использованием МПС. Целью данной работы являлась адаптация методики оценки рисков на основе экспертного Метода анализа видов и последствий отказов FMEA (Failure Mode Effect Analysis), изложенного в ГОСТ Р ИСО 31010-2011 для нужд микробиологических лабораторий, в том числе ветеринарно-санитарной экспертизы, осуществляющих производство микробиологических питательных сред и работу с ними. В рамках данной работы был проведен сравнительный анализ методов оценки риска с целью выбора оптимального; адаптация принципа СМК — риск-ориентированного мышления и метода FMEA для оценки рисков при реализации процессов изготовления МПС в условиях микробиологической лаборатории (на примере твердых агаровых сред); разработаны формы протокола оценки риска; выполнены расчеты количественной оценки уровней риска с целью определения необходимости предупреждающих действий и их выполнения для минимизации негативных последствий риска в случае его осуществления с помощью разработанных протоколов. Полученные результаты показали, что данная методика может быть успешно внедрена и использована в заявленной области.

Ключевые слова: микробиологические питательные среды, ветеринарно-санитарная экспертиза, система менеджмента качества (СМК), метод FMEA

Введение. При проведении анализа микробиологической безопасности сырья или готовой продукции животного происхождения большое значение имеет качество питательных сред, которые готовят непосредственно в лабораториях. Они являются основой микробиологической работы, и их качество часто определяет результаты всего исследования. Среды должны создавать оптимальные (наилуч-

шие) условия для жизнедеятельности микроорганизмов [1, 2]. Использование высококачественных питательных сред составляет залог успеха микробиологических исследований, в том числе и при проведении ветеринарно-санитарной экспертизы, поскольку микробиологические питательные среды отвечают своему назначению только в случаях соответствия их стандартам качества [3—5].

Для всех МПС, невзирая на их разнообразие и многочисленность, выделяются общие основные требования. При этом также необходимо учитывать, что изготовление высококачественных дифференциально-диагностических питательных сред представляет собой сложный, трудоемкий процесс, требующий наличия всех необходимых для приготовления среды компонентов, оборудования, стерильных условий и квалифицированного персонала.

Однако на всех этапах производства микробиологических питательных сред производитель, в особенности микробиологические лаборатории, изготавливающие среды на месте, сталкиваются с множеством производственных рисков [2].

Поэтому целью наших исследований явилось провести аналитический анализ риск-ориентированного мышления и метода FMEA для оценки рисков при реализации процессов изготовления МПС в условиях микробиологической лаборатории (на примере твердых агаровых сред).

Материалы и методы. В качестве алгоритма исследования были приняты процедуры, описанные в ГОСТ ISO 11133-2016 (ISO 11133:2014, IDT) [6]. Однако при выполнении их наблюдаются риски, которые в соответствии с ГОСТ Р ИСО 31010-2011 определяются как неопределенность в достижении цели.

Риск-ориентированное мышление в соответствии с ISO 9000:2015 (ГОСТ Р ИСО 9001-2015) позволяет любой структуре, в частности микробиологической лаборатории, определять факторы (угрозы-опасности), которые могут привести к отклонению от запланированных результатов процессов — в частности процесса «Изготовление питательных сред в условиях микробиологической лаборатории» и «Использование готовых стандартизированных питательных сред»; и использовать предупреждающие средства (действия) для минимизации негативных последствий (рисков).

С целью выбора метода экспертной оценки рисков были проанализированы несколько наиболее подходящих методов из 33 представленных в ГОСТ Р ИСО 31010-2011, в том числе:

- метод HACCP (Анализ опасности и критических контрольных точек);
- метод HRA (Анализ влияния человеческого фактора);
- метод SWIFT (Структурированный анализ сценариев методом «что, если?»);
- метод FMEA (Анализ видов и последствий отказов и анализ видов, последствий и критичности отказов).

В данной работе выбор метода определяется следующими критериями:

- возможность оценки вероятности (O) появления опасности-угрозы отклонения от запланированных результатов процесса;
- возможность вероятностной оценки последствий реализации опасности (S);
- возможность сравнительной оценки риска, то есть уровня остаточного риска после принятия предупреждающих действий по устранению потенциальной опасности [7, 8].

Поскольку необходимо получить количественные оценки вероятности появления риска, его уровня и величину остаточного риска методом экспертных оценок, с этой точки зрения, безусловно, более всего подходит метод FMEA.

К сожалению, популярный метод НАССР не позволяет оценить последствия реализации риска, а также количественную оценку уровня риска [7, 8]. Несмотря на это данный предупредительный метод широко используется в пищевой промышленности как гарантия безопасности производимых продуктов питания. Данный метод определяет системный подход к процессу производства продуктов питания, выявлению возможных факторов риска химического, физического и биологического происхождения, их анализ и контроль [7, 9].

Анализ видов и последствий отказов (FMEA) помогает идентифицировать:

- все виды потенциальных опасностей (рисков), которые могут привести, к несоответствиям при выполнении процессов;
- способы смягчения последствий влияния появления потенциальных опасностей для процессов [9, 10].

В настоящей статье рассматривается использование метода FMEA в процессе приготовления твердой агаровой среды в условиях лаборатории.

Метод FMEA может быть использован:

- для исследования всех видов опасностей для процессов;
- для идентификации последствий ошибок персонала (влияние человеческого фактора);
- для улучшения процессов.

Для выполнения метода FMEA необходима подробная информация, которая может включать:

- этапы выполняемого процесса;
- информацию о функционировании каждого этапа процесса;
- подробное описание параметров, которые могут влиять на функционирование процессов;
- сведения о результатах реализации опасностей;
- хронологические данные о появлении опасностей.

Метод FMEA включает в себя следующую последовательность действий.

- a) Определение области применения и целей исследования.
- b) Формирование рабочей экспертной группы.
- c) Изучение процессов, для которых применяют метод FMEA.
- d) Деление процесса на этапы.
- e) Определение функции каждого этапа.
- f) Определение для каждого этапа:

- появление возможных несоответствий при выполнении процессов и их причин;
- последствий несоответствий;
- уровень последствий при реализации несоответствий при выполнении процесса.

Уровень риска определяют как сочетание последствий вида реализации опасности и вероятности ее появления [9, 10].

Ранг приоритетности риска (RPN) является смешанной мерой критичности реализации опасности, его рассчитывают путем умножения ранга значимости последствий реализации опасности на ранг вероятности ее появления. В стандарте [9] предлагается градация рангов от 1 до 10.

Первичными выходными данными метода FMEA являются перечень видов рисков, механизмов возникновения рисков и его последствий для каждого этапа процесса. К выходным данным также относят информацию о причинах и последствиях реализации риска для процесса в целом [9, 10].

Метод применим к видам опасностей, связанных с ошибками персонала, нарушением работоспособности оборудования и методов реализации процессов.

При этом метод FMEA может быть использован только для идентификации отдельных опасностей, а не их сочетания.

Используя материал, представленный в открытом интернет-источнике [11], провели оценку приоритетности рисков, то есть определили приоритетное число риска (PRN).

Этот показатель, полученный перемножением вероятностей появления риска (O) и оценки тяжести его последствий (S), служит для оценки важности (приоритетности) риска. На его основе принимается решение о необходимости предпринимать или не предпринимать предупреждающие действия с целью снижения остаточного риска.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основе изучения конкретизации метода FMEA в ГОСТ Р 51814.2-2001 разработаны следующие таблицы балльных оценок для использования экспертной группой (табл. 1 и 2). Величина PRN при этом будет изменяться в диапазоне от 1 до 100.

Таблица 1 / Table 1

Оценка вероятности появления события / Risk Probability Assessment (Hazard)

Оценка вероятности появления данного вида риска (угрозы)	Балл «О»
Очень высокая	9—10
Высокая	7—8
Умеренная	5—6
Относительно низкая	3—4
Низкая	1—2

Исходя из полученной величины PRN, экспертная группа принимает одно из следующих решений:

- если RPN меньше 36 (**низкий** уровень данного вида риска), то принятие предупреждающих действий **не требуется**;
- если RPN больше 36, но меньше 90 (**приемлемый** уровень данного вида риска), то следует **начать проработку** предупреждающих действий по снижению риска;
- если RPN больше 90 (**высокий** уровень данного вида риска), то требуется **незамедлительная** разработка и принятие мер для снижения риска (табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

**Оценка значимости последствий события /
Impact Assessment**

Оценка значимости последствий события	Балл «S»
Очень опасное	10
Опасное	9
Очень важное	8
Важное	7
Умеренное	6
Слабое	5
Очень слабое	4
Незначительное	3
Очень незначительное	2
Отсутствует	1

С этой целью экспертная группа начинает с того, что определяет потенциальные причины такого высокого уровня риска. При этом рекомендуется воспользоваться приложением Н ГОСТ 111333-2016 (табл. 3 Сведения о видах недостатков, которые могут иметь питательные среды, а также о вероятных причинах их наличия).

Таблица 3 / Table 3

**Сведения о видах недостатков, которые могут иметь питательные среды,
а также о вероятных причинах их наличия /
Information about the types of disadvantages that a medium may have,
as well as the possible causes of its presence**

Вид недостатка	Возможная причина недостатка
Агаровая среда не застывает	Перегрев среды во время приготовления. Низкое значение pH, приводящее к кислому гидролизу. Использована неправильная масса агара. Агар был растворен не до конца. Недостаточное перемешивание ингредиентов
Неверное значение pH среды	Перегрев среды во время приготовления. Неудовлетворительное качество воды. Загрязнение химическими веществами извне. pH измерен при неправильной температуре. pH-метр неправильно калиброван. Неудовлетворительное качество обезвоженной (сухой) среды
Некорректный цвет среды	Перегрев среды во время приготовления. Неудовлетворительное качество воды. Неудовлетворительное качество обезвоженной (сухой) среды. Отсутствие одного или нескольких ингредиентов. Использованы неправильные ингредиенты. Неправильное значение pH. Загрязнение извне
Образование осадка	Перегрев среды во время приготовления. Неудовлетворительное качество воды. Неудовлетворительное качество обезвоженной (сухой) среды. Неудовлетворительный контроль pH. При приготовлении из отдельных ингредиентов — примеси в сырье
Ингибирование среды или низкая производительность среды	Перегрев среды во время приготовления. Неудовлетворительное качество обезвоженной (сухой) среды. Неудовлетворительное качество воды. Использована неправильная рецептура, например, ингредиенты неправильно взвешены, добавки введены в неверной концентрации. В посуде, где проводится приготовление, или в воде присутствует токсичный осадок. Контрольный(е) микроорганизм(ы) приготовлен(ы) неправильно

Окончание таблицы 3 / End of Table 3

Вид недостатка	Возможная причина недостатка
Недостаточная селективность или специфичность среды	Перегрев среды во время приготовления. Неудовлетворительное качество обезвоженной (сухой) среды. Использована неправильная рецептура. Неправильно осуществлено добавление ингредиентов, например, если среда была слишком горячая или неправильной концентрации. Загрязнение добавок. Контрольный(е) микроорганизм(ы) приготовлен(ы) неправильно
Загрязнение среды	Неадекватная стерилизация. Неэффективные методы асептики. Загрязнение добавок

Эти причины, в свою очередь, рассматриваются экспертной группой, т.е. по каждой причине проводится анализ, оценка вероятности ее возникновения и обнаружения и рассчитывается новое ожидаемое значение RPN также с помощью показателей O и S.

В случае, если RPN для любой из рассматриваемых причин снова превышает 36, то экспертная группа формулирует предупреждающие действия, а затем оценивает уровень риска их невыполнения тем же способом. И так продолжается до тех пор, пока уровень риска не станет приемлемым и, следовательно, предупреждающие действия — результативными.

Пример использования разработанной формы протокола оценки рисков на конкретных материалах приведен в табл. 4.

Таблица 4 / Table 4

**Протокол оценки рисков № 1 от ... (дата) /
Risk Assessment Protocol # 1 date dd/mm/yy "Agar medium does not solidify"**

№ п/п	Риск (нежелательная ситуация)	O	S	RPN	Причины риска (другие нежелательные ситуации)	O	S	RPN	Необходимость принятия предупреждающих действий	Оценка уровня риска невыполнения предприятием предупреждающих действий (ПД)						Ответственный за выполнение ПД	Срок выполнения ПД	Статус ПД и их результативность		
										Предупреждающие действия (ПД)		Риск невыполнения ПД (нежелательная ситуация)		O	S				RPN	
1	Агаровая среда не застывает	7	10	70	Перегрев среды во время приготовления	6	10	60	есть	Полное соблюдение температурного режима	Недостаточная квалификация или обученность персонала	3	10	30	Начальник лаборатории					
2					Низкое значение pH, приводящее к кислому гидролизу	4	8	32	нет											
3					Использована неправильная масса агара	6	10	60	есть	Контролировать вес	Неисправность весов	3	10	30	Начальник лаборатории					
4					Агар был растворен не до конца	4	7	28	нет											
5					Недостаточное перемешивание ингредиентов	4	7	28	нет											

Используя приложение Н (табл. 3 Сведения о видах недостатков, которые могут иметь питательные среды, а также о вероятных причинах их наличия) ГОСТ 111333-2016 и разработанную форму протоколов оценки рисков, а также материалы эксперимента, представленные в статье возможно проиллюстрировать сказанное на конкретных примерах (см. табл. 4).

Заключение. На основании изученных данных литературных источников была проведена адаптация принципа СМК — риск-ориентированного мышления и метода ФМЕА для оценки рисков при реализации процессов изготовления МПС в условиях микробиологической лаборатории (на примере твердых агаровых сред).

Разработаны формы протокола оценки риска и расчетов количественной оценки уровней риска, с целью определения необходимости предупреждающих действий и их выполнения для минимизации негативных последствий риска в случае его осуществления с помощью разработанных протоколов. Полученные результаты показали, что данная методика может быть успешно внедрена и использована в заявленной области.

© В.Е. Никитченко, Е.О. Рысцова, А.Н. Чернышева, 2019.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] ГОСТ ISO 9001:2015 (ГОСТ Р ИСО 9001-2015). Системы менеджмента качества.
- [2] Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов. СПб.: Проспект Науки, 2006. 336 с.
- [3] ISO 22000 Системы менеджмента безопасности пищевых продуктов. Требования ко всем организациям в цепи производства и потребления пищевых продуктов.
- [4] ГОСТ Р ЕН 12322-2010 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред.
- [5] ГОСТ Р ИСО/МЭК 31010-2011. Менеджмент риска. Методы оценки риска.
- [6] Электронный ресурс <http://www.nicemanagement.ru/doips-665-2.html>.
- [7] МЭК 60812 Методы анализа надежности систем. Метод анализа видов и последствий отказов (ФМЕА).
- [8] Методические рекомендации № 24 ФЦ /3947 от 20.12.2004 «Определение колиформных бактерий и *E. coli* с использованием хромогенных и флюорогенных индикаторных сред производства Merck (Германия). Методические рекомендации».
- [9] Прозоркина Н.В., Рубашкина П.А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие для средних специальных медицинских учебных заведений. Ростов-на-Дону: Феникс. 2002. 416 с.
- [10] Егорова И.Ю., Никитченко В.Е., Никитченко Д.В., Чернышева А.Н., Рысцова Е.О. Микробиологические питательные среды нового формата в ветеринарно-санитарной оценке продуктов питания и сырья животного происхождения // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2017. Т. 12. № 1. С. 76—85.
- [11] Санитария и гигиена молока и молочных продуктов. Методические указания к лабораторным работам / Могилевский государственный университет продовольствия. Могилев, 2009.

Сведения об авторах:

Никитченко Владимир Ефимович — доктор ветеринарных наук, профессор, профессор департамента ветеринарной медицины Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов; e-mail: v.e.nikitchenko@mail.ru

Рысцова Екатерина Олеговна — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент департамента ветеринарной медицины Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов; e-mail: ekaterina-ryscova@yandex.ru

Чернышева Анастасия Николаевна — магистр ветеринарно-санитарной экспертизы, аспирант Института микробиологии им. С.Н. Виноградского (ФИЦ Биотехнологии РАН), учебный мастер департамента ветеринарной медицины Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов; e-mail: a69117@yandex.ru

Для цитирования:

Никитченко В.Е., Рысцова Е.О., Чернышева А.Н. Анализ и предупреждение рисков при изготовлении лабораторных микробиологических питательных сред методом FMEA // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2019. Т. 14. № 1. С. 90—98. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-90-98.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-90-98

ANALYSIS AND PREVENTION OF RISKS IN THE MANUFACTURE OF LABORATORY MICROBIOLOGICAL CULTURE MEDIA BY FMEA METHOD

**Vladimir E. Nikitchenko, Ekaterina O. Rystsova,
Anastasiya N. Chernysheva**

Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)
6 Miklukho-Maklaya Street, Moscow, 117198, Russian Federation

Abstract. At all stages of the production of microbiological nutrient media (MNM), the manufacturer, and in particular, the microbiological laboratories that manufacture the media on site, face many operational risks. The presence of such risks, in almost every critical point of production and further operation of the MNM, is due to the presence of common basic requirements for all MNM, which must be taken into account and respected during their development and preparation; as well as the complexity and laboriousness of the very process of manufacturing high-quality differential-diagnostic and other nutrient media, requiring the availability of all the components necessary for preparing these media, equipment, sterile conditions and qualified personnel. In this regard, there is a need to search for effective methods to identify and prevent undesirable situations associated with the production and use of MNM. The aim of this work was to adapt the risk assessment methodology based on the expert method for analyzing the types and consequences of FMEA failures (Failure Mode Effect Analysis) set out in GOST R ISO 31010-2011 for the needs of microbiological laboratories, including those for veterinary and sanitary expertise, producing microbiological nutrient environments and using them. As part of this work, a comparative analysis of risk assessment methods was carried out in order to select the optimal one; adaptation of the QMS principle — risk-oriented thinking and the FMEA method for risk assessment in the implementation of MNM manufacturing processes in a microbiological laboratory (for example, solid agar media); risk assessment protocol forms were developed; calculations of a quantitative assessment of risk levels were carried out in order to determine the need for preventive actions and their implementation in order to minimize the negative consequences of risk in case of its implementation using the developed protocols. The results showed that this technique can be successfully implemented and used in the claimed area.

Key words: microbiological culture media, veterinary and sanitary expertise, quality management system (QMS), FMEA

REFERENCES

- [1] OJSC “All-Russian Scientific Research Institute of Certification”. GOST ISO 9001: 2015 (GOST R ISO 9001-2015). Quality Management Systems. Moscow: Standardinform Publ.; 2018. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/1200124394> [Accessed 27th May 2018]. (In Russ).
- [2] Galynkin VA, Zaikina NA, Kocherovets V.I. Nutrient media for microbiological quality control of drugs and food. St. Petersburg: Prospekt Nauki Publ.; 2006. (In Russ).
- [3] International Organization for Standardization. ISO 22000:2018. Food Safety Management System. Requirements for all organizations in the chain of production and consumption of food. 2018. (In Russ).
- [4] Laboratory of problems of clinical and laboratory diagnostics of the Moscow Medical Academy named after IM Sechenov. GOST R EN 12322-2010 Medical devices for in vitro diagnostics. Nutrient media for microbiology. Criteria of functional characteristics of nutrient media. Moscow: Standardinform Publ.; 2011. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/1200082586> [Accessed 27th May 2018]. (In Russ).
- [5] Autonomous non-commercial organization “Research Center for Monitoring and Diagnostics of Technical Systems”. GOST R ISO/IEC 31010-2011. Risk management. Risk assessment methods. Moscow: Standardinform Publ.; 2012. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/1200090083> [Accessed 29th May 2018]. (In Russ).
- [6] Nice management. Project Risk Management. Available from: <http://www.nicemanagement.ru/doips-665-2.html> [Accessed 30th May 2018]. (In Russ).
- [7] OJSC “Research Center for Monitoring and Diagnostics of Technical Systems”. GOST R 51901.12-2007 (IEC 60812: 2006) Risk management. Method of analyzing the types and consequences of failures. Moscow: Standardinform Publ.; 2008. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/1200062125> [Accessed 29th May 2018]. (In Russ).
- [8] Federal Hygiene and Epidemiology Centre, Determination of coliform bacteria and *E. coli* using chromogenic and fluorogenic indicator media produced by Merck (Germany): Guidelines [24 FC/3947]. 2004. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/1200092737> [Accessed 27th May 2018]. (In Russ).
- [9] Prozorkina HV, Rubashkina PA. Basics of Microbiology, Virology and Immunology: A textbook for secondary special medical schools. Rostov-on-Don: Feniks; 2002. (In Russ).
- [10] Egorova IY, Nikitchenko VE, Nikitchenko DV, Chernysheva AN, Rystsova EO. Microbiological nutrient media the new format in the veterinary-sanitary assessment food and raw materials of animal origin. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2017; 12(1): 76—85. Available from: doi: 10.22363/2312-797X-2017-12-1-76-85 (In Russ).
- [11] Shuliak TL. Basics of scientific research: teaching aid for students of the specialty 1-49 01 02 “Technology of storage and processing of animal raw materials” specialization 1-49 01 02 02 “Technology of milk and dairy products”. Mogilyov: UO MGUP Publ.; 2009. (In Russ).