

2. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – К.: Наукова Думка, 2007.
3. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наукова думка, 2005.
4. Gonzalez M., Serpa, M. Micropropagation de *Nephrolepis exaltat* L. Hort. Science. 1992;27(6):697.
5. Тахтаджян А.Л. Жизнь растений: Т.5, ч. 1. – М.: "Просвещение". 1981.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962;15:473-497.
7. Papafotiou M., Balotis G., Louka P., Chronopoulos J. In vitro plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2001;65:163–7.
8. Сорока А.В., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И. Влияние генотипа на размножение представителей семейства *Cactaceae* в культуре *in vitro*. Тез. 3-ей международной научной конференции "Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии, Минск, 2008. 549 с.
9. Garcia-Rubio, Malda-Barrera G. Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to Its Natural Habitat. Hort. Science. 2010;45(6):934–8.
10. S. A. de Oliveira, M. de F. Pires da Silva Machado, A. J. Prioli. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). In Vitro Cell Dev Biol – Plant. 1995;31(1):47-50.doi: 10.1007/BF02632226.

References

1. Butenko R.G. Biologiy kletok vusshih rasteniy in vitro I biotekhnologii na ih osnove. – M., 1999.
2. Cherevchenko T.M., Lavrentevna A.N., Ivannikov R.V. Biotechnologiy tropicheskikh I subtropicheskikh rasteniy in vitro. K.:Naukova dumka, 2007.
3. Kushnir G.P. Sarnacka V.V. Mikroklonalne rozmnozheniay roslun.- K.; Naukova dumka, 2005.
4. Gonzalez M., Serpa, M. Micropropagation de *Nephrolepis exaltat* L. Hort. Science. 1992;27(6):697.
5. Tahtadzhayn A.L. Zhizn rasteniy:T.5. №1. – M.: Prosveschenie. 1981.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962;15:473-497.
7. Papafotiou M., Balotis G., Louka P., Chronopoulos J. In vitro plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2001;65:163–7.
8. Soroka A.V., Berdichevac L.G., Fomenko T.I. Vliaynie genotipa na rozmnozhenie predstaviteley semeystva *Cactaceae* v kul'type *in vitro*. Tezu III Mezhdunarodnoy nauchnoy konferencii "Teoreticheskie I prikladnye aspektu biochimii I biotekhnologii, Minsk, 2008.549 p.
9. Garcia-Rubio, Malda-Barrera G. Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to Its Natural Habitat. Hort. Science. 2010;45(6):934–8.
10. S. A. de Oliveira, M. de F. Pires da Silva Machado, A. J. Prioli. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). In Vitro Cell Dev Biol – Plant. 1995;31(1):47-50.doi: 10.1007/BF02632226.

Надійшла до редколегії 10.04.17

В. Маляренко, студ., А. Голубенко, канд. биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка Київ, Україна

ИНИЦИАЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА IN VITRO У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА САСТАСЕАЕ

Целью нашего исследования было подобрать оптимальные питательные среды для инициирования каллусогенеза у некоторых представителей семейства *Cactaceae*. В работе использовали общепринятые методы биотехнологии растений. Первичные экспланты кактусов культивировали на питательной среде Мурашиге и Скуга (МС) с разведенным в два раза содержанием макро- и микроэлементов дополненной витаминами (B6 – 0.5 мг/л, PP – 1 мг/л), мезоинозитом (100 мг/л) и сахарозой (20 г/л). Установлено, что образования первичного каллуса было эффективным при культивировании эксплантов на агаризованной питательной среде с добавлением ½ МС с добавлением 20 г/л сахарозы, в сочетании с 3 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,2 мг/л индол-3-уксусной кислоты, 0,1 мг/л α-нафтилуксусной кислоты и витамина С. Выявлено, что для инициации дедифференциации и каллусогенеза необходимы высокие концентрации цитокининактивных регуляторов роста.

Ключевые слова: *Cereus peruvianus*, *in vitro*, каллус.

V. Maliarenko stud., A. Golubenko PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CALLUS INDUCTION IN VITRO OF CACTACEAE FAMILY

Our research goal has been to find the optimal nutrient media for initiation of the primary callus in the species of the *Cactaceae* family. Common methods of plant biotechnology were used. Primary explants of the cacti were cultivated on Murashige and Skoog medium (MS medium). The content of macro- and microelements has been diluted twice (½ MS) and the vitamins (B1 and B6 – 0.5 mg/l, PP – 1 mg/l) were added, as well as 100 mg/l meso-inositol and 20 g/l of sucrose. It was determined that callus formation formed efficiently when cultivated on half MS media with 20 g/l sucrose, 3 mg/l 6-benzylaminopurine, 0.2 mg/l indole-3-acetic acid, 0.1 mg/l α-naphthaleneacetic acid and 5 mg/l ascorbic acid. It was discovered, that for initiation of tissue differentiation and cacti callus formation, high concentrations of cytokinin-active growth regulators are required.

Key words: *Cereus peruvianus*, *in vitro*, callus.

УДК 578.863.1:578.083.24:578.083.33

О. Кучерявенко, асп., О. Пиріг, канд. с/г наук, Т. Бова, канд. біол. наук
Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, Київ,
О. Тимошенко, канд с/г наук
Чернігівський національний технологічний університет, Чернігів,
І. Будзанівська, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

КОНСТРУЮВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МВК У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

У результаті проведеної роботи отримано специфічні компоненти, які дозволяють сконструювати вітчизняну імуноферментну тест-систему для виявлення МВК, яка є невід'ємною складовою ефективного контролю насінневого матеріалу картоплі на всіх етапах вирощування.

Ключові слова: М-вірус картоплі, антиген, рослини-індикатори, діагностична антисироватка, кон'югат, імуноферментна тест-система.

Вступ. Вірусні хвороби є причиною виродження сортів картоплі, і саме вони є об'єктом найпильнішої уваги картоплярів у світі. Одним з найпоширеніших та шкочинних вірусних патогенів в агроценозах з картоплею є М-вірус картоплі (*Potato virus M*, рід *Carlavirus*, родина *Betaflexiviridae*). За багаторічними даними співробітників лабораторії вірусології Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва

НААН (ІСМАВ НААН) МВК спостерігається як у моноінфекції (36 % досліджуваних зразків), так і у комплексі з іншими мозаїчними вірусами (до 99 %). Крім того, у 20–70 % виявлено безсимптомний перебіг вірусного захворювання [1 – 5]. Тобто вже при вирощуванні насінневого матеріалу складаються передумови економічних збитків у галузі картоплярства. Втрати врожаю від М-вірусної інфекції можуть сягати 41 % [6–8]. Захист рос-

лин від шкодочинної дії MBK передбачає ранню діагностику інфекції, ефективний контроль насінневого матеріалу на всіх етапах вирощування, завчасне прогнозування поширення захворювання, проведення фітовірусологічних прочисток.

Сучасна високочутлива і високоспецифічна лабораторна діагностика вірусних патогенів картоплі на основі методів імуноферментного аналізу (ІФА) набуває все більш реальний і практичний інтерес для виробників насінневої картоплі.

Сьогодні є ряд закордонних компаній ("Bioreba", Швейцарія; "Neogen Europe Ltd.", Шотландія; "SASA", Шотландія; "DSMZ", Австрія; "Loewe", Німеччина; "Agdia", США; "Pocket Diagnostic", Англія; "SEDIAG", Франція), які виробляють комерційні імуноферментні набори для діагностики широкого спектру вірусних патогенів картоплі. Однак вартість імпортованих наборів вкрай висока, що робить їх малодоступними для масового використання вітчизняними виробниками сільськогосподарської продукції.

В результаті гострої нестачі діагностичних тест-систем для виявлення широкого кола фітопатогенів діагностика вірусних інфекцій основних сільськогосподарських культур проводиться значною мірою шляхом візуальної оцінки симптомів захворювання [9].

Тому, метою даної роботи було конструювання вітчизняної імуноферментної тест-системи для виявлення М – вірусу картоплі у рослинному матеріалі.

Матеріали і методи. В дослідженнях використовували колекційний штам MBK-н, який виділено з рослин картоплі сорту Нагорода в лабораторії вірусології Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Накопичення вірусу проводили на тест-рослинах *Lycopersicon esculentum* Mill., які заражали у фазу 3–4-х справжніх листків методом механічної інокуляції з попереднім опудрюванням карбондодом (500–600 меш) [10–12]. Рослини вирощували в умовах вегетаційних приміщень за 20–25 °С і фотоперіоду 16 годин. Інокулюм готували з листків уражених рослин з додаванням 0,01 М фосфатного буферного розчину, рН 7,2–7,5 в пропорції 1:10. Після інокуляції поверхню листків промивали дистильованою водою та розташовували у затемненому місці на 12 – 24 години для того, щоб вони могли краще перенести наслідки травмування при інокуляції. Контролем слугували здорові неінокульовані рослини або рослини, інокульовані буферним розчином. Через 21 день після інфікування рослини томатів перевіряли на наявність MBK, матеріал відбирали із верхнього та середнього ярусів.

Контроль вірусифікованого матеріалу проводили за допомогою електронної мікроскопії нативних препаратів негативно контрастованих 2% розчином фосфорновольфрамової кислоти [13–15].

Підтвердження наявності MBK в рослинному матеріалі проводили за допомогою ЗТ-ПЛР з електрофоретичним методом детекції та використанням специфічних праймерів до ділянки капсидного білка MBK. Отриманий продукт гену капсидного білка MBK візуалізували за допомогою електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію [16–18].

Отримання очищених препаратів MBK для імунізації кролів і подальшого отримання антисироватки проводили з використанням методу осадження 8 % поліетиленгліколем (М 6000) та диференціального центрифугування [19].

Концентрацію вірусного антигену визначали спектрофотометричним методом при довжинах хвиль 260 і 280 нм та розраховували за формулою Калькара: $C = 1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$, де: C – концентрація білка у мг/мл, A_{280} і A_{260} – оптична густина вірусної суспензії у кюветах товщиною 1 см при довжині хвиль 280 нм і 260 нм відповідно.

Чистоту вірусних препаратів визначали за співвідношенням E_{260}/E_{280} . За літературними даними коефіцієнт оптичної щільності E_{260}/E_{280} для MBK становить – 1,2–1,25 [20].

Специфічну до MBK антисироватку одержували імунізацією кролів за схемою трьохкратних ін'єкцій з інтервалом 7 днів, розробленою в лабораторії вірусології ІСМАВ НААН [21]. Для одержання моноклональних антитіл до MBK використовували двох кролів-самців породи Шиншилла віком 5 місяців та вагою 3,5–4 кг, яких утримували на стандартному раціоні в умовах віварію Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Якість антисироватки контролювали в реакції аглютинації та непрямому варіанті твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА) [22].

Виділення імуноглобулінів класу G з сироватки крові кроля проводили в два етапи: висолювання сироватки насиченим розчином сульфату амонію $(NH_4)_2SO_4$ (66%) та використанням іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі.

Елюцію очищених гаммаглобулінів визначали за допомогою спектрофотометрії при довжині хвилі 280 нм. Очищений імуноглобулін одержували у фракціях першого білкового піку. Концентрацію імуноглобулінів доводили до 1 мг/мл по показнику оптичної густини $A_{280} - 1,2$.

Кон'югацію одержаних специфічних антитіл з лузною фосфатазою проводили глутаральдегідним методом [23].

Титр та робоче розведення одержаного кон'югату визначали у сендвіч-варіанті ТІФА [24].

Результати та обговорення. У наших дослідженнях електронно-мікроскопічний аналіз інфікованого рослинного матеріалу, показав присутність у препаратах вірусних часток, відповідних за морфологією і розмірами MBK: довжина – 651 – 661 нм, діаметр 12–15 нм (рис. 1).

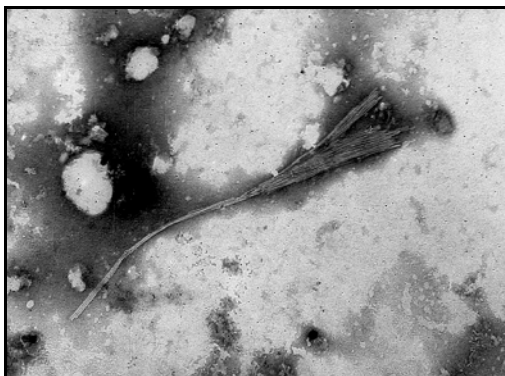


Рис. 1. Електронограма MBK (інструментальне збільшення $\times 20000$)

Методом полімеразно-ланцюгової реакції підтверджено наявність MBK у рослинному матеріалі. Детекція в агарозному гелі показала, що довжина пробігу проду-

кту ПЛР аналізованого зразку співпадала із позитивним контролем MBK, а його розмір становив 300 пар нуклеотидів (рис. 2).

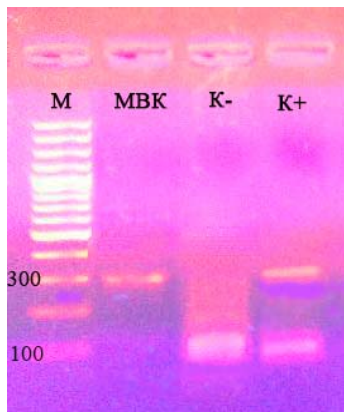


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР при визначенні М-вірусу картоплі:

М – маркери (GeneRuler DNA LadderMix, Fermentas, 100 пн (пар нуклеотидів); MBK – аналізований зразок; K(-) – негативний контроль; K(+)- позитивний контроль

Очищені вірусні препарати MBK були прозорими з легкою опалесценцією, концентрація білка в яких становила 4,0 – 6,0 мг / мл, співвідношення E_{260}/E_{280} дорівнювало – 1,16-1,19 (табл.1)

Таблиця 1. Параметри антигену MBK

Вірусний антиген	Оптична щільність, о.о.		Концентрація АГ, мг/мл	Співвідношення E_{260}/E_{280}
	260 нм	280 нм		
MBK-1	0,870	0,740	4,0	1,17
MBK-2	0,973	0,832	5,6	1,16
MBK-3	1,115	0,933	6,0	1,19

Вірусний антиген використовували для імунізації кролів із застосуванням повного (ПАФ) та неповного (ISA 25) адьювантів. Відбір крові здійснювали через 10 днів після останньої імунізації (табл.2).

Таблиця 2. Схема імунізації

Дні введення АГ	Спосіб введення	Кількість АГ, мл
1 – й	Підшкірно	1,5 АГ + 0,7 ПАФ
7 – й	Внутрішньошкірно	1,5 АГ + 0,7 ISA 25
14 – й	Підшкірно	1,5 АГ + 0,7 ISA 25

Титр одержаної антисироватки крові до MBK становив 1:1024 – 1:4096. Специфічність її підтверджено в реакції з екстрактами із здорових рослин картоплі сорту Жуковський ранній та тютюну, інфікованих ХБК, SBK, MBK, YBK, BTM. Спектрофотометричний аналіз імуноглобулінових фракцій, одержаних з гіперімунної сироватки крові, показав, що отримані препарати Ig G достатньо очищені ($A_{280}/A_{260} \approx 1,2$), тобто виділені специфічні Ig G можуть використовуватись як покривні антитіла для сенсibiliзації планшетів та для кон'югації з лужною фосфатазою. Імуноглобуліни розфасовували по 1 мл у флакони і зберігали при -20°C для виготовлення кон'югату, або консервували гліцеринном у співвідношенні 1:1 (v/v) для покривних антитіл – зберігали при 4°C .

Подальшим етапом нашої роботи було одержання кон'югату з лужною фосфатазою до MBK. Титр та робоче розведення одержаного кон'югату визначали у сендвіч-варіанті ТІФА. Титр кон'югату з лужною фосфатазою становив 1:32, а робоче розведення – 1:16. Позитивним контролем для визначення робочого розведення кон'югату був очищений препарат вірусу, негативним контролем – сік здорових рослин тютюну та картоплі. Позитивна реакція в лунках з антигеном до MBK відрізняється забарвленням реагентів. Значення оптичної густини позитивних контролів MBK в два рази перевищує середнє значення оптичної густини негативних контролів.

Отриманий кон'югат до MBK стабілізували гліцеринном та зберігали при -20°C .

Висновки. Одержано очищений вірусний антиген, специфічні антитіла та кон'югат з лужною фосфатазою, які дозволяють сконструювати вітчизняну імуноферментну тест-систему для виявлення М – вірусу картоплі в рослинному матеріалі.

Список використаної літератури.

- Бова Т.О. Фітовірусологічний моніторинг агроценозів з картоплею Чернігівської області / Бова Т.О., Дмитрук Ю.О., Дмитрук О. О. – Бояны: Місто, 2013. – С. 36–41.
- Коломиець Л.П. Моніторинг вірусних болезней картофеля на Полесьє України / Коломиець Л.П., Лебедь Л.Н., Шевченко Е.П. и др. // Защита растений: сб. научн. тр. РУП "Институт защиты растений" НАН Беларуси – Минск, 2006. – Вып. 30, Ч. 1. – С. 249–251.
- Коломиець Л. П. Вірусні хвороби картоплі / Коломиець Л. П. // Чернігівщина аграрна. – 2007. – № 2(6). – С. 7–9.
- Методи контролю фітовірусологічного стану агроценозів з картоплею та зернобобовими культурами : науково-методичні рекомендації / [уклад.: Т.О. Бова, С.В. Дерев'янка, О.О. Дмитрук, О.В. Пиріг, Ю.О. Дмитрук, О.О. Кучерявенко. – Чернівці, 2015. – 25 с.
- Моніторингові дослідження вірусних хвороб на посадках картоплі Полісся України / Дмитрук О.О., Дмитрук Ю.О., Бова Т.О., Пиріг О.В., Коломиець Л.П. // Сільськогосподарська мікробіологія. – Чернівці: ЦНІІ, 2012. – № 15–16. – С. 140–149.
- Вірусные болезни картофеля на Полесье Украины / Коломиець Л.П. // Агромаркет. – 2005. – № 12. – С. 2–5.
- Анисимов Б. В. "Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Б. В. Анисимов, Г. Л. Белов, Ю. А. Варицев и др. – М.: Картофельевод, 2009. – С. 58 – 67.

8. Карташева И.А. Сельскохозяйственная фитовирусология / И.А. Карташева – М: Колос, 2007. – С. 104–110.
9. Комаров А.Б. Современные диагностические иммуноферментные тест-системы для определения вирусных, бактериальных и грибных патогенов картофеля / А.Б. Комаров, А.Н. Блинцов, С.Н. Еланский // Сборник материалов третьей научно-практической конференции "Генетические и агротехнологические ресурсы повышения качества продовольственного и технического картофеля". – М., 2013. – С. 27–30.
10. Мельничук М. Д. Фітовірусологія / М. Д. Мельничук. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2005. – 200 с.
11. Оверченко В.В. Екологія вірусів / В.В. Оверченко. – К.: Національний університет біоресурсів і природокористування України ННІ рослинництва, екології та біотехнологій, 2013. – 58 с.
12. Гутникова З.И. Растения-индикаторы вирусов растений / З.И. Гутникова, А.В. Крылов. – Владивосток: Биолого-почвенн. ин-т, 1980. – 222 с.
13. Развязкина Г.М. Упрощенный метод обнаружения в электронном микроскопе вирусных частиц из сока растений / Развязкина Г.М., Полякова Г.П., Штейн-Марголина В.А. // Вопросы вирусологии. – 1968. – № 5. – С. 633–934.
14. Щербина Н.В. Метод приготовления препаратов фитопатогенных вирусов для электронной микроскопии / Щербина Н.В., Курбала М. Я., Коломиец Л.П. // V съезд микробиологов Украины. Тез. докл. – К., 1980. – С. 229.
15. Миронов А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. – С-Пб.: Наука, 1994. – 399 с.
16. RNeasy[®]MiniHandbook. Quiagen. – Quiagen. – 2006. – 83 p.
17. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции [Текст] / В.В. Зорина. – М., 2012. – 78 с.
18. Иванова Т. В. Модифікація методу виділення та очищення дволанцюгових РНК вірусів з плодів тил печериці двоспорової / Т. В. Иванова // Агроєкологічний журн. – 2014. – № 2 (42), т.1. – С. 49–54.
19. Метод отримання препаратів М-вірусу картоплі для виробництва діагностичної сироватки / О.Є. Мамчур, О.О. Дмитрук, Л.П. Коломиець // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. – Чернівці, 2005. – Вип. 1–2. – С. 172–178.
20. Лабораторний практикум з загальної фітовірусології: [навч. посібник] / М.Д. Мельничук, В.С. Кожукало, С.О. Смірнова, Г.Г. Мартин. – К.: НАУ, 2002. – 260 с.
21. Волкова І. В. Особливості імуноферментного аналізу рослин картоплі *in vitro* / І. В. Волкова, Л.П. Коломиець // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. – Чернівці: ЦНТЕІ, 2005. – Вип. 1–2. – С. 179–187.
22. Crowther J. R. ELISA. Theory and practice / J. R. Crowther. – N. Y.: Humana Press., 1995. – P. 38–39.
23. Кетти Д. Антитела. Методы / Д. Кетти. – М.: Мир, 1991. – Кн. 2. – 421 с.
24. Clark M. F. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses / M. F. Clark, A. N. Adams. – J. Gen. Virol., 1977, vol. 34, N 3. – P. 475–483.

References

1. Бова Т.О. Фітовірусологічний моніторинг агроценозів з картоплею Чернігівської області / Бова Т.О., Дмитрук Ю.О., Дмитрук О. О. – Бояны: Місто, 2013. – С. 36–41.
2. Коломиец Л.П. Мониторинг вирусных болезней картофеля на Полесье Украины / Коломиец Л.П., Лебедь Л.Н., Шевченко Е.П. и др. // Защита растений: сб. научн. тр. РУП "Институт защиты растений" НАН Беларуси – Минск, 2006. – Вып. 30, Ч. 1. – С. 249–251.
3. Коломиець Л. П. Вірусні хвороби картоплі / Коломиець Л. П. // Чернігівщина аграрна. – 2007. – № 2(6). – С. 7–9.
4. Методи контролю фітовірусологічного стану агроценозів з картоплею та зернобобовими культурами: науково-методичні рекомендації / [уклад.: Т.О. Бова, С.В. Дерев'янка, О.О. Дмитрук, О.В. Пиріг, Ю.О. Дмитрук], О.О. Кучерявенко. – Чернівці, 2015. – 25 с.

О. Кучерявенко, асп., А. Пирог, канд. с/х наук, Т. Бова, канд. биол. наук
Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, Киев, Украина,
Е. Тимошенко, канд. с/х наук
Черниговский национальный технологический университет, Чернигов, Украина,
И. Будзанивская, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МВК В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

В результате проведённой работы получены специфические компоненты, которые позволяют сконструировать отечественную иммуноферментную тест-систему для выявления МВК, которая является неотъемлемой составляющей эффективного контроля семенного материала картофеля на всех этапах выращивания.

Ключевые слова: М-вирус картофеля, антиген, растения-индикаторы, диагностическая антисыворотка, конъюгат, иммуноферментная тест-система.

5. Моніторингові дослідження вірусних хвороб на посадках картоплі Полісся України / Дмитрук Ю.О., Дмитрук Ю.О., Бова Т.О., Пиріг О.В., Коломиець Л.П. // Сільськогосподарська мікробіологія. – Чернівці: ЦНІІ, 2012. – № 15–16. – С. 140–149.
6. Вирусные болезни картофеля на Полесье Украины / Коломиец Л.П. // Агромаркет. – 2005. – № 12. – С. 2–5.
7. Анисимов Б. В. "Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков" / Б. В. Анисимов, Г. Л. Белов, Ю. А. Варицев и др. – М.: Картофельевод, 2009. – С. 58 – 67.
8. Карташева И.А. Сельскохозяйственная фитовирусология / И.А. Карташева – М: Колос, 2007. – С. 104–110.
9. Комаров А.Б. Современные диагностические иммуноферментные тест-системы для определения вирусных, бактериальных и грибных патогенов картофеля / А.Б. Комаров, А.Н. Блинцов, С.Н. Еланский // Сборник материалов третьей научно-практической конференции "Генетические и агротехнологические ресурсы повышения качества продовольственного и технического картофеля". – М., 2013. – С. 27–30.
10. Мельничук М. Д. Фітовірусологія / М. Д. Мельничук. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2005. – 200 с.
11. Оверченко В.В. Екологія вірусів / В.В. Оверченко. – К.: Національний університет біоресурсів і природокористування України ННІ рослинництва, екології та біотехнологій, 2013. – 58 с.
12. Гутникова З.И. Растения-индикаторы вирусов растений / З.И. Гутникова, А.В. Крылов. – Владивосток: Биолого-почвенн. ин-т, 1980. – 222 с.
13. Развязкина Г.М. Упрощенный метод обнаружения в электронном микроскопе вирусных частиц из сока растений / Развязкина Г.М., Полякова Г.П., Штейн-Марголина В.А. // Вопросы вирусологии. – 1968. – № 5. – С. 633–934.
14. Щербина Н.В. Метод приготовления препаратов фитопатогенных вирусов для электронной микроскопии / Щербина Н.В., Курбала М. Я., Коломиец Л.П. // V съезд микробиологов Украины. Тез. докл. – К., 1980. – С. 229.
15. Миронов А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. – С-Пб.: Наука, 1994. – 399 с.
16. RNeasy[®]MiniHandbook. Quiagen. – Quiagen. – 2006. – 83 p.
17. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции [Текст] / В.В. Зорина. – М., 2012. – 78 с.
18. Иванова Т. В. Модифікація методу виділення та очищення дволанцюгових РНК вірусів з плодів тил печериці двоспорової / Т. В. Иванова // Агроєкологічний журн. – 2014. – № 2 (42), т.1. – С. 49–54.
19. Метод отримання препаратів М-вірусу картоплі для виробництва діагностичної сироватки / О.Є. Мамчур, О.О. Дмитрук, Л.П. Коломиець // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. – Чернівці, 2005. – Вип. 1–2. – С. 172–178.
20. Лабораторний практикум з загальної фітовірусології: [навч. посібник] / М.Д. Мельничук, В.С. Кожукало, С.О. Смірнова, Г.Г. Мартин. – К.: НАУ, 2002. – 260 с.
21. Волкова І. В. Особливості імуноферментного аналізу рослин картоплі *in vitro* / І. В. Волкова, Л.П. Коломиець // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. – Чернівці: ЦНТЕІ, 2005. – Вип. 1–2. – С. 179–187.
22. Crowther J. R. ELISA. Theory and practice / J. R. Crowther. – N. Y.: Humana Press., 1995. – P. 38–39.
23. Кетти Д. Антитела. Методы / Д. Кетти. – М.: Мир, 1991. – Кн. 2. – 421 с.
24. Clark M. F. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses / M. F. Clark, A. N. Adams. – J. Gen. Virol., 1977, vol. 34, N 3. – P. 475–483.

Надійшла до редколегії 11.04.17

O. Kucheriavenko, postgraduate, O. Pyrih, Candidate of Agricultural Sciences,
T. Bova, Candidate of Biol. Sciences
Institute of Agricultural Microbiology and Agricultural Production NAAS, Kyiv, Ukraine,
O. Tymoshenko, Candidate of Agricultural Sciences
Chernihiv National University of Technology, Chernihiv, Ukraine,
I. Budzanivska, Doctor of Biol. Sciences
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DESIGNING OF ELISA TEST SYSTEM FOR DETECTING PVM IN PLANT MATERIAL

As a result of the work specific components needed to design a domestic ELISA test system for detecting Potato virus M were produced. The system is an integral part of the effective control of seed potato material at all stages of cultivation.

Keywords: *Potato virus M, antigen, indicator plants, diagnostic antiserum, conjugate, ELISA test system.*

УДК 616.72-002: 577.12

К. Дворченко, д-р біол. наук, М. Ашпін, асп.,
Є. Торгалло, канд. біол. наук, М. Тимошенко, канд. біол. наук, Л. Остапченко, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДІЯ ХОНДРОЇТИН СУЛЬФАТУ НА ГЛУТАТІОНОВУ СИСТЕМУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРИ КАРРАГІНАН-ІНДУКОВАНОМУ ГОСТРОМУ ЗАПАЛЕННІ

Встановлено, що при каррагінан-індукованому запаленні задньої кінцівки у сироватці крові зростає вміст окисненого глутатіону та збільшується глутатіонтрансферазна активність. За тих же експериментальних умов рівень відновленого глутатіону та активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази знижується. Показано, що при сумісному введенні препарату на основі хондроїтин сульфату та каррагінану тваринам вищевказані показники суттєво відновлювались до контрольних значень.

Ключові слова: *гостре запалення кінцівки, хондроїтин сульфат, глутатіонова система, сироватка крові.*

Вступ. На сьогоднішній день захворювання суглобів є однією з актуальних медико-соціальних проблем. Згідно статистичних даних 30% земного населення страждає від хвороб суглобів, які призводять до передчасного обмеження працездатності людей та значного погіршення якості їх життя [5, 11]. Патогенез більшості захворювань суглобів супроводжує запалення, розвиток якого безпосередньо пов'язаний з інтенсифікацією вільнорадикальних процесів [7]. У підтримці окисно-антиоксидантної рівноваги важливу роль виконує глутатіонова система, яка бере участь у метаболічних реакціях, спрямованих на підтримку клітинного гомеостазу та захист від окисного стресу. Тривалі запальні процеси у суглобі здатні призводити до дегенеративних змін хрящової тканини. В зв'язку з цим важливим є пошук препаратів, які б володіли регенераційними та протизапальними властивостями [1]. Виявлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту структурного компоненту хряща – хондроїтин сульфату, який забезпечує його пружність та щільність. Тому дослідження властивостей препаратів на основі хондроїтин сульфату є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів.

В зв'язку з цим, метою роботи було дослідити дію препарату на основі хондроїтин сульфату на стан глутатіонової системи у сироватці крові щурів при каррагінан-індукованому гострому запаленні задньої кінцівки.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі.

Всіх тварин розділяли на три експериментальні групи. Перша група – інтактний контроль. Другій групі тварин моделювали гостре запалення кінцівки щурів шляхом субплантарного введення 0,1 мл 1% розчину каррагінану у задню праву лапу [9]. Третій групі тварин за одну годину до введення каррагінану внутрішньом'язово вводили у терапевтичній дозі 3 мг/кг препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтин сульфат, (об'єм

речовини складав 1 мл/кг). Сироватку крові щурів отримували через 3 години після введення препаратів.

Глутатіонпероксидазну активність (КФ 1.11.1.9) оцінювали за зменшенням вмісту GSH в реакції з реактивом Елмана [2]. Глутатіонтрансферазну активність (КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення кон'югату GSH з 1-хлор-2,4-динітробензолом [2]. Глутатіонредуктазну активність (КФ 1.8.1.7) вимірювали за зменшенням оптичної густини проб в результаті окиснення НАДФН [2]. Вміст відновленого та окисненого глутатіону визначали спектрофлуориметричним методом із використанням ортофталевого альдегіду за різних значень pH середовищ [4, 8].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу.

Результати та їх обговорення. Важливим чинником, від якого залежить концентрація вільних радикалів у крові та тканинах організму є кооперативна робота ферментів антиоксидантної системи, однією із ланок якої є система глутатіону. Глутатіонова антиоксидантна система, яка включає глутатіонпероксидазу, глутатіонтрансферазу, глутатіонредуктазу та глутатіон перешкоджає накопиченню токсичних продуктів вільнорадикального окиснення, відіграє важливу роль в детоксикації, деградації та виведенні із організму чужорідних субстанцій.

Встановлено, що у щурів при гострому запаленні задньої кінцівки, індукованого каррагінаном, у сироватці крові знижується глутатіонпероксидазна активність – в 1,5 раза, глутатіонредуктазна активність – в 1,7 раза, при цьому глутатіонтрансферазна активність зростає в 1,6 раза відносно контролю (табл. 1). За даних експериментальних умов у сироватці крові вміст відновленого глутатіону знижується в 1,6 раза, а рівень окисненого глутатіону зростає в 1,5 раза порівняно з показниками контрольної групи. При введенні препарату "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові спостерігається зростання глутатіонпероксидазної активності – в 1,3 раза, глутатіонредуктазної активності – в 1,4 раза,