

## Список використаної літератури

1. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – М., 1999.
2. Черевченко Т. М. Биотехнология тропических и субтропических растений in vitro / Т. М. Черевченко, А. Н. Лаврентьевна, Р. В. Иванников. – К. : Наук. думка, 2007.
3. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – К. : Наук. думка, 2005.
4. Gonzalez M., Serpa, M. Micropropagation de *Nephrolepis exaltat* L. Hort. Science. 1992;27(6):697.
5. Тахтаджян А. Л. Жизнь растений / А. Л. Тахтаджян. – М. : Просвещение, 1981. – Т. 5, ч. 1.
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. Влияние генотипа на размножение представителей семейства *Cactaceae* в культуре in vitro. Тез. 3-й междунар. науч. конф. "Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии / А. В. Сорока, Л. Г. Бердичевец, Т. И. Фоменко. – 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. Biotekhnologiy 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 исследования было подобрать оптимальные питательные среды для инициирования каллусогенеза у некоторых представителей семейства *Cactaceae*. В работе использованы 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 образование первичного каллуса было эффективным при культивировании эксплантов на агаризованной питательной среде с добавлением ½ МС и 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 pervianus*, 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 cytokinine-active growth regulators are required.

Key words: *Cereus pervianus*, 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

Отримано специфічні компоненти, що дозволяють сконструювати вітчизняну імуноферментну тест-систему для виявлення МВК, яка є невід'ємною складовою ефективного контролю насіннєвого 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 виробни-

цтва НААН (ICMAV 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 насіннєвого матеріалу складаються передумови економічних збитків у галузі картоплярства. Втрати врожаю від М-вірусної інфекції можуть сягати 41 % [6–8]. Захист

рослин від шкодочинної дії MBK передбачає ранню діагностику інфекції, ефективний контроль насінневого матеріалу на всіх етапах вирощування, завчасне прогнозування поширення захворювання, проведення фітотвірусологічних 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 рослини 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 трьох – чотирьох справжніх листків методом механічної інокуляції з попереднім опудрюванням карборундом (500–600 меш) [10–12]. Рослини вирощували в умовах вегетаційних приміщень за 20–25 °С і фотоперіоду 16 год. Інокулюм готували з листків уражених рослин з додаванням 0,01 М фосфатного буферного розчину, рН 7,2–7,5 у пропорції 1:10. Після інокуляції поверхню листків промивали дистильованою водою та розташовували у затемненому місці на 12–24 год для того, щоб вони могли краще перенести наслідки травмування при інокуляції. Контролем служили 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 вірусинфікованого 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 із 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 сандвіч-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).

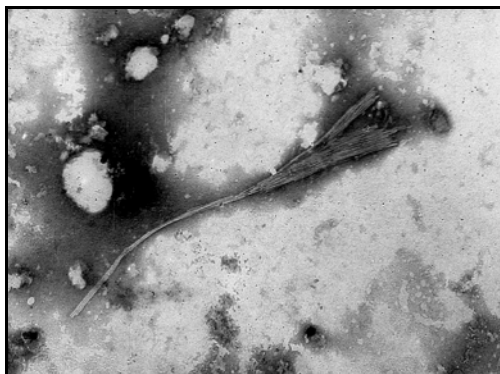


Рис. 1. Електроннограма MBK (інструментальне збільшення  $\times 20000$ )

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).

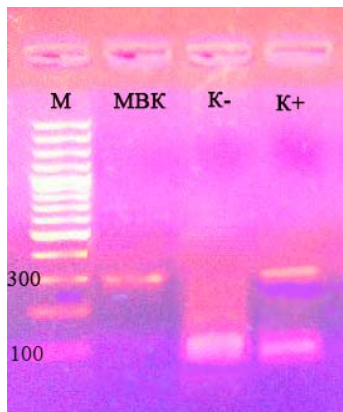


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР при визначенні М-вірусу картоплі:

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  $-20^{\circ}\text{C}$  для виготовлення кон'югату, або консервували гліцеринном у співвідношенні 1:1 (v/v) для покривних антитіл – зберігали при  $4^{\circ}\text{C}$ .

Подальшим етапом нашої роботи було одержання кон'югату з лужною фосфатазою до MBK. Титр та робоче розведення одержаного кон'югату визначали у сандвіч-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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**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 / Т. О. Бова, Ю. О. Дмитрук, О. О. Дмитрук. – Бояни : Місто, 2013. – С. 36–41.
- Моніторинг вірусних болезней картофеля на Полесье України / Л. П. Коломиец, Л. Н. Лебедь, Е. П. Шевченко и др. // Защита растений : сб. научн. тр. РУП "Институт защиты растений" НАН Беларуси. – Минск, 2006. – Вып. 30, ч. 1. – С. 249–251.
- Коломиец Л. П. Вірусні хвороби картоплі / Л. П. Коломиец // Чернігівщина аграрна. – 2007. – № 2(6). – С. 7–9.
- Методи контролю фітовірусологічного стану агроценозів з картоплею та зернобобовими культурами : наук.-метод. рекомендації / уклад. : Т. О. Бова, С. В. Дерев'янка, О. О. Дмитрук та ін. – Чернігів, 2015. – 25 с.
- Моніторингові дослідження вірусних хвороб на посадках картоплі Полісся України / О. О. Дмитрук, Ю. О. Дмитрук, Т. О. Бова та ін. // С.-г. мікробіологія. – Чернігів : ЦНІІ, 2012. – № 15–16. – С. 140–149.
- Коломиец Л. П. Вирусные болезни картофеля на Полесье Украины / Л. П. Коломиец // Агромаркет. – 2005. – № 12. – С. 2–5.
- Анисимов Б. В. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Б. В. Анисимов, Г. Л. Белов, Ю. А. Варецков и др. – М. : Картофелевод, 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 // Сб. матер. третьей науч.-практ. конф. "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. : Нац. ун-т 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 / Г. М. Развязкина, Г. П. Полякова, В. А. Штейн-Марголина // Вопросы вирусологии. – 1968. – № 5. – С. 633–934.
14. Щербина Н. В. Метод приготовления препаратов фитопатогенных вирусов для электронной микроскопии / Н. В. Щербина, М. Я. Курбала, Л. П. Коломиец // V съезд микробиологов Украины : тез. докл. – К., 1980. – С. 229.
15. Миронов А. А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / А. А. Миронов, Я. Ю. Комиссарчик, В. А. Миронов. – СПб. : Наука, 1994. – 399 с.
16. RNeasy<sup>®</sup>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 // Агроекологічний 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. – Чернігів, 2005. – Вип. 1–2. – С. 172–178.
20. Лабораторний практикум із загальної фітовірусології : навч. посіб. / 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 // С.-г. мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів : 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. Bova T.A. Fytovirusological monitoring of agroecosystems with potatoes of the Chernigov region / Bova T.A., Dmytruk Yu.A., Dmitruk AA – Boyany City, 2013. – P. 36–41.
2. Kolomiets L.P. Monitoring of viral diseases of potatoes on Polesye Ukraine / Kolomiets L.P., Lebed L.I., Shevchenko E.P., etc. // Plant Protection: Sat. Scientific Tr RUP "Institute of Plant Protection", National Academy of Sciences of Belarus – Minsk, 2006. – Issue. 30. Ch.1 – pp. 249–251.
3. Kolomiets L.P. Viral diseases of potatoes / Kolomiets L.P. // Chernigov oblast Agrarian – 2007. – No. 2 (6). – P. 7–9.
4. Methods of control of the phytovirusological condition of agroecosystems with potatoes and leguminous cultures: scientific and methodological recommendations / [method.: T.A. Bova SV Derevyanko, AA Dmitruk, AV Pirog, Yu.A. Dmitruk, AA Kucherivenko – Chernigov, 2015. – 25 p.

5. Monitoring studies of viral diseases in potato planting of Polesye Ukraine / Dmitruk AA, Dmitruk Yu.A., Bova T.A., Pirog AV, Kolomiets LP // Agricultural Microbiology. – Chernihiv: Central Scientific Research Institute, 2012. – No. 15–16. – P. 140–149.
6. Virus diseases of potatoes on Polesye Ukraine / Kolomiets L.P. // Agromarket – 2005. – No. 12. – S. 2–5.
7. Anisimov B.V. "Protection of potato from diseases, pests and weeds / BV Anisimov, G. L. Belov, Yu. A. Varitsev and others – M. : potatoes, 2009. – S. 58 – 67.
8. Kartacheva I.A. Agricultural phytovirusology / I.A. Kartasheva – M: Kolos, 2007. – P. 104–110.
9. Komarov AB Modern diagnostic immunoassay test systems for the detection of viral, bacterial and fungal pathogens of potatoes / A. B. Komarov, A.N. Blintsov, S.N. Elansky // A collection of materials of the third scientific-practical conference "Genetic and agrotechnological resources for improving the quality of food And technical potatoes ". – M., 2013. – P. 27–30.
10. Melnichuk N.D., phytovirusology / N.D. Melnychuk. – M. : Polygraf-konsalting, 2005. – 200 p.
11. Overchenko V.V. Virus Ecology / VV Overcho – K National University of Biosources and Nature Management of Ukraine UNI Plant Production, Ecology and Biotechnology, 2013. – 58 p.
12. Gutnikova Z.Y. Plants Indicators of Plant Viruses / Z.Y. Gutnikova, AV Krylov – Vladivostok: Biological and Soil. Inst., 1980. – 222 p.
13. Ryazyzkina M. Simplified method of detecting virus particles from juice of plants in an electron microscope / Razvyazkina M., Polyakova G.P., Stein-Margolina V.A. // Questions of virology. – 1968. – No. 5. – P. 633–934.
14. Shcherbina N.V. Method of preparation of preparations of phytopathogenic viruses for electron microscopy / Shcherbina NV, Kurbal M.Ya., Kolomiets L.P. // V Congress of Microbiologists of Ukraine. Tez Doc. – M., 1980. – P. 229.
15. Mironov AA Methods of electron microscopy in biology and medicine / Mironov AA, Komissarchik Ya.Yu., Mironov VA – C-Pb Science, 1994. – 399 p.
16. RNeasyRMiniHandbook. Quiagen. – Quiagen. – 2006 – 83 p.
17. Zorina V.V. Fundamentals of Polymerase Chain Reaction [Text] / VV Zorin – M., 2012. – 78 p.
18. Ivanova T.V. Modification of the method of isolation and purification of two-chain RNA viruses from the fetal bodies of bismuth bell peppers / T. Ivanov // Agroecological Journ – 2014 – No. 2 (42), t.1. – P. 49–54.
19. Method of preparation of preparations of M-virus of potato for production of diagnostic serum / E.E. Mamchur, AA Dmitruk, LP Kolomiets // Agricultural Microbiology: Intercity. Thematic Sciences Sat – Chernigov, 2005. – Issue 1–2. – P. 172–178.
20. Laboratory workshop on general phyturinism: [study. Allowance] / ND Melnichuk, B.C. Kozhukalo, SA Smirnov, G. Martin. – Moscow: NAU, 2002. – 260 p.
21. Volkova IV Features of immuno-enzymatic analysis of potato plants in vitro / V. Volkova, L.P. Kolomiets // Agricultural Microbiology: Interdistrict. Thematic Sciences Sat – Chernigov: CSTEI, 2005. – Issue. 1–2. – P. 179–187.
22. Crowther J. R. ELISA. Theory and practice / J. R. Crowther. – N. Y. : Humana Press., 1995. – P. 38–39.
23. Ketty D. Antibodies. Methods / D. Ketty. – M. : Mir, 1991. – Кн. 2. – 421 pp.
24. Clark M. F. Characteristics of the microplate methods of the enzyme-linked immunosorbent assay for 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

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 ОБНАРУЖЕНИЯ МВК В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Получены специфические компоненты, которые позволяют сконструировать отечественную иммуноферментную тест-систему для обнаружения 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.

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 В СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРИ КАРРАГІНАН-ІНДУКОВАНОМУ ГОСТРОМУ ЗАПАЛЕННІ

*Установлено, що при каррагінан-індукованому запаленні задньої кінцівки в сироватці крові зростає вміст окисненого глутатіону та збільшується глутатіонтрансферазна активність. За тих самих експериментальних умов рівень відновленого глутатіону й активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази знижується. Показано, що при сумісному введенні препарату на основі хондроїтин сульфату та каррагінану тваринам зазначені показники суттєво відновлюються 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 зі статистичними даними 30 % земного населення страждає від хвороб суглобів, які призводять до передчасного обмеження працездатності людей та значного погіршення якості їхнього 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. У 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.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідити дію препарату на основі хондроїтин сульфату на стан глутатіонової системи в 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 р.), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі.

Усіх 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 в задню праву лапу [9]. Третій групі тварин за одну годину до введення каррагінану внутрішньом'язово вводили в терапевтичній дозі 3 мг/кг препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтин суль-

фат, (об'єм речовини становив 1 мл/кг). Сироватку крові щурів отримували через 3 год після введення препаратів.

Глутатіонпероксидазну активність (КФ 1.11.1.9) оцінювали за зменшенням вмісту GSH у реакції з реактивом Елмана [2]. Глутатіонтрансферазну активність (КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення кон'югату GSH із 1-хлор-2,4-динітробензолом [2]. Глутатіонредуктазну активність (КФ 1.8.1.7) вимірювали за зменшенням оптичної густини проб у результаті окиснення НАДФН [2]. Вміст відновленого та окисненого глутатіону визначали спектрофлюориметричним 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.

Установлено, що в щурів при гострому запаленні задньої кінцівки, індукованому каррагінаном, у сироватці крові знижується глутатіонпероксидазна активність у 1,5 раза, глутатіонредуктазна активність – у 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, при цьому