

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белик В.Ф. Методика опытного дела в овощеводстве и бахчеводстве. – М.: Агропромиздат, 1992. – 319 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1985. – 336 с.
3. Животков Л.А., Замотаева З.А., Секатуева Л.М. Методика выявления потенциальной продуктивности и адаптивности сортов и селекционных форм озимой пшеницы по показателю «Урожайность» // Селекция и семеноводство. – 1994. – № 2. – С. 3–6.
4. Павленко В.Н., Звонкова И.Ю. Особенности технологии возделывания огурцов в Нижнем Поволжье // Вестник Прикаспия. – 2016. – № 1. – С. 12–14.
5. Шубитидзе Г.В., Курдюков Ю.Ф. Роль элементов систем земледелия в формировании устойчивой продуктивности агроценозов в засушливой степи Поволжья // Аграрный научный журнал. – 2015. – № 10. – С. 29–30.

Звонкова Ирина Юрьевна, старший преподаватель кафедры «Ремонт машин и ТКМ», Волгоградский государственный аграрный университет. Россия.

Павленко Владимир Николаевич, д-р с.-х. наук, проф. кафедры «Общественное питание, процессы и оборудование перерабатывающих производств», Волгоградский государственный аграрный университет. Россия.

400002, г. Волгоград, просп. Университетский, 26.
Тел.: (8442) 41-15-18.

Мухортова Тамара Васильевна, канд. с.-х. наук, научный сотрудник, Прикаспийский научно-исследовательский институт аридного земледелия. Россия.

Полухина Елена Владимировна, зав. лабораторией, Прикаспийский научно-исследовательский институт аридного земледелия. Россия.

416251, Астраханская область, Черноярский район, с. Солёное Займище, кв. Северный, 8.

Тел.: (8514) 92-54-39.

Ключевые слова: гибрид; сортоизучение; адаптивность; среднесортная урожайность; биологическая урожайность.

THE PRODUCTIVITY AND PARAMETERS OF ENVIRONMENTAL ADAPTABILITY OF SEDEK AGROFIRM CUCUMBER HYBRIDS IN THE CONDITIONS OF DRIP IRRIGATION IN NORTH-WEST-CASPIAN REGION

Zvonkova Irina Yuryevna, Senior Teacher of the chair "Machine Maintenance and Construction Materials Engineering", Volgograd State Agricultural University. Russia.

Pavlenko Vladimir Nikolaevich, Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the chair "Public Catering, Processes and Equipment of Processing Industries", Volgograd State Agricultural University. Russia.

Mukhortova Tamara Vasylyevna, Candidate of Agricultural Sciences, Researcher, Caspian Research Institute of Arid Agriculture. Russia.

Polukhina Elena Vladimirovna, Head of the laboratory, Caspian Research Institute of Arid Agriculture. Russia.

Keywords: hybrid; variety researching adaptability; yielding capacity; biological yielding capacity.

The productivity and parameters of Sedek agrofirma cucumber hybrids environmental adaptability in a semi-desert area of the North-West Caspian region was presented. Different adaptability coefficient hybrids were determined with different yielding capacity; biological yielding capacity was shown.

УДК 608.3:577.213.3:578.828:599.735.51

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО И ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО СПОСОБА ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

КРАСНИКОВА Екатерина Сергеевна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

ЛАРИОНОВА Ольга Сергеевна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

КРАСНИКОВ Александр Владимирович, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

УТАНОВА Гуля Хайлядиновна, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

Разработан способ, позволяющий на ранних стадиях количественно выявлять высококонсервативную область гена gag вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV). Применение олигонуклеотидного зонда дает возможность повысить чувствительность и специфичность метода, исключить субъективность при оценке результатов. Real-time PCR для детекции BIV значительно снижает возможность контаминации образцов, помещения, оборудования и реактивов, а также сокращает сроки проведения анализа.

Bovine immunodeficiency virus, согласно данным М. J. Van Der Maaten и др. (1972), был впервые выделен в 1969 г. в штате Луизиана (США) от 8-летней коровы голштинской породы с клиническими признаками персистирующего лимфоцитоза, генерализованной гиперплазией лимфатических узлов, поражением центральной

нервной системы, слабостью и кахексией. Изолированный вирус индуцировал формирование сентиция в клеточных культурах и был структурно близок к вирусу Висна-Маеди, в результате чего был отнесен к роду *Lentivirus* семейства *Retroviridae*. В связи с тем, что изолированный от коров лентивирус был очень похож на вирус





иммунодефицита человека, он был обозначен как «вирус иммунодефицита крупного рогатого скота». В механизме передачи *BIV*, по аналогии с ВИЧ, отмечены как горизонтальные, так и вертикальные пути распространения [7].

Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИ КРС) выявляют в Московской области и Ставропольском крае у 11–67 и 11–33 % обследованных животных соответственно [2, 6]. *BIV*-инфекция регистрируется в Индии (до 24 %), Канаде (до 23,4 %), Австралии (до 15,9 %), а также в Германии, Японии, Италии, Пакистане, Бразилии, Замбии, Турции и других странах мира, выявляют его и в Саратовской области – до 69 % [3].

BIV, как и другие лентивирусы, проявляет антигенную вариабельность, чтобы уклоняться от иммунной системы инфицированного организма. Геномное разнообразие *BIV*, обусловленное мутациями, рекомбинациями и селективным давлением организма, приводит к тому, что доля нуклеотидных замен в отдельных областях вирусной РНК составляет до 85 %, что имеет решающее значение в эволюционном развитии *BIV* [10].

Как и другие лентивирусы [1], *BIV* инфицирует клетки иммунной системы, прежде всего моноциты, макрофаги и лимфоциты. Длительный период вирусной латентности и отсутствие вирусемии – стратегия, чтобы избежать иммунного ответа. В-лимфоциты, несущие интегрированную ДНК провируса, не продуцируют детектируемые уровни вирусной РНК или белков [9]. В этой связи серологические тесты, направленные на обнаружение антител в сыворотке крови животного, имеют ряд ограничений.

Диагностика *BIV* с помощью полимеразой цепной реакции (ПЦР) считается надежным методом выявления КРС, инфицированного этим вирусом. Однако различные праймеры показывают различную чувствительность и специфичность, что связывают с высокой изменчивостью *BIV* [8].

ПЦР в реальном времени считают наиболее специфичным и чувствительным способом диагностики. Для скрининговых исследований Real-Time PCR может оказаться незаменимым, так как данный способ не только сокращает время анализа, но и значительно снижает вероятность контаминации нуклеиновыми кислотами в лаборатории. Кроме того, ПЦР позволяет дать количественную оценку результатам, то есть определить вирусную нагрузку на организм животного.

Цель наших исследований – разработка способа Real-Time PCR для детекции *BIV*, циркулирующих на территории Саратовской области.

Методика исследований. Материалом для исследования послужили 32 пробы периферической крови от коров породы казахская белоголовая из с. Озерное Саратовской области.

Определение ДНК провируса *BIV* методом классической ПЦР осуществляли по оригинальной методике В.В. Колотвина [2] на оборудовании BioRad (USA) на базе НИЛ «Геном» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. Анализ структуры генома референтного штамма *Bovine immunodeficiency virus* и фрагментов генома *BIV*, размещенных на

web-ресурсе NCBI с целью выявления наиболее консервативного участка, проводили с помощью компьютерных программ BLAST Conserved Domains и Vector NTI 11. Геном вируса в формате FASTA применяли для подбора специфических олигонуклеотидов с помощью компьютерной программы GENERUNR 3.0. Проверку качества и термодинамический анализ выбранных праймеров выполняли с помощью программы OLIGO DNA/RNA primer analysis software, v.5.0. и BLAST.

Компьютерный анализ показал, что ген *gag* является наименее вариабельным для *BIV*. К этому участку были сконструированы специфические олигонуклеотидные праймеры и TaqMan-зонды. При дизайне праймеров и зондов основными требованиями были степень гомологии (комплементарность) с выбранным участком гена; отсутствие самокомплементарных участков внутри олигонуклеотидов и комплементарности друг другу, чтобы не допускать возникновения устойчивых вторичных структур (димеров); близость значений температуры отжига праймеров; выбор температуры отжига зонда на 10 °С выше, чем праймеров. На основании проведенного компьютерного анализа и испытаний *in vitro* были отобраны пара праймеров и зонд, характеристики которых приведены в табл. 1.

Разработанные олигонуклеотиды имеют оптимальные размер и температуру отжига, а также структуру, о чем свидетельствуют показатели энергии Гиббса на 3' конце и 5' конце: -5 и -7 kcal/mol соответственно, энергии Гиббса димерных структур: 0,3 и 2,8 kcal/mol и GC состав: 45,8 и 48 % для Pr F и Pr R.

Состав реакционной смеси подбирали таким образом, чтобы концентрация ионов $MgCl_2$ была в пределах 1,5–2 мМ, что обеспечивает оптимальную скорость и точность работы фермента Taq-полимеразы, концентрация дНТФ – не более 0,4 мМ, концентрация праймеров – 10 пмоль/мкл и объем пробы – 10 мкл. Перед нанесением пробы ДНК во избежание образования неспецифических фрагментов на поверхность смеси вносили 1–2 капли расплавленного воска для ПЦР, чтобы разделить реакционную смесь и исследуемый образец.

Отработку условий ПЦР с использованием разработанных олигонуклеотидов осуществляли на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралия). Температурно-временной режим проведения ПЦР представлен в табл. 2.

Флуоресценцию измеряли по каналу Orange (возбуждение 589 нм, излучение 605 нм) при температуре 55 °С на втором циклировании. При учете результата *threshold* (порог) устанавливали вручную на уровне 30 % от максимального уровня флуоресценции в последнем цикле амплификации. Уровень *threshold* составил 0,05. Положительные пробы ДНК использовали в качестве позитивного контроля при определении чувствительности и специфичности метода. Из очищенных проб ДНК, полученных из лимфоцитов крови КРС, готовили разведения 10^{-3} и 10^{-4} . В разведении 10^{-3} «пороговый цикл» («Ct») составил 18, для 10^{-4} – 25. Специфичность разрабатываемого способа проверя-



Характеристика разработанных олигонуклеотидов

Показатель	Прямой праймер (Pr F)	Обратный праймер (Pr R)	Зонд (Z)
Структура от 5' к 3'	TAGGGTAGTGGG ATCTCAGAAATC	ACATCCGTAACA TCTCCTACCATC	(ROX)GAGGATGGTAGGAGA TGTTACGGAT(BHQ2)
Длина, нуклеотид	24	24	25
Температура отжига, °С	55,0	55,0	65,0
Локализация в геноме, нуклеотид	1380–1403	1516–1539	1513–1537
Длина фрагмента, пара нуклеотидов	160		–

Таблица 2

Температурно-временной режим проведения ПЦР

Этап	Т, °С	Время, с	Количество повторов
Начальная денатурация			
	95	300	1
Циклирование	Денатурация	95	10 циклов
	Отжиг	55	
	Элонгация	72	
Циклирование 2 с детекцией	Денатурация	95	25 или 30 циклов
	Отжиг (детекция)	55	
	Элонгация	72	

ли на гомологичных и гетерологичных образцах: провирусная ДНК *BIV*, *BLV* (вирус энзоотического лейкоза КРС), *FIV* (вирус иммунодефицита кошек), *FeLV* (вирус лейкемии кошек), а также образцах от интактных животных. Положительный результат в ПЦР был получен только с образцом ДНК, содержащими провирус *BIV*, при отсутствии кривой флуоресценции с другими пробами и в отрицательном контроле.

Для определения воспроизводимости разработанного метода были взяты 32 пробы периферической крови от коров (с. Озерное Саратовской области), признанных больными энзоотическим лейкозом на основании серологических и гематологических исследований, так как по литературным данным у таких животных наиболее часто выявляется вирус иммунодефицита КРС [3, 5]. В результате исследования в 10 пробах были получены кривые флуоресценции, пересекающие линию threshold, отсутствие таковой в отрицательном контроле свидетельствует о воспроизводимости результатов проведенных опытов.

Выводы. Разработанный способ диагностики дает возможность количественно выявлять на ранних стадиях высококонсервативную область гена gag вируса иммунодефицита крупного рогатого скота. Применение олигонуклеотидного зонда позволяет повысить чувствительность и специфичность ПЦР, исключить субъективность при оценке результатов. На данный способ получен Патент РФ [4].

Использование предлагаемой модификации ПЦР дает возможность значительно снизить вероятность контаминации образцов, помещения, оборудования и реактивов, а также сократить сроки проведения анализа, что важно как для владельцев животных, так и для ветеринарных специалистов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Изучение влияния FIV- и FELV-инфекции на биометрические характеристики лимфоцитов кошек /

Е.С. Красникова [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 11. – С. 21–24.

2. Колотвин В.В. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота: индикация инфекции и распространенность в хозяйствах Российской Федерации: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2007. – 24 с.

3. Красникова Е.С. Ретроспективный анализ заболеваемости вирусом иммунодефицита крупного рогатого скота // Материалы науч.-практ. конф. 2-й специализированной агропромышленной выставки «САРАТОВ – АГРО». – Саратов, 2011. – С. 34–36.

4. Красникова Е.С., Ларионова О.С., Красников А.В., Утанова Г.Х. Набор для выявления ДНК провируса иммунодефицита крупного рогатого скота, содержащий пару специфичных праймеров и зонд, и способ диагностики вирусного иммунодефицита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Патент 2595373 РФ. 2016. Бюл. № 24.

5. Оценка качества молока, полученного от инфицированных ретровирусами коров, и определение способов его переработки / Е.С. Красникова [и др.] // Научное обозрение. – 2015. – № 17. – С. 10–15.

6. Применение ПЦР для выявления вируса иммунодефицита КРС у животных в крови и пробах мяса / В.Г. Бурба [и др.] // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2009. – № 2. – С. 29–30.

7. Bovine Immunodeficiency virus molecular biology and virus-host interactions / M.A. Gonda et al. // Virus Res., 1994, Vol. 32, P. 155–181.

8. Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls / С.М. Gradil et al. // Vet Microbiol., 1999, Vol. 70(1–2), P. 21–31.

9. DNA cytosine methylation in the Bovine Leukemia Virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line / V. Pierard et al. // J Biol Chem., 2010, No. 285, P. 19434–19449.

10. Mansky L.M. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation // J Gen Virol., 1998, No. 79, P. 1337–1345.



Красникова Екатерина Сергеевна, канд. биол. наук, доцент кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Ларионова Ольга Сергеевна, д-р биол. наук, зав. кафедрой «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Красников Александр Владимирович, канд. вет. наук, доцент кафедры «Болезни животных и ветеринарно-

санитарная экспертиза», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

Утанова Гуля Хайлядиновна, аспирант кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335.
Тел.: (8452) 69-25-32.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; полимеразная цепная реакция; вирус иммунодефицита.

THE DEVELOPMENT OF EFFECTIVE AND HIGHLY SENSITIVE METHOD OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS DETECTION

Krasnikova Ekaterina Sergeevna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the chair «Microbiology, Biotechnology and Chemistry», Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Larionova Olga Sergeevna, Doctor of Biological Sciences, Head of the chair «Microbiology, Biotechnology and Chemistry», Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Krasnikov Alexander Vladimirovich, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the chair «Animal Diseases and Veterinary-sanitary Expertize», Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Utanova Ghulya Khaylyadinovna, Post-graduate Student of the chair «Microbiology, Biotechnology and Chemistry», Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Keywords: cattle; polymerase chain reaction; immunodeficiency virus.

A method of early quantitatively identification of the highly conservative region of the gag gene of bovine immunodeficiency virus was developed. An application of oligonucleotide probe allows increasing the sensitivity and specificity of the method, to eliminate subjectivity in evaluating the results. Using Real-time PCR for BIV detection can significantly decrease the possibility of contamination of specimens, facilities, equipment and reagents, and to reduce the time of analysis. The Patent № 2595373 was obtained in the developed method.

УДК633.112.9:631.811.98

КОМПЛЕКСНЫЕ ВОДОРАСТВОРИМЫЕ УДОБРЕНИЯ, РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ТЕХНОЛОГИИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ ЯРОВОГО ТРИТИКАЛЕ

КШНИКАТКИНА Анна Николаевна, Пензенский государственный аграрный университет

КШНИКАТКИН Сергей Алексеевич, Пензенский государственный аграрный университет

ДЕНИСОВ Константин Евгеньевич, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

ДЕНИСОВ Евгений Петрович, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

ЧЕТВЕРИКОВ Федор Петрович, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

ПОЛЕТАЕВ Илья Сергеевич, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

Представлены результаты полевых исследований эффективности микроудобрений, регуляторов роста и биопрепарата Байкал ЭМ-1 в условиях чернозема выщелоченного Пензенской области. Установлено, что предпосевная обработка семян регуляторами роста, комплексными удобрениями и бактериальными препаратами положительно влияет на формирование агроценоза, продукционный процесс, урожайность и качество зерна ярового тритикале сорта Укро. При некорневой подкормке растений тритикале в фазу колошения наибольшие показатели фотосинтетической деятельности были при использовании микроудобрения Мастер специальный на удобренном фоне: площадь листьев – 33,8 тыс. м²/га, ФП – 1,91 млн м². дн./га, ЧПФ – 3,15 г/м² в сутки. Наиболее высокая урожайность зерна (3,19 т/га) получена при совместном использовании Байкал ЭМ-1 с Мастер специальный, прибавка по отношению к контролю составила 0,67 т/га (26,6 %). При некорневой подкормке наиболее эффективным приемом оказалось применение препарата Мастер специальный на удобренном фоне (Р₆₀К₆₀). При обработке в фазу кущения урожайность (3,13 т/га) по отношению к контролю увеличилась на 16,3 %, колошения (2,89 т/га) – на 7,4 %, молочной спелости (3,05 т/га) – на 13,3 %. Наиболее высокие качественные показатели зерна тритикале отмечали при предпосевной обработке семян совместно препаратами Байкал ЭМ-1 и Поли-Фид и в фазу молочной спелости – водным раствором Мастер специальный.

Яровое тритикале по ряду важнейших показателей, таких как урожайность, качество продукции, высокие кормовые достоинства,

устойчивость к неблагоприятным почвенно-климатическим условиям и болезням превосходит пшеницу, ячмень и овес. Тритикале использу-