

05(К УН)  
Вісн



ISSN 1728-3817 (загальний)

ISSN 1728-2748 (серійний)



# ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

## БІОЛОГІЯ

44  
—  
2005



Черговий номер вісника присвячено вірусологічній тематиці. У ньому вміщено кращі наукові роботи, які було представлено на 4-й Міжнародній конференції "Біоресурси і віруси", що проходила 27–30 вересня 2004 р. на базі Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Розглянуто сучасні високоточні методи діагностики вірусних інфекцій, механізми взаємодії вірусів з навколишнім середовищем, проблеми епідеміології вірусних інфекцій.

Викладено нові погляди на розробку вакцин до ротавірусів, висвітлено сучасні досягнення в діагностиці цитомегаловірусної інфекції, питання насіннєвих вірусних інфекцій, контамінації молочниківих бактерій бактеріофагами, біотехнологічні прийоми захисту та лікування рослин від вірусної інфекції, вплив важких металів на розвиток вірусної інфекції та багато інших питань.

**Upcoming number of bulletin is dedicated to virology. It's a collection of the best works that were being presented during 4th International conference "Bioresources and viruses" which took place on September 26-30 2004 with support of Kyiv National University of Taras Shevchenko. These works are concentrated on questions of high-precision diagnostic methods of viral infections, interaction of viruses with the environment, epidemiological problems of viral infections.**

**Among the main reported highlights are: the new look at rotaviral vaccine processing, modern achievements in diagnostics of cytomegaloviral infection, a range of important questions which concern seed viral infections, phagal contamination of milk bacteria, biotechnological approaches to the treatment of plant virus infections, influence of heavy metals on viral infections development and many others.**

**ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР****РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ****Адреса редколегії****Затверджено****Атестовано****Зареєстровано****Засновник та видавець****Адреса видавця**

Наукова бібліотека  
ім. М. Максимовича  
**КНУ**

ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА



**2827JB**

45 - чит. зал. періодики та дисертацій

Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.

М.Є. Кучеренко, д-р біол. наук, проф., акад. НАН України;  
Т.Л. Проценко, канд. біол. наук (відп. секр.); І.В. Якубцова (техн. секр.);  
В.М. Войціцький, д-р біол. наук, проф.; С.В. Демидов, д-р біол. наук,  
проф.; М.Е. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; М.С. Мірошниченко,  
д-р біол. наук, проф.; М.М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., чл.-кор.  
УААН; В.К. Позур, д-р біол. наук, проф.; І.Ю. Костіков, д-р біол. наук,  
доц.; В.В. Серебряков, д-р біол. наук, проф.; М.Ю. Макарчук, д-р бі-  
ол. наук, проф.; В.П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.

01033, м. Київ-33, проспект акад. Глушкова, 2, корп. 12, Київський на-  
ціональний університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет  
**телефон** (38044) 266-9367

**Вченю радою біологічного факультету**  
17 січня 2005 року (протокол № 8)

**Вищою атестаційною комісією України.**  
Постанова Президії ВАК України  
№ 1-05/7 від 9.06.99

**Міністерством інформації України.**  
Свідоцтво про Державну реєстрацію КІ № 251 від 31.10.97

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка,**  
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"  
Свідоцтво внесено до Державного реєстру  
ДК № 1103 від 31.10.02

01030, Київ-30, б-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43  
**телефон** (38044) 239-3172, 239-3222; факс 234-0105

## ЗМІСТ

Абдуллаєва М.В., Фролов А.Ф., Федорова Н.Є., Меджидова М.Г., Адуєва С.М., Дегтярьова М.В., Воронцова Ю.Н., Алямовська Г.А., Кешищан Е.С., Кущ А.А.	
Лабораторна діагностика цитомегаловірусної інфекції в дітей раннього віку: порівняльний аналіз ефективності серологічного та швидкого культурального методів і полімеразної ланцюгової реакції	4
Білотка К.М., Трохименко О.П., Дзюблік І.В., Коршун Л.М., Салюк А.І.	
Культивування ротавірусів на полімерних носіях при одержанні культуральної інактивованої протиротавірусної вакцини	6
Богунов Ю.В., Гнотова Р.В.	
Генетична мінливість російських далекосхідних ізолятів вірусу мозаїки цвітної капусти	10
Гвоздяк Р.І., Ващенко Л.М., Кириченко А.М., Баркалова А.О., Коваленко О.Г., Мохунь Т.В., Лигирда Б.Ф.	
Вплив бактеріальної та вірусної інфекції на реакцію надчутливості в рослинах тютюну	13
Камзел О.А., Шевченко О.В., Будзанівська І.Г	
Підвищення вмісту X-вірусу картоплі в рослинах <i>Solanum tuberosum</i> при вирощуванні на ґрунті, контамінованому важкими металами	15
Коломієць Л.П.	
Контроль фітопатогенних вірусів в агрокосистемах України	16
Компанець Т.А.	
Вірусні хвороби гербери та біотехнологічне отримання її безвірусного посадкового матеріалу	18
Коваленко О.Г., Шепелевич В.В., Телегесева Т.А.	
Виявлення глікокон'югатів, специфічних до конканаваліну А, в апогласті листя тютюну, здорового та ураженого вірусом бронзовості томатів	20
Латушкіна Т.М., Бугасенко Л.О., Шевченко О.В., Поліщук В.П.	
Біотехнологічні прийоми оздоровлення посадкового матеріалу лаванди	21
Мандріка Т.Ю., Жолобак Н.М., Олевинська З.М., Діденко Л.Ф., Слівак Н.Я.	
Нейтралізуюча активність антитіл до рослинного рабдовірусу кучерявої карликовості картоплі, щодо зоорабдовірусної інфекції на моделі вірусу везикулярного стоматиту в умовах <i>in vitro</i>	23
Можасєва К.А., Кастальєва Т.Б., Гірсова Н.В.	
Шкідливість і збереження інфекційності віроїду веретеноподібності бульб картоплі	25
Можасєва К.А., Кастальєва Т.Б., Гірсова Н.В.	
Штамовий склад вірусу жовтої карликовості ячменя в основних регіонах Азіатської частини Росії	27
Петренко О.М., Демчук І.В., Зарицький М.М.	
Оздоровлення сортів картоплі з використанням синтетичних речовин, похідних імідазотриазолу	28
Постоєнко О.М., Сенчугова Н.А.	
Моніторинг вірусних хвороб цукрових буряків	31
Ромашев С.А., Семчук Л.І., Андрійчук О.М., Ігнатенко Т.О., Яцковська Л.І., Колонюк І.О.	
Дослідження фагів фітопатогенних бактерій та їхнього впливу при внесенні на експериментальні ділянки з посівами цукрового буряку	33
Шевченко Т.П., Бойко А.П., Кондратюк О.А., Орловська Г.М., Свиридовська Л.В., Петренко С.М., Назаренко Г.А.	
Насіннєві вірусні інфекції соняшнику різних сортів	34
Шугай М.О., Шевченко Т.П., Бойко А.П.	
Серологічні властивості фагів молочнокислих бактерій	36
Товкач Ф.І., Балко О.Б.	
Структурно-морфологічна організація базальних пластинок дефектних помірних бактеріофагів <i>Erwinia carotovora</i>	38
Степанова О.А.	
Вірусна патологія ссавців, що живуть у неволі в бухтах Севастополя	39
Тимошок Н.О., Олевинська З.М., Косенко Л.В., Слівак М.Я.	
Індукція цитокінів рослинними препаратами	41
Трохименко О.П., Дзюблік І.В., Білотка К.М.	
Застосування імунопотенціюючих компонентів для ротавірусних антигенів – новий крок до створення високоімуногеної інактивованої протиротавірусної вакцини	43
Вергун Л.Ю., Пейсак З., Собко Ю.А., Шиков О.Т.	
Антитіла до вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней у сироватках свиней	45
Волкова І.В., Зарицький М.М.	
Конструювання імуноферментних тест-систем для діагностики X-вірусу картоплі з використанням нових імунореагентів	46
Бучацький Л.П., Щербик В.В.	
Роль субчастинок рибосоми в утворенні поля зв'язності амінокислот генетичного коду	48
Жунько І.Д., Ліманська Н.В., Мілкус Б.Н., Конуп Л.О.	
Діагностика вірусу мармуровості винограду за допомогою полімеразної ланцюгової реакції	49
Харіна А.В., Корнійчук І.В., Бисова М.Є., Кокозей В.М., Нестерова О.В.,	
Дослідження антивірусної активності гетерополіядерних координаційних сполук перехідних металів на різних рівнях взаємодії вірус-рослина	51
Сизов Д.В., Поліщук В.П.	
Кристалізація та попередній рентгеноструктурний аналіз трансактиваційного домену білка E2 віrusu папіломи великої рогатої худоби типу 1 (ВПВРХ-1)	53

---

**CONTENTS**

---

<b>Abdullaeva M., Frolov A., Fedorova N., Medgidova M., Adueva C., Degtyareva M., Voroncova Y., Alyamovskaya G., Keshischian E., Kushch A.</b>	
Laboratory diagnostics of cytomegalovirus infection in newborns and infants: comparative analysis of efficiency of serological, rapid culture methods and polymerase chain reaction .....	4
<b>Bilotkach K., Trokchimenko O., Dzyublik I., Korschun L., Saliyk A.</b>	
Rotaviruses cultivation on the polyethylene ribbons for an antirotaviral vaccine production.	
Genetic diversity of natural field populations of CaMV in the Russia by PCR-RFLP analysis of ORF VI .....	6
<b>Bogynov Yu., Gnutova R.V</b>	
Genetic diversity of natural field populations of CaMV in the Russia by PCR-RFLP analysis of ORF VI .....	10
<b>Gvozdyak R., Vashchenko L., Kirichenko A., Barkalova A., Kovalenko O., Mohun T., Ligirda B.</b>	
The effect of bacterial and viral infection on hypersensitive reaction in tobacco plants .....	13
<b>Kamzel O., Shevchenko O., Budzanivska I.</b>	
Increase of potato X-virus content in Solanum tuberosum plants grown on heavy metal-contaminated soil .....	15
<b>Kolomiyetz L.P</b>	
Control of phytopathogenic viruses in agroecosystems of Ukraine .....	16
<b>Kompanets T.A</b>	
Virus diseases of the gerbera and biotechnological obtaining of virus-free planting material .....	18
<b>Kovalenko O., Shepelevich V., Telegeeva T.</b>	
Detection of glicoconjugates, specific to concanavalin A, in appoplast of healthy tobacco leaves and infected by tomato spotted wilt virus .....	20
<b>Latushkina T., Bugaenko L., Shevchenko A., Polischuk V.</b>	
Biotechnological methods of producing of lavender virus-free planting material .....	21
<b>Mandrika T., Zholobak N., Olewinskaya Z., Didenko L., Spivak N.</b>	
Neutralizing activity of antibodies to a vegetative rhabdovirus curly potato dwarf virus, of zoorhabdovirus infectious on model of vesicular stomatitis virus on condition in vitro .....	23
<b>Mozhaeva K., Kastalyeva T., Girsova N.</b>	
Harmfulness and survival of potato spindle tuber viroid .....	25
<b>Mozhaeva K., Kastalyeva T., Girsova N.</b>	
Incidence of Barley Yellow Dwarf Disease in Asiatic Russia .....	27
<b>Petrenko O., Demchuk I., Zaritsky M.</b>	
Using compounds of imidazotriazol in antiviral therapy of potato cultivars .....	28
<b>Postoenko O., Senshugova N.</b>	
Monitoring of viral sugar beet diseases .....	31
<b>Romashev S., Semchuk L., Andriychuk O., Ignatenko T., Yatskovskaya L., Kolonuk I.</b>	
Research of phages of phytopathogenic bacteria and their influence at depositing on experimental fields with sowings of sugar-beet .....	33
<b>Boyko A., Kondratyuk O., Shevchenko T., Orlovska G., Svyrydovska L., Petrenko S., Nazarenko G.</b>	
Seed-borne virus infections of various cultivars of sunflower .....	34
<b>Shugay M., Shevtshenko T., Boyko A.</b>	
Serological characteristics of lactic acid bacteria phages .....	36
<b>Tovkach F., Balko O.</b>	
Structural and morphological organization of basal plates of deficient bacteriophages of <i>Erwinia carotovora</i> .....	38
<b>Stepanova O.</b>	
Viral pathology of mammals, living in captivity in bays of Sevastopol .....	39
<b>Tymoshok N., Olevinska Z., Kosenko L., Spivak N.</b>	
Cytokine induction by plants preparations .....	41
<b>Trokhymenko O., Dzyublyk I., Bilotkach K.</b>	
immunogenic inactivated anti-rotavirus vaccine Application of immunopotentiating components for rotavirus antigens – a new step towards creating the highly .....	43
<b>Vergun L., Pejsak Z., Sobko Yu., Shikov A.</b>	
Anti-PRRSV antibodies in pigs serum .....	45
<b>Volkova I., Zaritsky M.</b>	
Construction of immunoenzyme test-system for the detection of potato X-virus with using of new immunoreagents .....	46
Buchatsky L.P., Scherbic V.V.	
The role of ribosomal subparticles in formation of the connection field of aminoacids of genetic code .....	48
<b>Zhunko I., Limanskaya N., Milkus B., Konul L.</b>	
Diagnostic of virus of marble vine grape disease using polymerase chain reaction .....	49
<b>Kharina A., Korniychuk I., Bisova M., Kokozay V., Nesterova O.</b>	
An investigation of antiviral activity of heteropolynuclear coordination compounds of transition metals on different levels plant-virus relationships .....	51
<b>Sizov D., Polischuk V.</b>	
Crystallization and preliminary X-ray analysis of the E2 transactivation domain from bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) .....	53

## ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ЦИТОМЕГАЛОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ В ДІТЕЙ РАНЬОГО ВІКУ: ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ СЕРОЛОГІЧНОГО ТА ШВІДКОГО КУЛЬТУРАЛЬНОГО МЕТОДІВ І ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Обстежено 50 дітей у віці від одного дня до одного року, яких було розділено на дві групи: 23 із клінічними ознаками ЦМВІ (1-ша група), 27 – без специфічних ознак ЦМВІ (2-га група). Для діагностики ЦМВІ використано методи: тіФА для виявлення анти-ЦМВ IgM та IgG; швидкий культуральний метод (ШКМ) та ПЛР. Отримано дані, що вказують на високу ефективність ШКМ при діагностичі ЦМВІ.

*Fifty children aging 1-st day till 1-st year were investigated. The infants were divided into two groups: with (n=23, group I) and without (n=27, group II) specific clinical symptoms of CMV. The following methods were used for CMV diagnostics: solid-phase immunoenzyme assay (EIA) for detection of IgM and IgG anti-CMV antibodies, rapid culture method (RCM) for revealing the infectious active virus (IAV) and PCR for detection of CMV DNA. The data obtained demonstrate the high efficiency of RCM for diagnostics of CMV.*

Вступ. Цитомегаловірусна інфекція (ЦМВІ) – це одна з досить поширених перинатальних інфекцій у немовлят і дітей раннього віку. Особливу небезпеку становить генералізована ЦМВІ, яка може порушувати постнатальний розвиток інфікованої дитини, вражати внутрішні органи й нерідко закінчується смертю дитини.

Згідно з опублікованими даними, у 0,5–5 % немовлят виявляють вроджену цитомегаловірусну інфекцію, та 10 % ЦМВ-інфікованих дітей мають виражену клінічну симптоматику [1, 2]. Вроджена ЦМВІ часто носить генералізований характер, перебіг якої відбувається з переважним враженням центральної нервової системи, шлунково-кишкового тракту, нирок і легенів. Численні дослідження підтверджують, що серед усіх відомих внутрішньоутробних інфекцій саме ЦМВІ є визначальною причиною враження головного мозку і втрати слуху у немовлят [3]. Крім цього, ЦМВ, що має тропність до різних клітин людини, в тому числі й до клітин імунної системи, за тривалої персистенції в організмі може впливати на усі ланки імунної системи, провокуючи імунодефіцитний стан [4]. Внутрішньоутробне інфікування плоду частіше відбувається за первинного інфікування жінок у першому триместрі вагітності, в цьому разі передача віrusу відбувається більш ніж у 50 % випадків [1]. За реактивації вторинної ЦМВІ в період вагітності частота передачі віrusу становить менше 2 % [5].

Діагностика ЦМВІ у новонароджених дітей часто є складним завданням через відсутність специфічної клінічної симптоматики й у зв'язку з особливостями імунної системи немовляти. Так, встановлено, що при діагностиці неонатальної ЦМВІ визначення специфічних IgM дає близько 50 % хибно-негативних результатів [6].

На даний час найбільш чутливим методом діагностики вважається визначення ДНК ЦМВ за допомогою ПЛР. Однак за його допомогою не завжди вдається диференціювати форму ЦМВІ, тому що високочутлива ПЛР визначає й ДНК віrusу, що перебуває у латентному стані. За даними різних дослідників, тільки у 40–65 % пацієнтів, в яких методом ПЛР виявляється ДНК віrusу, згодом визначається характерна клінічна симптоматика ЦМВІ. На думку деяких дослідників, тільки негативний результат ПЛР має діагностичне значення [2].

У зарубіжних країнах значного поширення набула модифікація культурального методу, так званий "shell via!", або швидкий культуральний метод (ШКМ), який включає співкультурування клінічних зразків і клітин культури з наступним виявленням віrusних білків у заражених клітинах за допомогою моноклональних антитіл (МКА). Згідно з даними зарубіжних дослідників [7], цей метод має як високу специфічність, так і високу

прогностичну значимість, які становлять 100 % і 94 %, відповідно. До того ж істотно скорочуються терміни отримання результату – з 10–20 днів при використанні звичайного стандартного культурального методу до 24–72 год, за що метод одержав назву швидкий культуральний (ШКМ).

Незважаючи на поширеність ЦМВІ, до теперішнього часу чітких і загальноприйнятих рекомендацій щодо лабораторного обстеження новонароджених дітей із підоюзом на ЦМВІ не розроблено.

Мета роботи полягає у комплексному обстеженні дітей раннього віку з підоюзом на ЦМВІ і в оцінці ефективності методів лабораторної діагностики даної інфекції.

**Об'єкт і методи дослідження.** Обстежено 50 дітей у віці від одного дня до одного року життя, що перебували на лікуванні в дитячій міській клінічній лікарні №13 ім. Н.Ф. Філатова (м. Москва) й у Центрі корекції розвитку дітей раннього віку Московського НДІ педіатрії й дитячої хірургії МОЗ РФ у 2001–2004 рр.

За допомогою БКМ виявляли присутність інфекційно-активного ЦМВ у крові дітей. Для цього фібробласти легень ембріона людини вирощували на 24-лункових панелях упродовж двох діб до досягнення повного моношару, потім на 1–2 год на лунки вносили по 200 мкл лімфоцитарної фракції крові, отриманої після центрифугування у градієнта Фіколл-Пака. Клітини відмивали та інкубували протягом 24–72 год у культуральному середовищі за температури 37°C в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub>. Далі у клітинах виявляли антигени ЦМВ методом імуноцитохімічного фарбування. Для цього моношар клітин промивали фосфатно-солевим буфером (ФСБ) (0,1 моль/л, pH 7,4). Потім клітини фіксували абсолютном метанолом протягом 10 хв за температури –20°C. Після промивання на препарати наносили суміш очищених моноклональних антитіл (МКА), специфічних до надраннього (IEp72) і раннього (pp65) білків віrusу, та інкубували протягом 1 год за 37°C [7, 8]. Як індикаторні антитіла використовували кролячі антимишині імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою хрону (DakoCytomation, Данія). Для проявлення реакції на клітини наносили субстрат DAB (Biosciences, США). Препарати переглядали за допомогою інвертованого мікроскопа Leitz Labovet, використовуючи об'єктиви 20x, 40x і 100x.

Визначення специфічних АТ класів M і G у сироватках крові проводили методом тіФА за допомогою тест-систем "Enzygnost Anti-CMV Ig" та "Enzygnost Anti-CMV Ig" фірми Behring (Німеччина). Оцінку результатів проводили відповідно до рекомендацій фірми-виробника.

ДНК ЦМВ у зразках крові дітей виявляли за допомогою реактивів набору ЦИТОПОЛ (ТУ-9398-428-17253567-01) виробництва ТОВ НПФ "Літекс" (Москва) і

ТОВ НПФ "Гентех" (Москва) відповідно до інструкцій фірм-виробників.

**Результати та їх обговорення.** 50 дітей, обстежених у віці від одного дня до одного року на присутність маркерів ЦМВІ, розділили на дві групи. До першої ввійшли 23 дитини з такими клінічними симптомами ЦМВІ, як мікроцефалія, гепатосplenомегалія, вроджений кардит, фіброз печінки, гіоплазія зорових нервів, гіпертензійно-гідроцефальний синдром, пневмонія, гіпотрофія, приглухуватість, враження ЦНС, полікістоз нирок. У дітей цієї групи було виявлено більше двох симптомів ЦМВІ, 12 дітям було поставлено клінічний діагноз ЦМВІ. До другої групи ввійшли 27 дітей з неспецифічною клінічною симптоматикою, зокрема, із пороками серця, затримкою психомоторного розвитку незрозумілого генезу. У деяких із цих дітей спостерігалися окремі ознаки, що зустрічаються за ЦМВІ, проте, діагноз ЦМВІ поставлено не було.

Частота виявлення специфічних анти-ЦМВ антитіл у дітей раннього віку

Групи дітей	IgM + IgG -	IgM+ IgG +	IgM- IgG+	IgM- IgG-	Кров	Сеча	
1-ша – з клінічними ознаками ЦМВІ (n=23)	0	4 (17 %)	18 (78 %)	1 (4 %)	45,0 % (9 з 20)	36,4 % (4 з 11)	65,0 % (13 з 20)
2-га – з відсутністю клінічної симптоматики ЦМВІ (n= 27)	2 (7 %)	4 (15 %)	12 (44 %)	9 (33 %)	15,4 % (2 з 13)	25,0 % (2 з 8)	23,1 % (3 з 13)

Отримані дані свідчать про те, що результати серологічного аналізу часто не збігаються з клінічними проявами і не дозволяють надійно діагностувати ЦМВІ або відкинути цей діагноз. Так, у дітей з вираженими клінічними симптомами у переважній більшості випадків фіксувалися відсутність АТ IgM і наявність АТ IgG, а в дітей з неспецифічними клінічними ознаками відзначалися як наявність АТ IgG, так і присутність АТ класу IgM. Можливо, відсутність анти-ЦМВ IgM, особливо в дітей, що народилися від інфікованих матерів, пов'язана з їхньою нездатністю виробляти антитіла до ЦМВ через імунологічну толерантність, а АТ класу G у багатьох випадках можуть мати материнське походження. Присутність IgG антитіл і не може бути підставою для зняття клінічного діагнозу. Можливо, негативний результат є наслідком недостатньої чутливості використовуваної тест-системи, особливо за невеликої кількості АТ IgM. Материнські антитіла (АТ) до ЦМВ також можуть ускладнювати інтерпретацію даних серологічного аналізу. У той самий час не можна виключити, що в дітей, у сироватках яких виявлено анти-ЦМВ IgM, з'являються клінічні ознаки ЦМВІ у процесі подальшого розвитку. Це означає, що такі діти заслуговують на подальше спостереження.

Порівняльний аналіз серологічних даних вказує на необхідність використання додаткових лабораторних методів для діагностики ЦМВІ, для прогнозування ризику розвитку неонатальної патології й обґрунтування тактики терапії. У зв'язку із цим зразки крові всіх дітей було досліджено на наявність прямих маркерів ЦМВІ: ДНК та інфекційно-активного вірусу (ІАВ). Вірусну ДНК виявляли методом ПЛР, ІАВ – за допомогою ШКМ.

Під час аналізу зразків крові всіх дітей 1-ї групи за допомогою ШКМ ІАВ було визначено у 15 випадках, що становило 65 %. Методом ПЛР було обстежено 12 зразків крові в дітей із клінічними симптомами, з них у п'яти випадках показано наявність ДНК ЦМВІ, що становило 42 %. При порівнянні ПЛР із ШКМ відзначено один збіг позитивних результатів і два збіги негативних, розбіжності фіксувалися в дев'ятьох випадках. Важливо відмітити, що у всіх дітей з клінічними проявами ЦМВІ, що перебували у важкому стані, було встановлено позитивні результати ШКМ. При обстеженні 2-ї групи дітей (з неспецифічними клінічними ознаками) було показано,

одним з найпоширеніших лабораторних методів діагносування ЦМВІ є виявлення вірусспецифічних анти-тіл класів IgM та IgG [6]. У зв'язку із цим сироватки крові дітей обох груп було вивчено на присутність специфічних анти-ЦМВ АТ методом тіФА. Отримані дані, представлені в таблиці, показують, що серед дітей 1-ї групи (з клінічними симптомами ЦМВІ) лише в однієї дитини не було виявлено анти-ЦМВ АТ, тоді як серед дітей 2-ї – 33 % не мали АТ до ЦМВІ. Практично сироватки всіх дітей 1-ї групи (95 %) містили АТ класу IgG, серед дітей 2-ї групи анти-ЦМВ IgG було знайдено в сироватках 59 % дітей. Найбільше зацікавлення викликає виявлення анти-ЦМВ IgM, які розглядаються як показник початкової стадії й/або гострої фази інфекції. Було встановлено, що АТ класу IgM зустрічалися у сироватках 17 % дітей із клінічними ознаками й у сироватках 22 % дітей без клінічних ознак ЦМВІ.

Частота виявлення специфічних анти-ЦМВ антитіл у дітей раннього віку

що в чотирьох з 20 обстежених дітей (20 %) було виявлено ДНК методом ПЛР. Інфекційно-активного вірусу в жодної дитини виявлено не було. При порівнянні результатів, отриманих методами ПЛР і ШКМ, спостерігався збіг результатів у 80 % випадків.

Раніше при вивченні ЦМВІ у трансплантаційних хворих було показано, що чутливість ПЛР вища, ніж ШКМ [3]. Одним з пояснень ситуації у випадках, коли позитивні результати ПЛР фіксувалися за негативних результатів ШКМ, є виявлення ДНК ЦМВ у дефектних вірусних частках, що не мають інфекційної активності. Про те, що в організмі інфікованих осіб накопичуються дефектні частинки, свідчать дані ультраструктурного аналізу клітин від пацієнтів з активною ЦМВІ [9]. Це може бути пов'язано з експресією й реплікацією ДНК ЦМВ у клітинах організму без повного циклу інфекційного процесу, що включає збірку й вихід вірусних частинок з клітини. Можливо, саме виявлення методом ПЛР ДНК ЦМВ, що не має інфекційної активності, пояснює більш низьку прогностичну цінність цього методу порівняно з ШКМ.

Було цікаво порівняти результати трьох використовуваних лабораторних методів діагностики ЦМВІ в дітей раннього віку

У дітей 1-ї групи (з клінічними ознаками), в яких виявлено АТ класу M, ІАВ визначено у трьох із чотирьох випадків. Однак ДНК ЦМВ у цих випадках встановлено не було. Наявність у сироватках дітей цієї групи АТ класу G супроводжувалося виявленням ІАВ у 15 з 23 випадків (65 %), а позитивні результати ПЛР – у п'яти з 12 випадків (42 %).

Звертають на себе увагу результати обстеження однієї дитини, що перебувала на лікуванні у ДКЛ №13 ім. Н.Ф. Філатова з клінічними симптомами ЦМВІ. Серологічний аналіз не показав у неї анти-ЦМВ IgM та IgG, тоді як результати ШКМ і ПЛР були позитивними. У цьому випадку серологічна діагностика ЦМВІ виявилася неможливою. Можна припустити, що відсутність імунного захисту сприяла прояву інфекційної активності ЦМВІ в організмі дитини й розвитку клінічно вираженої ЦМВІ.

При обстеженні дітей 2-ї групи (з неспецифічними клінічними ознаками) наявність АТ класу M і ДНК було встановлено в одному із шести випадків. Збіг негативних результатів спостерігався при визначені анти-ЦМВ

IgM, ДНК й IAB ЦМВ у 16 з 20 випадків. Можна припустити, що принаймні більша частина дітей цієї групи (80 %) не були інфікованими ЦМВ. IgG у цій групі було виявлено в 16 випадках, з них у чотирьох – ДНК ЦМВ, але IAB не знайдено в жодному із зразків.

**Висновки.** Отже, сукупність отриманих нами даних показує, що:

1. Широко застосовуваний метод тіФА для визначення анти-ЦМВ АТ не є надійним для діагностики ЦМВ у немовлят і дітей раннього віку через присутність материнських А і незрілість імунної системи дітей.

2. Порівняння частоти виявлення ЦМВ за допомогою ШКМ і ПЛР показало, що збіг результатів становив 80 %, при цьому позитивні результати ПЛР було отримано як у дітей з клінічними проявами ЦМВ, так і без них.

3. ШКМ дозволяє в короткий термін визначити у крові хворої дитини інфекційно активний вірус, наявність якого корелює з проявом клінічних симптомів ЦМВ.

4. Для надійної діагностики ЦМВ у немовлят і дітей раннього віку необхідно застосовувати, крім серологічних методів виявлення анти-ЦМВ АТ IgM та IgG класів, методи виявлення прямих маркерів ЦМВ: ПЛР і ШКМ. Дані, отримані при використанні трьох лабораторних методів, дозволяють об'єктивно оцінити ситуацію, правильно поставити діагноз і призначити специфічну протівірусну терапію.

1. Gaytart M.A., Steegers E.A., Semmekrot B.A. et al. // Obstet. Gynecol. Synt. – 2002. – Vol.57. – P.245–256.
2. Grangeot-Keros L., Cointe D. // J. Clin. Virol. – 2001. – Vol.21. – P. 213–221.
3. Lazzarotto T., Guetta B., Spezzacatene P. et al. // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol.38. – P.3540–3544.
4. Boeckh M., Nichols W.G. // Herpes. – 2003. – Vol.10. – P.12–16.
5. Но М. // Rev. Infect. Dis. – 1990. – Vol.12. – P.S701–S710.
6. Пустовіт Б., Херман Ф., Макарова Н.Е., Кущ А.А. // Питання вірусології. – 2001. – Т.2. – С.24–29.
7. Nielsen S.L., Sorensen I., Andersen H.K. // J. Clin. Microbiol. – 1988. – Vol.26. – P.554–561.
8. Макарова Н., Кущ А., Мартынова В., Баринский И., Пустовіт Б. // Питання вірусології. – 1996. – Т.2. – С.28–32.
9. Grefte A., Blom N., Van Der Giessen M., Von Son W. // J. Infect. Dis. – 1993. – Vol.168. – P.1110–1118.

Надійшла до редколегії 12.10.04

УДК 57.086.83

К.М. Білоткач, асп., О.П. Трохименко, канд. біол. наук,  
І. В. Дзюблик, д-р мед. наук, Л.М. Коршун, асп.,  
А.І. Салюк, канд. техн. наук

## КУЛЬТИВУВАННЯ РОТАВІРУСІВ НА ПОЛІМЕРНИХ НОСІЯХ ПРИ ОДЕРЖАННІ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ ІНАКТИВОВАНОЇ ПРОТИРОТАВІРУСНОЇ ВАКЦІНИ

Оптимізовано режим культивування вакцинного штаму ротавіруса на насадці із стрічок поліетиленової плівки, що дозволяє одержувати вірусомісну рідину із титром SA -11 не меншим за 7,5 Ig TCE<sub>50</sub>/мл.

We have optimized a process of rotavirus cultivation on the polyethylene ribbons that allow us to obtain a rotavirus contained media with titer SA-11 RV at least as 7,5 Ig TCE<sub>50</sub>/ml.

**Вступ.** На сьогодні припинено випуск багатьох з необхідних вітчизняних вакцинних препаратів, її однією з причин цього є нерентабельність їх виробництва внаслідок застосування застарілих і неефективних технологій культивування біологічних агентів (БА) [1]. Так, не виробляються вкрай необхідні для сільського господарства протиротавірусні вакцини, хоча й існує вже апробована та рекомендована до застосування культуральна інактивована протиротавірусна вакцина ветеринарного призначення, яку було розроблено на кафедрі вірусології КМАПО та яка є мультимерним комплексом антигенів ротавірусу мавп SA-11 та координаційно сполучені двовалентною платини [2]. І причиною цього є застаріла технологія одержання біомаси ротавіруса та субстрату для його репродукції – поверхневозалежної культури клітин свинячої нирки ембріональної версинізованої (ПКК СНЕВ), що здійснюється у матрасах, унаслідок чого собівартість кінцевого продукту є зависокою для потенційного покупця – фермерських господарств України. Окрім того, згідно з літературними даними, гіперімунне молоко чи молозиво, отримане від вакцинованих протиротавірусними вакцинами корів, можна було б використовувати і для пасивної імунізації дітей раннього віку, що особливо важко переносять ротавірусний гастроenterит та часто помирають унаслідок виснажливої ротавірусної діареї [3]. Отже, розробка ефективної технології культивування БА для виробництва вірусних вакцин, зокрема, і для протиротавірусної вакцини є актуальним напрямком розвитку вітчизняної біотехнології імунобіологічних препаратів [1].

Шляхи підвищення ефективності культивування ПКК і вірусів добре відомі, це переїзд до глибинного культивування, а також оптимізація складу культурального середовища та режиму культивування біологічних агентів.

Для переходу до глибинного культивування нами було запропоновано використовувати системи культивування насадкового типу [4]. Ці системи відрізняються

наявністю збільшеної поверхні для культивування ПКК ("поверхня росту") і дозволяють спрощувати процеси відмивання моношарів клітин від залишків сироватки перед інфікуванням вірусами, спрощувати стадії заміни живильного середовища, вести культивування ПКК у "м'яких" умовах щодо впливу гідродинамічних сил на клітини, а також автоматизувати процеси культивування та вести їх у режимі перфузії [5].

Мета даної роботи полягала у збільшенні виходу вакцинного штаму ротавіруса шляхом оптимізації стадії насаджування клітинної біомаси ПКК СНЕВ на насадці, виготовлені зі стрічок поліетиленової плівки. До завдань дослідження входило: визначити оптимальні умови культивування БА (мінімальну посівну концентрацію ПКК СНЕВ) та дослідити методи скорочення lag-фази при інокуляції низькими посівними концентраціями; визначити оптимальну інфікуючу дозу вакцинного штаму ротавірусу; проаналізувати вплив основних субстратів росту на проліферацию ПКК СНЕВ; визначити економічні коефіцієнти споживання основних субстратів росту та продукції метаболітів; з урахуванням визначених оптимальних умов культивування БА розробити режим глибинного культивування на насадці біологічних агентів для виробництва протиротавірусної вакцини ПКК СНЕВ.

**Об'єкт і матеріали дослідження.** Як вакцинний ротавірус використовували ротавірус мавп штаму SA-11, отриманий в лабораторії етіології, епідеміології і профілактики ентеровірусних інфекцій Інституту поліомієліту і вірусних енцефалітів ім. М.П. Чумакова РАМН. Вакцинний ротавірус зберігали й пасажували на кафедрі вірусології КМАПО. Інфекційний титр вірусу визначали за ЦПД у культурі клітин, антигенної титр – у РНГА з рідким еритроцитарним діагностикумом "Ротатест" (Росія).

У роботі використовували ПКК свинячої нирки ембріональної версинізованої (СНЕВ), отриману в Інституті ветеринарної медицини (м. Київ). ПКК СНЕВ культивували впродовж 20 пасажів на кафедрі вірусології КМАПО.

Використовували ростове живильне середовище на основі середовища ДМЕМ (пропис D 5468) і 199 (пропис M 5017) (у співвідношенні 1 : 1) ("Біотест лабораторія", Україна) з додаванням 5 % сироватки крові ембріонів корів (СКЕК) ("Сангва", Україна) та антибіотиків: 100 од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину ("Київмедпрепарат", Україна).

Як поверхню росту для культивування ПКК СНЕВ використовували плівку з поліетилену низької щільності (ПП), виготовлену згідно з ГОСТ 10354–82 для застосування у харчовій промисловості та сільському господарстві.

Питому швидкість росту ПКК СНЕВ  $\mu$  визначали за формулами: 1)  $\mu = (X_k - X_0) \cdot (X_0 \cdot t)^{-1}$ ; 2)  $\mu = (\ln(X_k/X_0))/24$ , де,  $\mu$  – питома швидкість росту, доба<sup>-1</sup>;  $X_k$  – кількість живих клітин, що виростили наприкінці культивування (кожної доби), тис. клітин/мл;  $X_0$  – кількість клітин, що була на початку культивування, тис. клітин/мл;  $t$  – час культивування, доба,  $\ln$  – натуральний логарифм, 24 – коефіцієнт перерахунку питомої швидкості росту на години.

Питому швидкість росту за першою формулою визначали кожні 24 год як питому швидкість утворення продукту – біомаси клітин (за визначенням, питома швидкість утворення продукту – це відношення приросту концентрації продукту до його початкової концентрації за одиницю часу). Другою користувалися для визначення питомої швидкості росту в ранній експоненціальній фазі (24–48 год культивування). Кількість клітин підраховували у гематометрі за стандартною методикою.

Як середовище кондиціювання (СК) використовували середовище культивування ПКК СНЕВ, відіbrane після культивування культури впродовж 48 год і відфільтроване через фільтри з діаметром пор 0,45 мкм.

Концентрацію глюкози визначали з використанням глюкометра "Precision Q-I-D glucose meter" (Medisence, Abbott Laboratories, Inc.).

Статистичну обробку даних проводили за програмою "Microsoft Excel".

**Результати та їх обговорення.** З метою переходу до глибинної технології культивування на початку наших досліджень ми провели скринінг широкодоступних на ринку України матеріалів, на поверхні яких, згідно з літературними даними, можна було б культивувати ПКК [4]. У результаті цих досліджень нами було виявлено, що поверхня плівки, виготовленої з поліетилену низької щільності (ГОСТ 10354-82), не поступається за своєю біоафінністю гідрофілізованому полістиролу – полімеру, що найчастіше використовується для культивування ПКК [6]. Отже, зважаючи на розповсюдженість на ринку України зазначеної поліетиленової плівки та її невисоку вартість, а також на ступінь її біоафінності, нами було розроблено методику виготовлення з неї насадки для культивування ПКК і вакцинного штаму ротавірусу. При культивування ПКК СНЕВ на модельній насадці, виготовленій за запропонованою нами методикою, ми дійшли до висновку, що без відновлення у середовищі культивування вичерпаних основних субстратів росту ріст клітин є обмеженим [7]. Разом з тим, згідно з літературними даними, надлишок таких субстратів, як глюкоза та глютамін, є причиною інгібування росту культури [8]. Отже, нами в першу чергу було визначено рівні оптимальних концентрацій вказаних субстратів.

**1. Дослідження впливу лімітуючих ріст клітин субстратів – глюкози й глютаміну – на вихід біомаси клітин і визначення їхніх оптимальних концентрацій.** Дослідження впливу концентрації субстратів росту на активність проліферації ПКК СНЕВ проводили, культивуючи клітини в умові різних початкових концентрацій глюкози та глютаміну впродовж перших 50 год після інокуляції за методом, описаним у [9].

За цим методом упродовж перших 50 год та за умови інокуляції мінімальною посівною концентрацією клітин клітини не здатні суттєво змінити середовище культивування так, щоб виявилися вторинні впливи, а саме: зниження початкових концентрацій субстратів чи накопичення продуктів метаболізму, отже, концентрації субстратів можна вважати постійними впродовж дослідження. Для визначення рівнів впливу початкових концентрацій субстратів на активність проліферації ПКК СНЕВ кожної доби (24 та 48 год) підраховували кількість клітин, яка збільшилась.

При дослідженні впливу початкових концентрацій глюкози (від 1 до 4 г/л) та глютаміну (від 0,1 до 0,6 г/л) на питому швидкість росту було встановлено, що глюкоза при збільшенні її концентрації спрямлює як субстрат інгібуючий вплив, тоді як глютамін не впливав на питому швидкість росту ПКК СНЕВ. За даними проведеного дисперсійного аналізу вплив глюкози становив 77,6 %, глютаміну – 13,76 %. Згідно з початковими концентраціями глюкози та глютаміну та розрахованими питомими швидкостями росту (за другою формулою) й за відповідних концентраційних співвідношень субстратів з використанням методів регресійного аналізу було оцінено математичні моделі впливу глюкози та глютаміну на швидкість росту культури ПКК СНЕВ: Моно (кінетика насичення субстратом); субстратного інгібування, за  $Y/x/s = \text{const}$  та субстратного інгібування за  $Y/x/s \neq \text{const}$  [10]. У результаті підбору оптимальної математичної моделі, яка б описувала інгібуючий вплив збільшених концентрацій глюкози на уповільнення швидкості росту ПКК СНЕВ, ми дійшли висновку, що математична модель субстратного інгібування, яка передбачає залежність економічного коефіцієнта  $Y/x/s$  від концентрації субстрату  $\mu = (\mu_{\max} \cdot S (1 - a \cdot S)) / (K_m + S + S^2 / K)$ , де  $K_m$  – константа Міхаеліса,  $K_i$  – константа інгібування,  $\mu_{\max}$  – максимальна швидкість росту культури, найкраще описує отримані нами експериментальні дані. Константи математичної моделі було розраховано як коефіцієнти рівняння лінійної регресії. Коефіцієнт детермінації для розрахованої кривої регресії  $r^2$  становив 0,98, що відбиває близькість розрахованих та експериментально отриманих даних. Форма одержаної математичної залежності показує, що існують такі концентрації субстратів, для яких  $\mu$  перебуває в окрузі  $\mu_{\max}$ . Отже, за алгоритмом пошуку екстремумів функції було знайдено оптимальне значення  $S_{opt}$ , що дорівнює 0,53 г/л глюкози.

Раніше при дослідженні впливу лімітуючих ріст субстратів у середовищі культивування на проліферативну активність ПКК СНЕВ нами було показано, що для ПКК СНЕВ спостерігався чіткий вплив збільшення концентрації глюкози на загальний вихід біомаси клітин [7]. Проте таке явище може бути зумовлено тим, що у пробах з більшим вмістом глюкози на 24-ту годину культивування відсоток клітин, що вижили, був більшим. Пояснити таку протекторну дію глюкози можна підвищеннем густини середовища культивування, що позитивно впливає на стійкість клітин до механічних пошкоджень. У той самий час вплив збільшення концентрації глютаміну на вихід біомаси клітин було неможливо встановити однозначно. За результатами дисперсійного аналізу вплив глютаміну було оцінено в 1,53 %, розрахована оптимальна початкова концентрація глюкози становила 2,8 г/л.

Оскільки залежності швидкості росту ПКК СНЕВ від концентрації у середовищі культивування глютаміну в межах від 0,1 до 0,6 г/л виявлено не було, ми провели додаткову серію експериментів з використанням більш низьких концентрацій глютаміну від 0,01 до 0,1 г/л. За отриманими даними впливу глютаміну на відсоток клітин, що вижили,

не спостерігалося, результати щодо кількості клітин на 24-ту годину культивування не аналізувалися.

У межах концентрацій від 0,01 до 0,1 г/л глютамін впливає на швидкість росту ПКК СНЕВ, а вигляд отриманої залежності нагадує типову криву насищення, що відповідає кінетиці росту БА за математичною моделлю Моно.

Отже, було запропоновано оцінити отримані експериментальні дані згідно з моделлю Моно. Оцінку значень констант  $\mu_{\max}$  та  $K_s$  проводили за згаданим раніше методом найменших квадратів. Розраховані значення  $\mu_{\max}$  та  $K_s$  дорівнювали  $0,020927 \text{ год}^{-1}$  та  $0,01692 \text{ г/л}$ , відповідно;  $r^2$  кривої регресії дорівнював 0,73, що відображає цілком прийнятну близькість експериментально отриманих і розрахованих результатів. Проте за вказаними моделлю неможливо визначити оптимальну концентрацію глютаміну в середовищі, можна лише сказати, що швидкість росту зменшиться на 50 % за концентрації глютаміну 0,017 г/л.

На основі результатів дослідження нами було зроблено висновки, що варто використовувати стандартні середовища з найменшим вмістом вказаних субстратів, а після зниження концентрації субстрату до його оптимальної межі – підтримувати П. Проте для зменшення відсотка загибелі клітин при субкультивуванні початкову концентрацію глукози для культивування ПКК СНЕВ потрібно доводити до 2,8 г/л.

**2. Визначення оптимальної посівної концентрації ПКК СНЕВ при ІІ культивуванні на поверхні поліетиленової плівки.** Оскільки для інокуляції насадкових систем культивування потрібно мати чималу кількість клітин, то в наших дослідженнях ми визначали мінімальну посівну концентрацію клітин, що здатна прижитися на поверхні поліетиленової плівки. Для визначення оптимальної посівної концентрації досліджували характер росту ПКК СНЕВ залежно від різних посівних концентрацій: від  $25 \cdot 10^3$  до  $8 \cdot 10^5 \text{ клітин/мл}$  ( $2 \text{ см}^2$ ). Культивували ПКК СНЕВ упродовж 96 год, визначаючи кожної доби кількість клітин, що збільшилася.

Згідно з отриманими даними, при використанні посівних концентрацій ПКК СНЕВ, вищих за  $50 \cdot 10^3 \text{ клітин/мл}$ , на початку культивування спостерігалася загибель клітин, при цьому із ростом посівної концентрації збільшується й відсоток загиблих клітин (до 17,5 %). Водночас приріст клітин був найбільшим – 240 % – для посівних концентрацій  $25-50 \cdot 10^3 \text{ клітин/мл}$ , а для більш високих посівних концентрацій становив 178–182 %. Слід зауважити, що саме за посівної концентрації  $25-50 \cdot 10^3 \text{ клітин/мл}$  не було відмічено загибелі клітин, отже, менший приріст клітин за більших посівних концентрацій, очевидно, спричинено попередньою загибеллю частини клітин.

Явище загибелі клітин у перші 24 год культивування спостерігається досить часто, зменшення ж рівня загибелі можна досягти введенню до середовища культивування більшого відсотку сироватки, яка містить білки прикріплення та збільшує стійкість клітин до механічних пошкоджень, що виникають при перемішуванні суспензії клітин.

Аналізуючи криві росту, побудовані на основі підрахунку кількості клітин кожної доби культивування, ми зробили висновки, що фази латентного росту (lag-фази) культури за посівних концентрацій від  $25-200 \cdot 10^3 \text{ клітин/мл}$  сильно затягнуті (до 48 год), тоді як за вищих посівних концентрацій фаза латентного росту більш коротка. Щодо адаптації клітин до умов культивування, то за посівних доз до  $10^5 \text{ клітин/мл}$  по живного середовища (чи до  $5 \cdot 10^4 \text{ клітин/см}^2$ ) клітини ПКК СНЕВ не здатні адаптуватись до умов культивування при використанні середовища зазначеного вище складу. Таке явище можна пояснити недостатністю в середовищі культивування аутокринних факторів росту, що ініціюють ріст клітин, а за малих концентрацій (до  $10^5 \text{ клітин/мл}$ ) клітини ПКК СНЕВ не здатні самостійно достатньою мірою кондиціювати середовище для активації власної проліферації. Розв'язанням проблеми може стати додавання до середовища культивування більшого відсотку СКЕК, проте слід зазначити, що сироватка є найдорожчим компонентом по живого середовища, тому доцільно було б ввести до основного по живого середовища середовище кондиціювання, що, як відомо, містить багато аутокринних факторів росту.

В інших випадках, тобто за посівних концентрацій  $2-8 \cdot 10^5 \text{ клітин/мл}$ , фаза є короткочасною, та культура швидко переходить в експоненціальну фазу росту. Питомі швидкості росту ПКК СНЕВ на 72-гу годину культивування для посівних доз  $2-8 \cdot 10^5 \text{ клітин/мл}$  майже не відрізняються та більші за "0", тобто можна зробити висновок, що оптимальною концентрацією для інокуляції насадки є посівна концентрація  $2 \cdot 10^5 \text{ клітин/мл}$ , оскільки вона є найнижчою з посівних концентрацій, яка в змозі забезпечити нормальній цикл росту культури.

**3. Дослідження введення середовища кондиціювання на скорочення фази латентного росту ПКК СНЕВ.** Дослідження впливу середовища кондиціювання на активацію росту ПКК СНЕВ проводили шляхом внесення 12,5–50 % СК (об'єм/об'єм) в основне по живне середовище на початку культивування. Як контрольне використовували по живне середовище, що не містило СК. За результатами наших досліджень, при використанні посівної концентрації  $2 \cdot 10^5 \text{ клітин/мл}$ , кількість живих клітин на першу добу культивування (24 год) у контролі (без додавання середовища кондиціювання) зменшувалася на 10 %, тоді як кількість клітин у лунках з додаванням середовища кондиціювання, навпаки, зростала до 35 %, що свідчить про позитивний вплив на проліферативну активність ПКК СНЕВ введення середовища кондиціювання. Максимальні швидкості росту для проб з додаванням СК були близькими 0,72–0,82 доба<sup>-1</sup>, тоді як швидкість росту на 72-ту годину культивування для проб з додаванням 50 % СК була меншою, ніж для проб з меншим вмістом СК: 0,13 проти 0,33–0,37 доба<sup>-1</sup> відповідно. Отже, можна зробити висновок, що за більшого вмісту середовища кондиціювання кількість токсичних метаболітів зростає, тоді як концентрація субстратів росту залишається сталою. Тобто при культивуванні на середовищі, що містить більший відсоток СК, культура швидше перейде до стадії уповільнення росту внаслідок накопичення інгібіторів росту. За менших концентрацій СК у базальному середовищі характер росту ПКК СНЕВ практично не відрізняється, окрім того, що за більшої концентрації СК культура швидше перейде у стаціонарну фазу. Отже, для інтенсифікації росту ПКК СНЕВ доцільно додавати 25 % СК до основного середовища культивування.

**4. Визначення оптимальної інфікуючої дози вірусу. Дослідження впливу щільності моношару клітин ПКК СНЕВ під час інфікування вакцинним штамом ротавірусу SA-11 на вихідний титр вірусу.**

Підрахована перед інфікуванням ротавірусом кількість клітин на лунку становила: на 24-ту годину культура –  $2,5 \cdot 10^5 \pm 2 \cdot 10^5$ ; на 48-му –  $4,3 \cdot 10^5 \pm 3 \cdot 10^4$ , 62-ту –  $6,65 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^5$  та на 96-ту –  $7 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^5$ .

Отримані в ході дослідження дані свідчать, що щільність культури клітин ПКК СНЕВ впливалася на вихід ротавірусу, так, на 48-му годину культивування ротавірусу його інфекційний титр, Ig TЦД<sub>50</sub>/0,1 мл становив: 3,5; 5,5; 3,5; 3,0 відповідно для 24-, 48-, 72- та 96-годинних культур. Отже, при збільшенні щільності клі-

тин вихід вірусу зростає, проте, досягає свого максимуму за щільноті  $43 \cdot 10^4$  клітин/ $\text{см}^2$  та за подальшого збільшення кількості клітин на одиницю поверхні росту вихід вірусу знижується.

Слід зауважити, що з третьої доби ПКК СНЕВ заповнювала всю поверхню культивування та починала формувати полішари, тобто при інфікуванні вірусом уражалися лише поверхневі шари клітин, та неможливо було досягти синхронного інфікування всієї культури. Зниження титру вихідного вірусу в даному випадку можна пояснити утрудненим поширенням вірусу в культурі ПКК СНЕВ при досягненні нею щільних полішарів клітин. Окрім того, починаючи з 72-ї години культивування культура уповільнює свій ріст і переходить до стаціонарної фази росту.

Тобто можна зробити висновок, що продуктивність інфікування ротавірусом ПКК СНЕВ зменшується у стаціонарній фазі росту та при формуванні культурою клітин щільних полішарів клітин. У свою чергу, найбільший вихід вірусу можна отримати за щільноті моношару клітин ПКК СНЕВ до  $6 \cdot 10^5$  клітин/ $\text{см}^2$  поверхні росту.

**Визначення оптимальної інфікуючої дози ротавірусу SA-11 на моношарі ПКК СНЕВ.** При інфікуванні культур клітин тварин високими дозами вірусів часто спостерігається зменшення виходу вірусу. Разом з тим, необхідно дослідити вплив зниження інфікуючої дози ротавірусу на вихідний титр вірусу з ПКК СНЕВ, оскільки максимальною інфікуючою дозою, яку економічно доцільно застосовувати, є 100 доз вірусу, проте її бажано зменшити. Отже, потрібне дослідження впливу різних інфікуючих доз вірусу (менших за 100 доз) на вихідний титр вірусу.

ПКК СНЕВ культивували впродовж двох діб, після чого отримали неповністю сформований моношар клітин зі щільнотою клітин  $34,25 \cdot 10^4$  клітин/ $\text{см}^2$ , що задовільняло умови отримання максимальної кількості вірусу. На клітини моношару вносили ротавірус в інфікуючій дозі від  $10^2$  до  $10^{-3}$  ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл.

Згідно з отриманими в цьому дослідженні даними, антигенної та інфекційний титри мали найбільші значення через 48 год культивування – 1 : 128 ГАО/0,25 мл і 5,5 Ig ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл для 100 інфікуючих доз та 1 : 32 ГАО/0,25 мл і 3,5 Ig ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл для 10 інфікуючих доз відповідно. За результатами досліджень було встановлено, що зниження інфікуючої дози вірусу від 100 до 0,001 дози негативно впливає на вихід вірусу – його антигенної та інфекційний титри не досягали бажаних рівнів вірусної активності. Враховуючи, що кількість клітин у лунці планшету на момент інфікування становила  $34,25 \cdot 10^4$  клітин/ $\text{см}^2$ , оптимальною для ПКК СНЕВ та посівного ротавірусу SA-11 є множинність зараження  $2,9 \cdot 10^{-4}$  ТЦД<sub>50</sub>/клітину.

**5. Визначення рівнів споживання ПКК СНЕВ основних рістлімітуючих субстратів.** Підвищення виходу вірусу при культивуванні на чутливих лініях клітин можна досягти шляхом суттєвого збільшення кількості клітин, що використовуються для репродукції вірусів. Одним із способів збільшення клітинної біомаси поверхнево-залежних культур, за умов достатньої площини поверхні росту, є подовження часу їх культивування. Проте, як було зазначено вище, тривале культивування неможливе без корекції концентрацій спожитих субстратів і накопичених інгібторів росту. Визначивши рівні споживання субстратів і продукції інгібторів (qGlc, qGln, rLac, rNH4+), а також відповідні економічні коефіцієнти ( $Y_x/\text{Glc}$ ,  $10^9$  клітин/г;  $Y_{\text{Lac}}/\text{Glc}$ , г/г;  $Y_{\text{NH4+}}/\text{Gln}$ ,  $\text{ммоль} \cdot \text{l}^{-1}/\text{ммоль} \cdot \text{l}^{-1}$ ) надає можливість прогнозувати поточні концентрації субстратів та їх метabolітів у середовищі культивування й підтримувати їх на певному оптимальному рівні.

Згідно з вимірюваними в експоненціальній фазі росту ПКК СНЕВ концентраціями глукози, амонію та лактату було розраховано економічні коефіцієнти:  $Y_x/\text{Glc}$  (економічний коефіцієнт перетворення 1 г глукози на клітинну біомасу) –  $0,406 \cdot 10^9$  клітин/г;  $Y_{\text{Lac}}/\text{Glc}$  (перетворення 1 г глукози на лактат) – 1,098 г/г. Розраховані рівні споживання та продукції метabolітів: qGlc (питоме споживання глукози) –  $1,427 \text{ г} / 10^9$  клітинами за добу; rLac (питома продукція лактату) –  $1,567 \text{ г} / 10^9$  клітинами за добу;  $r\text{NH}_4^+$  –  $1,475 \text{ ммоль} \cdot \text{l}^{-1} / 10^9$  клітинами за добу. Значення  $Y_{\text{Gln}}/\text{Glc}$  (споживання глутаміну на 1  $\text{ммоль} \cdot \text{l}^{-1}$  глукози) та  $Y_{\text{NH4+}}/\text{Gln}$  (перетворення 1  $\text{ммоль} \cdot \text{l}^{-1}$  глутаміну на амоній) – було прийнято рівними 0,163 та  $1,143 \text{ ммоль} \cdot \text{l}^{-1} / \text{ммоль} \cdot \text{l}^{-1}$ , відповідно, згідно з літературними даними; а також qGln (питоме споживання глутаміну) –  $1,29 \cdot 10^9$  клітинами за добу [10].

**6. Дослідження застосування напівбезперервного режиму культивування ПКК СНЕВ з порційним внесенням субстрату.** Як найбільш доцільний режим культивування нами було обрано напівбезперервний режим культивування з порційним внесенням субстратів. Він дозволяє досягти більшої концентрації клітин на одиницю об'єму культивування без перевитрат живильного середовища. При цьому слід очікувати, що вихід клітин буде більшим, ніж у періодичній системі культивування, оскільки ріст клітин в останній лімітуватиметься низькими залишковими концентраціями субстратів.

З літературних джерел відомо, що ключовим моментом при використанні напівбезперервного режиму з порційним внесенням субстрату є склад живильного середовища та протокол підтримування оптимальних концентрацій субстратів та заданої (оптимальної) швидкості росту ПКК СНЕВ нами було запропоновано алгоритм, в основі роботи якого лежить припущення про експоненціальний ріст культури та сталість у часі економічного коефіцієнта  $Y_x/s$ . Суть роботи алгоритму полягає в тому, що за реально вимірюваною концентрацією глукози та заданими початковими концентраціями клітин і субстратів, відомими економічними коефіцієнтами та гранично допустимими концентраціями субстратів і метabolітів та заданим часом культивування розраховуються теоретичні значення концентрацій субстратів і метabolітів у певний момент часу, а також їхня дія щодо керування системою культивування, а саме: об'єм концентрованих розчинів субстратів, що необхідно ввести, чи кратність розведення середовища культивування. І хоч визначити, якою мірою обчислені за алгоритмом величини концентрацій субстратів чи метabolітів або розрахована теоретична концентрація клітин збігаються з реальними їхніми значеннями, було неможливо, завдяки використанню пропонованого алгоритму керування системою культивування нами було отримано вищі більш ніж у два рази врожаї клітин і вірусомісна рідина з титром SA-11 не меншим за  $7,5 \text{ Ig TCD}_{50}/\text{мл}$ , що у  $10^3$  вище, ніж вихідний титр ротавірусу, одержаного за "матрасною" технологією культивування. Проте слід зауважити, що вже з п'ятої доби культивування періодичність (два рази) та об'єм заміни середовища (до 75 %) зростають, тобто при масштабному культивуванні ПКК на насадках доцільно переходити до режиму перфузії.

**Висновки.** Застосування нової технології одержання біомаси вакцинного штаму ротавірусу, а саме, культивування ротавірусу на поверхнево-залежній культурі клітин СНЕВ, що зросла на насадці, виготовленій із ущільнених стрічок поліетиленової плівки та прокультивованій у напівбезперервному режимі з порційним внесенням субстрату, дозволяє одержати вірусомісну рідину з титром

SA-11 не меншим за 7,5 Ig TCD<sub>50</sub>/мл, що свідчить про ефективність застосування розробленої технології культивування вакцинного штаму ротавірусу мавп SA-11, перспективність її застосування у виробництві біомаси вірусу для виготовлення інактивованої протиротавірусної вакцини ветеринарного призначення, що дозволить підвищити рентабельність виробництва вакцини та відповідно поширити цей продукт серед тваринницьких господарств України з метою специфічної профілактики ротавірусного гастроenterиту серед тварин.

УДК 635.21:632.98:578.5

1. Сергеев В. А. Вирусные вакцины. – К., 1993.
2. Грін В. М. // Ветеринарна медицина України. – 1997. – № 9. – С. 8–9.
3. Guarino A. // Pediatrics. – 1994. – Vol. 93, No. 1. – P. 12–16.
4. Білоткач К.М., Салюк А. І., Трохименко О. П., Даублик І. В. // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75, № 5. – С. 124.
5. Lubliniecki A. S. // Cytotechnology. 1998. – Vol. 28. – P. 139 – 145.
6. Білоткач К. М., Салюк А. І., Трохименко О. П., Даублик І. В. // Вісн. Техн. ун-ту. – 2004. – Т. 9, № 2. – С. 158–166.
7. Білоткач К. М., Трохименко О. П., Коршун Л. М. // Аграр. вісн. Причорномор'я. Ветеринарні науки. – 2004. – Вип. 25. – С. 78–88.
8. Yang J-D. // Biotechnol. and Bioeng. – 2000. – Vol. 69. – P. 74–82.
9. Glacken M. W., Adema E., Sinskey A.J. // Biotechnol. and Bioeng. – 1988. – Vol. 32. – P. 491–506.
10. Chester S., Daniel I. C. Animal cell Bioreactors. – Berlin, 1991.

Надійшла до редакції 08.11.04

Ю.В. Богунов, канд. біол. наук,  
Р.В. Гнутова, д-р біол. наук

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РОССИЙСКИХ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА МОЗАИКИ ЦВЕТНОЙ КАПУСТЫ

Амплифицировано полноразмерные копии гена белка цитоплазматических включений шести природных изолятов ВМЦК. Показано наявность истинных различий рестрикционных профилей у российских изолятов и зарубежных штаммов ВМЦК, что позволяет зробити припущення, що на Півдні Далекого Сходу Росії циркулює відособлена, генетично однорідна популяція ВМЦК.

*Full-length copies of the ORF VI coding a viroplasmin of the six natural field CaMV isolates were amplified. Essential distinctions of the restriction patterns of Russian and foreign isolates were observed. We compared our data with one of foreign researchers and show that far-eastern CaMV isolates are independent, genetically homogeneous population.*

**Вступление.** К настоящему моменту в агроценозах дальневосточного региона России выявлено около 50 фитовирусов из 16 родов, еще больше описано их штаммов. Ежегодный фитосанитарный мониторинг поражаемости овощных культур, которые в последние годы нами интенсивно изучаются, показал, что в регионе распространены малоизученные вирусы и их штаммы. Одним из таких является ДНК-геномный каулимориус мозаики цветной капусты (*Cauliflower mosaic virus*, ВМЦК) [1]. ВМЦК был выделен из культуральных растений семейства крестоцветных: капусты цветной и белокочанной, редиса (табл. 1). Результаты сравнительного изучения биологических свойств шести природных изолятов вируса позволяют предположить, что для ВМЦК, циркулирующего в крае, характерна высокая генетическая изменчивость. Изоляты отличались по проявлению инфекции (симптомам) и имели различия в круге экспериментально заражаемых растений.

Мы попытались изучить генетическую изменчивость российских дальневосточных изолятов ВМЦК. Это позволит пополнить наши знания о штаммовом разнообразии этого вируса, географической привязанности. Кроме того, это также необходимо для разработки молекулярных методов его диагностики.

В ряде зарубежных исследований было показано, что изоляты (штаммы) ВМЦК, собранные в различных регионах и имеющие биологические особенности, обладают характерными (индивидуальными) профилями рестрикции при расщеплении их ферментами ДНК [2, 3]. Однако, по нашему мнению, большей информативности можно достичь при использовании метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в сочетании с ПЦР.

Это позволяет сравнивать изоляты непосредственно по тем последовательностям ДНК, которые отвечают за их фенотипические особенности. За счет использования "мелкощепящих" рестриктаз ПЦР-ПДРФ анализ становится более детальным.

Такой подход обоснован тем, что ранее обнаруженные фенотипические различия между изолятами должны иметь отражение в последовательности ДНК штаммов вируса. Нами был проанализирован не в целом геном изолятов, а только участок ДНК ВМЦК, кодирующий белок цитоплазматических вирусных включений (ГБЦП, ОРС VI), который, как было установлено ранее зарубежными исследователями, является одним из основных факторов

развития штаммоспецифичных симптомов инфекции [4, 5] и способен определять специфичность изолята по отношению к кругу поражаемых растений [6].

**Материалы и методы.** ДНК изолятов ВМЦК выделяли из вирусных препаратов и использовали в качестве матрицы для амплификации. В ПЦР применяли специально сконструированные олигонуклеотидные праймеры, структура которых была подобрана на основе известных нуклеотидных последовательностей вируса. Были амплифицированы нуклеотидные последовательности, представляющие собой полноразмерные копии исследуемого гена всех изучаемых изолятов. Ампликоны были обработаны девятью рестриктазами, семь из которых являлись частощепящими.

Таблица 1. Изоляты ВМЦК, выявленные в Приморском крае на овощных культурах

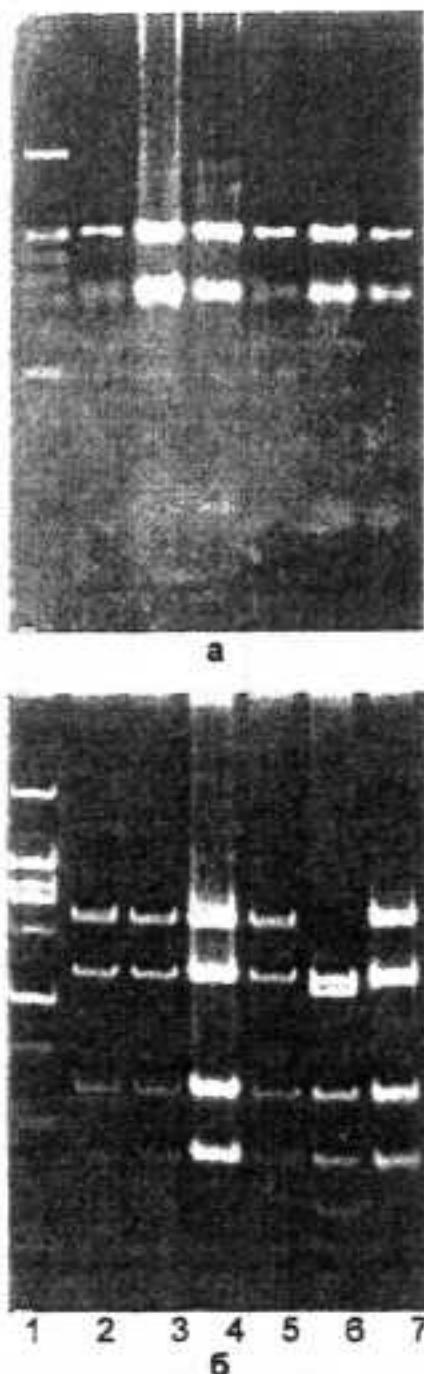
Изолят	Место сбора материала	Растение-хозяин
ВМЦКо	г. Артем Приморского края, частное хозяйство	Капуста цветная
ВМЦК-1	ОПХ с. Пуциловка Уссурийского района	Капуста белокочанная
ВМЦК Р-1	Дальневосточная опытная станция ВИР, г. Владивосток	Редис
ВМЦК Р-2	г. Артем Приморского края, частное хозяйство	Редис
ВМЦК-6	ОПХ с. Пуциловка Уссурийского района	Капуста белокочанная
ВМЦК-7		Капуста цветная

**Результаты и обсуждение.** Известно, что полиморфизм ДНК вызывается либо точечными мутациями в виде единичных нуклеотидных замен, либо ошибками при репликации ДНК в виде инсерций или делеций. Для штаммов одного вида вируса анализ фрагментов ДНК, полученных при использовании рестриктаз типа *TaqI*, позволяет оценить сходство геномов по числу общих (идентичных) фрагментов в их составе [7]. Проведенный нами анализ генетической изменчивости дальневосточных изолятов ВМЦК показал, что для пяти из них (ВМЦКо, ВМЦК-1, ВМЦК Р1, ВМЦК Р2, ВМЦК-7) характерна 100 %-ная степень сходства по данным ПДРФ-анализа. Отличия в нуклеотидной последовательности (одна нуклеотидная замена) обнаружены только для ВМЦК-6.

Таблица 2. Сравнительный анализ длин рестрикционных фрагментов ГБЦВ (п. н.) зарубежных и российских изолятов ВМЦК

Изоляты	Bari	BBC	D/H	Cabb-S	CM1841	CMV-1	D-4	NY8153	PV147	S-Japan	W260	XinJing	VMЦКо	VMЦК-6
Географическое происхождение	Италия	США	Венгрия	Италия	США	США	Франция	США	США	Япония	Аргентина	Китай	Россия	Россия
Номер по-следо-ватель-ности	D00335	M90542	M10376	V00141	V00140	M90543	M23620	M90541	X53850	X14911	L09053	AF140604		
Рестрикта-зы														
AluI	200 517 1145	190 197 269 394 746	190 197 351 399 746	108 198 269 385 746	190 197 269 394 746	108 161 190 198 394	108 161 190 197 1140	197 395 459 746	182 197 277 399 746	108 161 190 197 416	108 197 351 562 579	250 337 480 548	250 337 480 548	
BsuRI	236 259 285 354 789	190 249 315 468 634	246 249 639 783 495	307 318 346 440 634	190 249 316 468 634	173 249 315 468 634	134 190 249 316 334	178 190 315 468 634	190 249 315 468 635	246 249 315 468 639	249 656 1029	783 1140	147 357 470 1129	147 357 470 1129
Sse9I	450 511 733	302 437 511	162 269 413	375 423 470	302 438 511	248 444 511	248 376 511	302 437 511	302 444 511	162 308 375	162 256 437	182 329 375	232 409	232 409
EcoRI	464 1439	548 1434	458 1439	396 1425	459 1434	458 1438	397 1496	397 1496	458 1435	396 1439	458 1456	396 1445	423 1396	423 1396
HindIII	776 1147	811 1072	816 1101	802 1072	811 1073	811 1072	811 1073	811 1072	221 1692	221 1696	221 1164	-	215 250 548 1154	215 250 548 1154
Kzo9I	138 140 141 539 651	126 140 200 608 648	133 140 200 613 648	140 200 648 732 648	126 140 205 608 648	171 140 201 216 341	126 171 201 608 648	126 140 200 608 648	133 140 200 613 648	140 174 200 523 648	124 200 461 648	106 126 327 1115	106 126 327 1115	
MspI	286 313 586 687	236 283 310 1032	236 283 310 1037	283 310 413 846	236 283 310 1032	236 283 310 1032	236 283 310 1032	236 283 310 1033	283 310 1273	236 283 310 1054	112 124 283 310	115 217 1041	115 217 1041	
TaqI	202 735 986	199 234 369	199 732 986	199 732 972	200 369 612	199 234 369	200 234 369	199 234 612	199 732 369	199 675 986	199 689 1003	199 729 992	1008 729	1008 729
Tru9I	156 531 554 595	319 753 807	262 753 812	319 681 798	319 754 807	319 753 807	281 319 473	319 753 807	319 753 808	314 251 498	247 345 331	252 337 566	171 232 337	232 337 509 622

Полученные данные свидетельствуют о том, что в настоящее время присваивать статус самостоятельного штамма изоляту вируса только по его фенотипическим признакам (экспериментальный круг растений хозяев, вирусные включения, физические свойства вирионов, симптоматология) не всегда оправдано, так как штамм является отражением генотипической изменчивости. Между всеми изучаемыми изолятами (ВМЦКо, ВМЦК-1, ВМЦК Р1, ВМЦК Р2, ВМЦК-6, ВМЦК-7) не удалось обнаружить существенных отличий в последовательности участка генома, кодирующего указанные выше признаки. Из 33 выявленных сайтов рестрикции только один оказался полиморфным (см. рис.).



Примеры ПДРФ-профилей ГБЦВ дальневосточных изолятов ВМЦК: 1 – 100 бр+1,5 Кб ДНК; 2 – ВМЦКо; 3 – ВМЦК-1; 4 – ВМЦК Р-1; 5 – ВМЦК Р-2; 6 – ВМЦК-6; 7 – ВМЦК-7; а – ТаqI (2 %-ный агарозный гель), б – Tgl9I (5 %-ный ПЛАГ)

Таким образом, данные по рестрикционному анализу позволяют нам говорить только об одном штамме – обычном (дальневосточном), выделенном из различных культур семейства крестоцветных. Тем не менее, выявленные даже небольшие различия между дальневосточными изолятами, проявляющиеся в отсутствии сайта рестрикции у одного изолята (ВМЦК-6), уже свидетельствуют о наличии генетической вариабельности в популяции ВМЦК, циркулирующего на Дальнем Востоке России.

Особенно интересно исследовать изменчивость дальневосточных изолятов не только в сравнении друг с другом, но и с зарубежными изолятами. Метод ПДРФ с присущими ему ограничениями все-таки по-

зволяет это сделать. На основе известных нуклеотидных последовательностей OPC VI ВМЦК мы реконструировали рестрикционные карты 12 зарубежных штаммов, которые сравнили с данными, полученными на местном материале. Было установлено, что российские изоляты вируса чаще всего характеризуются уникальными наборами рестрикционных фрагментов (табл. 2).

Обобщая полученные данные, мы имеем основание предположить, что ВМЦК в дальневосточном регионе России представляет своеобразную, достаточно однородную популяцию, которая обоснованно существует на данной территории. Это одно из возможных объяснений столь существенных отличий дальневосточных российских изолятов вируса от зарубежных, что свидетельствует об актуальности и необходимости их дальнейшего изучения. Более обстоятельно генетические и филогенетические взаимоотношения зарубежных и дальневосточных штаммов можно будет исследовать после секвенирования последних.

Несмотря на то, что с помощью рестрикционного анализа учитывается лишь малая доля нуклеотидных замен, этот метод оказался чрезвычайно информативным и в большинстве случаев позволял зарубежным авторам выявлять внутривидовую изменчивость ВМЦК [2, 3, 8]. В 1986 г. был описан [6] изолят D4, системно поражающий не только крестоцветные, но и растения из семейства пасленовых. С помощью ПДРФ-анализа были продемонстрированы существенные отличия генетической карты данного штамма от карт геномов ранее описанных штаммов.

Таким образом, литературные данные последних лет, а также наши исследования свидетельствуют о целесообразности использования ПЦР-ПДРФ анализа для дифференциации фитовирусов внутри вида. В последнее время предлагается рангу "штамм" придать таксономический статус [1]. В таком случае при таксономии фитовирусов ниже ранга "вид" видимо необходимо использовать дополнительные критерии. Настоящей работой мы подтвердили, что только фенотипические свойства изолятов, которые ранее использовали на начальных стадиях изучения штаммов, не могут являться основанием для присвоения статуса нового штамма.

Современный подход к изучению штаммов ВМЦК должен опираться не только на комплекс классических вирусологических методов, но и на методы молекулярной биологии, поскольку все фенотипические особенности изолятов генетически детерминированы. Без молекулярно-генетических исследований в настоящее время при идентификации штаммов не обойтись.

1. Гнугова Р.В., Топкан В.Ф. // Агробиол. журн. – 2002. – Спецвып. – С.6–14.
2. Hull R., Howell S.H. // Virology. – 1978. – Vol. 86. – P. 482–493.
3. Hull R. // Virology. – 1980. – Vol. 100. – P. 78–90.
4. Zijlstra C., Scharpen-Hernandez N., Gal S., Hohn T. // Virus genes. – 1996. – Vol. 13. – P. 5–17.
5. Geri C., Cecchini E., Giannakou M.C. et al. // Mol. Plant-Microb. Interactions. – 1999. – Vol. 12. – P. 377–384.
6. Schoelz J.E., Shepherd R.J., Richins R.D. // Phytopathology. – 1986. – Vol. 76. – P. 451–454.
7. Алтухов Ю.П., Салманкова Е.А. // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 9. – С.1173–1195.
8. Meagler R., Shepherd R., Boyer H. A. // Virology. – 1977. – Vol. 80. – P. 362–375.

Поступила в редакцию 30.09.04

УДК 578.28: 578.85/86: 579.841.1

Р.І. Гвоздяк, д-р біол. наук, Л.М. Ващенко, канд. біол. наук,  
А.М. Кириченко, канд. біол. наук, А.О. Баркалова, інж.,  
О.Г. Коваленко, д-р біол. наук, Т.В. Мохунь, асп., Б.Ф. Лигирда, асп.

## ВПЛИВ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ТА ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НА РЕАКЦІЮ НАДЧУТЛИВОСТІ В РОСЛИНАХ ТЮТЮНУ

Вивчено взаємний вплив вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) та патоварів *Pseudomonas syringae* – pv. *atrofaciens* 8281, pv. *lachrymans* 9126 та pv. *phaseolicola* 200.2. ВТМ не впливає на морфологію колоній і клітин псевдомонасів та на їхню здатність викликати реакцію надчутливості (РНЧ) в листках тютюну. Сік із інфікованого ВТМ листя тютюну не впливає на РНЧ, тоді як сік із листя, ураженого вірусом бронзовості томатів, був активним і залежав від штаму бактерій. Фітопатогенні псевдомонаси пригнічують інфекційність ВТМ.

The influence of *Pseudomonas syringae* – pv. *atrofaciens* 8281, pv. *lachrymans* 9126 and pv. *phaseolicola* 200.2 on tobacco mosaic virus (TMV) has been studied. It has been shown that TMV does not affect morphology of cell and colonies of pseudomonas and its capacity to cause hypersensitive reaction (HR) in tobacco leaves. Juice from tobacco leaves infected by TMV does not influence on HR. Juice from tobacco leaves infected by tomato spotted wilt virus are active, but its activity depended on bacteria strains. Phytopathogenic bacteria reduce infections of TMV.

**Вступ.** Фітопатогенні віруси й бактерії мають важливе значення у формуванні фітоценозів, оскільки можуть суттєво впливати на біологічні та фізіологічні реакції, імунологічний статус і продуктивність рослин-хазяїв. Найбільш цікавими, на наш погляд, є захисні властивості фітопатогенних вірусів і бактерій щодо рослин-хазяїв, які можуть бути неспецифічними і виявлятись як щодо вірусів, так і щодо бактерій. Проте захисні властивості фітопатогенних вірусів і бактерій вивчено недостатньо. Раніше було показано здатність бактеріальної інфекції [1, 2], а також вбитих бактерій [3] та їхніх клітинних фракцій [4] індукувати у рослин стійкість до вірусів. Разом з тим, віруси можуть індукувати стійкість не тільки до себе самих, але й до інших патогенів [5], у тому числі й до фітопатогенних бактерій [6]. Одним з виявів стійкості рослин до вірусної та бактеріальної інфекції є реакція надчутливості (РНЧ). Вона виявляється в локалізації інфекційного агента, відмінні клітин у місцях його проникнення та блокуванні системного поширення інфекції. Якщо РНЧ певних рослин на проникнення багатьох окремих патогенів досліджено, то для змішаних інфекційних агентів її ще не вивчено. У нашій роботі досліджено вплив бактеріально-вірусної інфекції на розвиток РНЧ у листі тютюну.

**Об'єкт і методи дослідження.** У дослідах використовували три штами бактерій роду *Pseudomonas*, які є збудниками захворювань жита – *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 8281, квасолі – *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 200.2, огірків – *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 9126. Патовари відрізняються спеціалізацією – *P. syringae* pv. *atrofaciens* уражує широке коло зернових культур, *P. syringae* pv. *phaseolicola* та *P. syringae* pv. *lachrymans* є вузькоспеціалізованими патогенами. Відрізняються вони й за антигенним складом [7].

Бактерії вирощували у пробірках на картопляному агарі (КА) упродовж 24 год за температури 28°C. Для вивчення впливу ВТМ на морфологію колоній і клітин бактерій суміш бактерій-ВТМ висівали на КА. Через 24 год інкубації вивчали морфологію колоній та клітин, кількість яких збільшилась.

Реакцію надчутливості, спричинену бактеріями, здійснювали за методом [8], використовуючи рослини тютюну *Nicotiana tabacum* сорту Імунний 580, який реагує на вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) локальними некрозами, та мутанту цього сорту, для якого характерне системне поширення вірусу [9]. Оцінку РНЧ, зумовлену бактеріями, проводили за 10-балльною шкалою, наведеною в роботі [10]. Для індукції РНЧ використовували суспензію клітин фітопатогенних бактерій, суміш бактерій-ВТМ, а також сік з уражених ВТМ і вірусом бронзовості томатів (ВБТ) листя чутливого мутанта із симптомами мозаїчності (ВТМ), а також мозаїчності та суверої некротизації (ВБТ) та сік із здорового листя тютюну.

Для визначення впливу бактерій на РНЧ, викликану ВТМ, суспензію бактеріальних клітин ( $10^8$  клітин/мл) у фізіологічному розчині змішували у співвідношенні об'ємів 1 : 1 із суспензією ВТМ (10 мкг/мл). Антивірусну активність одержаної суміші через 30 хв визначали шляхом інокуляції листя рослин-індикаторів: *Nicotiana tabacum* сорт Імунний 580, *Nicotiana sanderae* та *Datura metel*. Для визначення активності ВТМ у суміші бактерії-віруси бактерії осаджували центрифугуванням за 5000 об/хв упродовж 10 хв, потім центрифугатом інокулювали індикаторні рослини. Про зміну РНЧ, індуковану ВТМ, судили за кількістю локальних некрозів. Проводили біометричну обробку одержаних результатів [11].

**Результати та їх обговорення.** Для вивчення впливу ВТМ на реакцію надчутливості на рослинах тютюну, спричинену фітопатогенними бактеріями виду *P. syringae*, проводили інокуляцію листя тютюну сумішшю бактерій-ВТМ і самими бактеріями. Реакція надчутливості, зумовлена штамами *P. syringae* pv. *Atrofaciens* 8281 і *P. syringae* pv. *lachrymans* 9126, виявлялася однаковою мірою за наявності та відсутності ВТМ. Тобто ВТМ не впливає на здатність бактерій спричинювати РНЧ.

Відомо, що під впливом будь-якої інфекції в рослинах змінюється обмін речовин і відбуваються різні зумовлені нею біохімічні процеси. Проте вплив зміни метаболізму хворої вірусінфікованої рослини на РНЧ, індуковану фітопатогенними псевдомонасами, не вивчено. Нами показано, що ін'єкція суспензії клітин фітопатогенних бактерій *P. syringae* в листі, ураженому ВТМ або ВБТ, викликає таку саму РНЧ, як і на здоровому листі тютюну. Тобто інфекційний процес в листі тютюну, спричинений вірусами, не впливає на кінцевий результат вияву РНЧ, зумовленої фітопатогенними бактеріями. Спостерігається лише деяка затримка формування некротичних зон.

Можна припустити, що механізми виникнення та перебігу РНЧ і патологічного процесу, спричинених вірусами та бактеріями, є різними. Вони не перекриваються й не перешкоджають один одному. Про те, що вірусна інфекція має свої, дещо відмінні від бактеріальної, особливості свідчать результати дослідів з рослинами тютюну сорту Імунний 580 та його нестійким до ВТМ мутантом. На ін'єкцію ВТМ надчутливі рослини реагують за типом РНЧ, а мутантні – системною інфекцією. У цей самий час фітопатогенні псевдомонаси викликають РНЧ як на рослинах сорту Імунний 580, так і на чутливих рослинах його мутанту. Для детального дослідження цього питання необхідно вивчити ці реакції в динаміці розвитку інфекційного процесу, викликаного як вірусами, так і бактеріями.

Подальше вивчення впливу вірусів на індуковану бактеріями РНЧ проводили шляхом додавання соку з листя тютюну до суспензії бактеріальних клітин. Сік із здорового листя тютюну та ураженого ВТМ, введений під

епідерміс листя цієї рослини, не спричинював РНЧ. Внесення до суспензії бактеріальних клітин соку із системно ураженого ВТМ плюну не впливало на ініціацію та перебіг РНЧ, зумовленої бактеріями. В усіх варіантах досліду РНЧ було оцінено у 9 балів. Можливо, це пов'язано з великою концентрацією бактеріальних клітин ( $10^8$  клітин/мл), яка не дозволила виявити вплив соку з уражених ВТМ рослин на розвиток РНЧ, індукованої *P. syringae*.

Дещо інші результати одержано в разі вивчення впливу соку з листя тютюну, ураженого ВБТ, на РНЧ, спричинену бактеріями. У цій серії експериментів бактерії індукували РНЧ невисокої інтенсивності (5–8 балів). Можливо, це пов'язано з особливостями ВБТ-інфекції, яка, на відміну від мозаїчної ВТМ-інфекції, є некротичною, а також погодними умовами під час проведення дослідів. Сік із здорового та ураженого ВБТ листя тютюну не спричинював РНЧ в листі тютюну сорту Імунний 580.

РНЧ, зумовлена сумішшю клітин бактерій *P. syringae* pv. *phaseolicola* 200.2 та *P. syringae* pv. *lachrymans* 9126 і соку з листя тютюну, ураженого ВБТ, була більш вираженою порівняно з РНЧ, спричиненою введенням лише суспензії клітин цих штамів. Для штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 нами спостерігалася протилежна залежність. Тобто РНЧ виявлялася інтенсивніше за інокуляції листя тютюну суспензією клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281, ніж за інокуляції сумішшю клітин і соку з листя тютюну, ураженого ВБТ (табл. 1).

Для вивчення взаємного впливу ВТМ і фітопатогенних бактерій готували суспензію однодобових клітин бактерій титром  $10^8$  клітин/мл (за стандартом каламутності) та змішували у співвідношенні за об'ємом 1 : 1 з розчином вірусу (ВТМ використано у вигляді суспензії концентрацією 10 мкг/мл). Вивчали морфологію бактеріальних клітин і вплив вірусу на виживання бактерій. Різниці в морфології клітин бактерій у присутності ВТМ та без нього нами відмічено не було.

При висіві суспензії клітин бактерій, змішаних з ВТМ, та без нього (контроль) на картопляний агар відмінності у кількості та морфології колоній, що виросли, зафіксовано не було. Тобто ВТМ не впливав на виживання та морфологію клітин і колоній досліджуваних фітопатогенних бактерій.

При дослідженні антивірусної активності бактерій було встановлено, що всі три штами знижують агресивність ВТМ (табл. 2). Антивірусна активність залежить від штаму бактерій. Найбільш активним виявився штам 9126, який пригнічував утворення некрозів, індукованих ВТМ на рослинах плюну та дурману, відповідно на 62 та 79 %.

Таблиця 1. Вплив соку з листя тютюну, ураженого ВБТ, на реакцію надчутливості цієї рослини, зумовлену бактеріями виду *P. Syringae*

Патовари <i>P. syringae</i>	Сік з листя тютюну	Реакція надчутливості	
		через 24 год	через 48 год
pv. <i>atrofaciens</i> 8281	—	Бурі водонасичені плями	9
pv. <i>lachrymans</i> 9126	—	Те саме	5–6
pv. <i>phaseolicola</i> 200.2	—	Слабкі плями	7–8
—	ВБТ	0	0
pv. <i>atrofaciens</i> 8281	ВБТ	Бурі водонасичені плями	6–7
pv. <i>lachrymans</i> 9126	ВБТ	Те саме	8–9
pv. <i>phaseolicola</i> 200.2	ВБТ	Видно площу введення на просвіт	8–9

Примітки: ВБТ – сік з листя тютюну, ураженого вірусом бронзовості томатів; “—” – ін'єкція рослин тільки бактеріями.

Для того, щоб встановити локалізацію антивірусних речовин у бактеріальній культурі, з інфекційної суміші бактерій ( $10^8$  клітин/мл) і ВТМ (10 мкг/мл) бактерії осаджували центрифугуванням (5 000 об/хв). Випробування інфекційності одержаної надосадової рідини на рослинах-індикаторах показало, що антивірусна активність зберігається в ній після видалення бактеріальної маси й суттєво не відрізняється від активності суспензії бактерій-віруси. Причому пригнічення утворення локальних некрозів, індукованих ВТМ, штамами бактерій мало місце на всіх трьох рослинах-індикаторах. Зниження вірусної активності в надосадовій рідині може бути наслідком адсорбції бактеріальними клітинами вірусів і наявності антивірусних сполук у ній. Враховуючи те, що суспензію клітин бактерій і ВТМ готували на фізіологічному розчині, який екстрагує з клітин ліпополісахариди (ЛПС), можна припустити, що ЛПС та екзополісахариди мають антивірусну активність.

Таблиця 2. Вплив *Pseudomonas syringae* на ВТМ *in vitro*

Тест-рослини	Штами бактерій	Середня кількість некрозів, шт.		Пригнічення, %
		Дослід	Контроль	
<b>Суспензія бактерій (<math>10^8</math> клітин/мл) та ВТМ (10 мкг/мл)*</b>				
<i>Nicotiana tabacum</i> , сорт Імунний 580	pv. <i>atrofaciens</i> 8281	65	143	55 ± 5
	pv. <i>lachrymans</i> 9126	54	142	62 ± 1
	pv. <i>phaseolicola</i> 200.2	103	197	48 ± 4
<i>Datura metel</i>	pv. <i>atrofaciens</i> 8281	6	11	46 ± 27
	pv. <i>lachrymans</i> 9126	7	33	79 ± 3
	pv. <i>phaseolicola</i> 200.2	18	31	42 ± 13
<b>Центрифугат суспензії **</b>				
<i>Nicotiana tabacum</i> , сорт Імунний 580	pv. <i>atrofaciens</i> 8281	8	13	39 ± 10
	pv. <i>lachrymans</i> 9126	14	35	60 ± 8
	pv. <i>phaseolicola</i> 200.2	11	36	69 ± 8
<i>Datura metel</i>	pv. <i>atrofaciens</i> 8281	0	2	100 ± 2
	pv. <i>lachrymans</i> 9126	1	3	67 ± 30
	pv. <i>phaseolicola</i> 200.2	2	3	33 ± 10
<i>Nicotiana sanderae</i>	pv. <i>atrofaciens</i> 8281	9	24	63 ± 6
	pv. <i>lachrymans</i> 9126	8	22	64 ± 29
	pv. <i>phaseolicola</i> 200.2	7	27	74 ± 10

Примітки: \* Бактеріальну суспензію ( $10^8$  клітин/мл) змішували із суспензією ВТМ (10 мкг/мл) і через 30 хв інокулювали рослини-індикатори.

\*\* Центрифугування здійснювали за 5 000 об/хв упродовж 10 хв. Інфекційність ВТМ у надосадовій рідині визначали на рослинах-індикаторах.

- Ahl P., Benjama, Samson R., Gianinazzi S. // Phytopath. z. – 1981. – Bd.102, N 2. – S. 201–212.
- Bergstrom G.C., Johnson M.C., Kuc J. // Phytopatology. – 1982. – Vol.72, N7. – P. 922–926.
- Gianinazzi S., Martin C. // Physiol. Veget. – 1976. – Vol.14, N1. – P. 133–139.
- Loebenstein G. Localization and induced resistance in virus infected plants // Ann. Rev. Phytopathol. – 1972. – Vol.10. – P. 177–206.
- Коваленко А.Г. // Итоги науки

и техники. Сер. Захиста растений. – 1983. – Т.3. – С. 91–167.

- McIntyre J.L., Dodds J.A., Hale J.D. // Phytopatology. – 1981. – Vol.71, N 3. – P. 297–301.
- Пастушенко Л.Т., Симонович И.Д. // Микробиол. журн. – 1979. – Т. 41, № 3. – С. С.22–228.
- Klement Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas* // Natura. – 1963. – Vol. 199, № 4890. – P. 299–300.
- Щербатенко И.С. // Микробиол. журн. – 1993. – Т.

55, № 1. – С. 89–101. 10. Гвоздяк Р.І., Пасичник Л.А., Ходос С.Ф., Ващенко Л.М. // Мікробіол. журн. – 2001. – Т. 63, № 6. – С. 25–31. 11. Молостов А.С.

Елементы вариационной статистики. – К., 1965

Надійшла до редколегії 18.10.04

УДК 578.85/86

О.А. Камзел, студ.,

О.В. Шевченко, канд. біол. наук,

І.Г. Будзанівська, канд. біол. наук

## ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ Х-ВІРУСУ КАРТОПЛІ В РОСЛИНАХ *SOLANUM TUBEROSUM* ПРИ ВИРОЩУВАННІ НА ГРУНТІ, КОНТАМІНОВАНОМУ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

Досліджено вплив різних концентрацій солей важких металів у ґрунті на перебіг фітовірусної інфекції. окрема та комбінована дія вірусної інфекції та важких металів призводить до зменшення вмісту сумарного хлорофілу за рахунок зменшення концентрації хлорофілу *b*. Встановлено, що іони важких металів не індукують морфологічних змін віріонів ХВК.

The influence of different concentration process of heavy metal salts in soil on phytoviral infection process has been investigated. Separate and combined influence of viral infection and heavy metal leads to decrease of general chlorophyll content due to decrease of the concentration chlorophyll *b*. It was determined that heavy metal ions do not induce any morphological alteration of PVX virions.

**Вступ.** Поширення фітовірусних інфекцій в агроценозах України набуває неконтрольованого характеру. Поряд із цим небезпеку становить хімічне забруднення довкілля, особливо важкими металами, які залучаються до кругообігу в кількостях, які значно перевищують раніше існуючі. Так, при обстеженні різних регіонів України виявлено, що в Харківській області (район Зміївської ДРС) концентрація вірусів набагато більша порівняно з менш забрудненими Київською, Одеською та Волинською. Таку саму залежність виявлено щодо важких металів (кадмій, нікель, свинець, мідь, цинк) [1, 2]. Виникла гіпотеза ймовірної синергічної взаємодії мікроелементів-полютантів і вірусних антигенів.

На сьогодні достеменно відомі як закономірності розвитку фітовірусних інфекцій, так і вплив важких металів на онтогенез рослин [3]. Але реакція рослин на спільну дію обох стресорів залишається не вивченою. У зв'язку із цим постає актуальне питання розуміння механізмів взаємодії вірусної інфекції та сполуч важких металів в організмі рослин як стресових факторів біотичної та абіотичної природи. Тому метою даної роботи було дослідження перебігу вірусної інфекції рослин у модельній системі Х-вірус картоплі – рослини *Solanum tuberosum* у присутності різних концентрацій важких металів у ґрунті.

**Матеріали та методи дослідження.** У роботі використовували модельну систему ХВК – *Solanum tuberosum*. В експерименті було задіяно інтактні рослини; рослини, які вирощувалися на контамінованому важкими металами ґрунті, інфіковані та не інфіковані вірусом; інфіковані вірусом рослини, які вирощувалися на звичайному ґрунті. Накопичення Х-вірусу картоплі здійснювали на рослинах *Nicotiana tabacum* cv. *Trapsom*. Виділення вірусу проводили методом диференційного центрифугування [4]. Важкі метали – мідь, цинк і свинець – вносилися у ґрунт прикоренево окремо у формі таких водорозчинних солей, як  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Границя допустимі концентрації (ГДК) 5, 10 та 50 було розраховано за показниками металів-полютантів у ґрунтах господарств Харківської області [4–6]. У дослідженнях використовувалися фізіологічні значення ГДК, які є більшими за стандарти ВОЗ (Cu – 100, Zn – 300, Pb – 100) [3]. Слід зазначити, що всі рослини вирощувалися в однакових умовах. Вміст сумарного хлорофілу та співвідношення концентрації хлорофілу *a* до хлорофілу *b* визначали колориметрично за допомогою диметилсульфоксиду [7]. Для визначення концентрації вірусу в дослідних рослинах застосовували непрямий імуноферментний аналіз (ІФА) [8, 9]. Морфологічні властивості вірусу досліджували методом трансмісивної електронної мікроскопії шляхом негативного контрастування [10].

**Результати та обговорення.** При візуальному дослідженні динаміки появи вірусіндукованих симптомів ураження рослин було виявлено, що в інфікованих Х-вірусом картоплі контрольних рослинах симптоми з'явилися на 14-й день після інфікування, що відповідає лі-

тературним даним [1]. Вірусіндуковані симптоми характеризувалися розвитком помірної мозаїки листків. Рослини, які вирощувалися на контамінованому важкими металами ґрунті, виявляли симптоми вірусного ураження значно пізніше. Розвиток вірусоспецифічних симптомів спостерігався лише на 21-й день після інфікування. Інтенсивність вияву симптомів різнилася залежно від концентрації металів. Наприклад, внесення будь-якого з важких металів у концентрації 10 ГДК призводило до розвитку більш суверої мозаїки молодих листків порівняно з рослинами, які зростали на ґрунті з додаванням 5 ГДК важких металів. Листки також мали менший розмір, були скрученими та значною мірою деформованими, що особливо характерно для інфікованих рослин, які оброблялись цинком і міддю.

Для контролю фізіологічного стану рослинного організму проводилися дослідження вмісту хлорофілу. В інфікованих рослин на початкових етапах вірусна інфекція індукувала незначне підвищення рівня хлорофілу, надалі під впливом вірусної інфекції концентрація сумарного хлорофілу зменшувалася. Сумісний вплив вірусної інфекції та важких металів також індукував зменшення вмісту сумарного хлорофілу. Як показали розрахунки, це відбувається внаслідок зниження концентрації хлорофілу *b*.

У результаті аналізу накопичення Х-вірусу в рослинах картоплі було показано, що вірусіндуковані рослини, вирощені без додавання важких металів у ґрунт, максимально накопичували Х-вірус картоплі на 14–21-шу добу після інфікування. Концентрація вірусу становила 25 мкг/г тканини. Внесення міді, цинку та свинцю в концентрації 5 ГДК призводило до більш значного накопичення ХВК дослідними рослинами. Зокрема, контамінація свинцем індукувала збільшення концентрації вірусу в 1,3 рази, міді – у 1,4, а цинку – у 1,6 рази порівняно з контролем (рис. 1).

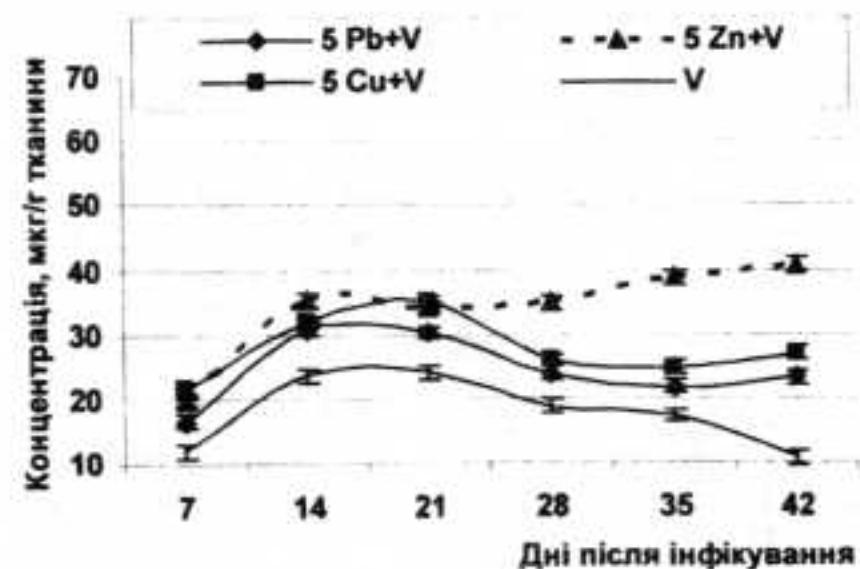


Рис. 1. Зміна концентрації ХВК із часом у рослинах *S. tuberosum* L., які вирощувалися у ґрунті з додаванням важких металів у концентрації 5 ГДК (V – вірусна інфекція)

© О.А. Камзел, О.В. Шевченко, І.Г. Будзанівська, 2005

При внесенні міді та цинку в концентрації 10 ГДК вміст ХВК у дослідних рослинах перевищував значення контрольних інфікованих рослин у 2,5 рази. Цікавим є те, що при внесенні 10 ГДК свинцю суттєвої різниці щодо накопичення вірусу порівняно з інфікованими рослинами, які зростали на ґрунті, контамінованому 5 та 50 ГДК важких металів, не відмічалося. Згідно з літературними даними, це явище можна пояснити тим, що свинець є малорухомим металом як у ґрунті, так і по провідних системах рослини [5] (рис.2).

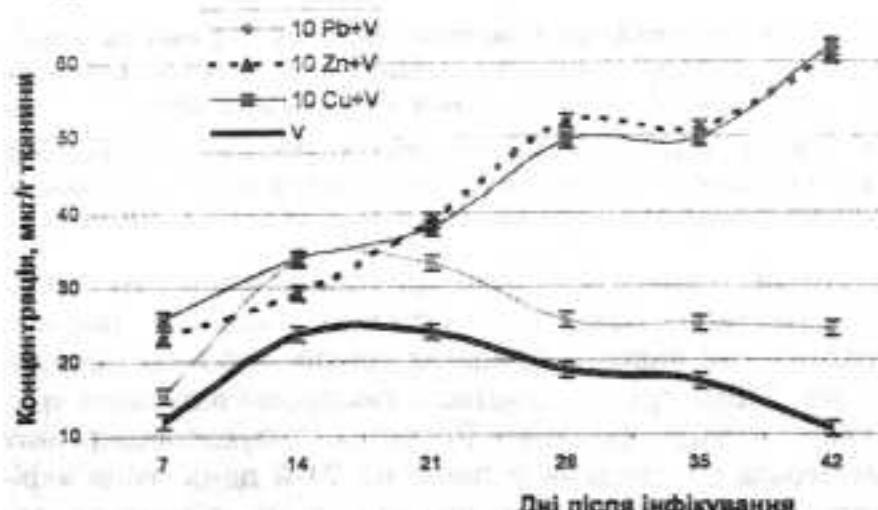


Рис. 2. Зміна концентрації ХВК із часом у рослинах *S. tuberosum* L., які вирощувалися у ґрунті з додаванням важких металів у концентрації 10 ГДК. Позначення: V – вірусна інфекція

Надвисокі концентрації дослідних металів у ґрунті (50 ГДК) не індукували інтенсивного накопичення ХВК дослідними рослинами. З'явилось припущення можливості антагоністичного впливу важких металів на вірусні частинки. Суть механізму може полягати в адсорбції іонів металів на специфічних сайтах субодиниць капсидного білка вірусу [10, 11], а також неможливістю репро-

дукції вірусу в рослині з пригніченим фізіологічним станом.

З метою вивчення можливого впливу високих концентрацій важких металів у рослині на морфологію віріонів ХВК проводився електронно-мікроскопічний аналіз даного вірусу. Було показано, що високий вміст свинцю, міді чи цинку в рослинах не впливає на морфологічні властивості вірусних частинок. Віріони ХВК характеризувалися типовою морфологією та розмірами ( $515 (\pm 3) \times 13 (\pm 1)$  нм).

**Висновки.** Показано, що розвиток вірусоспецифічних симптомів, індукованих ХВК, уповільнюється за наявності у ґрунті високих концентрацій важких металів. Високі концентрації важких металів індукують розвиток більш суворих симптомів інфікованих рослин. Вияв симптомів спостерігається у вигляді деформації листків порівняно з контрольними рослинами. Рослини *Solanum tuberosum*, які зростають на контамінованому важкими металами (мідлю та цинком за 10 ГДК) ґрунті, більш інтенсивно накопичують Х-вірус картоплі, ніж інфіковані, але не контаміновані металами. окрема та комбінована дія вірусної інфекції та важких металів призводить до зменшення вмісту сумарного хлорофілу за рахунок зменшення концентрації хлорофілу b. Встановлено, що іони важких металів не індукують морфологічних змін віріонів ХВК.

- Моніторинг вірусних інфекцій рослин в агроценозах України / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, В.П. Рижук та ін. – К., 2001.
- Шевченко О.В., Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П. та ін. // Агроном. журн. – 2002. – Спецвип. – С. 62–72.
- Kabbata-Pendias A., Pendias H. Trace elements in soils and plants. – Boca Raton, 1986.
- Bonnet M., Camares O., Veisseire P. // J. Exp. Bot. – 2000. – Vol.51, N.348. – P. 945–953.
- Кабата-Пендіас А., Пендіас Х. Мікроелементи в почвах і растеннях. – М., 1989.
- Weilum A.R. // J. Plant Physiol. – 1994. – Vol.144. – P. 307–313.
- Crowther J.R. ELISA. Theory and practice. – N.Y., 1995.
- Антитела. Методы: В 2 т. / Под ред. Д. Кэтти. – М., 1991.
- Гуральчук Ж.З. // Физиология и биохимия культур. растений. – 1994. – Т.36, №2. – С.С.107–117.
- Nedoluzhko A., Douglas T. // J. Inorganic Chem. – 2001. – Vol.84. – P. 233–240.
- Hill S.A. Methods in plant virology. – Oxford, 1984.

Надійшла до редакції 04.11.04

УДК 576.858:632

Л.П. Коломієць, канд. біол. наук

## КОНТРОЛЬ ФІТОПАТОГЕННИХ ВІРУСІВ В АГРОЕКОСИСТЕМАХ УКРАЇНИ

Досліджено склад популяції вірусів картоплі в зоні Полісся України. Показано суттєву роль штаму вірусу в перебігу інфекції та необхідність вивчення штамового складу поширеніх у регіоні патогенів для об'єктивної оцінки розвитку вірусних інфекцій в агроценозах.

Composition of potato virus population in Ukraine Polissya have been researched. The important role of the virus strain in infection process and necessity of the strain composition research for the objective evaluation of virus infections in certain agroecosystems have been shown.

**Вступ.** Контроль фітопатогенних вірусів є невід'ємною складовою рослинництва на всіх етапах створення й вирощування сортів сільськогосподарських культур, що включає визначення ступеня поширеності захворювань, складу популяції патогенів, розробку заходів щодо обмеження їх розповсюдження й шкідливої дії, а також методів і засобів діагностики.

Однією з найбільш популярних сільськогосподарських культур в Україні є картопля, завдяки її широкому використанню як продукту харчування, корму для тварин, сировини для переробної промисловості. Найбільші площи ця культура займає в зоні Полісся, агрокліматична та ґрунтована характеристика якої відповідає біологічним потребам культури. Урожайність бульб за останні 15 років становила в середньому 120 ц/га, з великими коливаннями по роках, що у два–три рази нижче потенційних можливостей культури [1]. В останні роки відмічається обвальне падіння врожаю до 82,7 ц/га [2].

Урожайні властивості бульб зумовлені фенотипічною мінливістю, мають модифікаційний характер і залежать від впливу на них кліматичних і метеорологічних факторів, агротехніки, технології насінництва та збудників хвороб.

На картоплі паразитують більше 76 видів мікроорганізмів. Велика кількість різних патогенів викликає необхідність виділити найважливіші з них щодо частоти появи, швидкості, можливостей хімічного захисту від них, здатності передаватися наступному поколінню, економічних витрат на селекційну роботу, спрямовану на створення відповідної стійкості [3]. Серед численних хвороб картоплі вірусні є найбільш поширеними. Втрати врожаю внаслідок вірусного ураження коливаються у великих межах: від достовірних відмінностей порівняно із здоровими до майже повної втрати товарного врожаю. Крім того, погіршується якість бульб – знижується вміст білка, крохмалю, а також товарність.

Вірусні хвороби поширені у всіх державах і регіонах, де вирощується картопля. Проте видовий склад і ступінь ураженості є різними залежно від природних і господарських умов, сортів картоплі та стану насінництва. Більшість з описаних вірусів картоплі в Україні не вивчались.

Мета проведених досліджень – визначення складу популяції вірусів, що вражають картоплю в північних районах Лівобережного Полісся України, отримання базових даних для розробки пропозицій, рекомендацій, заходів щодо підвищення продуктивності культури та поліпшення фітосанітарного стану даної агроекосистеми.

**Об'єкт і матеріали дослідження.** Об'єкт проведених досліджень – популяція вірусів-збудників хвороб картоплі, поширені у природних умовах Північного Полісся.

При виконанні робіт вихідним матеріалом для виділення вірусів служили ізоляти, відібрані в польових умовах при обстеженні посівів картоплі. Використовували комплекс діагностичних методів: симптоматології, імунології, електронної мікроскопії, рослин-індикаторів. Інфікували рослини методом механічної інокуляції та з використанням попелиць. Для виділення штамів застосовували існуючі та розроблені авторами методики. Досліди проводили в умовах вегетаційних кімнат і польових ділянок, керуючись в останньому випадку методикою польового досліду [4].

**Результати та їх обговорення.** Результати вірусологічного обстеження насаджень картоплі в зоні Полісся України загалом свідчать про високий природний інфекційний фон у даній агроекосистемі, який сформувався протягом багатьох років насичення сівоземін посівами картоплі. 94 % обстежених сортів, вирощених у польових умовах, уражені вірусами. При цьому ступінь ураженості сортозразка становить 5–100 %.

Виділені у природних умовах та ідентифіковані: M-вірус картоплі (MBK, potato virus M), Y-вірус картоплі (YBK, potato virus Y), X-вірус картоплі (XBK, potato virus X), S-вірус картоплі (SBK, potato virus S), вірус скручування листя картоплі (BСЛК, Potato leafroll virus), F-вірус картоплі (FBK, potato aucuba mosaic virus), A-вірус картоплі (ABK, potato virus A), ратл-вірус (RBK, tobacco rattle virus).

Превалують у посівах MBK у моноінфекції чи в комплексі з іншими мозаїчними вірусами (64 % обстежених зразків), набуває все більш значного поширення YBK груп звичайних і некротичних штамів. Скручування листя виявлено в 0,5–2,0 % зразків. Невизначені в Україні залишається рівень розповсюдження FBK, ABK та RBK, представника так званих "ґрунтових вірусів", поширеність яких у нашій державі теж не вивчено.

Нами проводяться дослідження в цьому напрямку. Для контролю природного інфекційного фону ми застосували тест-ділянки серед посівів картоплі та огорожин, на яких висаджували набір рослин-індикаторів. Рослини цих самих партій паралельно вирощували в ізольованих умовах у вегетаційних приміщеннях з метою виключення невстановленої насінної інфекції. У середньому 90 % індикаторних рослин виявили симптоми вірусного ураження, з них виділено віруси MBK, YBK, ABK. Упродовж вегетації тест-рослини не були колонізовані попелицями. Тобто у природному середовищі є резерватори інфекції та активні вектори, що переносять означені віруси за неперsistентним типом передачі з високим ступенем ефективності.

Рослини 15 % обстежених сортозразків демонструють симптоми неідентифікованої інфекції – у загальній картині вірусного ураження не виявлено віруси, які вже ідентифіковані в регіоні. Виходячи з того, що у світовій практиці виявлено близько 40 вірусів картоплі [5–9], ми не вважаємо вичерпними отримані дані щодо складу їх популяції. Продовжується дослідження виділених ізолятів, відібраних зразків для аналізу. Ця робота значно ускладнюється відсутністю в Україні засобів діагностики переважної більшості фітопатогенних вірусів.

Відносно виділених у регіоні вірусів проведено дослідження штамового складу. Виділені штами різної патогенності MBK і XBK, штами YBK, віднесені до груп звичайних і некротичних штамів.

Вивчення впливу на рослини картоплі штамів MBK різної патогенності проводили в умовах теплиці та польової дослідної ділянки. Механічно заражали по 20 рослин картоплі штамами MBK різної патогенності. Контролем слугували здорові неінокульовані рослини пробіркової культури сорту Приєксульська рання.

Встановили, що в рік інокуляції на рослинах картоплі не розвивалися симптоми ураження MBK. У бульбовому поколінні інокульованих рослин у варіанті зараження сильнопатогенным штамом (M200) в рослин спостерігалося закручування, подрібненість, просвітлення жилок листків, відставання рослин у рості. Симптоми інфекції починали виявлятися в першій бульбовій репродукції, у наступних. У варіанті зараження слабопатогенным штамом (M139) в рослин не відмічалися симптоми, вони не відрізнялися зовні від здорових у семи бульбових репродукціях (термін спостереження), і врожай не знижувався порівняно з контролем.

Протягом дослідження відмічалося достовірне підвищення врожаю у варіанті зараження M139 на 23,5–36,6 % і суттєве зниження – на 16,4–66,6 % у варіанті зараження сильнопатогенным штамом M200 порівняно з неінокульованими контрольними рослинами (див.табл.).

З подовженням терміну культивування відбувалося перезараження рослин контрольного варіанта MBK – виявлено 85,3 % інфікованих рослин у шостій бульбовій репродукції. Причому йде перезараження матеріалу штамами різної патогенності, як показали аналізи, проведені з використанням рослин-індикаторів.

#### Вплив M-вірусу картоплі на врожай картоплі сорту Приєксульська рання

Варіант досліду	Врожай, г/кущ	Різниця до контролю, %
<b>Третя бульбова репродукція (теплиця)</b>		
Контроль	77,5	-
Зараження M139	75,9	-2,1
Зараження M200	17,0	-66,6
HCP05	35,9	
<b>Четверта бульбова репродукція (поле)</b>		
Контроль	718,2	-
Зараження M139	979,7	+36,6
Зараження M200	404,0	-43,1
HCP05	35,0	
<b>П'ята бульбова репродукція (поле)</b>		
Контроль	194,8	-
Зараження M139	251,4	+29,1
Зараження M200	162,8	-16,4
HCP05	20,0	
<b>Сьома бульбова репродукція (поле)</b>		
Контроль	234,7	-
Зараження M139	289,8	+23,5
Зараження M200	-	
HCP05	14,0	

Примітка: M139 – слабопатогений штам MBK; M200 – патогений штам MBK.

Було встановлено існування перехресного захисту між штамами MBK: проведені модельні досліди на рослинах томату чилійського показали, що зараження рослин слабопатогенным штамом M захищає їх від патогенного штаму цього вірусу за інтервалу між інокуляціями 15–30 діб і рівня протекції 93–97 %. У серії польових дослідів встановлено, що присутність у рослинах картоплі (використані сорти Приєксульська рання, Невська, Луговська) слабопатогенного штаму MBK ефективно захищає від патогенних форм цього вірусу в польових умовах і тим самим зберігає 22–24 % врожаю.

Встановлено також ефективність спільногого застосування слабопатогенних штамів і біологічно активних речовин, як специфічних і неспецифічних індукторів вірусостійкості. Виявлено різницю в реакціях томату чилійського при зараженні штамами MBK і SBK ми скористались при вивченні взаємовідносин цих вірусів у складі комплексної інфекції. Рослини томату чилійського заражали механічно у фазі двох справжніх листків слабопатогенным штамом SBK, а потім інокульювали слабо- і сильнопатогенними штамами MBK з інтервалом 1, 6, 9, 15, 19, 23, 30 діб після першої інокуляції. У

результаті дослідження у всіх рослинах було виявлено MBK і SBK. У варіанті, де повторна інокуляція проводилася слабопатогенним штамом MBK, рослини виявляли слабкі симптоми зараження SBK – могло спостерігатись слабке закручування листків. У варіанті, де повторна інокуляція проводилась сильнопатогенним штамом MBK, мало місце послаблення характерних симптомів або повна відсутність симптомів сильнопатогенного штаму MBK, що спостерігалося в інтервалі між інокуляціями в дев'ять діб, потім посилюючись.

Таким чином, на рослинах томату чилійського відмічалася інтерференція між SBK і MBK. Ці досліди доповнили результати спостережень за рослинами картоплі, інфікованими комплексом MBK (сильнопатогенний штам) і SBK, коли відмічали послаблення симптомів MBK.

В умовах модельних, вегетаційних і польових дослідів виявлено також, що суміш слабопатогенних штамів XBK та MBK не викликає симптомів захворювання і не знижує врожай уражених сортів порівняно з контрольними рослинами цих сортів, а присутність слабопатогенних штамів XBK і MBK у складі змішаної інфекції з патогенними формами інших вірусів послаблює їх патогенну дію.

Ураженість рослин хворобами і відповідно стійкість до інфекції значною мірою зумовлено генетично: для кожного сорту характерні специфічні віруси або їхня комплексна інфекція. При обстеженні виділяються толерантні та обмежено толерантні до вірусної інфекції сорти (Асплія, Бородянська рожева, Бриліант, Брянська рання, Галичанка, Дзвін, Ізоля, Конкорд, Латона, Маріс Бард, Незабудка, Нікіта, Ольвія, Пост 86, Пролісок, Ракурс, Ресурс, Самара, Санте, Слава, Строма, Тімате та ін.), в яких відбувається зараження вірусом, значне накопичення патогену, але продуктивність рослин при цьому не знижується або втрачається незначною мірою. Рослини із цим типом стійкості таким чином сприяють накопиченню інфекції в агроекосистемі.

Ми провели дослідження щодо визначення патогенності ізолятів MBK, виділених з толерантних сортів картоплі (за 100 %-ної ураженості посіву) з використанням тест-рослин, і встановили різну їхню патогенність з переважанням слабопатогенних (60 % досліджених зразків).

Отримані результати демонструють суттєву роль штаму вірусу в перебігу інфекції, що зумовлює необхідність вивчення штамового складу поширеніх у регіоні патогенів для об'єктивної оцінки розвитку вірусних інфекцій в агроценозах.

Штами вірусів, ізоляти та аномальні патоформи, що потребують додаткового аналізу з метою ідентифікації збудників і подальшої розробки методів їх діагностики, виділені у природних умовах Полісся, підтримуються в теплицях.

Для вивчення й практичного використання вірусів рослин необхідні надійні методи збереження та підтримання виділених зразків. У лабораторії колекційний матеріал зберігається в бульбах картоплі, насінні уражених рослин, ліофілізованому та гербарному матеріалі. Нами розроблено методику, за якою віруси картоплі містяться в росли-

нах пробіркової культурі і яка забезпечує стабільність характеристик зразків і підтримання їх в активному стані. Матеріал використовується при виконанні дослідницьких і прикладних робіт.

**Висновки.** У природних умовах північних районів Лівобережного Полісся України виділено та ідентифіковано: M-вірус картоплі (MBK, potato virus M), Y-вірус картоплі (YBK, potato virus Y), X-вірус картоплі (XBK, potato virus X), S-вірус картоплі (SBK, potato virus S), вірус скручування листя картоплі (BCLK, potato leafroll virus), F-вірус картоплі (FBK, potato aucuba mosaic virus), A-вірус картоплі (ABK, potato virus A), ратл-вірус (PBK, tobacco rattle virus). Продовження досліджень виділених ізолятів, відбір зразків для аналізу значно ускладнено відсутністю в Україні засобів діагностики переважної більшості фітопатогенних вірусів.

Проведено вивчення штамового складу виділених у регіоні вірусів. Виділено штами різної патогенності MBK та XBK, штами YBK, віднесені до груп звичайних і некротичних штамів.

Встановлено перехресний захист між штамами MBK: проведені модельні досліди на рослинах томату чилійського показали, що зараження рослин слабопатогенним штамом M захищає їх від патогенного штаму цього вірусу за інтервалу між інокуляціями 15–30 діб і рівня протекції 93–97 %. У серії польових дослідів показано, що присутність у рослинах картоплі слабопатогенного штаму MBK ефективно захищає від патогенних форм цього вірусу в польових умовах і тим самим зберігає 22–24 % врожаю, суміш слабопатогенних штамів XBK та MBK не викликає симптомів захворювання і не знижує врожаю уражених сортів порівняно з контрольними рослинами цих сортів, а присутність слабопатогенних штамів XBK, MBK і SBK у складі змішаної інфекції з патогенними формами інших вірусів послаблює їх патогенну дію.

Отримані результати свідчать про суттєву роль штаму вірусу в перебігу інфекції й наголошують на необхідності вивчення штамового складу поширеніх у регіоні патогенів для об'єктивної оцінки розвитку вірусних інфекцій в агроценозах. Штами вірусів, ізоляти та аномальні патоформи, що потребують додаткового аналізу з метою ідентифікації збудників і подальшої розробки методів їх діагностики, виділені у природних умовах Полісся, підтримуються у теплицях. Колекція вірусів рослин має велике практичне значення у зв'язку з розробкою та виробництвом імунодіагностикумів.

1. Молоцький М. // Картофляр. – 2000. – №2. – С.10.
2. Картофля / За ред. В.В. Кононенко. – К., 2003.
3. Куценко В.С. Картофля. Хвороби і шкідники. – К., 2003.
4. Зыкин А.Г. Вирусные болезни картофеля. – Л., 1976.
5. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М., 1988.
6. Анисимов Б.В. // Картофель и сорта. – 2003. – №7. – С.25–28.
7. Картофель: селекция, семеноводство, технология возделывания / П.И.Альсмик, В.С.Шевелуха, Х.Ортель и др. – Минск, 1988.
8. Potato diseases: diseases, pest and defects // Ed. by D.E. van der Zaag. – Wageningen, 1996.
9. Struik H.C., Wiersema S.G. Seed potato technology. – Wageningen, 1999.
10. Paul Khurana S.M., Shekhawat G.S., Singh B.P., Pandey S.K. Potato: global research and development. – Shimla, 2000.

Надійшла до редактора 22.10.04

УДК [578.85/86+57.085.2]:632.9

Т.А. Компанець, канд. біол. наук

## ВІРУСНІ ХВОРОБИ ГЕРБЕРИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ОТРИМАННЯ ЇЇ БЕЗВІРУСНОГО ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ

Виявлено не описаний раніше на гербери вірус. Модифіковано технологію культивування *in vitro*, клонального мікророзмноження та укорінення рослин гербери. Створено нові модифікації поживного середовища.

Was revealed undocumented earlier on gerbera virus. Technologies for *in vitro* cultivation, clonal micropagation and implanting of gerbera plants have been. New modifications of nutrient medium have been developed for this culture.

**Вступ.** Одним з факторів, що обмежує продуктивність і розвиток декоративно-квіткових культур, є фітоінфекції, які викликають погіршення декоратив-

них якостей та фізіологічного стану рослин, що в кінцевому рахунку призводить до значних економічних збитків, а саме – до зниження врожаю на 40–70 % [1].

У країнах з розвиненим квітникарством, таких як Голландія та Польща, за площею вирощування гебера посідає друге місце після гвоздики [2]. Інтерес до цієї культури зумовлено її високою прибутковістю, адже вона цвіте упродовж усього року і довго зберігається у зрізаному вигляді.

Серед хвороб гербери найбільш шкідливими є вірусні та грибні. Проблема ураження гербери фітовірусами є особливо актуальною з огляду на те, що це багаторічна рослина, яку розмножують вегетативно, при цьому збудник, як правило, передається новій рослині.

Більшість методів захисту рослин від фітопатогенних вірусів виявляють опосередковану дію й орієнтовані на скорочення резервуарів інфекції, обмеження розповсюдження вірусів переносниками та зменшення шкідливого впливу віrusу на рослину через підвищення стійкості рослин до цих патогенів, виведення вірусостійких сортів, а також отримання посадкового матеріалу на безвірусній основі. Унаслідок внутрішньоклітинного паразитизму вірусів найбільш ефективними є біотехнологічні прийоми звільнення рослин від цих патогенів з подальшим культивуванням у захищених від повторного інфікування умовах. Для цього застосовується метод культури тканин *in vitro*, що лежить в основі клонального мікророзмноження рослин, а також відкриває широкі можливості для боротьби з фітовірусними інфекціями.

У зв'язку з економічною перспективністю культури гербери метою досліджень було обстеження її промислових насаджень, виявлення та ідентифікація збудників вірусних хвороб і розробка можливих шляхів отримання безвірусного посадкового матеріалу цієї культури.

**Матеріали та методи.** Для виявлення та ідентифікації вірусів на рослинах гербери в умовах промислового вирощування ми застосовували непрямий метод імуноферментного аналізу [3] та трансмісивну електронну мікроскопію [4]. Для отримання асептичної культури гербери *in vitro* використовували квіткові бруньки рослин сортів Роулетта та Циган, в яких методом ІФА віруси не виявлялися. Стерилізацію первинних експлантів проводили шляхом послідовної обробки хлораміном, тимерасалом та етанолом за розробленою нами схемою. Культивування тканин *in vitro* здійснювали на модифікованих поживних середовищах Мурасіге-Скуга (МС), що містили повну і половинну концентрацію макросолей, а також макросолі МС в поєднанні з мікросолями Хеллера [5]. Експланти культивували за температури 23°C і 16-годинного фотoperіоду. Періодичність субкультивування становила три-шість тижнів. Для дослідження процесів морфогенезу в поживне середовище додавали фітогормони БАП, ІОК, НОК.

**Результати та їх обговорення.** При обстеженні промислових насаджень гербери нами було виявлено віруси плямистого в'янення томатів і тютюнової мозаїки, описані на гербери раніше, а також не описаний на цій культурі вірус – нитковидні вірусні частинки довжиною близько 705 нм, співвідношення довжини та ширини віріону – 54,44 ± 0,01. Зразки рослинного матеріалу, в яких було виявлено цей вірус у реакції ІФА, реагували із сироваткою до Y-вірусу картоплі. Молекулярна маса єдиного структурного білка цього вірусу становить 36 ± 0,5 кДа.

Біотехнологічний процес отримання та вирощування безвірусного посадкового матеріалу є багатостадійним. На першому етапі ми проводили пошук здорових рослин, які б могли бути використані для подальшої мультиплікації. Рослини без зовнішніх симптомів ураження перевіряли на вірусносійство методами ІФА та електронної мікроскопії. Для введення гербери в культуру *in vitro* ми використовували квіткові бруньки рослин, що не давали позитивної реакції на виявлення вірусів мето-

дом ІФА. Використовуючи диски з листкової пластиинки, нам вдалося отримати калюс, проте регенерації рослинного організму із цього калюсу не відбувалось. Експериментальним шляхом нами було підібрано оптимальні умови стерилізації квіткових бруньок гербери, які полягали у послідовній стерилізації в розчинах 1 %-ного хлораміну, 1 %-ного тимерасалу та 70 %-ного етанолу. Після стерилізації для звільнення від ендогенних фітогормонів експланти висаджували на живильне середовище, позбавлене регуляторів росту, а через 7–10 діб субкультивували життєздатні, не контаміновані мікрофлорою – на повноцінне середовище.

Слід зазначити, що суттєву роль у процесі введення гербери в культуру *in vitro* відіграє пора року, коли проводиться відбір первинних експлантів. У наших експериментах найкращим виявився період з кінця жовтня до початку січня. Можливо, це пояснюється природними геокліматичними умовами зростання цієї культури, а саме тим, що на цей час припадає весняно-літній період південної півкулі.

На наступному етапі нашої роботи експериментально було визначено умови індукції проліферації калюсу з наступним формуванням цілого рослинного організму. Оскільки регенерація та клональне мікророзмноження рослин гербери дещо ускладнено через відмінності морфогенетичної реакції різних її сортів на склад поживного середовища та співвідношення регуляторів росту – ці умови для кожного сорту доводиться підбирати окремо. У своїх дослідженнях за основу всіх модифікацій ми використовували середовище МС, яке, за літературними даними, найчастіше використовується для інших культур. Змінюючи концентрацію та співвідношення мінеральних солей, а також вітамінів і регуляторів росту, ми оцінювали ефективність кожної модифікації за здатністю індукувати регенерацію рослин, за швидкістю регенерації та морфологією отриманих регенерантів. Серед усіх перевірених модифікацій нами було відібрано чотири основні (див.табл.).

Склад підібраних поживних середовищ для культивування гербери *in vitro*

Компоненти	Концентрація компонентів поживного середовища, мг/л			
	1	2	3	4
Макроелементи	MS	½ MS	MS	MS
Мікроелементи	MS	MS	MS	Хеллера
Хелатоване залізо	MS	MS	MS	MS
Сахароза	30000	30000	45000	30000
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	85	-
Аденінсульфат	10	10	10	10
Гліцин	10	10	10	10
Мезоінозитол	100	100	100	100
Tіамін-HCl	500	500	30	10
Піридоксин-HCl	125	125	10	10
Нікотинамід	250	250	10	-
Кальцію D (+) пантотенат	250	250	-	-
Холінхлорид	125	125	-	-
р-Амінобензонат	25	25	-	-
Біотин	2,5	2,5	2,5	2,5
Ціанокобаламін	2,5	2,5	-	-
БАП	5	5	10	10
ІОК	-	-	0,5	-
НОК	0,1	0,3	-	1
Агар	7000	7000	7000	7000
pH	5,5	5,5	5,5	5,5

Найкращим, на нашу думку, було середовище № 2, термін регенерації рослин на якому був найменшим і становив два–три тижні. Також нами було визначено максимальний термін культивування калюсної тканини

в наших модифікаціях поживного середовища – 11–12 місяців. Адже за тривалого багатократного субкультурування калюсної тканини в її клітинах накопичується цитогенетична мінливість, яка призводить до втрати здатності пагоно- та коренеутворення [5]. Разом з тим, відомо, що високі концентрації фітогормонів впливають на морфофізіологічні особливості рослин, зокрема, на підвищення концентрації цитокінів може спричинити збільшення частоти виникнення хромосомних аберацій і виникнення аномальних пагонів [6].

Укорінення рослин-регенерантів гербери ми проводили на поживному середовищі, яке відрізнялося від стандартного підвищеною концентрацією сахарози та НОК. На цьому середовищі формування нормальної кореневої системи відбувалось за два–три тижні.

Таким чином, нами було досліджено коло вірусів, які циркулюють на рослинах гербери в тепличних господарствах м. Києва та Київської області, що дало змогу

УДК 578.28/86

виявити неописаний раніше на гербери вірус з родини *Potyviridae*. Підібрано умови отримання асептичної культури гербери *in vitro*, які передбачають час відбору первинних експлантів, а також умови їх стерилізації. Модифіковано склад поживного середовища для культивування гербери *in vitro* за рахунок зміни концентрації та співвідношення мінеральних компонентів і регуляторів росту, що дозволило прискорити процес мікроклонального розмноження цієї культури.

1. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2001. – № 35. – С. 47–53.
2. Френкіна Т. // Цветоводство. – 2000. – № 6. – С. 6.
3. Гнотова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М., 1993.
4. Салтига Ю.Т., Снітинський В.В. Електронна мікроскопія біологічних об'єктів. – Львів, 1999.
5. Калинин Ф.Л., Кушнір Г.П., Сарнацкая В.В. Технологія мікроклонального размноження растений. – К., 1992.
6. Мелик-Саркісов О.С., Чережанова Л.В., Овчинникова В.Н. // Сельськогосп. біологія. – 1994. – № 1. – С. 69–73.

Надійшла до редакції 22.10.04.

О.Г. Коваленко, д-р біол. наук, В.В. Шепелевич, асп.,  
Т.А. Телегесева, інж.

## ВИЯВЛЕННЯ ГЛІКОКОН'ЮГАТИВ СПЕЦІФІЧНИХ ДО КОНКАНАВАЛІН А, В АПОПЛАСТІ ЛИСТЯ ТЮТЮНУ, ЗДОРОВОГО ТА УРАЖЕНОГО ВІРУСОМ БРОНЗОВОСТІ ТОМАТІВ

Досліджено кількісні та якісні зміни вмісту білків і вуглеводів в апопласті здорового та ураженого вірусом бронзовості томатів (ВБТ) листя тютюну. У дослідних рослинах на шосту добу в міжклітинній рідині спостерігалися зростання як білків, так і вуглеводів, а також появу нового хроматографічного компонента в білок-вуглеводневому комплексі рослин, здатного до взаємодії з конканаваліном А. Встановлено, що цей компонент пригнічує інфекційність віrusу тютюнової мозайки (ВТМ) в рослинах дурману та накопичення віrusу у тканинах тютюну.

*It was investigated qualitative and quantitative changes of proteins and carbohydrates in apoplast of normal tobacco leaves and infected with tomato spotted wilt virus (TSWV). At 6<sup>th</sup> day in intercellular liquid of investigated plants it was observed increasing of contents of proteins and carbohydrates. It was also observed showing up of new chromatographic component in protein-carbohydrate complex of plant, which was capable to interchange with concanavalin A. It was found that this component depresses infectiousness of tobacco mosaic virus (TMV) in *Datura stramonium* plants, and also accumulation of virus in tissues of tobacco plant.*

**Вступ.** Теоретичною основою селекції стійких до вірусів форм рослин є знання захисних механізмів природної та індукованої вірусостійкості. Відомо, що в надчутливих рослинах, інфікованих вірусом, завдяки активації захисних механізмів вірус локалізується в місцях його проникнення й формується індукована вірусостійкість тканини до повторної інфекції [1, 2]. Важливу роль у цьому процесі відіграють білки й вуглеводи [3, 4]. У нашій лабораторії раніше було встановлено, що в надчутливих рослинах тютюну, уражених вірусом тютюнової мозайки (ВТМ), на ранніх стадіях інфекції поряд з кількісним зростанням накопичення білків і вуглеводів, переважно в апопласті, спостерігається і якісні зміни, що виражуються в утворенні двох додаткових вуглеводмісних біополімерів, відсутніх у контролі.

Стосовно інфекції, викликаної вірусом бронзовості томатів (ВБТ) у тютюну та інших рослин, відомо, що, хоч локалізації вірусної інфекції не має місця, формується неспецифічна системна індукована вірусостійкість, ефективна також щодо ВТМ [5, 6]. Отже, важливо було дослідити кількісні та якісні зміни вмісту розчинних білків і вуглеводів в апопласті листя тютюну, інфікованого ВБТ.

**Об'єкт і методи дослідження.** У роботі використовували високовірulentний ізолят ВБТ, виділений з плантації тютюну Кримської дослідної станції тютюництва, як тест-вірус використовували звичайний штам U1 ВТМ. Досліди проводили на рослинах тютюну сорту Імунний 580. Для визначення антивірусної активності виділених фракцій використовували рослини *Datura stramonium*, надчутливі до ВТМ, а також диски з листя тютюну сорту Імунний 580, чутливого до цього вірусу. Дослідні рослини інокулювали ВБТ у гліцин-сульфіт-магнієвому (ГСМ) буфері (концентрація 0,1 моль/л (0,1 моль/л гліцин, 0,01 моль/л MgCl<sub>2</sub> x

6H<sub>2</sub>O, 0,01 моль/л Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), pH 8,0. Контрольні рослини обробляли в такий самий спосіб буфером за відсутності віrusу. Листя уражених і здорових рослин для аналізів відбирали через 3, 6, 9, 12 та 20 днів після інокуляції. Міжклітинну рідину (МР) з листя отримували після інфільтрації його ГСМ-буфером, що містив 1 моль/л NaCl, та наступного центрифугування у спеціальних пробірках за  $6 \cdot 10^3$  об/хв упродовж 15 хв. МР ліофільно висушували. В отриманих препаратах визначали вміст білків за [7], вуглеводів – за реакцією з 0,2 %-ним анtronом, розчиненим у концентрованій H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Високомолекулярні фракції білків і вуглеводів з МР виділяли за допомогою гель-фільтрації колонки (10 x 30 см) з біогелем P-10, урівноважених з фосфатним буфером (0,1 моль/л), що містив 0,15 моль/л NaCl (ФБС). Згадану фракцію збирали і піддавали афінній хроматографії на колонці (1,2 x 11 см) з лектином конканавалін А, іммобілізованим на сефарозі. Речовини, що не з'язалися з носієм, вимивали ФБС, колонку заповнювали α-метил-Д-манозидом (ММ) (0,05 моль/л) і витримували упродовж ночі в холодильнику, а потім Кон-А-специфічні глікоокон'югати елюювали розчином ММ в ФБС (0,05 моль/л), рееструючи процес елюції за допомогою проточного денситометра, сполученого з самописцем. Фракції збирали за допомогою автоматичного колектора і визначали в них вміст білків за Бредфордом, а потім перевіряли їх антивірусну активність. Зокрема, досліджували вплив фракцій на інфекційність ВТМ на листі дурману (*Datura stramonium*) та репродукцію цього віrusу в дисках з листя чутливого мутанта тютюну сорту Імунний 580.

Отримані результати піддавали статистичній обробці [8].

**Результати та їх обговорення.** Показано, що на ранніх стадіях ВБТ-інфекції (три–шість діб після інокуляції) спостерігається збільшення вмісту розчинних білків в апо-

пласти (140–227 % від контролю) первинно інфікованого листя тютюну. Для більш пізніх етапів інфекції (дев'ята доба) характерна нормалізація та навіть спад (12-та доба) концентрації цих речовин у міжклітинному просторі вторинно інфікованих листків. Динаміка вмісту вуглеводів в апопласти уражених рослин має більш складний характер: спочатку відбувається зниження (третя доба), а потім (шоста доба) підвищення (175 % від контролю) вмісту вуглеводів, після чого має місце нормалізація (порівняно з контролем) вмісту цих речовин в інфікованих рослинах.

Аналіз хроматограм показав, що нанесений на колонку контрольний взірець елюється трьома піками: два з них –

**Таблиця 1. Вплив препаратів (фракцій) міжклітинної рідини на інфекційність ВТМ на рослинах дурману (*Datura stramonium*)**

Інокуллюм	Дні після інокуляції	Вміст білка у фракції, мкг/мл	Кількість некрозів		Пригнічення інфекційності вірусу, %
			у досліді	у контролі	
ВТМ	6	12	29,3	46,5	37
Вода	6	16	124,5	140	12
ВТМ	9	0,025	22,7	26,5	15
Вода	9	4	38,1	33,3	14
ВТМ	20	16	65,7	72,57	10
Вода	20	10	20,8	23,3	11

Водночас у дослідах *in vivo* на ізольованих дисках тютюну виявлено, що дослідні й контрольні фракції, виділені як на шосту, так і на дев'яту і 20-ту добу після інокуляції пригнічують репродукцію ВТМ. Однак істотне

вимиваються ФБС (0,1 моль/л), один – а-метил-Д-манозидом (0,05 моль/л). У досліді в зоні виходу Кон-А-специфічних речовин реєструвались два чіткі компоненти, один з яких був відсутній у контролі. У складі Кон-А-специфічних компонентів виявлено білки й вуглеводи. Перевірка фракцій на антивірусну активність показала, що ця активність виявляється у фракціях, виділених через шість діб після інокуляції тютюну ВТМ. Фракції, виділені через дев'ять і 20 діб після інокуляції, достовірно не пригнічували інфекційність ВТМ *in vitro* (табл. 1).

**Таблиця 2. Вплив препаратів (фракцій) міжклітинної рідини на репродукцію ВТМ у дисках із листя тютюну Імунний 580 (чутливий мутант)**

Інокуллюм	Дні після інокуляції	Вміст білка у фракції, мкг/мл	Кількість некрозів, шт.*		Пригнічення інфекційності вірусу, %
			в досліді	в контролі	
ВТМ	6	90	0,1	4,6	98
Вода	6	90	1,8	6,5	72
ВТМ	9	35	1,6	5,5	71
Вода	9	35	0,9	3,3	73
ВТМ	20	35	0,7	7,3	91
Вода	20	35	0,3	9,9	97

\*Інфекційність ВТМ в екстрактах визначали на *Datura stramonium*.

Оскільки виявлені компоненти зв'язувались з Кон-А-сефарозою в результаті афінної хроматографії, можна вважати, що вони містять у своєму складі вуглеводи – манозу і/або глюкозу.

Отже, системна некротична ВТМ-інфекція в тютюну спричиняє якісні та кількісні зміни у складі білків і вуглеводів апопласти листя на ранніх стадіях інфекції, тобто на шосту добу після інокуляції, а саме: підвищення концентрації білків і вуглеводів і появу нового хроматографічного компонента в білок-вуглеводневому комплексі рослин, здатного до взаємодії з манозо-глюкозоспецифічним лектином конканаваліном А. Встановлено, що цей компонент пригнічує інфекційність ВТМ у рослинах дурману та накопичення вірусу у тканинах тютюну. Оскільки антивірусна активність виявля-

ється не лише в дослідних фракціях, але й у відповідних контрольних фракціях глікокон'югатів, можна вважати, що виявлені нами природні та вірусоіндуковані речовини виконують не лише антивірусні, але й сигнальні (регуляторні) функції. Ці функції, очевидно, є необхідною ланкою у формуванні індукованої вірусостійкості рослин.

1. Коваленко А.Г. // Итоги науки и техники. Сер. Защита растений. – 1983. – №3. – С. 91–167.
2. Ross A.F. Systemic effects of local lesion formation // Viruses of plants. – Amsterdam, 1966. – Р. 127–150.
3. Kovalenko A. // Zbl. – 1987. – Vol.142, N3. – Р. 301–310.
4. Loebenstein G., Gera A. // Virology. – 1981. – Vol. 7. – Р. 127–150.
5. Коваленко О.Г., Шепелевич В.В. // Мікробіол. журн. – 2003. – Т.66, N 2. – С. С.81–85.
6. Rupet J. // Ad. Vir. Research. – 1968. – N65. – Р. 65–196.
5. Bradford M.M. // Anal. Biochem. – 1976. – Vol.72, N1. – Р. 248–254.
8. Молостов А.С. Елементы вариационной статистики. – К., 1965.

Надійшла до редакції 22.10.04

Т.М. Латушкіна, асп., Л.О. Бугасенко, д-р біол. наук, О.В. Шевченко, канд. біол. наук, В.П. Поліщук, д-р біол. наук

## БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПРИЙОМИ ОЗДОРОВЛЕННЯ ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ ЛАВАНДИ

Наведено результати тестування рослин лаванди на вірусносійство методом ІФА. У дослідних зразках детектовано вірус некротичної плямистості бальзаміну (INSV, Tospovirus). Показано ефективність методів культури апікальних мерисм, термо- і хемотерапії для одержання оздорованого посадкового матеріалу лаванди.

The results of lavender plants testing on virus-carrier with the help of ELISA method have been presented. The *Impatiens necrotic spot virus (INSV, Tospovirus)* was detected in experimental samples. The effectiveness of methods of culture apical meristem, thermo- and chemotherapy was shown in order of producing of lavender virus-free planting material.

Вступ. Важливою ланкою сільськогосподарського виробництва Криму є вирощування лаванди – цінної ефіро-

олійної рослини із широким спектром використання в парфумерно-косметичній і фармацевтичній промисловос-

ті. Проте одним з факторів, стимулюючих розширення площ під цією культурою, є уражуваність її патогенами різної етіології – бактеріальної, грибної та вірусної [1]. Особливо небезпечними є віруси, оскільки вони зумовлюють у рослин лаванди патологічні зміни: жовтяниці, скручування листків, виродження, всихання кущів [2]. Поширеність рослин з вірусними симптомами на окремих промислових плантаціях досягає 16–86 % [3]. Вірусні хвороби зумовлюють зниження урожайності лаванди, у хворих рослин на другий рік вирощування кількість і маса суцвіть зникають майже вдвічі, кількість квіток у суцвітті – на 37 %, рослини всихають через два–три роки [2], а також погіршується якість ефірної олії [4]. Крім того, лаванда – це багаторічна вегетативно розмножувана культура, тому при закладанні маточників контамінованими саджанцями відбувається поширення вірусних антигенів через посадковий матеріал з кожною репродукцією та накопичення вірусів на промислових плантаціях з кожним роком культивування.

Агротехнічні або хімічні способи боротьби з вірусними інфекціями є малоефективними. На сучасному етапі розвитку біотехнології проблема боротьби з вірусними хворобами рослин вирішується за допомогою культури апікальних меристем у поєднанні з термо- або хемотерапією. Для багатьох важливих сільськогосподарських культур (картоплі, плодових, декоративних рослин) розроблено методи звільнення їх від вірусів та інших патогенів [5, 6]. Слід зазначити, що оздоровлення від вірусів залежить від багатьох факторів: генотипу рослини, штаму вірусу й характеру його взаємодії з рослиною-господарем, розміру меристем та умов культивування.

Мета даної роботи – вивчити вплив біотехнологічних прийомів (культури меристем, термо- і хемотерапії) на розвиток та оздоровлення від вірусів рослин лаванди.

**Об'єкт і методи досліджень.** Матеріалом для проведення досліджень були рослини лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.) сортів Синева і Степова. У роботі використовували біотехнологічні методи: культуру апікальних меристем [5, 7], термотерапію *in vitro* та хемотерапію *in vitro* [5]. Рослинний матеріал стерилізували 70 %-ним етанолом (40 с) та 50 %-ним розчином препарату "Брадофен" (12 хв) і тричі промивали у стерильній дистильованій воді. Меристеми розміром 0,2, 0,7 і 1,0 мм, ізольовані з апікальних і пазушних бруньок, культивували на модифікованому нами живильному середовищі Мурасиге–Скуга [8], доповненному кінетином (1,0 мг/л) і гібереловою кислотою (1,0 мг/л) – MC5.

Термотерапії піддавали мікропагони та мікророслини другого пасажу, які культивували *in vitro* в термокамері за температури  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , відносної вологості повітря 60–70 %, освітленості 2–3 клк.

У дослідах з хемотерапії використовували віразол (рибавірин, 1- $\beta$ -D-рибофuranозил-1,2,4-тріазол-3-карбоксамід, "Sigma", Німеччина). Препарат додавали до живильного середовища MC5 у концентраціях 5,0, 10,0, 20,0 і 30,0 мг/л з наступним використанням для культивування ізольованих мерistem розміром 0,7 мм. Усі експерименти ставили у двократній повторності, об'єм вибірки становив 20 рослин.

Тестування вихідних та оздорвлених рослин на вірусоносійство проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА) в непрямій та сендвіч модифікації [9] на 96-лункових планшетах ("Labsystems", Фінляндія). Для аналізу вихідних та оздорвлених інтактних рослин відбирали наважку листків масою 1 г і гомогенізували в 3 мл фосфатного буферного розчину (ФБР) (0,1 моль/л, pH 7,4). Рослини з культури *in vitro* гомогенізували в ФБР (0,1 моль/л) у співвідношенні 1 : 5 (маса : об'єм). Гомогенат центрифугували за 5000 об/хв впродовж 15 хв, для аналізу використовували надосад. Розчинні екстракти наносили в карбонатному буфері у спів-

відношенні 1 : 1 (об'єм : об'єм). У роботі використовували кроплічні полікліональні антитіла, специфічні до вірусу тютонової мозаїки (TMV, *Tobamovirus*), вірусу мозаїки люцерни (AMV, *Alfamovirus*), вірусу огіркової мозаїки (CMV, *Cucumovirus*), X-вірусу картоплі (PVX, *Potexvirus*), вірусу жовтої карликовості ячменю (BYDV, *Luteovirus*), вірусу смутчастої мозаїки пшениці (WSMV, *Potyvirus*), вірусу некротичної плямистості бальзаміну (NSV, *Tospovirus*). У непрямому ІФА застосовували антivидові антитіла, мічені лужною фосфатазою ("Sigma", Німеччина). Проявляли реакцію буфером із субстратом (N-п-нітрофенілфосфат) в концентрації 1,0 мг/мл, а зупиняли NaOH (3 моль/л). Результати реєстрували на автоматичному ELISA-ридері "Dynex Technologies" за довжини хвилі 405 нм. За позитивний результат брали показник екстинції, що перевищував показник негативного контролю у два рази. Для статистичної достовірності кожен зразок аналізували у трикратній повторності.

**Результати та їх обговорення.** Для одержання оздорованого посадкового матеріалу лаванди було відібрано зовні здорові рослини, які вирощували в умовах закритого ґрунту. Тестування рослин на вірусоносійство проводили методом ІФА в непрямій та сендвіч модифікації. Дані аналізу показали, що дослідні зразки містять антигени NSV, причому показник екстинції сорту Синева ( $E_{405} = 0,613$  опт.од.) буввищим порівняно із сортом Степова ( $E_{405} = 0,445$  опт.од.). Показник екстинції рослинних екстрактів із сироватками, специфічними до TMV, AMV, TRV, WSMV, BYDV, CMV і PVX, перебував на рівні негативного контролю. У подальшій роботі використовували експланти з рослин, в яких було детектовано NSV.

Для вивчення впливу розміру мерistem на регенерацію та звільнення від вірусу рослин лаванди культивували експланти висотою 0,2, 0,7 і 1,0 мм. Встановлено, що потенційна регенераційна здатність ізольованих мерistem лаванди не залежить від розміру експланту. Частота формування регенерантів у всіх варіантах досліду становила 80–100 %. Проте рослини, що регенерували з мерistem 0,7 і 1,0 мм, характеризувались більш швидкими темпами росту та інтенсивнішим розвитком порівняно з рослинами, що формувались з експлантів розміром 0,2 мм. У наших дослідженнях визначено оптимальні умови для основних етапів клонального мікророзмноження лаванди – введення в культуру та ініціації розвитку мерistem, власне мікророзмноження, укорінення та адаптації рослин до умов *in vitro* [10].

Метод термотерапії (дія на рослину підвищеними температурами 36–42 $^{\circ}\text{C}$ ) дозволяє звільнити від вірусів верхівки пагонів, що відростають під час термообробки [5]. Для лаванди проводили термотерапію в умовах *in vitro*, оскільки інтактні рослини характеризуються низькою термотolerантністю. Мікропагони (неукорінені рослини) та мікророслини другого пасажу висотою 15–20 мм поміщали в термокамеру з температурою 25 $^{\circ}\text{C}$ . Щоденно температуру підвищували на 2 $^{\circ}\text{C}$  і доводили до 37 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . У результаті досліджень встановлено, що інтенсивність росту і термотolerантність дослідних рослин залежали від генотипу та типу досліджуваного матеріалу. Визначено, що оптимальною експозицією термообробки лаванди є 10 днів, оскільки збільшення тривалості термотерапії призводило до збільшення відсотку загибелі апікальних бруньок мікророслин. За 10 днів культивування в термокамері кількість життездатних мікропагонів сорту Синева досягала 66,67 %, а сорту Степова – 57,14 %. Життездатність верхівкових бруньок мікророслин була вищою, ніж мікропагонів в обох досліджуваних сортів: у мікророслин сорту Синева відмічено 100 %-ве збереження життездатності, тоді як у сорту Степова цей показник був нижчим – 66,67 %. Приріст пагонів дослідних рослин суттєво не відрізнявся від контрольних, проте у сорту Степова приріст був у 1,7-

2,1 рази більший (19,67–25,25 мм), ніж у сорту Синєва (11,43–12,08 мм). За період термообробки в дослідних рослин сформувалась одна пара листків, а в контролі – дві-четири пари листків. З відростів пагонів було експлантовано й висаджено на живильне середовище МС5 верхівкову бруньку довжиною 3–5 мм. Приживленість ізольованіх бруньок становила 50–100 %. Характерною особливістю розвитку ізольованих бруньок було множинне пагоноутворення. Одержані рослини розмножені в культурі *in vitro* та адаптовані до умов *in vivo*.

Для блокування репродукції *INSV* за можливого зараження апікальної меристеми лаванди до складу культурального середовища додавали віразол. Дослідження проводили із сортом Синєва. Відмічено інгібую-

чу дію цього препарату на ріст меристемних рослин. У дослідних рослин спостерігалось зменшення основних біометрических показників зі збільшенням концентрації віразолу в живильному середовищі. Сублетальною визначена концентрація віразолу 20,0 мг/л, оскільки у варіанті з концентрацією віразолу 30,0 мг/л спостерігалось значне пригнічення рослин та їх загибель на 30–40-й день культивування.

Детекцію антигенів *INSV* у рослинах-регенерантах проводили за допомогою методу непрямого ІФА. У результаті аналізу встановлено, що звільнення рослин лаванди від вірусу *INSV* залежало від застосованого біотехнологічного прийому, генотипу та концентрації вірусного антигену у вихідних рослинах (див.табл.).

Ефективність біотехнологічних прийомів оздоровлення рослин лаванди

Метод	Кількість безвірусних рослин, %	
	Сорт Синєва	Сорт Степова
Культура апікальної меристеми розміром 0,7 мм	60,0	100,0
Те саме, 0,2 мм	80,0	100,0
Термотерапія <i>in vitro</i>	70,0	100,0
Хемотерапія з концентрацією віразолу 5,0 мг/л	70,0	-
Те саме, 10,0 мг/л	70,0	-
Те саме, 20,0 мг/л	80,0	-

Найбільш ефективними для звільнення рослин сорту Синєва від *INSV* виявилися методи культури апікальних меристем розміром 0,2 мм та хемотерапії з концентрацією віразолу 20,0 мг/л, при застосуванні яких одержано 80,0 % безвірусних рослин. У сорту Степова вільними від вірусу *INSV* були всі рослини-регенеранти. На нашу думку, це можна пояснити таким чином: у вихідній рослині сорту Степова концентрація антигену була нижчою, ніж у сорту Синєва, тому швидкість накопичення вірусних антигенів була меншою; рослини сорту Степова характеризуються більшою інтенсивністю росту як інтактних рослин, так і рослин у культурі *in vitro* та при їх термотерапії порівняно із сортом Синєва, що, можливо, сприяє збільшенню ділянки апексу пагону, вільної від вірусу.

**Висновки.** Для звільнення рослин лаванди від вірусу некротичної плямистості бальзаміну доцільно застосовувати такі біотехнологічні прийоми, як культуру апікальних меристем або поєднання культури апікальних меристем з термотерапією або хемотерапією (віразол 20,0 мг/л). Одержані посадковий матеріал необхідно

тестувати на вірусоносійство для вибраковки заражених рослин. Безвірусні рослини були розмножені за допомогою методу клонального мікророзмноження й висаджені в ізольованих умовах теплиці для створення маточника суперсупереліти.

1. Назаренко Л.Г., Бугаєнко Л.А. Эфиromасличные, пряно-ароматические и лекарственные растения. – Симферополь, 2003. 2. Чумак В.А., Подмаркова Н.М., Семчукова Н.А. // Сб. тр. ИЭЛР. – 1992. – Т. 13. – С. 48–54. 3. Podmarkova N.M., Sveshnikova T.V., Chumak V.A., Semchukova N.A. // Intern. Conf. "Fundamental and applied problems in phytopathology". Abstracts (22–26 May 1994). – Yalta, 1994. 4. Семчукова Н.А. // Науч. тр. ученых Крым. аграр. ун-та. – 2002. – Вып. 72. – С. 139–142. 5. Митрофанова О.В., Славгородская-Курпнева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта, 2000. 6. Styer D.J., Chin C.K. Meristem and shoot tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation // Horticult. Rev. – 1983. – Vol. 5. – Р. 221–227. 7. Калинин Ф.П., Сарнацкая В.В., Попіщук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии культуральных растений. – К., 1980. 8. Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, №13. – Р. 474–497. 9. Альтіла 2. Методы / Под ред. Д. Кэтти. – М., 1991. 10. Лагушіна Т.М. // Вісн. аграр. науки Причорномор'я. – 2003. – Т. 2, спецвип. 3 (23). – С. 151–158.

Надійшла до редакції 20.10.04

УДК 57.083.3:577.27+578.824:578.869

Т.Ю. Мандріка, інж., Н.М. Жолобак, канд. біол. наук., З.М. Олевинська, провід. інж., Л.Ф. Діденко, канд. біол. наук., Н.Я. Слівак, д-р біол. наук

## НЕЙТРАЛІЗУЮЧА АКТИВНІСТЬ АНТИТІЛ ДО РОСЛИННОГО РАБДОВІРУСУ КУЧЕРЯВОЇ КАРЛІКОВОСТІ КАРТОПЛІ ЩОДО ЗООРАБДОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НА МОДЕЛІ ВІРУСУ ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТУ В УМОВАХ *IN VITRO*

Показано здатність імуно глобулінів до рослинного рабдовіруса ВККК нейтралізувати інфекційну активність зоорабдовіруса везикулярного стоматиту (VBC) у перевивній культурі тваринних клітин, що випливає з показників індексу нейтрализації та ефективності інібіції цитопатичної дії (ЦПД) VBC гомологічними та гетерологічними антитілами.

The ability of antibodies to a vegetative rhabdovirus (CPDV) is shown to neutralize infectious activity of a zoorhabdovirus (VSV) in to culture of animal cell. That is investigation of the indexes neutralization and effectiveness inhibitory cytopathogenic activity of the vesicular stomatitis virus of homologous and heterologous antibodies.

**Вступ.** Вірус кучерявої карліковості картоплі (ВККК) та вірус везикулярного стоматиту (VBC) належать до однієї родини *Rhabdoviridae*, мають певні загальні особливості експресії геному й містять так звану "мінус"-геному неінфекційну РНК [1].

Завдяки тому, що ВККК передається механічним шляхом і здатен накопичуватися у великій кількості, він може служити моделлю для вивчення універсальної закономірності структурної організації рабдовірусів та їхніх антигенных властивостей. Авторами роботи [2] на

прикладі нуклеокапсидного білка N циторабдовірусу некротичного пожовтіння салату-латуку й нуклеорабдовірусу жовтої сітчастості осоту встановлено короткі ділянки гомології гена білка N, одна з яких довжиною 24 амінокислотних залишків здатна формувати антигенну детермінанту та відповідає ділянці високої гомології вірусів везикулярного стоматиту та сказу.

При використанні подвійної імунодифузії в гелі та вестерн-імуноблотингу виявлено антигенну спорідненість між вірусами везикулярного стоматиту, сказу та вірусу кучеря-

© Т.Ю. Мандріка, Н.М. Жолобак, З.М. Олевинська, Л.Ф. Діденко, Н.Я. Слівак, 2005

вої карликівості картоплі, а також ідентифіковано антигенно споріднені нуклеокапсидні білки у складі ВВС, ВС і ВККК з молекулярною масою 43 та 51 кДа [3].

Перспективним у плані розробки лікувально-профілактичних заходів є дослідження можливості інактивації зоорабдовірусів (вірусу сказу та вірусу везикулярного стоматиту) антитілами, отриманими до рослинних рабдовірусів, тому що біотехнологія таких препаратів має неоціненні переваги: безпечність, простота, мінімальні матеріальні витрати порівняно з традиційними підходами.

На цій підставі наше завдання полягало у вивченні перехресної вірусонейтралізуючої активності антитіл, специфічних до структурних білків рослинного рабдовіруса ВККК щодо зоорабдовірусної інфекції (на моделі ВВС) в умовах *in vitro*.

**Об'єкт і матеріали досліджень.** У реакції нейтралізації використовували препарат вірусу (ВВС) раніше стандартизований та кількісно відтитрований у робочій дозі 100LD<sub>50</sub>. Тобто для зараження клітин обрано одну інфікуючу дозу вірусу, титр якого попередньо виявляли при обліку за ЦПД.

Для порівняння вірусонейтралізуючої активності антитіл гомо- та гетерологічних сироваток необхідно було отримати очищені вірусні препарати вірусів ВККК і ВВС для одержання специфічних до них антитіл.

Вірус везикулярного стоматиту (ВВС) виділяли з інфікованої культури клітин тестикул поросят (направцьованої у відділі проблем інтерферону та імуномодуляторів Інституту мікробіології та вірусології НАНУ) за модифікованим методом [4].

Клітини через 24 год після інфікування ВВС осаджували центрифугуванням за 600 об/хв упродовж 15 хв. До супернатанту додавали ПЕГ-6000 та NaCl у кінцевій концентрації 7 % та 2,2 % відповідно. Суміш лишали на ніч за температури 4°C. Осад ресуспендували в буфері ТЕ, який містив: Трис-НСІ (1 ммол/л, pH 7,4) та ЕДТА (1 ммол/л). Осаджували ПЕГ-6000 центрифугуванням за 10000 об/хв упродовж 15 хв. З надосаду вірус осаджували за 23000 об/хв в роторі SW-27 (Beckman) за 4°C упродовж 2,5 год. Осад суспендували в ТЕ буфері. Вірусну суспензію нашаровували на лінійний 7–52 % сахарозний градієнт у ТЕ буфері (1 ммол/л) та центрифугували в роторі SW-27 (Beckman) упродовж 16–18 год за 4°C. Вірусну зону збиралі та розводили в чотири рази ТЕ буфером та осаджували за 23000 об/хв упродовж 2,5 год. Осад суспендували в ТЕ буфері та зберігали в рідкому азоті.

Виділення ВККК з інфікованих рослин виконували таким чином. Листя махорки з яскраво вираженими симптомами захворювання гомогенізували в рідкому азоті. До гомогенату додавали буфер, який містив гліцин (0,1 моль/л), MgCl<sub>2</sub> (0,01 моль/л), Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0,01 моль/л), pH 8,0. Потім фільтрували через нейлоновий фільтр. Фільтрат центрифугували за 5000 об/хв упродовж 10 хв. З надосадової рідини вірус осаджували 7 %-ним поліетиленгліколем (ПЕГ-6000) у присутності NaCl (0,15 моль/л). Преципітований ПЕГ вірус збиралі центрифугуванням за 10000 об/хв упродовж 15 хв. Осад ресуспендували в буферному розчині pH 7,0, який містив гліцин (0,1 моль/л), MgCl<sub>2</sub> (0,01 моль/л). Потім звільнялись від ПЕГ центрифугуванням за 10000 об/хв упродовж 15 хв [5].

Сироватки, специфічні до ВККК, ВВС, одержували шляхом імунізації підшкірно кролів сумішшю рівних об'ємів очищеного вірусного препарату та повного ад'юванта Фрейда ("Difco") за стандартною методикою [6].

Реакцію нейтралізації проводили таким чином. На плату з моношаром клітин ПТП (у концентрації 5,105 мл) вносили препарат ВВС з відповідним розведенням гомологічних і гетерологічних антитіл. Інкубація тривала протягом 15, 30 та 60 хв за температури 37°C. Як контроль використовували неінфіковані клітини ПТП. У досліді враховували логарифм розведення сироватки, який захищає 50 % клітин від загибелі під дією ВВС. 50 % нейтралізуючої дії ВВС підраховували за формулою Ріда та Менча [7].

За титр антитіл досліджуваної сироватки брали те її розведення, яке ще стримувало розвиток ЦПД вірусу в 50 % заражених клітин культури. ЦПД у відсотках визначали за формулою:

$$\text{ЦПД} = \frac{\text{контр.} - \text{дослід.}}{\text{контр.}} \times 100\%.$$

**Результати та їх обговорення.** Даною роботою проводилась з метою встановлення здатності антитіл до рослинного рабдовіруса ВККК нейтралізувати інфекційну активність ВВС у культурі клітин.

Нейтралізуючу здатність антитіл виявляли, інкубуючи до зараження вірус із серійними двократними розведеннями сироваток за температури 37°C упродовж 15, 30, 60 хв (див.табл.). 100 % нейтралізацію вірусу викликала гомологічна сироватка в розведеннях 1 : 8, 1 : 16, а в розведенні 1 : 64 – стримувала розвиток ЦПД вірусу в 50 % заражених клітинах. У гетерологічній системі антитіла до ВККК у розведенні 1 : 32 стримували розвиток вірусу в 50 % заражених клітинах.

#### Нейтралізація цитопатичної дії ВВС у культурі клітин ПТП гомологічною та гетерологічною сироватками

Титр сироватки	Цитопатична дія ВВС, %									
	Гомологічна сироватка (проти ВВС)			Гетерологічна сироватка (проти ВККК)			Нормальна сироватка			
	15*	30	60	15	30	60	15	30	60	
1 : 8	0	0	0	50,0	22,7	22,7	81,8	77,2	72,7	
1 : 16	0	18,2	0	36,4	31,8	31,8	81,8	72,7	72,7	
1 : 32	18,2	18,2	27,2	31,8	45,4	45,4	77,2	72,7	72,7	
1 : 64	52,4	45,4	36,4	68,2	54,5	54,5	81,8	72,7	77,2	
1 : 128	72,7	59,1	31,8	72,7	59,1	72,7	77,2	72,7	77,2	
1 : 256	77,2	63,6	54,5	72,7	72,7	72,7	72,7	72,7	72,7	

\* Час інкубації.

Збільшення частки неінфікованих клітин, тобто підвищена нейтралізуюча ефекту пов'язано зі збільшенням концентрації антитіл, узятих для нейтралізації. За більшої концентрації антитіл ефект нейтралізації наступає раніше та є більш значним.

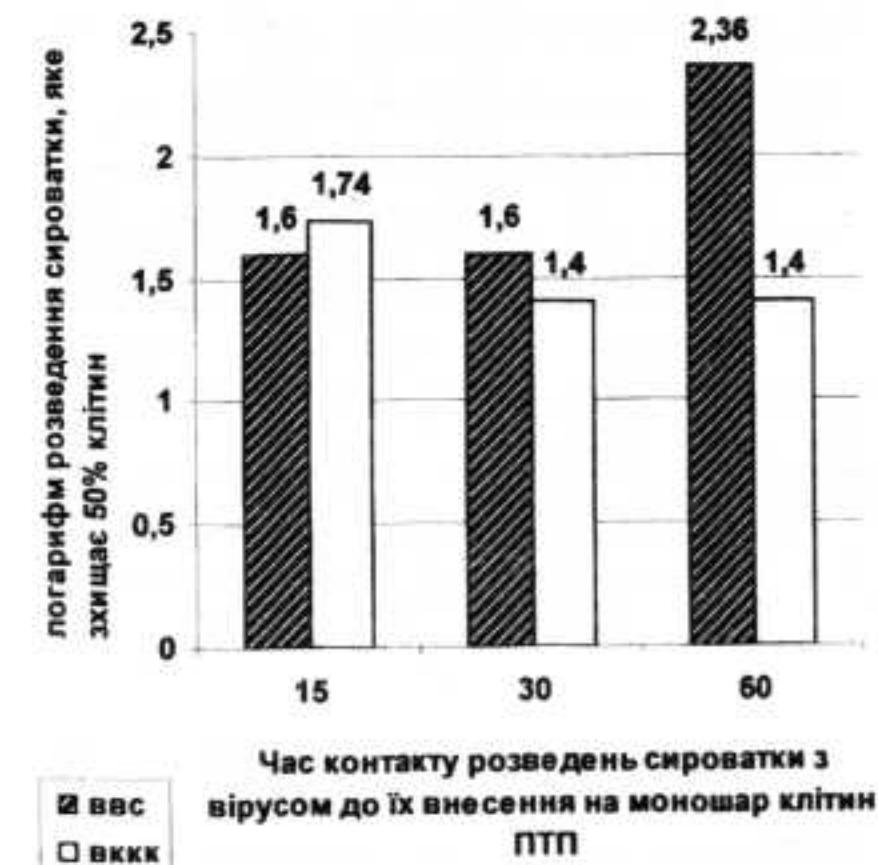
Різницю в кількості неінфікованих клітин у присутності антитіл ( $I_{\text{H}}$ ) та за контрольного зараження без антитіл ( $I_{\text{K}}$ ) виражає індекс нейтралізації:

$$I_{\text{H}} = 1 - \frac{I_{\text{H}}}{I_{\text{K}}}.$$

У проведених дослідженнях виявлено зміну індексу нейтралізації специфічних антитіл проти ВВС і специфічних антитіл проти ВККК залежно від часу інкубації та розведення сироватки. Так, у розведеннях гомологічної сироватки 1 : 8 та 1 : 16 індекс нейтралізації найбільший (дорівнює 1), незважаючи на час інкубації (15, 30, 60 хв), і

це свідчить, що отримана сироватка є високоспецифічною й нейтралізує у вказаних розведеннях увесь внесений вірус. При розведенні гетерологічної сироватки 1 : 8, 1 : 16 індекс нейтралізації дорівнює 0,7 та 0,57, а в розведеннях до 1 : 32, 1 : 64 – йде зниження нейтралізуючої дії сироватки, виявляється ЦПД вірусу. У розведеннях 1 : 128 та 1 : 256 сироватка практично не виявляє нейтралізуючої здатності, при цьому рівень ЦПД найбільший. Це свідчить, що оптимальне розведення гомо- та гетерологічної сироваток для нейтралізації ВВС становить 1 : 8 та 1 : 16. Обидві сироватки виявляють нейтралізуючу активність проти ВВС, але гомологічна сироватка має вищий індекс нейтралізації, ніж гетерологічна на 25–30 %.

Після обліку ЦПД через 24 год рівень вірусонейтралізуючої активності сироватки виражали як розведення, яке захищає 50 % клітин від загибелі, викликаної ВВС. 50 % нейтралізуючої дії ВВС підраховували за формулою Ріда та Менча.



Як видно з наведених даних, логарифм розведення сироватки, який викликає 50 % затримки ЦПД, становив  $1.6 \pm 0.3$ ;  $1.6 \pm 0.2$  для гетерологічної системи та  $1.4 \pm 0.33$ ;  $1.7 \pm 5.18$  для гомологічної системи за 15- та 30-хвилинного інкубування відповідно (див.рис.).

Таким чином, як гомологічна, так і гетерологічна сироватки затримують ЦПД ВВС з однаковою ефективністю.

УДК 632.38

Причиною цього явища може бути спільність компонентів вірусів, які належать до однієї родини рабдовірусів, що й проявляється в однаковій ефективності сироваток за 15- та 30-хвилинах інкубації їх з ВВС.

Більш тривала інкубація гомо- та гетерологічних сироваток з ВВС (60 хв) виявляє достовірну різницю між ними. Для сироватки, специфічної до ВВС, ефективний логарифм розведення сироватки становив  $2.3 \pm 0.25$ , тоді як для ВВКК 50 % клітин від ЦПД ВВС захищало тільки розведення сироватки, виражене в  $\log^2 1.4 \pm 0.2$ , що не відрізняється від ефективного розведення за 15- та 30-хвилинного контакту та підтверджує стабільність спостережуваного ефекту.

Із цього випливає, що на початкових етапах контакту ВВС з гомо- та гетерологічними сироватками (15 та 30 хв) відміні між ними не спостерігається. Більш тривала інкубація виявляє відмінність в ефективності інгібіції ЦПД ВВС сироватками проти ВВС та ВВКК. Ефект інгібіції ЦПД ВВС гетерологічною сироваткою стабільний протягом усіх проміжках часу. Вірогідно, нейтралізуючий ефект сироваток складається з двох фаз-компонентів. Перша – перехресна, властива вірусам родини *Rhabdoviridae*. Наступна – є специфічною для різних вірусів. Одержані дані, ймовірно, знайдуть застосування в біотехнології, зокрема, для одержання імунологічних реагентів (антігенів специфічних сироваток), і можуть бути використані в серологічних тестах з метою виявлення вірусів з родини *Rhabdoviridae* в різних еукаріотичних об'єктах, що сприятиме розвитку нових перспективних нетрадиційних біотехнологій.

**Висновки.** Показано здатність імуноглобулінів до рослинного рабдовірусу ВВКК нейтралізувати інфекційну активність зорабдовіруса везикулярного стоматиту в перевивній культурі тваринних клітин на основі отриманих показників індексу нейтралізації та ефективності інгібіції ЦПД ВВС антитілами (гомо- та гетерологічними).

Ефективність інгібіції ЦПД ВВС антитілами до ВВС та антитілами до ВВКК відрізняється залежно від часу контакту, розведення сироватки з вірусом до їх внесення в моноліп клітин ПТП.

1. Wagner R.R., Emerson S.V. Transcription of vesicular stomatitis virus // The rhabdoviruses. – N.Y., 1987. 2. Wetzel I., Dietzgen R.G., Geering A.D.W., Dahl J.L. // Virology. – 1994. – Vol. 202, №2. – P. 1054–1057. 3. Максименко Л.А., Пархоменко Н.Й., Діденко Л.Ф., Дяченко Н.С. // Матер. Всеосн. науч. конф. Актуальні вопросы вакцинно-сывороточно дела в ХХI веке... (Біомед, Пермь, 17–18 июня 2003 г.) – Пермь, 2003. – С. 153–155. 4. Валенже А.Р., Мейер С.А., Роджес Д.Р. // Virology. – 1974. – Vol. 61, №2. – P. 547–558. 5. Діденко Л.Ф., Пархоменко Н.І., Максименко Л.А. и др. // Біополимеры и клетка. – 2001. – №4. – С. 308–313. 6. Форт П. Обнаружение вирусных антигенов при помощи иммунофлуоресценции // Методы вирусологии и молекулярной биологии. – М., 1972. 7. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л., 1988.

Надійшла до редакції 29.10.04

К.А. Можаєва, канд. с.-х. наук, Т.Б. Кастальєва, канд. біол. наук, Н.В. Гірсьова, канд. біол. наук

## ВРЕДОНОСНОСТЬ И СОХРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОСТИ ВИРОИДА ВЕРЕТЕНОВИДНОСТИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ (ВВКК)

Показано високу шкідливість ВВКК для картоплі, особливо в насінництві. Вивчено тривалість збереження інфекційності патогену в умовах *in vivo* і *in vitro*, а також особливості його передачі.

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) was shown to be great harmful for potato and particularly for potato seed-farming. Lifetimes of viroid *in vivo* and *in vitro* and distinctive features of its spreading were studied.

**Введение.** Вироиды – уникальный класс фитопатогенов, которые состоят из одной низкомолекулярной РНК [1]. Вироид веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) – односторонняя ковалентно-замкнутая РНК, состоящая из 359 нуклеотидов. Она имеет значительное количество спа-

ренных оснований (до 70 %), что и определяет ее особые свойства. Инфекционность вироида сохраняется в условиях, при которых инактивируются наиболее стабильные вирусы, например, ВТМ. В настоящее время ВВКК обнаружен на всех континентах. В ряде стран Европы он является ка-

рантними об'єктами по списку А<sub>2</sub> ОЕРР/ЕРРО, 1978. За рубежом потери урожая картофеля при сильном поражении достигают 40–90 % [1].

В России веретеновидность клубней картофеля была известна с начала 30-х годов XX в., тогда она получила название "готика". Возбудитель был идентифицирован как ВВКК только в начале 70-х годов. Изучение этого заболевания во ВНИИФ проводится с 1976 г. К началу 90-х годов заболевание получило широкое распространение и было выявлено в основных производящих картофель регионах как Европейской, так и в Азиатской части России [2, 3]. В результате ошибок, допущенных при использовании технологии получения оздоровленного посадочного материала, принятой в СССР в конце 70-х – начале 80-х годов XX ст., ВВКК стал опасным патогеном, угрожающим производству семенного картофеля [4, 5]. Такими ошибками были: 1) отсутствие исходного банка здоровых сортов картофеля, свободных наряду с вирусной и от вирионидной инфекции; 2) отсутствие на практике методов, пригодных для массовой диагностики ВВКК; 3) повсеместное внедрение метода апикальной меристемы для получения оздоровленного картофеля, исключение процедуры клонового отбора.

Для решения возникшей проблемы МСХ и РАСХН провели мероприятия, которые должны были обеспечить получение семенного картофеля, свободного от вирусов и ВВКК. К настоящему времени банк основных сортов безвирусного картофеля проверен на отсутствие вирионидной инфекции, налажено семеноводство с использованием биотехнологических комплексов на региональном уровне, созданы структуры, обеспечивающие сертификацию семян картофеля [4, 6].

Тем не менее урожайность картофеля в России остается низкой и составляет в среднем 9–10 т/га. Основным производителем (до 90 % валового сбора) в последнее время стал частный сектор. Однако обеспеченность частных производителей здоровым семенным материалом не налажена. Пораженность картофеля болезнями, особенно бактериальными и вирусными, возрастает, и уж совсем не известна обстановка с пораженностью ВВКК, распространение которого в большей степени, чем других заболеваний, связано с "человеческим фактором".

**Объект и методы исследования.** Исследования проведены во ВНИИ фитопатологии (Россия, Московская область). Вирионид веретеновидности клубней картофеля выделяли в составе низкомолекулярной РНК из листьев картофеля, томатов и *Scopolia sinensis* по методике, описанной ранее [7, 8]. Для идентификации патогена использовались методы растений-индикаторов, электрофореза в полиакриламидном геле (в том числе возвратного) и молекулярной гибридизации.

**Результаты и их обсуждение.** Вредоносность ВВКК изучали в полевых условиях с использованием естественно и искусственно инфицированных сортов картофеля. Для исследования влияния искусственного инфицирования было проведено несколько многолетних опытов: 1) опыт 1977–1982 гг. с заражением трех сортов картофеля (Детское сельский, Лорх, Надежда); 2) опыт 1993–1996 гг. с заражением четырех сортов картофеля (Бронницкий, Лорх, Луговской, Прибрежный); 3) опыт 1998–2003 гг. с заражением четырех сортов картофеля (Луговской, Невский, Прибрежный, Утенок). Влияние естественного инфицирования изучали на двадцати сортах картофеля. Инфицированные сортобразцы были получены из различных хозяйств разных областей Европейской части РФ в 1993–1997 гг.

В опыте 1977–1982 гг. снижение урожая за семь лет достигало 70–90 % в зависимости от сорта. В опыте 1993–1996 гг. за четыре года снижение составило 40–90 %, в 1998–2003 гг. за шесть лет оно составило 35–50 %. На рис. 1 и 2 представлена средняя урожайность с куста в течение трех лет для двух сортов картофеля

куста в течение трех лет для двух сортов картофеля (Луговской и Невский), инфицированного ВВКК. При высоком уровне инфицирования через пять лет воздействия или даже ранее происходит элиминация (самовыбраковка) образца. Так было с десятью сортами картофеля (Бронницкий, Волжанин, Грация, Лорх, Луговской, Невский, Пауль Вагнер, Пензенская скороспелка, Санте, Синева).

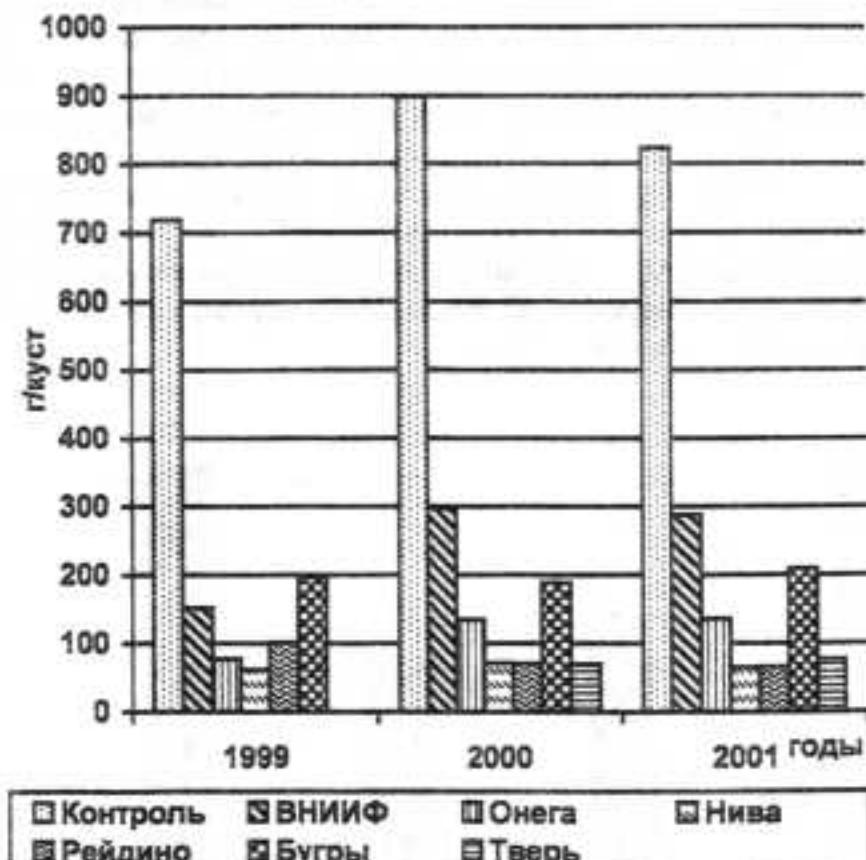


Рис.1. Влияние различных географических изолятов ВВКК на урожайность картофеля сорта Луговской.  
(Нива, Райдино, Бугры, Онега – сельскохозяйственные предприятия Ленинградской области; ВНИИФ – Московская область; Тверь – Тверской сельскохозяйственный институт)

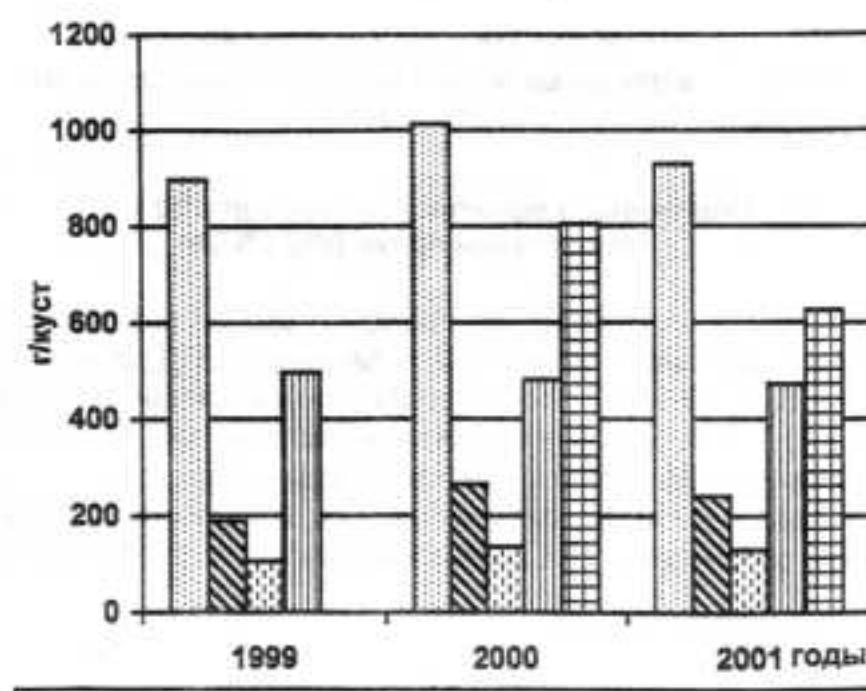


Рис.2. Влияние различных географических изолятов ВВКК на урожайность картофеля сорта Невский.  
(Онега, Белогорка – сельскохозяйственные предприятия Ленинградской области; ВНИИФ – Московская область)

Результаты многолетних опытов с искусственно и естественно зараженными сортами картофеля подтверждают сделанные нами ранее выводы [9]:

1. Величина потери урожая от ВВКК зависит от таких факторов, как продолжительность инфицирования, сорт картофеля, штамм ВВКК, погодные условия года выращивания.

2. Снижение урожая происходит в основном за счет уменьшения размера клубня и в меньшей степени за счет уменьшения количества клубней на кусте.

Среди сортов картофеля, с которыми мы работали, не было ни одного, который бы не поражался ВВКК, однако сорта Утенок и Прибрежный поражались в меньшей степени, чем другие.

В России основным способом распространения ВВКК остается продажа инфицированного семенного картофеля. В настоящее время существует единственный метод борьбы с ВВКК – избавление от зараженного семенного материала.

ВВКК поражает также томаты в открытом и в закрытом грунте. Так, в 80-е годы прошлого века он был выявлен нами в томатах открытого грунта в Армении. В наших опытах четыре сорта томатов (Лусинэ, Нвер, Сонато, Эчмиадзинский) снижали урожайность при заражении ВВКК на 70–90 %.

Для томатов может представлять опасность семенная инфекция ВВКК. В результате многолетних опытов нами были получены данные о продолжительности сохранения инфекционности ВВКК в семенах и листьях томатов. Было показано, что инфекционность вириода сохраняется в сухих листьях, хранящихся при комнатной температуре два года; в лиофильно высушенных листьях при -20°C – 13 лет; в семенах томатов, сохранивших всхожесть, около 23 лет. В соке инфицированных растений ВВКК сохраняется при комнатной температуре четыре–пять дней, при 4°C – 10 дней; в составе очищенной низкомолекулярной РНК при комнатной температуре 45 дней, при 4°C – 60 дней и при -20°C – 23 года [10].

При выращивании в питательном растворе здоровые растения томата заражаются вириодом уже через пять суток после того, как в раствор попадают больные растения. В этих же условиях черенки, имеющие боль-

шую раневую поверхность, заражаются вириодом на третий сутки. Было показано, что после удаления из питательного раствора больного растения инфекционность ВВКК в нем сохранялась еще трое суток. Результаты этого опыта доказывают опасность заражения и распространения ВВКК при выращивании томатов и картофеля в гидропонной культуре.

Несмотря на высокую стабильность молекулы ВВКК и контагиозность этого патогена, возможность передачи его через почву и с растительными остатками установить не удалось (при использовании для диагностики двух циклов накопления патогена в растениях-индикаторах и возвратного электрофореза в ПААГ).

**Заключение.** Способность ВВКК к длительному сохранению нативности, высокая контагиозность патогена, многочисленные способы передачи инфекции (механически, семенами, клубнями, с питательным раствором и др.) характеризуют веретеновидность клубней как опасное заболевание, особенно для семеноводства картофеля. Величина потери урожая картофеля зависит от комплекса факторов и может достигать 80–90 %.

1. Diener T.O. *Viroid and viroid diseases*. – N.Y.: Toronto, 1979.
2. Кастальева Т.Б., Можаева К.А., Писецкая Н.Ф. и др. // Вестн. РАСХН. – 1992. – № 3. – С. 22–24.
3. Mozhueva K.A., Girsova N.V., Kastalyeva T.B. // Russian Phytopathol. Soc. – 2002. – Vol. 3. – P. 39–41.
4. Контроль качества и сертификации семенного картофеля (практическое руководство). – М., 2003.
5. Можаева К.А., Васильева Т.Я., Кастальева Т.Б. // Картофель и овощи. – 1994. – № 2. – С. 28–29.
6. Мусин С.М., Бойко В.В., Кондакова О.А. и др. // Вопросы картофелеводства: Матер. науч.-практ. конф. (Москва, 8–10 сент. 2001 г.). – М., 2001. – С. 272–276.
7. Можаева К.А., Мелдрайс Я. А., Друка А.Я. и др. // Биолог. науки. – 1989. – № 7. – С. 104–110.
8. Методические указания по диагностике вириода веретеновидности клубней картофеля. – М., 1999.
9. Можаева К.А., Васильева Т.Я. // Биолог. науки. – 1982. – № 11. – С. 26–30.
10. Гирсова Н.В., Можаева К.А. // Вестн. защиты растений. – 2002. – № 1. – С. 72–72.

Поступила в редакцию 22.10.04

УДК 632.3:633.16

К.А. Можаева, канд. с.-х. наук, Т.Б. Кастальева, канд. биол. наук, Н.В. Гирсова, канд. биол. наук

## ШТАММОВЫЙ СОСТАВ ВИРУСА ЖЕЛТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ЯЧМЕНЯ В ОСНОВНЫХ РЕГИОНАХ АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

В Азиатской части России, так же как и в Европейской, обнаружены все известные штаммы вирусов, вызывающих болезнь зерновых культур, называемую желтой карликовостью ячменя. Наблюдались небольшие различия в преобладании тех или иных штаммов ВЖКЯ/ВЖКЗ по годам, а в отдельные годы – по регионам.

All known viruses causing barley yellow dwarf disease were found in Asiatic Russia as it was done in European Russia earlier. Slight differences in BYDV/CYDV predominance were observed in different years and in regions as well.

**Введение.** Желтая карликовость ячменя – одно из наиболее опасных заболеваний, поражающих зерновые культуры, особенно серые хлеба. Возбудитель заболевания – вирус желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ) из семейства Luteoviridae и вирус желтой карликовости злаков (ВЖКЗ) из семейства Poleroviridae. Вирусы имеют сферическую форму, передаются только тлями персистентно. В зависимости от вида переносчика различают четыре штамма ВЖКЯ (MAV, PAV, SGV, RMV) и один ВЖКЗ (RPV).

Это заболевание отмечено в зерносеющих регионах всех стран мира, где сосредоточено 95 % производства зерна. В этих регионах периодически наблюдаются эпифитотии, приводящие к значительным потерям урожая. Например, в США только при 1 %-ном уровне поражения посевов зерновых и кукурузы ежегодные потери достигают 250 млн дол. Неустойчивые сорта зерновых культур в годы эпифитотий могут снижать урожай на 60–90 %, а в обычные годы – на 10–15 % [1]. Из-за повсеместного распространения и вредоносности это заболевание было названо "желтой чумой" зерновых культур [2]. Вредоносность заболевания определяется сложным комплексом взаимодействия в системе

вирус–переносчик–растение на фоне конкретных погодных условий. Последняя сильная эпифитотия желтой карликовости в странах Европы и Северной Африки наблюдалась в конце 1980-х – начале 1990-х годов.

Поскольку желтая карликовость ячменя – проблема всех стран, производящих зерно, под руководством международных организаций CIMMYT и ICARDA разработана глобальная программа координации исследований по ВЖКЯ и созданию устойчивых к этому вирусу сортов. К сожалению ни СССР, ни Россия не участвовали в этой программе. В бывшем СССР желтая карликовость была известна в Прибалтике, Молдавии, Украине и России. В России ВЖКЯ впервые был выявлен в начале 1960-х годов в Краснодарском крае во время эпифитотийного поражения зерновых культур вирусными болезнями, а затем в Московской области [3]. Однако в последующие годы в бывших республиках СССР, за исключением Украины, изучением возбудителя этого заболевания не занимались [4].

В 1988–1991 гг. в Европейской части России произошло сильное эпифитотийное поражение серых хлебов заболеванием неизвестной этиологии. В большин-

стве областей Нечерноземной и Центрально-Черноземной зон было поражено более 2 млн га посевов овса и ячменя. На больших площадях посевы списывались, так как снижение урожая достигало 90 % [5]. Было установлено, что основной причиной эпифитотии был ВЖКЯ [6]. Эпифитотия показала как необходимость борьбы с желтой карликовостью ячменя, так и неготовность к ее проведению, поскольку в стране не было устойчивых сортов и возможности идентифицировать патоген с использованием современных методов.

С 1991 г. и по настоящее время изучением ВЖКЯ в России занимается группа вирусологии ВНИИФ. Целью исследований было создание тест-системы для иммуноферментного определения ВЖКЯ, изучение эпидемиологии, биологических свойств вируса и определение его штаммового состава. С 2001 г. работа проводится по проекту МНТЦ. Одной из задач проекта было выявление этого заболевания и изучение штаммового состава ВЖКЯ и ВЖКЗ в Азиатской части России.

**Объект и методы исследования.** Объект изучения – возбудители желтой карликовости ячменя: вирус желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ) и вирус желтой карликовости злаков (ВЖКЗ). Образцы зерновых культур с симптомами поражения ВЖКЯ/ВЖКЗ были собраны в 2001–2003 гг. при проведении обследований или получены из областных СТАЗР. Наличие штаммов ВЖКЯ и ВЖКЗ определяли методом ИФА с коммерческими штаммоспецифическими антителами или с monoclonalными антителами, полученными совместно с Т.Н. Ерохиной из Института биоорганической химии РАН [7]. Особенности проведения ИФА с образцами злаков описаны ранее [8].

**Результаты и их обсуждение.** За последние 14 лет желтая карликовость наблюдалась в 36 областях и краях восьми регионов Европейской части России: Северного, Северо-Западного, Центрального, Волго-Вятского, Центрально-Черноземного, Северокавказского, Средневолжского и Нижневолжского. Здесь были выявлены MAV, PAV, SGV и RMV штаммы ВЖКЯ, а также RPV ВЖКЗ [9].

В 1995 г. вирусы, вызывающие желтую карликовость, были впервые обнаружены в Азиатской части России [10]. Образцы из зерносеющих краев и областей всех регионов Азиатской части РФ (Урал, Западная и Восточная Сибирь, Дальний Восток) были проверены на пораженность вирусами, вызывающими желтую карликовость. Из 329 образцов, имевших симптомы поражения ЖКЯ, по данным ИФА, только 269 были инфицированы ВЖКЯ/ВЖКЗ. Все известные штаммы ВЖКЯ и ВЖКЗ были обнаружены в этих образцах. Как правило, зерновые культуры были поражены несколькими вирусами или штаммами ВЖКЯ. В среднем за три года PAV ВЖКЯ был выявлен в 45 % образцов, MAV ВЖКЯ – также в 45 %, SGV ВЖКЯ – в 51 %, RMV ВЖКЯ – в 59 % и RPV ВЖКЗ – в 47 % образцов. Доля разных штаммов ВЖКЯ/ВЖКЗ в инфицировании злаков в Азиатской части России за три года (2001–2003 гг.) составляла, %: PAV – 18, MAV – 18, SGV – 21, RMV – 24, RPV – 19 (рис. 1). Была определена доля образцов, инфицированных одним или большим количеством штаммов ВЖКЯ и/или ВЖКЗ в те же годы. Она составила, %: образцов, содержащих один штамм – 33, два штамма – 27, три – 19, четыре – 11, пять – 10. Наблюдались различия в преобладании тех или иных штаммов и вирусов по годам и по регионам. В 2001 г. MAV штамм ВЖКЯ преобладал на Урале и в Западной Сибири, тогда как в Восточной Сибири чаще встречался PAV ВЖКЯ. В 2002 г. PAV и RMV ВЖКЯ и RPV ВЖКЗ примерно в одинаковой пропорции присутствовали в образцах из Уральского региона. То же самое относится к PAV, MAV и SGV штаммам ВЖКЯ в образцах из Восточной Сибири. В 2003 г. RMV ВЖКЯ был обнаружен в 65–70 % образцов из всех четырех регионов. В Западной Сибири в 2003 г. преобладал

SGV ВЖКЯ (75 %). Доля разных штаммов ВЖКЯ/ВЖКЗ в инфицировании злаков варьировала по регионам в среднем за три года в пределах, %: 14–25 для PAV ВЖКЯ, 16–22 для MAV ВЖКЯ, 12–22 для SGV ВЖКЯ, 19–34 для RMV ВЖКЯ и 17–22 для RPV ВЖКЗ. Сравнение штаммового состава ВЖКЯ/ВЖКЗ Европейской и Азиатской частей России показывает, что различия не существенны, они не превышают 5–6 % (рис. 1, 2).

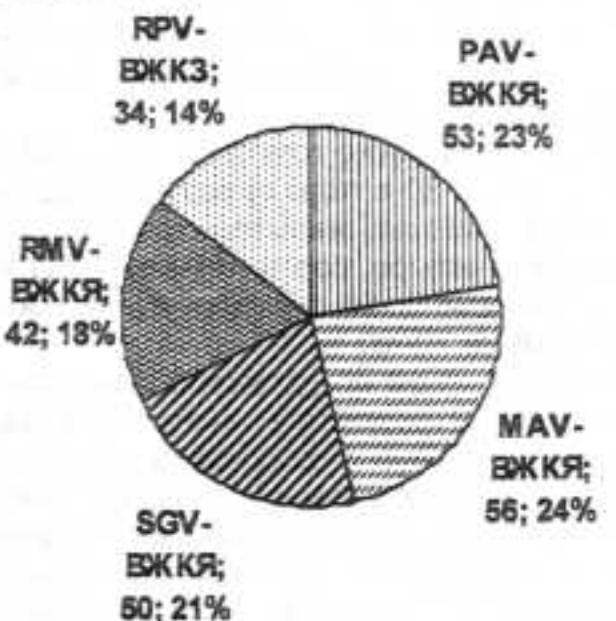


Рис. 1. Доля разных штаммов ВЖКЯ и ВЖКЗ в инфицировании образцов зерновых культур из Европейской части РФ в 2001–2003 гг. (Цифры под названием штамма представляют соответственно процент образцов, содержащих данный штамм, и их долю в суммарной инфекции)

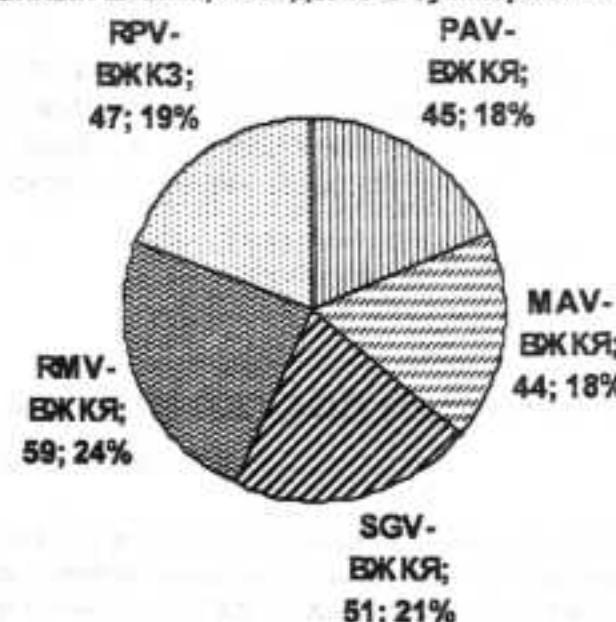


Рис. 2. Доля разных штаммов ВЖКЯ и ВЖКЗ в инфицировании образцов зерновых культур из Азиатской части РФ в 2001–2003 гг. (Цифры под названием штамма представляют соответственно процент образцов, содержащих данный штамм, и их долю в суммарной инфекции)

**Заключение.** Все четыре штамма ВЖКЯ и RPV ВЖКЗ присутствовали почти в одинаковой пропорции в образцах из основных зерносеющих краев и областей всех четырех регионов Азиатской части России. Лишь 1/3 инфицированных образцов содержали один штамм вируса. Большинство образцов были инфицированы смесью от двух до пяти штаммов вируса (ВЖКЯ + ВЖКЗ). Имелись различия в уровне поражения зерновых культур ВЖКЗ и в штаммовом составе ВЖКЯ в разных регионах и в разные годы.

**Благодарность.** Благодарим МНТЦ за финансовую поддержку.

1. Lister R.M., Ranieri R. // Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress. – St. Paul, 1995. – P. 29–53.
2. Plumbe R.T. Plant virus Epidemiology. – Oxford, 1983.
3. Развязкина Г.М. Вирусные заболевания злаков. – Новосибирск, 1975.
4. Омельченко Л.И., Симоненко В.К., Бондаренко И.Р. // Микробиол. журн. – 1996. – Т.58, № 3. – С. 58–62.
5. Юдкин Л.Ю., Митрофанов Ю.И., Теплоухова Т.Н. // Тез. докл. совещ. "Проблемы вирусных болезней зерновых культур и пути их решения". – Тверь, 1993. – Ч.1. – С. 2–4.
6. Можаева К.А., Васильева Т.Я. // Защита растений. – 1992. – № 6. – С. 52–53.
7. Ерохина Т.Н. // Биоорганическая химия. –

1995. – Т. 21, N. 4. – С. 256–260. 8. Кастьєва Т.Б., Ерохіна Т.Н., Васильєва Т.Я. // Докл. РАСХН. – 1996. – N 5. – С. 42–44. 9. Можаєва К.А., Кастьєва Т.В. // Barley Yellow dwarf disease: Recent advances and

future strategies. – Mexico, 2002. 10. Можаєва К.А., Кастьєва Т.В., Васильєва Т.Я. // Barley yellow dwarf newsletter, – 1998. – N 7.

Поступила в редколегію 22.10.04

УДК 631.52:632.38

О.М. Петренко, наук. співроб.,  
І.В. Демчук, зав. сектором,  
М.М. Зарицький, канд. біол. наук

## ОЗДОРОВЛЕННЯ СОРТІВ КАРТОПЛІ З ВИКОРИСТАННЯМ СИНТЕТИЧНИХ РЕЧОВИН, ПОХІДНИХ ІМІДАЗОТРАЗОЛУ

**Досліджено дві нові синтетичні органічні речовини, похідні імідазотразулу, які виявили антивірусну дію під час первинного тестування в умовах модельних дослідів. Розроблено методику їх застосування, що дало змогу підвищити ефективність і стабільність оздоровлення сортів картоплі від мозаїчних вірусів.**

*Departure of plant virology and biotechnology of Institute of Agricultural Microbiology has developed a virus disease eradication technique for the initial material of seed potato. Two new antiviral organic compounds of imidazotriazil, which antiviral action were proved in our experiments, have been studied.*

Вступ. Майже всі культурні рослини уражуються вірусними хворобами, які здатні викликати епіфітотії, що захоплюють великі території й завдають колосальних збитків врожаю багатьох культур. У наш час описано більше 600 фітопатогенних вірусів, до того ж їх кількість з кожним роком невпинно зростає. За деякими оцінками вчених, загальні втрати продукції від вірусних хвороб рослин у світі досягають 60 млрд дол. щорічно.

Доволі багато вірусів здатні розповсюджуватись через насіння, але особливо небезпечними вони є для культур, що розмножуються вегетативно, зокрема, для картоплі. У цьому разі вірусна інфекція прогресує із року в рік, поступово знижуючи врожай і насамкінець спричинює вірусне виродження культури.

На сьогодні описано більше 30 вірусів, які паразитують на картоплі. В Україні значного поширення набули такі вірусні хвороби картоплі, як зморшкувати і смугаста мозаїка, скручування листків, збудниками яких на більшості сортів є X-, Y-, S-віруси, що зустрічаються часто у змішаних інфекціях з ВСЛК і M-вірусом картоплі.

Труднощі боротьби з вірусними інфекціями зумовлено особливостями як біології рослин, так і паразитизму вірусів. Тому достатньо великого значення набув радикальний метод звільнення рослин від вірусів – метод культури тканин. Багатьма авторами, в тому числі й нами, було доведено присутність вірусів у меристематичній тканині. Дані говорять про те, що найбільша зона верхівкової меристеми вільна від вірусів L, Y, A, менша – від X і найменша – від S і M вірусів [1,2].

Методи культури тканин виявились досить зручними для розмноження рослин, тому що при культивуванні *in vitro* повністю відсутні переносники системних хвороб, що дозволяє вирішувати важливі проблеми рослинництва, а саме: в десятки й сотні разів збільшувати коефіцієнт розмноження рослин, одержувати здоровий, звільнений від вірусної інфекції посадковий матеріал. Цей метод не пов'язаний із сезонністю й надає можливість отримувати рослини-регенеранти в будь-яку пору року. Культура тканини картоплі використовується для одержання вихідного матеріалу в різних схемах первинного насінництва картоплі, а також для створення і підтримки колекцій генофонду культури [3].

Спільне використання методів культивування меристем *in vitro* й хіміотерапії підвищує ефективність оздоровлення, знижує інтенсивність репродукції вірусу або впливає на стабільність віріону, при цьому суттєво не перешкоджає інтенсивності росту рослини-регенеранта.

Використання оздорованого вихідного матеріалу забезпечує приріст врожаю бульб на 39–210 %, а еліта, отримана на безвірусній основі, перевищує за врожайністю на 26 % аналогічний матеріал, отриманий на основі візуального добору [4].

Ефективність роботи щодо звільнення заражених сортів картоплі від вірусів залежить від особливостей біології самих патогенів та їх взаємовідносин з рослинами-господарями, розміру ізольованих меристем, умов культивування й методів контролю зараженості, що використовуються у процесі оздоровлення, випробування та розмноження рослин.

Процес оздоровлення картоплі можна розділити на чотири фази: перша – добір вихідного матеріалу, виявлення та ідентифікація вірусів; друга – антивірусна терапія, виділення меристем, одержання рослин-регенерантів; третя – випробування оздоровлених рослин, важливим етапом якого є вірусологічний контроль з використанням ефективних методів діагностики; четверта – розмноження й продовження випробування в умовах, що викликають реінфекцію [5].

Дослідження з оздоровлення сортів картоплі у відділі фітовірусології й біотехнології ІСГМ ведуться комплексно в напрямку розробки технологічного процесу з вивченням впливу елементів технології на збереження ідентичності оздоровлених регенерантів вихідному сорту, збереження продуктивності мериклонів на рівні генетичного потенціалу сорту, на розробку та застосування системи контролю вірусологічного стану регенерантів на всіх етапах технології одержання оздорованого вихідного матеріалу.

**Об'єкт і матеріали досліджень.** Нами проведено серію дослідів з відпрацювання етапу технології оздоровлення. При цьому використовували й порівнювали ефективність: термотерапії; хіміотерапії із застосуванням двох нових антивірусних речовин; спільної дії термо- та хіміотерапії.

Для регенерації рослин з експлантів використовували середовище Ван-Гофа, тому що воно сприяє меншому калюсоутворенню. При подальшому культивуванні рослин одержаних ліній використовували середовище Мурсасіге-Скуга в нашій модифікації [6]. Модифікацію провели під час досліду з визначення реакції різних сортів картоплі на умови культивування *in vitro* та оптимізації складу поживного середовища для отримання якісних меристемних рослин картоплі. Досліджували п'ять варіантів агаризованого (6 %) середовища на основі середовища Мурсасіге-Скуга (МС) на восьми сортах оздоровлених пробікових рослин картоплі різних груп стиглості. У варіантах проводили заміну хлоридної форми кальцію на нітратну, досліджували дію різних концентрацій макросолей, вітамінів і фітогормонів. Обчислювали висоту рослин, кількість міжвузлів, площу листків і масу коренів. Усі сорти добре ростуть за варіантів два і три, коли концентрації аденину та ІОК становлять 0,5 мг/л, що забезпечує дружне утворення коренів і гарний ріст рослин. Таким чином варіант

два використовується для підтримання колекції оздоровлених сортозразків, а варіант три – для масового розмноження меристемних рослин у культурі *in vitro*.

Як модельну систему використовували М-вірус картоплі, слабо- і сильнопатогенні штами на рослинах картоплі різних сортів (Луговська, Альвара, Панда).

Проводили комплексну діагностику як у процесі добору матеріалу для оздоровлення, так і під час контролю отриманих ліній рослин-регенерантів, використовуючи метод імуноферментного аналізу, електронної мікроскопії та рослин-індикаторів.

Термотерапію застосовували для вегетуючих рослин картоплі в термокамері за температури 37–38°C упродовж двох–шести тижнів залежно від сорту.

Для підвищення ефективності цього методу використовували хіміотерапію, досліджуючи антивірусну дію двох нових речовин, наданих співробітниками кафедри хімії Чернігівського технологічного університету.

Пошук нових антивірусних речовин у фітовірусології є важливим завданням, оскільки існуючий їх спектр, який виявляє антивірусну дію щодо фітовірусів, є занадто вузьким, а для використання у практиці оздоровлення майже недоступним. Для розв'язання цієї проблеми ми провели випробування антифітовірусної дії двох нових синтетичних речовин: ABP1 і ABP2. Ці речовини є похідними імідазотріазолу, при їх синтезі використовувалися кілька достатньо ефективних сполук. Експериментальний синтез проводився співробітниками кафедри хімії Чернігівського технологічного університету. (Хімічні формули та схему синтезу не наводимо, тому що ця розробка ще не захищена патентом.)

Перед використанням нових речовин у дослідах з оздоровлення було проведено біологічні тести на їх безпосередню дію на вірусні частинки в соку інфікованих рослин. Зрізані пагони картоплі сорту Луговська, враженої MBK, витримували добу в розчині ABP1 в рідкому поживному середовищі МС. Дію антивірусної речовини перевіряли методом електронної мікроскопії. У результаті виявили подрібнення вірусних частинок М-вірусу в соку оброблених рослин, тоді як у препаратах контрольного варіанта спостерігали непошкоджені вірусні частинки MBK.

Під час оздоровлення рослин використовували антивірусний комплекс, який складався із 2,4-діоксо-гексагідро-1,3,5-тріазину (ДГТ), ціаногуанідину і розгалуженого манану (РМ) – полісахариду, виділеного з дріжджів роду *Candida* sp. (клітинні дріжджові манани), надані О.Г. Коваленком. У дослідах з новими речовинами ми використовували цей комплекс як стандарт під час порівняння ефективності антивірусної дії.

Досліджували дві концентрації нових речовин: 0,1 і 0,05 г/л, використовуючи двофазну дію: перша фаза – витримували частинки зелених пагонів картоплі в рідкому розчині антивірусних речовин протягом двох діб; друга – виділяли експланти розміром 0,3–0,5 мм і висаджували їх на поживне середовище з додаванням ABP.

Для контролю стабільності геному одержаних ліній регенерантів використали RAPD-аналіз. ДНК було ізольовано за допомогою набору NucleoSpin Plant DNA (Macherey-Nadler). Реакційна суміш складалась з буфера, ДНК рослини, що аналізували, дезоксинуклеотидфосфатів (dATP, dTTP, dCTP, dGTP – по 0,2 мімоль/л кожного), MgCl<sub>2</sub> (1,5 мімоль/л), 2,5 U Tag ДНК-полімерази (*Thermus aquaticus*, Invitrogen), по 0,5 мімоль/л праймерів (AGGTCACTGA для першого аналізу та GCAAGTAGCT – для другого). Результати реакції після електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі у трис-ацетатному буфері було сфотографовано в УФ-світлі. RAPD-аналіз проведено в Інституті молекулярної фізіології Макса Планка рослин (Гольм, Німеччина) А.В.Литовченком.

Статистичний аналіз результатів проведено за тестом програми Microsoft Excel.

**Результати та їх обговорення.** Дослідили вплив ABP1 у двох варіантах концентрації (0,1 та 0,05 г/л) на сильно- та слабопатогенний штами MBK (MBK\* та MBK<sup>O</sup> відповідно) на рослинах картоплі сорту Луговська. Встановили, що приживлюваність меристем знижується та залежить від концентрації ABP1 та від штаму вірусу для варіанта з MBK\* – на 35 %, для варіанта з MBK<sup>O</sup> – на 32 %. За концентрації ABP1 0,05 г/л для варіанта з MBK\* – на 33 %, для варіанта з MBK<sup>O</sup> – на 25 % порівняно з контролем. Ефективність оздоровлення також має залежність від концентрації ABP1 та від штаму MBK. За концентрації ABP1 0,1 г/л знижується ефективність оздоровлення на 4 % для варіанта з MBK\* і на 5 % – для варіанта з MBK<sup>O</sup>. За концентрації ABP1 0,05 г/л збільшується на 20 % для варіанта з MBK\* і на 18 % – для варіанта з MBK<sup>O</sup> порівняно з контролем.

Таким чином, встановили, що ефективність оздоровлення та приживлюваність меристем залежать як від штаму MBK, яким інфіковані рослини картоплі, так і від концентрації ABP1. Меристеми, виділені з картоплі, інфікованої MBK\*, приживлюються гірше на 3 %, ніж меристеми виділені з картоплі, інфікованої MBK<sup>O</sup> за концентрації ABP1 0,05 г/л. Ефективність оздоровлення варіанта з MBK\* більша на 1 % від варіанта MBK<sup>O</sup> за концентрації ABP1 0,1 г/л і на 2 % за концентрації ABP1 0,05 г/л. За концентрації ABP1 0,1 г/л спостерігається зниження приживлення відносно концентрації ABP1 0,05 г/л на 2 % для варіанта з MBK\* і на 7 % – для варіанта з MBK<sup>O</sup>. Речовина ABP1 має антивірусну дію тільки при застосуванні її в концентрації 0,05 г/л, а в концентрації 0,1 г/л дає лише негативний ефект.

Дослідили антивірусну дію речовин ABP1 і ABP2 в концентрації 0,05 г/л на рослинах картоплі сорту Альвара, уражених MBK. Контролем слугували рослинні регенеранти, отримані з мерistem і бруньок живців, які витримували в дистильованій воді. Результати дослідження наведено в таблиці.

ABP2 не знижує рівня приживлюваності меристем порівняно з контролем, при тому, що ABP1 виявляє незначний фіtotоксичний ефект. У варіантах із застосуванням ABP регенерація відбувається швидше, ніж у контролі. Кількість безвірусних рослин збільшується до 80,0–83,3 % проти 33,3 % у контролі. Слід зазначити, що середня продуктивність ліній регенерантів, отриманих при використанні ABP1, значно перевищує продуктивність таких у контролі, а також за використання ABP2.

#### Ефективність оздоровлення сортозразка Альвара з використанням двох нових ABP

Критерій оцінки ефективності дії ABP у варіантах досліду	Контроль	ABP1	ABP2
Приживлення меристем, %	42,9	35,7	42,9
Тривалість регенерації, місяці	5-6	3-3,5	1-3
Безвірусні меристеми, %	33,3	80,0	83,3
Продуктивність регенерантів, г/кущ	537,4	649,0	522,5

Для визначення термінів та умов регенерації, коли регенеранти матимуть найбільшу стабільність геномного апарату, вивчали мериклональну мінливість рослинні регенерантів різних ліній у межах одного сорту залежно від строків регенерації, типу експланта й типу ABP.

Досліджували лінії рослин-регенерантів двох сортів: Альвара і Панда, які отримали в результаті оздоровлення методом культури тканин у комплексі з хіміотерапією з використанням ABP1 і ABP2, упродовж двох вегетацій. Рослини другого бульбового покоління порівнювали, окрім рослин контрольних ліній, також і з вихідними материнськими клонами. Серед п'яти ліній сор-

тозразка Панда, різних за походженням і способом терапії експланктів, привертають увагу мериклони 167 і 181, отримані із застосуванням АВР1, продуктивність яких значно нижча за продуктивність вихідних материнських клонів і контрольної лінії (без застосування АВР), та лінія 172 (із застосуванням АВР2), продуктивність рослин якої достовірно перевищує вихідні та контрольні клони за цією ознакою. Розмах коливань досить значний – від 131,7 до 486,3 г/кущ, тобто лінія 172 у 3,7 рази продуктивніша, ніж лінія 167. Детальне порівняння рослин-регенерантів і вихідних материнських не виявило будь-яких відхилень за морфологічними ознаками між рослинами лінії 172 і материнськими, бульби же рослин лінії 167 відрізнялися за формою – від короткоовальних до видовженоовальних (бульби вихідних рослин мають форму від округлих до округло-овальних), а також меншою кількістю вічок. Сходи ліній 167 і 181 з'явились на шість–сім діб пізніше, ніж сходи контролю, а у фазі бутонізації рослини відрізнялися значно меншою висотою.

RAPD-аналіз дев'яти ліній рослин-регенерантів сортозразка Альвара і шість ліній сорту Панда показав, що регенеранти не мають відмінностей генотипу в межах кожного сорту. Таким чином, антивірусні речовини АВР1 і АВР2, поживне середовище для регенерації, її

УДК: 578.85/86

(від двох до п'яти місяців) і тип тканини виділеного експланту (меристема, брунька) не впливають на стабільність геному оздоровлених сортозразків картоплі.

**Висновки.** У результаті проведених досліджень встановлено залежність ефективності хіміотерапії сортозразків від вихідного складу виявленіх у них вірусів. Тому технологія передбачає варіювання етапів і методів залежно від складу патогенів у матеріалі, що оздоровлюється.

На основі отриманих даних вдосконалено етапи технології оздоровлення сортів картоплі методом культури меристем у поєднанні з хіміотерапією, а також розроблено схему та умови фітовірусологічного та сортового контролю отриманих ліній і відбору кращих з них за продуктивністю.

1. MacKinnon J.P., Munro J.J. / Amer. potato J. – 1959. – № 36. – P.410–413.
2. Svobodova J. // Intern. Bot. Congr., Edinburg – 1964. – P.485–486.
3. Кушнір Г.П., Сарнацкая В.В. // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть: У 2 т. – К., 2000 – Т.1. 4. Трофимець Л.М., Хромова Л.Н., Егорова Л.И. Современные методы получения безвирусного картофеля. – М., 1975.
5. Трофимець Л.Н., Хижняк П.А., Кучумов А.П. Методи лічення картофеля, зараженого вірусними болезнями. – М., 1978.
6. Демчук І.В., Петренко О.М., Коломієць Л.П. та ін. // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Біологія. – 2002. – № 3 (18). – С. 205–209.

Надійшла до редакції 22.10.04

О.М. Постоєнко, канд. біол. наук,  
Н.А. Сенчугова, канд. біол. наук

## МОНІТОРИНГ ВІРУСНИХ ХВОРОБ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Досліджено стан промислових посівів цукрового буряку Центральної та Західної України, протягом кількох років з урахуванням умов зовнішнього середовища, сівозмін та інших чинників. Результати обстежень показали присутність комплексу фітопатогенних вірусів. Особливу увагу звернено на коренеплоди з надмірним розвитком бічних корінців як можливих носіїв хвороби ризоманії.

*Studied inspection results of the industrial sowing in Central and Western Ukraine showed the presence of phytopathogenic viruses. We have paid special attention on the roots with excessive development of lateral roots, however examination of the presence of antigens to the virus of beet necrotic yellow vein has given negative results.*

**Вступ.** Захист рослин становить важливу складову інтенсивного сільськогосподарського виробництва. Знижуючи втрати продукції в полі й під час її зберігання, захист рослин сприяє стабілізації врожаю, дозволяє більш повно використовувати потенціальну продуктивність культурних рослин. У результаті цього поліпшується співвідношення витрат на виробництво та доходів від врожаїв.

Цукрові буряки були й залишаються однією з основних технічних культур не тільки для України, а і для Європи в цілому. Їх виробництво збільшується головним чином за рахунок підвищення врожайності, цьому сприяє інтенсифікація буряківництва та введення в культуру нових більш інтенсивних сортів. У зв'язку із цим суттєво підвищуються вимоги до захисту цукрових буряків від хвороб і шкідників. Серед більш ніж 60 хвороб цукрового буряку особливо шкідливими є церкоспороз, пламистість, борошниста роса тощо. Хвороби викликають порушення нормального фізіологічного стану рослин, зміни морфологічного складу, що в кінцевому рахунку веде до пригнічення росту, а інколи до повної загибелі рослин. Як свідчать літературні джерела, шкода, яку завдають врожаю буряків різні патогени, може сягати 15,5–34,7 % [1].

Особливою загрозою для рослин буряку залишаються вірусні інфекції: мозайка, жовтяниця, слабке пожовтіння, тому що боротьба з ними на рівні рослинного організму майже неможлива. Поширенню вірусів можуть сприяти інтенсифікація виробництва, зменшення культур у сівозмінах, терміни висіву тощо. Крім того, пожвавлення в останні роки обміну насіннєвим матеріалом між Україною та країнами Європи, зокрема використання нових нерайонованих сортів, які більш ураз-

ливі до вірусних інфекцій, загострює епідеміологічну ситуацію. Суттєвими для перебігу інфекційного процесу є умови зовнішнього середовища.

У зв'язку з надзвичайною важливістю проблеми захисту посівів буряків і профілактики виникнення небезпечних захворювань, з кожним роком збільшується актуальність проведення щорічного моніторингу посівів основних бурякосіючих регіонів України.

**Об'єкт і матеріали дослідження.** Об'єктом дослідження були зразки листя цукрового буряку, які відбирали за візуальними ознаками захворювання. Ці зразки в подальшому досліджували методом непрямого імуноферментного аналізу (ІФА) для з'ясування природи збудника. Зразки гомогенізували в розчині буферу PBS, pH7,4 та центрифугували за 4 000 об/хв. Виявлення патогенів здійснювали із застосуванням антисироваток до антигенів, які найчастіше зустрічаються на культурі цукрового буряку. Імуноферментний аналіз проводили в полістіролових планшетах для імуналогічних досліджень (фірми Limbodo/Titertek U.S.A.). Гомогенат вносили у планшети для адсорбції вірусного антигену, інкубацію проводили впродовж 12 год за температури 4°C. Подальші маніпуляції проводили за методикою [2]. За хромоген-субстрат використовували ортофенілендіамін, реакцію враховували за довжини хвилі 492 нм на приладі Dynatech [2].

**Результати та їх обговорення.** Порівнюючи симптоматичну картину на полях буряків протягом 2001–2004 рр., можна зазначити, що на рослинах у 2001 р. переважали симптоми жовтяниці на відміну від 2002 р., коли повсюдно спостерігалися симптоми мозайки. За нашими спостереженнями, на полях у 2003 р. було

значно менше характерних симптомів, ніж у попередні роки. Картину ураження рослин у 2004 р. можна охарактеризувати таким чином: якщо в червні зустрічалися рослини, які мали симптоми сильної мозаїки та деформації листових пластинок, то в серпні переважали симптоми жовтяници, гофрування та скручування верхівок листків. На відміну від минуліх років упродовж усього польового сезону не було виявлено комах-шкідників.

Встановлення антигенів патогенів, які найчастіше зустрічаються на культурі цукрових буряків, здійснювали із застосуванням антисироваток до вірусів: жовтяници (ВЖБ, *Closterovirus*), слабкого пожовтіння (ВСПБ, *Luteovirus*), мозаїки (ВМБ, *Rotavirus*) та тютюнової мозаїки (ВТМ, *Tobamovirus*) (рис. 1, а). Аналізуючи результати, отримані у 2001 р., ми найпоширенішим був вірус слабкого пожовтіння буряку. У меншій кількості виявлялись антигени до вірусів жовтяници та мозаїки буряку. Зразки, що давали позитивну реакцію з антитілами до вірусу тютюнової мозаїки, були ще рідкими. На відміну від попереднього, у 2002 р., зважаючи на дуже важкий у сільськогосподарському розумінні рік (позитивні сумарна температура значно перевищувала норму), вірусні антигени виявлялись у зразках з усіх досліджених областей, але їх співвідношення було різним (рис. 1).

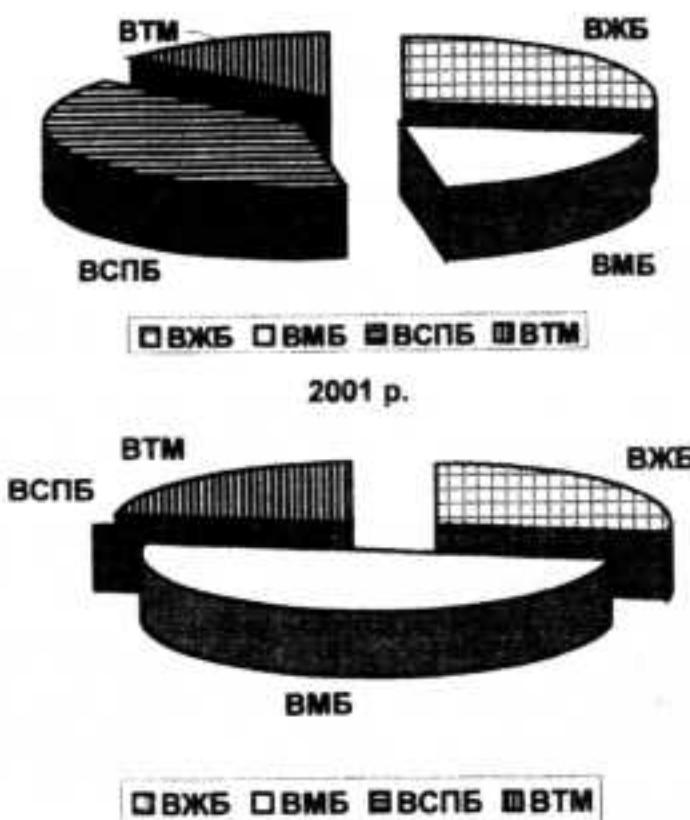


Рис. 1. Співвідношення вірусних антигенів у зразках цукрових буряків 2001–2002 рр.

У половини дослідних зразків було виявлено вірус мозаїки буряку, дещо менше – віруси жовтяници буряку та тютюнової мозаїки. Слід зазначити, що кількість антигенів вірусу слабкого пожовтіння буряку, на відміну від попереднього року, була незначною.

Порівняння результатів, отриманих у 2003 та 2004 рр., показало, що вони корелювали між собою й відмінності між показниками були несуттєвими (рис. 2).

Аналізуючи динаміку захворюваності рослин протягом чотирьох років, слід відзначити певні зміни в циркуляції вірусних антигенів у досліджених агроценозах (рис. 3).

Існує тенденція до зниження присутності вірусу слабкого пожовтіння буряку. Циркуляція антигенів вірусів жовтяници та тютюнової мозаїки характеризується сталими показниками. При обстеженні агроценозів цукрового буряку встановлено достовірне збільшення антигенів вірусу мозаїки буряку. Отримані результати дозволяють прогнозувати подальшу циркуляцію вірусів в агроценозах.

Слід зазначити, що у сезоні 2003 р. в західних областях виявляли рослини, зовнішні ознаки яких давали підставу для перевірки їх на наявність збудника ризоманії. Перевірка цих зразків дала негативні результати. Проте це не повинно заспокоювати господарства, що вирощують буряки. Незважаючи на те, що інфекцію не була детектовано, необхідно постійно проводити тестування для попередження ймовірності спалаху цієї вкрай небезпечної хвороби.

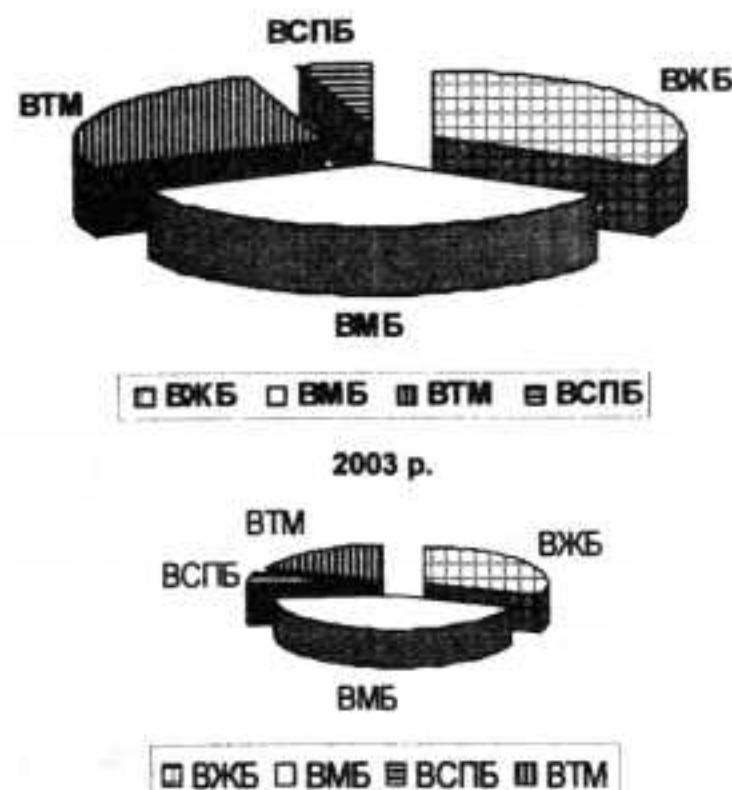


Рис. 2. Співвідношення вірусних антигенів у зразках цукрових буряків 2003–2004 рр.

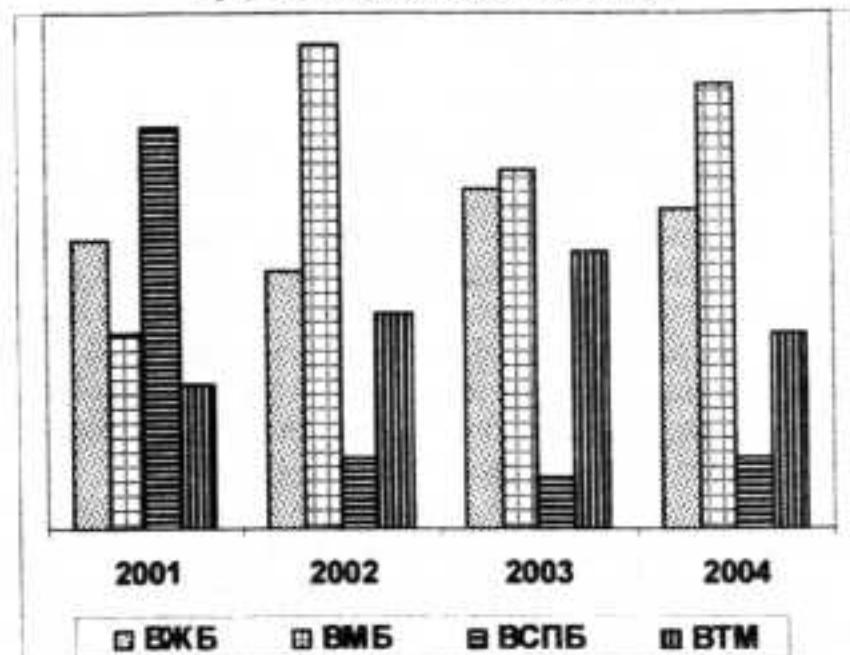


Рис. 3. Динаміка виявлення антигенів різних вірусів цукрового буряку

**Висновки.** Проведений упродовж чотирьох років щорічний моніторинг показав, що фітовірусологічний стан промислових посівів цукрового буряку принципово не змінюється й виявлені антигени постійно циркулюють в агроценозах. Отже, без достатнього захисту рослин, без орієнтації всього виробництва на своєчасне виявлення та знешкодження осередків вірусних захворювань успішне вирощування цукрових буряків неможливе. Особливу увагу необхідно приділяти й насінникам цукрових буряків, оскільки нами неодноразово виявлялися антигени вірусів і при їх обстеженні. Це особливо небезпечно тому, що тільки кілька господарств вирощують та розповсюджують насіння цукрових буряків по Україні.

1. Власов Ю.И. Вирусные и микоплазменные болезни растений. – М., 1992.
2. Гнотова Р.В. Серология и иммунодиагностика вирусов растений. – М., 1993.

Надійшла до редакції 22.10.04

УДК 578/1

С.А. Ромашев, провід. інж., Л.І. Семчук, канд. біол. наук,  
О.М. Андрійчук, канд. біол. наук, Т.О. Ігнатенко, провід. інж.,  
Л.І. Яцковська, провід. інж., І.О. Колонюк, студ.

## ДОСЛІДЖЕННЯ ФАГІВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА ЇХНЬОГО ВПЛИВУ ПРИ ВНЕСЕННІ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДІЛЯНКИ З ПОСІВАМИ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ

Досліджено фаги фітопатогенних бактерій *Xanthomonas axopodidis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 1025, *Erwinia carotovora* 216 з метою вивчення їхнього впливу на патогенную мікрофлору. Визначено спектр літичної активності фагів до 25 штамів бактерій, встановлено терміни та умови зберігання препаратів фагів у лабораторних умовах і в експериментальних агроценозах. Перевірено їхній можливий вплив на азотфіксуючу мікрофлору.

*Phages of phytopathogenic bacteria Xanthomonas axopodidis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 1025, *Erwinia carotovora* 216 were studied to evaluate their influence on pathogenic bacteria. The range of their lytic activity to 25 bacterial strains was determined. Features of their survival at artificial agrocoenosis and experimental conditions were investigated. Their probable influence on nitrogen-fixing bacteria was checked out.

Вступ. У сільському господарстві гостро стоїть проблема створення екологічно чистих технологій для боротьби з патогенами рослин. Застосування хімічних засобів, як правило, супроводжується токсичною дією та призводить до знищенння природної мікрофлори. Одним з альтернативних підходів для вирішення цього питання є можливість застосування для захисту рослин бактеріофагів як природних антагоністів бактерій. Завдяки специфічності дії фагів, такі препарати дають змогу знищувати патогенную мікрофлору, не впливаючи на природну. Окрім того, здатність фагів до самореглікації дозволяє застосовувати для захисту рослин невеликі об'єми препаратів. Ще в 1926 р. було запропоновано [1] використовувати фаги для контролю бактеріальних інфекцій рослин. Проте через захоплення хімічними технологіями дослідження в цьому напрямку не набули тоді свого продовження. Зараз, коли на перший план вийшли екологічні проблеми, знову виник інтерес до використання для захисту рослин бактеріофагів. Експериментальні дослідження показали, що в деяких випадках застосування фагів може бути більш ефективним, ніж традиційні хімічні засоби [2]. Так, використання фагів зменшувало на 86–100 % захворювання персика, що викликається *Xanthomonas oryzae* [3]. У США ведуться роботи та отримано патент на створення препаратів на основі фагів для боротьби з інфекціями бобових, що викликаються *Pseudomonas syringae* [4]. Для України такою стратегічною культурою є цукровий буряк.

Метою нашої роботи було дослідження в лабораторних умовах та при внесенні на експериментальні польові ділянки біологічних властивостей природних ізолятів фагів патогенних бактерій цукрового буряку родів *Xanthomonas*, *Pseudomonas* та *Erwinia*, а саме:

- спектра літичної активності до фітопатогенної мікрофлори;
- термінів та умов зберігання в лабораторіях і в експериментальних агроценозах;
- впливу на азотфіксуючу мікрофлору.

**Матеріали та методи.** У дослідженнях використовували ізоляти бактеріофагів 7324/4, 7325/5 (*Xanthomonas axopodidis* pv. *beticola* 7325) 1025/2, 1025/3 (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 1025) 216/V<sub>2</sub> та 216/ КС (*Erwinia carotovora* 216), отримані в нашій лабораторії з рослин цукрового буряку [5]. Віруси накопичували на відповідних культурах у поживному бульйоні з зерацією за температури 25°C. У дослідах використовували лізати бактерій з концентрацією 10<sup>9</sup> пліямоутворюючих одиниць (ПУО) на мілілітр. Титри бактеріофагів визначали за Граціа [6].

Для вивчення спектра літичної активності фагів використовували патогенні для сільськогосподарських рослин бактеріальні культури: *P. syringae* pv. *tabaci* шт. 223, *P. syringae* pv. *aptata* шт. 185, *P. syringae* pv. *tabaci* шт. 8646, *P. chlorophagis* шт. 8612, *Burkholderia gladioli* pv. *alliiicola* 8494, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4228, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *P. viridiflava* 8867, *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *P. syringae* pv. *syringae* 8653, *B. polymixta* 9034, *P. fluorescens* 8573, *P. viridiflava* 8868 успіху не мали.

*P. syringae* pv. *aptata* шт. 8545, *P. syringae* pv. *syringae* шт. 8653, *B. polymixta* шт. 9034, *P. fluorescens* шт. 8573, *P. viridiflava* шт. 8868, отримані з колекції музею відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім. академіка Д.К. Заболотного НАН України.

Визначення дії вірусів на азотфіксуючі бактерії проводили на промислових штамах азотфіксуючих культур: *Agrobacterium radiobacter* шт. 10 та 204 (препарат діазофіт), *Bacillus subtilis* шт. 26D (препарат фітоспорин), *Bacillus polymixta* шт. 6M, KB (препаратори БСП, поліміксобактерин), *Azotobacter chroococcum* шт. 20 (препарат азотбактерин), *Enterobacter nitimpressuris* шт. 32-3, 30-Ф (препаратори ФМБ, ризоентерин), *Bradyrhizobium japonicum* шт. М-8 (препарат ризобофтіт, соя), *Bradyrhizobium* sp. 29 (Оловігічні) (препарат ризобофтіт, еспарцет), *Synergistobacter meliloti* шт. 4 (препарат ризобофтіт, люцерна), *Rhizobium leguminosarum* шт. П-2 (препарат ризобофтіт, горох), наданих лабораторією екології ґрунтівих мікроорганізмів Інституту агрономії та біотехнології УААН.

Обробку рослин цукрового буряку препаратами фагів проводили за допомогою розпилювача. Біологічну активність фагів на листях цукрового буряку визначали титруванням їхніх змивів на чутливих культурах за Граціа. Для можливості зіставлення результатів з листової пластинки за допомогою металевого штампу робили висічки з фіксованою площею. Ці висічки витримували за 4°C упродовж 12 год із постійним струшуванням.

Для визначення біологічної активності фагів на насінні цукрового буряку проби замочували на 2 год у фаголізатах бактерій і просушували до сипкості. Екстракцію фагів проводили фізіологічним розчином упродовж 12 год з постійним струшуванням. Отримані змиви обробляли хлороформом і титрували. Біологічну активність фагів визначали через 1, 3, 6, 18, 24, 50, 100 днів після обробки.

Фаголізати висушували й витримували за 20°C упродовж 180 днів. Біологічну активність фагів визначали через 1, 3, 6, 18, 24, 50, 100, 180 днів. Висушений зразок фага змивали стерильним фізіологічним розчином, обробляли хлороформом і титрували на відповідні чутливі культури.

**Результати та їх обговорення.** Визначення літичної активності фагів 7324/4, 7325/5, 1025/2, 1025/3, 216/V<sub>2</sub> та 216/ КС до 16 штамів фітопатогенних бактерій виявило, що бактеріофаги 7324/4, 7325/5 уражували тільки бактерій *X. axopodidis* pv. *beticola* 7325, бактеріофаги 1025/2, 1025/3 – тільки *P. syringae* pv. *atrofaciens* 1025 а 216/V<sub>2</sub>, 216/ КС – бактерій *E. carotovora* 216. Спроби отримати негативні колонії при зараженні цими бактеріофагами культур *P. syringae* pv. *tabaci* 223, *P. syringae* pv. *aptata* 185, *P. syringae* pv. *tabaci* 8646, *P. chlorophagis* 8612, *Burkholderia gladioli* pv. *alliiicola* 8494, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4228, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *P. viridiflava* 8867, *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *P. syringae* pv. *syringae* 8653, *B. polymixta* 9034, *P. fluorescens* 8573, *P. viridiflava* 8868 успіху не мали.

Зараз у сільському господарстві використовують бактеріальні добрива, створені на основі симбіотрофних азотофіксуючих мікроорганізмів [7], тому досліджувані бактеріофаги перевіряли на здатність уражувати дев'ять виробничих штамів азотофіксуючих бактерій, які входять до складу цих препаратів.

Результати показали, що жоден з тестованих бактеріофагів не уражав культури *Agrobacterium radiobacter* шт. 10 та 204, *Bacillus subtilis* 26D, *Bacillus polymyxa* 6M, КВ, *Azotobacter caelosacrum* 20, *Enterobacter litoralis* 32-3, 30-Ф, *Bradyrhizobium japonicum* M-8, *Bradyrhizobium* sp. 29 (*Onobrychis*), *Sinorhizobium meliloti* 4, *Rizobium leguminosarum* P-2.

Важливим фактором у розробці антибактеріальних препаратів на основі бактеріофагів є термін їхньої біологічної активності. Встановлено, що бактеріофаги зберігають свою інфекційність на поверхні листя цукрового буряку без зміни концентрації впродовж не менш як 24 діб у лабораторних умовах і не менш як 12 діб у польових, хоч в останньому випадку концентрація поступово зменшується.

При зберіганні лізатів бактерій за 4°C фаги не втрачали інфекційності впродовж п'яти років, хоч її титр поступово знижувався. Так, для фагів 1025/2, 1025/3, 216/V<sub>2</sub> та 216/ KC перший титр становив 10<sup>10</sup> ПУО/мл, а через п'ять років він знишився до 10<sup>8</sup> ПУО/мл. За той самий період часу концентрація ізолятів 7324/4, 7325/5 зменшилась від 10<sup>10</sup> ПУО/мл до 10<sup>8</sup> ПУО/мл.

Одним з найбільш простих методів використання бактеріофагів є обробка рослин і насіння суспензією, що містить фаги. Встановлено, що бактеріофаги добре адсорбується на поверхні насіння цукрового буряку. Дослідження динаміки зміни інфекційної активності фагів показало, що в перші

6–12 діб інфекційний титр фагів 1025/2, 1025/3, 216/V<sub>2</sub> та 216/ KC знишився до 10<sup>8</sup> ПУО/мл, а фагів 7324/4, 7325/5 – до 10<sup>4</sup> ПУО/мл. При зберіганні обробленого насіння спостерігалось поступове зменшення інфекційного титру фагів до 10<sup>2</sup>–10<sup>4</sup> ПУО/мл на 100-й день.

Відомо, що найбільш зручними для зберігання, транспортування та використання є препарати у вигляді порошку. Їх досить ліпко розводити та дозувати, а, можливо, й додавати до інших засобів захисту рослин або мікродобрив. У результаті проведених нами досліджень встановлено, що у висушенному вигляді отримані нами фаги можуть зберігатися, не втрачаючи активності впродовж шести місяців, навіть за кімнатної температури.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що досліджувані фаги є специфічними за колом хазяїв і не виявляють літичної активності до промислових штамів азотофіксуючих бактерій. За штучного внесення в екосистему вони характеризувались певною стійкістю до впливу факторів зовнішнього середовища. Це дозволяє вважати їх перспективними щодо створення препаратів для захисту сільськогосподарських рослин від патогенної мікрофлори.

1. Moore E.S. // South Afr. J. Sci. – 1926. – Vol. 23. – P. 306. 2. McNeil D.L., Romero S., Kandula J. et al. // New Zealand Plant Protect. – 2001. – Vol. 54. – P. 220–224. 3. Civerolo E.L. // Phytopathology. – 1973. – Vol. 63. – P. 1279–1284. 4. Kutter E., Sulakvelidze A. Bacteriophage: biology and application. – Baltimore, 2004. 5. Бойко А. Л., Семчук Л. І., Ромашев С.А., Андрійчук О. М. // Вісн. аграр. наук. – 2001. – № 8. – С. 51–53. 6. Adams M. Bacteriophages. – M., 1961. 7. Смирнов В.В., Патока В.П., Підгорський В.С. та ін. // Агробіол. журн. – 2002. – № 3. – С. 3–9.

Надійшла до редакції 22.10.04

УДК 578.85/.86

Т.П. Шевченко, канд. біол. наук, А.Л. Бойко, д-р біол. наук, О.А. Кондратюк, канд. біол. наук, Г.М. Орловська, провід. інж., Л.В. Свиридовська, провід. інж., С.М. Петренко, інж., Г.А. Назаренко, студ.

## НАСІННЄВІ ВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ СОНЯШНИКУ РІЗНИХ СОРТИВ

Проведені дослідження з детекції вірусних захворювань соняшника в посіяному матеріалі, встановлено, що тільки два сорти містять антигени ВПЗТ, а передпосівна термотерапія є ефективною щодо оздоровлення насіння соняшнику від віруса мозайки люцерни та не впливає на оздоровлення насіння соняшнику від вірусу огіркової мозайки, оздоровлення насіння соняшнику від віруса плямистого зів'янення томатів перебуває в залежності від лінії.

*Results of the investigations of virus diseases of sunflower in plant material demonstrated that only two cultivars contained TSWV antigens. The presowing thermotreatment is an efficient measure for elimination of AMV antigens from plant material, but does not affect the content of CMV antigens in plants. The elimination of the antigens of TSWV is line-dependent.*

**Вступ.** Мета сертифікації насіння цінних сільськогосподарських культур полягає в забезпеченні генетичної ідентичності та чистоти сорту, його здатності до вирощування, а також відсутності патогенів, які передаються насінням. Велика кількість фітопатогенних грибів, бактерій і вірусів можуть передаватися через насіння, що є визначальним в епідеміології даних захворювань. Уражене насіння є місцем зберігання збудників багатьох вірусних хвороб, осередком виникнення масових епіфітотій, зумовлених активізацією локалізованих у насінні вірусів [1, 2].

Відомо, що 0,1 % вихідної насіннєвої передачі збудника достатньо для того, щоб призвести до значних втрат врожаю. Наслідком такої передачі навіть поодинокими насінинами є ураження нових географічних районів [3].

**Мета роботи** – провести детекцію антигенів вірусів, що уражують соняшник і передаються насінням, а саме, вірусу плямистого зів'янення томатів (ВПЗТ), вірусу мозайки люцерни (ВМЛ) та вірусу огіркової мозайки (ВОМ). На наявність вірусних інфекцій у насінні було обстежено такі сорти, як Лідер, Погляд, Запорізький-9, Красень, Прометей, Березанський, Салют, Запорізький-22, Запорізький-32 та три елітні та суперелітні лінії соняшнику ЗЛ-102Б, БК-464Б та ЗЛ-22Б.

**Об'єкт та матеріали дослідження.** Детекцію вірусів проводили такими методами, як непрямий імуноферментний аналіз у модифікації indirect-ELISA з використанням вірусоспецифічних кролячих полікліональних антитіл та електронна мікроскопія з використанням як контрастера водного розчину уранілацетату, інструментальне збільшення при цьому становило 65 000. За розробленими методиками, для визначення наявності фітовірусів у насінні аналізували 12-денні кільчики різних сортів і ліній соняшнику, гомогенізацію яких здійснювали у фосфатно-сольовому буфері (рН 7,4).

**Результати та їх обговорення.** У процесі досліджень з детекції вірусних захворювань соняшнику в посіяному матеріалі різних сортів соняшнику було встановлено, що тільки два сорти (Красень і Погляд) містять антигени ВПЗТ, а антигени ВМЛ та ВОМ не діагностувались.

Аналіз трьох суперелітних та елітних ліній соняшнику до проведення передпосівної термотерапії ліній методом ІФА на наявність ВОМ, ВМЛ та ВПЗТ виявив, що в насінні трьох ліній соняшнику найбільше містилося антигенів ВМЛ і найменше – ВПЗТ, проміжним був показник вмісту антигенів ВОМ. Було встановлено, що найбільш контамінованою вірусними антигенами є лінія ЗЛ-102Б (рис.1).

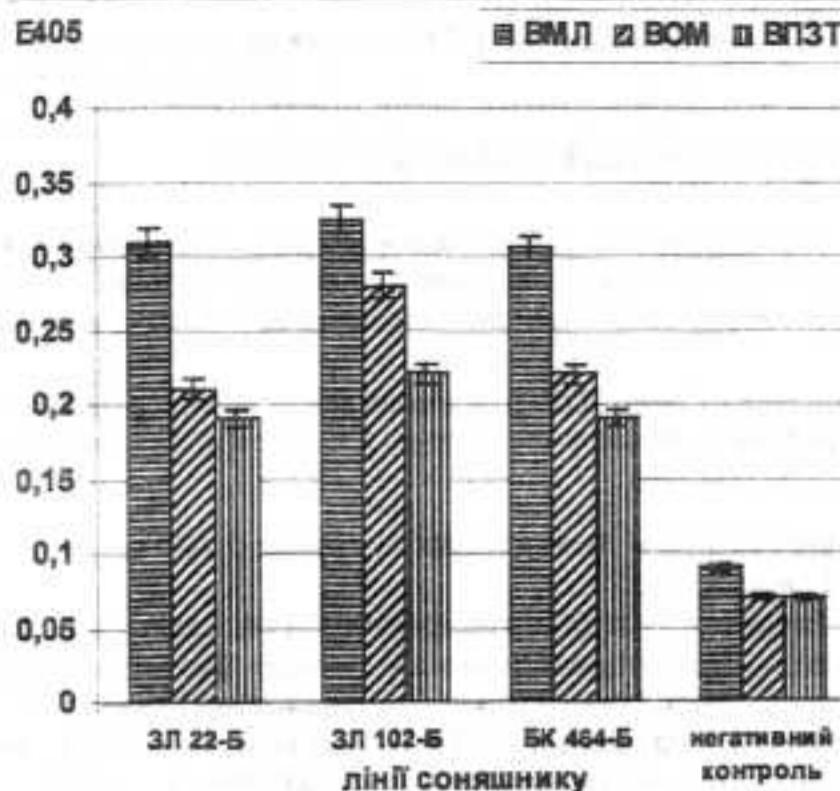


Рис. 1. Діаграма результатів ІФА наявності антигенів ВМЛ, ВОМ, ВПЗТ

У свою чергу наявність вірусних антигенів у лінії БК-464Б представлено таким чином: найбільше детектується ВМЛ, найменше – ВПЗТ та проміжним показником є наявність антигенів ВОМ. Аналіз ліній ЗЛ-22Б виявив найбільший уміст антигенів ВМЛ серед досліджуваних ліній і відносно однаковий рівень вмісту антигенів ВПЗТ та ВОМ. Присутність усіх тестованих антигенів у всіх лініях, що досліджувалися, свідчить про можливість сумісної вірусної інфекції даними вірусами.

Для підтвердження отриманих результатів було проведено ЕМ дослідження зразків. Це дозволило виявити ізометричні вірусні частинки розміром 29–30 нм, що є характерним для ВОМ, та поодинокі ізометричні частинки розміром 60–85 нм, що є типовим для ВПЗТ.

Передпосівна термообробка насіння соняшнику – це агроприйом, який є важливим моментом у комплексній системі заходів боротьби з вірусними хворобами соняшнику, забезпечуючи підвищення врожайності та якості насіння [4].

Оздоровлення посівного матеріалу від вірусних інфекцій проводили за допомогою передпосівної термообробки насіння трьох ліній соняшнику в режимі температур 59–60°C упродовж 6 год. Це термооброблене насіння та контрольне, що не проходили передпосівної термообробки, висівали в польових умовах.

При обстеженні посівів соняшнику на контрольних рослинах було виявлено широкий спектр вірусоспецифічних та вірусоподібних симптомів, пов'язаних з патологіями забарвлення та форми листків, росту та розвитку рослин у цілому. На дослідних рослинах, що проходили передпосівну термообробку, теж було виявлено симптомами, але в меншій кількості. Поширеними симптомами як на контрольних, так і на дослідних посівах були й деформація листової пластинки, хлоротична крапчастість, редукція листка, деградація верхівки рослини.

Для підтвердження вірусної природи симптомів і встановлення ефективності передпосівної термотерапії було проведено тестування дослідних і контрольних рослин та їхнього насіння на наявність антигенів ВОМ, ВМЛ та ВПЗТ методом ІФА. Згідно з розробленими методиками для визначення наявності фітovірусів у насінні аналізували 12-денні кільчики трьох ліній соняшнику методом імуноферментного аналізу.

У результаті його проведення було встановлено, що вміст антигенів ВОМ як у дослідних, так і в контрольних зразках однаковий у всіх лініях, що свідчить про неефективність передпосівної термообробки насіння соняш-

нику з метою інактивації ВОМ. Щодо наявності антигенів ВПЗТ, то порівняно з контролем зниження їх вмісту відбулося тільки у лінії БК-464Б на 45 % (рис.2).

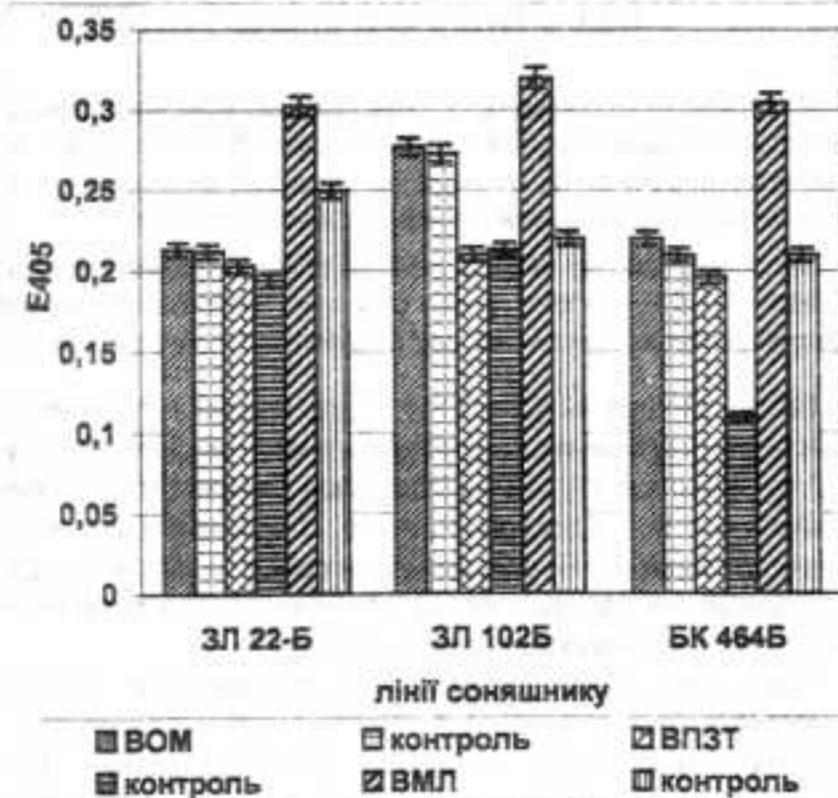


Рис. 2. Діаграма вмісту вірусних антигенів у насінні соняшнику після його передпосівної термообробки

Отже, результати ІФА вказують на те, що ефективність передпосівної термотерапії насіння соняшнику з метою звільнення від ВПЗТ залежить від лінії соняшнику. Щодо антигенів ВМЛ, то зниження їх вмісту відбулося у всіх дослідних зразках.

У лінії ЗЛ-22Б зменшилась присутність вірусних антигенів на 17,5 %, у лінії ЗЛ-102Б – на 31,2 % та у лінії БК-464Б – на 31 %, що свідчить про ефективність передпосівної термотерапії з метою оздоровлення насіння від ВМЛ.

Враховуючи результати досліджень впливу термотерапії на оздоровлення посівного матеріалу елітних і суперелітних ліній соняшнику від вірусів, що передаються насінням, було встановлено ефективність термообробки в режимі 59–60°C впродовж 6 год для знешкодження ВМЛ, який за морфологією є бацилоподібним. Водночас використаний нами режим передпосівної термообробки виявився неефективним щодо інактивації ВОМ. Крім того, ефективність термотерапії для інактивації ВПЗТ залежала від лінії соняшнику, про що свідчить зниження вмісту вірусних антигенів тільки в лінії БК-464Б. Це може бути пояснено сортовими відмінностями хімічного складу насіння.

**Висновки.** Отже, проведення передпосівної термообробки насіння має вибіркову дію на різні віруси та залежить також від лінії соняшнику. Аналіз сортів і трьох суперелітних та елітних ліній соняшнику встановив, що в насінні трьох ліній соняшнику найбільше містилося антигенів ВМЛ і найменше – ВПЗТ, тільки два сорти містили антигени ВПЗТ, при цьому антигени ВМЛ і ВОМ у них не діагностувались. Найбільш контамінованою вірусними антигенами (ВМЛ, ВОМ та ВПЗТ) виявилась лінія ЗЛ-102Б. Передпосівна термотерапія насіння в режимі 59–60°C є ефективною щодо оздоровлення насіння від ВМЛ, залежить від лінії соняшнику для ВПЗТ та не впливає на ВОМ. Передпосівна термотерапія насіння соняшнику викликала зниження наявності антигенів ВМЛ на 31,2 % у лінії ЗЛ-102Б, на 31 % – у лінії БК-464Б та на 17,5 % – у лінії ЗЛ-22Б.

1. Franki R. I. B., Rovert G. Milne et al. *Atlas of plant viruses*. – Raton, 1985. 2. Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.Y.L. *Virus taxonomy. Sixth report of the ICTV*. – Wien, 1995. 3. Князєва Н.А., Бойко А.Л., Закусило А.О. та ін. // Біополімери : клітина. – №8. – 1996. – С. 81–87. 4. Князєва О. А., Бойко А. Л., Смирнова С. О. *Насіннєві вірусні інфекції соняшника та методи їх діагностики*. – К., 1999.

УДК 578.81

М.О. Шугай, асп., Т.П. Шевченко, канд. біол. наук,  
А.Л. Бойко, д-р біол. наук

## СЕРОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ФАГІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

За допомогою твердофазного ІФА досліджено серологічну спорідненість трьох ізолятів фагів молочнокислих бактерій. Виявлено високий ступінь спорідненості (93,2 %) ізолятів 3Ф та 9Ф, на підставі чого їх віднесене до серотипу 1. Фаг 8Ф віднесено до серотипу 2, оскільки в перехресних реакціях нейтралізації з поліклональними антисироватками до 3Ф та 9Ф не було виявлено спільних антигенних детермінант.

Serological affinity of three isolates of lactic acid bacteria phages were analysed using ELISA. 3Ф and 9Ф phage showed a high level of affinity (93,5 %), for that reason they were related to the serotype 1. Phage 8Ф was related to the serotype 2, because in cross reaction with polyclonal antisera to 3Ф and 9Ф common antigenic determinants were not revealed.

**Вступ.** Майже 70 років тому стало відомо, що бактеріофаги здатні спричиняти порушення виробничої молочнокислої ферментації [1]. Хоч з того часу технологія розробки заквасок постійно вдосконалюється, літичні фаги молочнокислих бактерій (МКБ) залишаються однією з головних причин порушення ферментативної активності, призводячи до значних втрат у молочній промисловості [2].

Проведені нами дослідження свідчать про значне поширення фагів МКБ на підприємствах молочного профілю України [3]. У кількох випадках вони стали причиною уповільнення та призупинення процесу виробництва. Виділені за цих умов ізоляти фагів 3Ф та 8Ф, а також фаг 8Ф, які належать до різних літичних груп, було відібрано для проведення подальших досліджень.

Першим етапом вірусної інфекції є адсорбція фагової частинки на поверхні чутливої клітини-хазяїна. Тому дослідження серологічних властивостей фагів МКБ, результати яких може бути використано для потреб виробництва, є актуальними.

**Об'єкт і методи дослідження.** Для репродукції фагів використали такі штами бактерій-хазяїв: для 3Ф – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1106, 8Ф – *L.lactis* subsp. *cremoris* 1211, 9Ф – *L.lactis* subsp. *lactis* 1112. Фаголізати високого титру отримували в рідкому поживному середовищі на основі гідролізованого молока. Очищення та концентрування вірусів проводили за допомогою диференціального центрифугування (28 000 об/хв, 2,5 год; центрифуга УЦП-65, ротор типу РПУ-30). Антисироватки одержували шляхом інtrapеритонеального введення мишам фагових суспензій з титром 10<sup>10</sup> ПУО/мл в об'ємі 0,5 мл. Імунізацію проводили трикратно з інтервалами у сім днів. Забір крові здійснювали на 10-й день після останньої імунізації.

З метою визначення титру отриманих антисироваток і дослідження серологічної спорідненості фагів застосували метод непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) indirect ELISA [4]. Реакції проводили з трьома розведеннями антисироваток (1 : 500, 1 : 1000 та 1 : 2000), що дозволило оцінити ступінь вираженості реакції. Для виявлення антитіл використовували видоспецифічні антиглобулінові кон'югати, мічені пероксидазою хрону. Результати реакцій обчислювали за допомогою ІФА-ридері.

Серологічну спорідненість вірусів обчислювали за формулою Арчетті [5], в якій замість величин констант нейтралізації використали значення оптичної густини, отримані за умов тестування фагів методом ІФА в гомо- та гетерологічних системах:

$$K \% = 100 \cdot \sqrt{\frac{A/B}{A/A} \cdot \frac{B/A}{B/B}}$$

де A/B та B/A – оптична густина в гетерологічних системах з антигенами A та B, відповідно; A/A та B/B – оп-

тична густина в гомологічних системах з антигенами A та B, відповідно.

**Результати та їх обговорення.** На першому етапі досліджень було отримано мишачі поліклональні антисироватки до трьох ізолятів фагів. Тестування антисироваток з використанням методу ELISA дозволило визначити їхні титри, які становили для 3Ф – 1 : 3200, 8Ф – 1 : 10000 та 9Ф – 1 : 1500. Подальші дослідження спрямували на визначення серологічної спорідненості вірусів. Із цією метою використали метод ELISA в гомо- та гетерологічних системах. Як видно з рис. 1, 2, фаги 3Ф і 9Ф у перехресних реакціях з антисироватками до 9Ф і 3Ф показали досить високі значення оптичної густини порівняно з тими, які отримані в реакціях з гомологічними антисироватками. Цей факт засвідчує існування спільних для фагів 3Ф і 9Ф антигенних детермінант, з якими в перехресних реакціях прореагували активні центри антитіл [6]. За формулою Арчетті серологічна спорідненість цих вірусів становить близько 93,2 %, на підставі чого ізоляти фагів 3Ф і 9Ф можна віднести до одного серотипу.

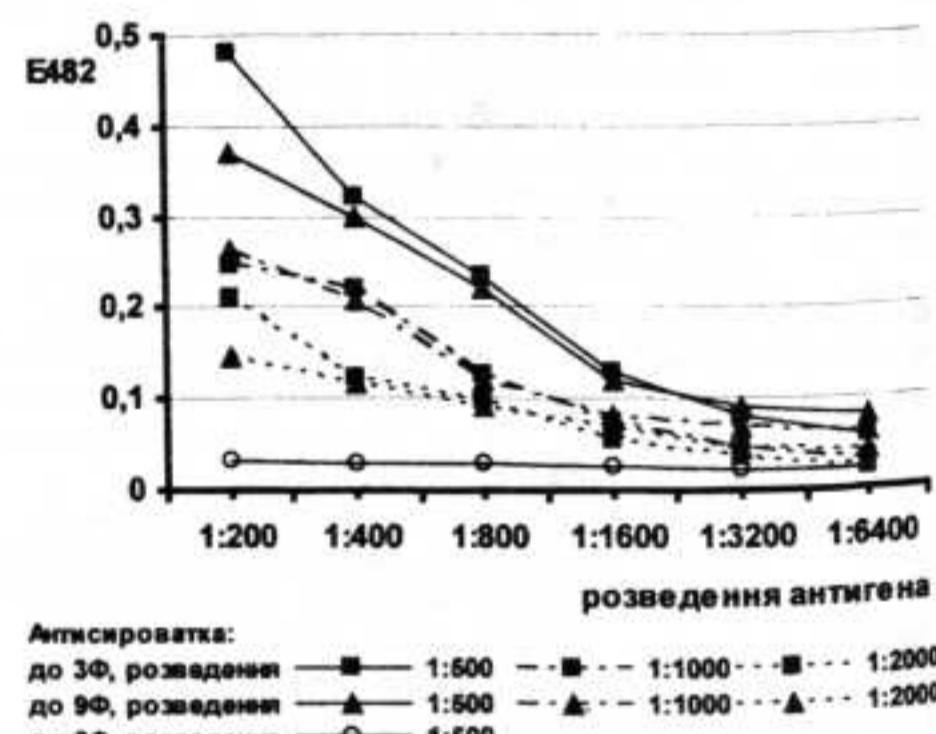


Рис 1. Криві тестування фага 3Ф у гомо- та гетерологічній системах

Проте згідно з попередніми дослідженнями вищезазначені фаги відрізняються деякими характеристиками: мають різних бактерій-хазяїв, виявляють різну чутливість до підвищеної температури, формують дещо відмінні негативні колонії із зоною неповного лізису. Але це не суперечить даним, отриманим за допомогою ІФА, про високу серологічну спорідненість 3Ф і 9Ф. Адже за умов взаємодії фага з поліклональною антисироваткою відбувається нейтралізація як антигенів фагової голівки, так і антигенів його хвостового відростка. На відміну від цього у випадку взаємодії фага із чутливими клітинами з рецепторами бактерій реагують

виключно антигенні детермінанти хвостового відростка. Факт існування різного кола хазяїв для обох вірусів свідчить про відмінності структури хвостових відростків фагів. Таким чином, можемо зробити висновок, що обидва фаги мають подібні антигенні детермінанти голівки, але відрізняються антигенними детермінантами хвостового відростка.

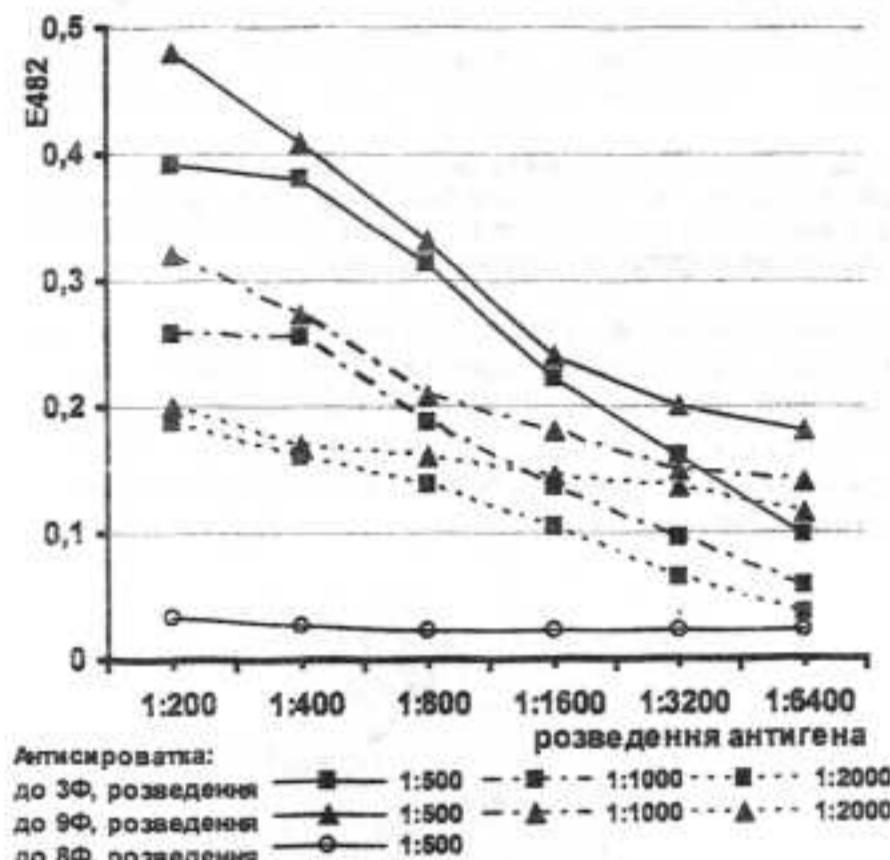


Рис. 2. Криві тестування фага 9Ф у гомо- та гетерологічних системах

Зауважимо, що у трьох з восьми досліджуваних на наявність вірусів зразках було виявлено фаги, в яких спектри літичної активності збігаються з літичною активністю ЗФ, а негативні колонії мають певну подібність. Окрім того, один із цих фагів, а саме 11Ф, був ізольований з того самого зразка, що й 9Ф. Уявивши до уваги цей факт, а також вищезгадані результати ІФА, можемо зробити припущення, що 9Ф походить від ЗФ, тобто є його мутантом зі зміною кола хазяїв ( $Rh^+$ ). Можливо, завдяки змінам у структурі хвостового відростка 9Ф набув здатності репродукуватися на "нових" штамах, але при цьому втратив здатність до репродукції на "материнських" штамах. Частота виникнення таких мутантів за одними даними становить  $10^{-8}$  [7], за іншими –  $10^{-7}$  [8]. Окрім того, відомо, що адсорбція є одним з головних факторів, лімітуючих репродукцію фага [7]. Таким чином, унаслідок  $Rh^+$ -мутацій фаги набувають здатності адсорбуватися, а отже, згодом і репродукуватися на клітинах серологічно споріднених штамів МКБ. Тому для забезпечення стабільності процесу виробничої ферментації недоцільно вводити до складу закваски серологічно споріднені штами молочнокислих бактерій.

За допомогою ІФА в гетерологічних системах фагів ЗФ і 9Ф з антисироваткою до 8Ф отримано значення оптичної густини, що лежать нижче порогового рівня чутливості даного методу. Аналогічні результати було показано за умов використання фага 8Ф та антисироватки до ЗФ і 9Ф, оскільки вищезгаданий фаг дав позитивну реакцію лише з гомологічною антисироваткою (рис. 3).

На підставі цього можна зробити висновок, що фаг 8Ф містить на своїй поверхні антигенні детермінанти, які відрізняються від антигенної детермінант фагів ЗФ і 9Ф, а отже, віднести його до серотипу 2.

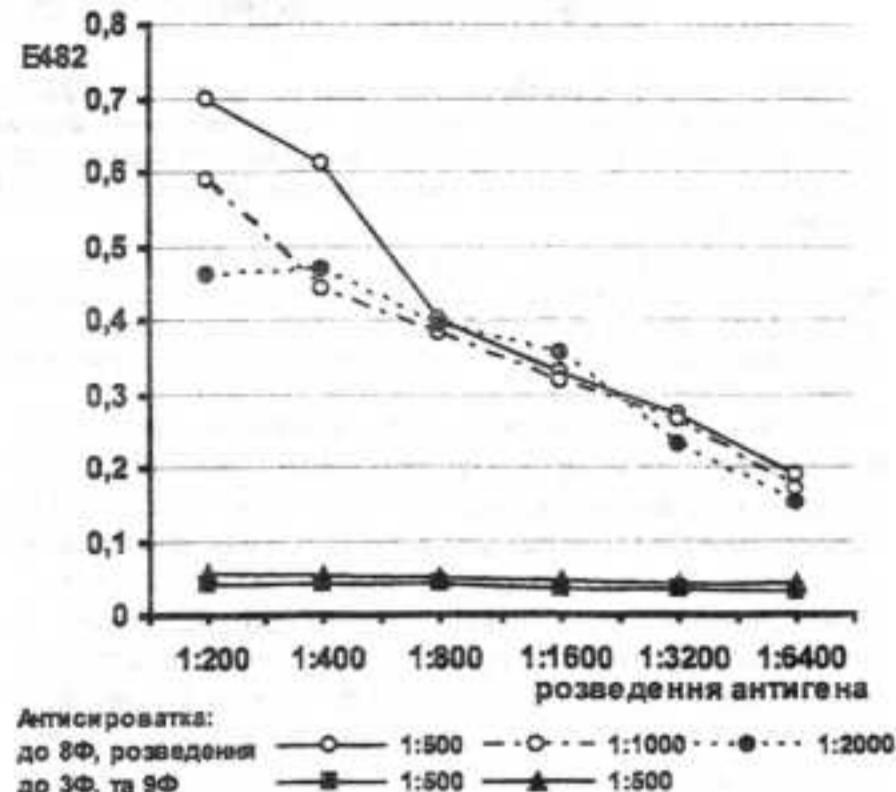


Рис. 3. Криві тестування 8Ф у гомо- та гетерологічних системах

Згідно з [9], відсутність нейтралізації чи слабка нейтралізація фагів МКБ у гетерологічних системах корелює з фаговими видами. Тому, можливо, фаги серотипів 1 та 2 належать до різних видів. Проте дати однозначну відповідь допоможуть подальші дослідження.

**Висновки.** За допомогою твердофазного ІФА виявлено високий ступінь спорідненості (93,2%) ізолятів ЗФ і 9Ф, на підставі чого їх віднесено до серотипу 1. Фаг 8Ф віднесене до серотипу 2, оскільки в перехресних реакціях нейтралізації з полікліональними антисироватками до ЗФ і 9Ф не було виявлено спільніх антигенної детермінант.

Зважаючи на високу частоту виникнення  $Rh^+$ -мутантів, при створенні заквашувальних композицій і для проведення ротацій необхідно добирати серологічно неспоріднені штами МКБ. Це дозволить зменшити ймовірність виникнення фагів-мутантів, активних до штамів закваски.

1. Whitehead, H.R., and G.A. Cox. // N.Z.J. Sci. Technol. – 1935. – №16. – P. 319–320. 2. Gabs S., Josephsen J. // Letters in Applied Microbiol. – 2003. – Vol.36. – P. 320–332. 3. Шугай М.О., Бойко А.Л., Рожанська О.М., Кігель Н.Ф. // АгроЭкол. журн. – 2004. – №3. – С. 69–71. 4. Антитела. – Кн. 2. Методы / Под ред. Д. Катти. – М., 1991. 5. Траценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская З.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М., 1989. 6. Ройт А., Бросток Дж., Майл Д. Иммунология. – М., 2000. 7. Jarvis A.W. // Appl. and Environmen. Microbiol. – 1978. – Vol.36, №6. – P.785–789. 8. Промышленная микробиология / Под ред. И.С. Єгорова. – М., 1989. 9. Geller B.L., Klaus J., Schell M.D., Hornsby M.J. et al. // J. Dairy Scienc. – 1998. – Vol.81. – P.895–900.

Надійшла до редколегії 22.10.04

УДК 579.869.1.826.2

Ф.І. Товкач, д-р біол. наук, О.Б. Балко, асп.

## СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНА ОРГАНІЗАЦІЯ БАЗАЛЬНИХ ПЛАСТИНОК ДЕФЕКТНИХ ПОМІРНИХ БАКТЕРІОФАГІВ *ERWINIA CAROTOVORA*

Для аналізу будови базальних пластинок різних дефектних фагів *E. carotovora* та помірного ервініофага ZF-40 застосовано цифрову растрову обробку їх електронно-мікроскопічних зображень. Уперше показано, що за структурно-морфологічною організацією частинки типу базальних пластинок (BPJ) штаму J2 не мають аналогів серед інших подібних структур. Ця обставина, а також чотириосьова симетрія BPJ можуть свідчити про прадавнє походження даних утворень фагової природи.

*For the analysis of the baseplate structure of different defective phages of *E. carotovora* and the temperate bacteriophage ZF-40 of these bacteria the raster processing of electronic microscopic micrographs has been used. For the first time it has been established that the baseplate-like particles (BPJ) of the strain J2 don't have any analogous elements in their structural and morphological organisation. This pointed out phenomenon and fourfold symmetry of BPJ can testify the ancient origin of these phage elements.*

**Вступ.** При дослідженні фітопатогенних пектолітичних бактерій *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* було встановлено наявність дефектної множинної лізогенії як видової ознаки [1]. У складі свого геному ця бактерія містить профаги, тобто має потенційну здатність до виділення різноманітних помірних бактеріофагів. Вплив на такі штами факторів, які приводять до індукції бактеріальної SOS-системи, викликає синтез фагових компонентів. В індуктованих лізатах клітин *E. carotovora*, як правило, виявляються голівки, базальні пластинки та хвостові відростки, які не здатні збиратися в цілісні віріони. Вивчення цих структур показало, що тільки фагові хвостові відростки вбивають чутливі клітини. Із цієї причини їх було віднесено до макромолекулярних бактеріоцинів.

Однією з незвичних особливостей профагів *E. carotovora* J2 є утворення ними надлишку частинок типу фагових базальних пластинок – BPJ [2]. Подібне явище з урахуванням можливої біологічної активності в літературі ще не описане і становить значний науковий інтерес. Розвиток структурно-морфологічних досліджень частинок дефектних помірних бактеріофагів міг би створити передумови для встановлення походження дефектної лізогенії у фітопатогенів, а також її ролі в екології цих важливих бактерій.

**Матеріали та методи.** Структурно-морфологічну організацію частинок типу базальних пластинок штаму J2 *E. carotovora* досліджували методом електронної мікроскопії [2]. Фотографічні зображення отриманих препаратів переводили в цифрову форму та аналізували за допомогою програми для растрової обробки графіки Adobe Photoshop.

**Результати та їх обговорення.** Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що структури типу базальних пластинок превалують у лізатах, індуктованих налідиксою кислотою (20 мкг/мл). Вони не зв'язані між собою та із хвостовими відростками дефектних фагів. Дані утворення мають нечіткі розмиті контури (рис. 1) і перебувають у трьох конформаційних станах: "велосипедного колеса", невпорядкованих "клубків" і симетричних окружлих "клубків" із чітко вираженою центральною частиною [2]. Вихідячи із цього, можна припустити, що просторова організація частинок BPJ є сферичною або близькою до такої й характеризується середнім діаметром 39,8 нм.

Порівняльне вивчення електронно-мікроскопічного зображення частинок BPJ та його цифрового аналога (рис. 1) дозволило виявити особливості їхньої внутрішньої морфології. Ці структурні елементи виглядають, як темні та світлі поля характерної конфігурації, що чергаються між собою. На рис. 1 світлі ділянки позначені цифрами 1–4. Відрізки між протилежними ділянками 1 і 3, 2 і 4 проходять через центр симетрії четвертого порядку і мають одинакові розміри, які становлять близько 11,2 нм. Геометрія світлих ділянок додатково свідчить, що симетрія базальних пластинок не може бути

кратною трьом і відповідно шести. Це зумовлено тим, що в межах означених морфологічних ділянок (рис. 1, 1–4) виявляються парні округлі компоненти, які відображають їх чотириосьову симетрію. Як видно з рис. 1, основний складовий компонент BPJ загалом включає чотири ділянки.



Рис. 1. Цифровий аналог частинки BPJ, оброблений за допомогою растрової програми. Стрілками показані парні округлі компоненти. 1–4 – світлі ділянки, які характеризують чотириосьову симетрію

Оскільки ці зв'язані ділянки регулярно повторюються по всій поверхні сфери (наприклад, елемент 1, 4, 5 і 6, рис. 1), можна припустити, що вони формують структурно-морфологічну субодиницю вищого порядку, ніж окрема ділянка. При цьому характер внутрішніх зв'язків між структурними та структурно-морфологічними субодиницями залишається невідомим. Для його визначення доцільним є проведення рентгено-структурного аналізу BPJ.

Аналогічну будову було виявлено і в інших частинках. Зокрема, на одній із них можна спостерігати такі самі структурно-морфологічні субодиниці, як і в попередньому випадку. Попарно скомпоновані світлі ділянки в цій частинці формують чотирикутну пластинку, яка розташована у площині ABCD. У свою чергу, ця площа є перерізом кулі, на якій компоненти структурно-морфологічної субодиниці розташовані асиметрично щодо центра 0. Ця асиметрія свідчить про випуклість даної субодиниці й про сферичність частинки BPJ.

На відміну від частинок BPJ зі штаму J2 окремі базальні пластинки (БП), отримані аналогічним чином з *E. carotovora* 35A і життєздатного помірного ервініофага ZF-40 (рис. 2), мають принципово іншу морфологію. При обробці електронограм БП штаму *E. carotovora* 35A було встановлено, що ці фагоподібні структури характеризуються шестиосьовою симетрією. Як видно з рис. 2, по краях базальної пластинки розміщені характерні структурні компоненти, які формують специфічні конгломерати, або так звані "снігові шап-

ки". Кількість цих утворень у всіх БП даного штаму дорівнює шести. Крім того, в більшості з них чітко виділяється також і округла центральна частина, яка з'єднує зовнішні компоненти разом в єдину структуру та збігається із загальним центром симетрії. Незважаючи на деякі відмінності в будові, базальні пластинки інших штамів *E. carotovora* мали просторову структуру, подібну до вищеописаної.



Рис. 2. Базальна пластинка помірного бактеріофага ZF-40 після цифрової обробки

Наявність бокових структур незвичної форми в базальних пластинках фага ZF-40 (рис. 2) прямо свідчить про шестиосьову симетрію. Спільним для зазначеного компонента фагового віріону та БП зі штаму 35A є їхня плоска просторова організація. На відміну від ВРJ, ця особливість

значно полегшує цифровий аналіз електронно-мікроскопічних зображень. Як видно з рис. 2, базальна пластинка фага ZF-40 містить шість округлих світлих субодиниць чіткої морфології. Вони розташовані в окремих внутрішніх ділянках структури, які розділені між собою перетинками. Кожна така ділянка співвідноситься із зовнішньою бокою структурою. Прямі лінії, умовно проведені через центр частинки і протилежні субодиниці, не змінюють свого напрямку, що може свідчити про їх локалізацію в одній площині фагової базальної пластинки.

Таким чином, проведені дослідження виявили кардинальні відмінності частинок ВРJ від інших аналогічних структур фагової природи, які стосуються морфологічної організації й порядку симетрії. Уперше показано, що частинки типу базальних пластинок, отриманих лізогенною індукцією клітин *E. carotovora* J2, мають чотириосьову симетрію. Цей факт може свідчити про прадавнє походження даних утворень, які, можливо, є залишками невідомого життєздатного фага, який у процесі подовжених еволюційних змін втратив здатність до повноцінного внутрішньоклітинного розвитку. За морфологією та типом симетрії частинки ВРJ не мають відповідних аналогів, описаних у літературі, а тому потребують особливої уваги та подальшого детального дослідження.

1. Товкач Ф.І. Лізогенія і бактеріофаги *Erwinia carotovora*: Автореф. дис... д-ра біол. наук. – К., 2002. 2. Товкач Ф.І. Дефектна лізогенія *Erwinia carotovora* // Микробіологія. – 2002. – Т. 71, № 3. – С. 359–367.

Надійшла до редколегії 22.10.04

УДК 578:599.6(262.5)

О.А.Степанова, докторант

## ВИРУСНАЯ ПАТОЛОГИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ОБИТАЮЩИХ В НЕВОЛЕ В БУХТАХ СЕВАСТОПОЛЯ

*Вірусологічними й серологічними дослідженнями виявлено контакти ссавців, що живуть у неволі в бухтах Севастополя, з вірусами гепатиту З, грипу і морбілівірусами.*

*Serological and virological studies testified the contact of mammals, living in captivity in bays of Sevastopol, with viruses of Hepatitis C, viruses of influenza and morbilliviruses.*

**Вступление.** Неконтролируемая антропогенная деятельность и загрязнение Мирового океана вызывают отрицательные изменения в биологических сообществах. Среди высокоорганизованных обитателей водоемов – млекопитающих – под влиянием экологических дисбалансов возникают нарушения обменных процессов, снижаются защитные свойства организма и, как следствие, ослабляется иммунологический статус, что повышает их восприимчивость к инфекционным болезням.

Вирусные инфекции играют определенную роль в инфекционной заболеваемости и смертности теплокровных гидробионтов. И хотя эта проблема представляет огромный интерес для широкого круга специалистов, она еще недостаточно изучена.

Анализ публикаций [1] позволил установить, что у теплокровных морских животных выявлены контакты с арбо-, адено-, энtero-, калици-, поксо-, ретро-, рабдо-, парамиксо- (род парамиксо- и род морбилилли-), гепадно- и другими вирусами, приводящими к патологическим состояниям разной степени тяжести – от бессимптомного носительства и иммунного ответа до смертельного исхода. Так, только от эпизоотий, вызванных морбиливирусом, разразившихся в 1987–1988 гг., среди млекопитающих в Европе и Сибири погибло около 120 тыс. животных. И в мире пока еще не спокойно в отношении морбиливирусной инфекции: есть сообщение [2], что она активизировалась и в 2002 г.

По сведениям из публикаций [3] в 1990 г. морбиливirus уже поражал морских млекопитающих Средиземного моря. Логично предположить, что в тогда же

вирус проник и в воды Черного моря. В 1989–1990 гг. на Западном и Южном побережье Крыма сотрудниками лаборатории БРЭМА (г. Симферополь) было обнаружено небывалое количество (271) мертвых дельфинов азовок. В пересчете на весь периметр Черного и Азовского морей получилась цифра в несколько тысяч павших животных [4]. Однако информации о причине эпизоотий 1989–1990 гг. у побережья Крыма обнаружить не удалось. Можно лишь предположить, что гибель млекопитающих была вызвана морбиливирусной инфекцией. Впервые ее роль в массовом море черноморских дельфинов-белобочек, разразившемся в июле–сентябре 1994 г., была установлена сотрудниками лаборатории БРЭМА совместно с доктором Т. Куйкеном из Саскачеванского университета (Канада). Это заразное для морских млекопитающих заболевание ранее никогда не регистрировалось в Черном море. Опасность ситуации заключалась в том, что вспышки инфекции в черноморском регионе могли повторяться, причем вирус способен перекинуться и на другие виды черноморских дельфинов [4, 5, 6].

Факт проникновения морбиливирусной инфекции в Черное море, впервые установленный сотрудниками лаборатории БРЭМА, и явился основной причиной изучения материала от подневольных теплокровных гидробионтов бухт Севастополя. Помимо исследований, направленных на изучения контакта этих животных с морбиливирусом, были проведены и иные анализы,

тестирующие наличие контактов теплокровных обитателей севастопольских бухт и с другими вирусами.

**Матеріал и методы исследований.** В 1997 г. от подневольных животных (моржа *Odobenus rosmarus*, белухи *Delphinapterus leucas* и сивуча *Eumetopias jubatus*), обитающих в Артиллериийской бухте, были взяты смывы из дыхательных путей. Состояние здоровья животных на момент отбора проб было удовлетворительным, что отмечалось наблюдениями ветеринарного врача.

В том же 1997 г. у трех бутылконосных черноморских дельфинов *Tursiops truncatus*, обитающих в Казачьей бухте (Государственный океанариум), брали кровь. Состояние здоровья этих животных, по наблюдениям ветеринарного врача, было неудовлетворительным: у них отмечались неподвижность или малоподвижность, отсутствие аппетита, увеличение частоты дыхания, нарушения в системе пищеварения (жидкие, водянистые испражнения).

В 1999 г. у трех бутылконосных черноморских дельфинов *Tursiops truncatus* и белухи *Delphinapterus leucas*, обитающих в неволе в Артиллериийской бухте, в целях профилактического обследования брали кровь и смывы из дыхательных путей. По заключению ветеринарного врача состояние здоровья трех животных (двух дельфинов и белухи) на момент отбора проб было удовлетворительным. А у одного из дельфинов отмечались нарушение координации движений, воспаление глаз и одышка (увеличение частоты дыхания).

Смывы изучали вирусологически с использованием культуры клеток L-41. Эта культура клеток является чувствительной по отношению к заражению энтеровирусами, инфицирование которыми вызывает специфическое цитопатогенное действие. Кровь исследовали серологически методом иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие антител к вирусам гепатита A и C, в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) на наличие антител к видовым антигенам вируса гриппа – A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) на присутствие антител к видовому представителю морбиливирусов – вирусу кори. Также сыворотки были проверены методом ИФА на наличие поверхностного антигена вируса гепатита B-HbsAg.

Забор материала от животных, транспортировка, хранение, обработка и подготовка проб для исследований, проведение вирусологических и серологических анализов осуществлялись в соответствии с методиками и требованиями, принятыми в медицинских учреждениях. Весь материал от морских животных изучали в вирусологической лаборатории Севастопольской городской санэпидстанции.

**Результаты и обсуждение.** При вирусологическом исследовании материала 1997 г. (смывов из дыхательных путей здоровых на момент забора крови животных – моржа, белухи и сивуча) на культуре клеток L-41 эффекта цитопатогенного действия не наблюдалось, то есть были получены отрицательные результаты.

Сыворотки крови больных (в момент забора материала) дельфинов в 1997 г. были изучены на наличие антител к вирусам гепатита A и C, к видовым антигенам вируса гриппа, к морбиливирусу кори, а также на наличие поверхностного антигена гепатита B-HbsAg. Проведенный серологический анализ позволил выявить два положительных результата: методом ИФА в крови одного дельфина определены антитела к вирусу гепатита C (сыворотку исследовали только в разведении 1 : 100, титрования не проводили), в сыворотке другого дельфина методом РПГА были выявлены антитела к морбиливирусу кори в титре 1 : 20, что указывает на инфицированность этих животных вирусом гепатита C и морбиливирусом. Есть сведения о выяв-

лении у морских млекопитающих вирусных гепатитов [7, 8]. Однако в доступной нам литературе мы не обнаружили описания вирусных гепатитов, этиологически обусловленных вирусом гепатита C. Какова эпидемиология этой инфекции у морских млекопитающих, в частности у дельфинов, в настоящий момент установить не представляется возможным. Это предмет дальнейших дискуссий и исследований ученых.

Обнаружение в 1997 г. антител к морбиливирусу кори в крови больного дельфина свидетельствует о морбиливирусной инфекции. Известно, что гомология нуклеотидной последовательности гена матрикса морбиливируса морских млекопитающих с геном вируса кори составляет 58 %, а их белки имеют 77 % гомологии [9]. Поскольку в нашем исследовании в сыворотке крови дельфина в РПГА выявлены антитела к вирусу кори в титре 1 : 20, то можно ожидать, что к морбиливирусу морских млекопитающих титр антител будет выше. Клиническая картина заболевания (малоподвижность, отсутствие аппетита, увеличение частоты дыхания, нарушения в системе пищеварения), наблюдавшаяся у дельфина в момент забора крови, не противоречила предполагаемому диагнозу "острая морбиливирусная инфекция с поражением нервной системы, дыхательных путей и пищеварительного тракта".

Наши исследования впервые привели к обнаружению в крови черноморского бутылконосого дельфина *Tursiops truncatus* антител к морбиливирусу. Данный факт подтверждал проникновение в Черное море морбиливирусной инфекции морских млекопитающих, ранее выявленной у черноморских дельфинов белобочек *Delphinus delphis* лабораторией БРЭМА (г. Симферополь) [5, 6].

Вирусологический анализ материала 1999 г. – смывов из дыхательных путей от внешне здоровых животных (двух дельфинов и белухи) – показал отрицательные результаты, то есть эффект цитопатогенного действия отсутствовал. Однако этот эффект проявлялся при первом пассаже материала от одного из трех исследованных дельфинов, состояние здоровья которого в момент забора пробы было неудовлетворительным. К сожалению, накопить и идентифицировать предполагаемый вирус не удалось, поскольку культура клеток L-41 не подходила для его выделения, что потенциально свидетельствует о принадлежности его к энтеровирусам.

Серологические исследования крови морских млекопитающих (материал 1999 г.) также позволили выявить некоторые положительные результаты. Так, методом РПГА в крови дельфина, материала от которого давал ЦПД в первом пассаже на культуре клеток, были выявлены антитела к морбиливирусу кори в титре 1 : 10, что, по нашему мнению, свидетельствует о его контакте с морбиливирусной инфекцией морских млекопитающих. Поскольку в нашем исследовании в сыворотке крови дельфина в РПГА выявлены антитела к вирусу кори в титре 1 : 10, то можно ожидать, что к морбиливирусу морских млекопитающих титр антител будет выше. Низкий титр антител в крови животного указывает либо на недавнее заражение и наличие вирусемии, либо на ранее (свыше 8–12 месяцев тому назад) перенесенную инфекцию, завершившуюся выработкой иммунитета. Эффект цитопатогенного действия на культуре клеток L-41 (используемых для выделения и накопления энтеровирусов), проявившийся при первом пассаже материала от этого дельфина и угасающий при последующих, не противоречит логичному предположению о наличии в смывах из дыхательных путей животного морбиливируса. Таким образом, на основании клинической картины заболевания (нарушение координации движений, воспаление глаз, одышка),

даних серології, неспецифіческого цитопатогенного дії (на культуре клеток L-41) первого пасажа смыва из дыхательных путей у исследуемого животного был поставлен диагноз острой морбіллівірусної інфекції з пораженiem нервної системи, слизистих оболочек глаз и дыхательных путей.

При изучении сыворотки крови четырех морских млекопитающих (материал 1999 г.) в РТГА на наличие антител к вирусным антигенам гриппа трех видов – A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> ( $H_3N_2$ ) для трех дельфинов были получены отрицательные результаты, а в крови белухи обнаружены антитела в титрах 1 : 10, 1 : 20 и 1 : 40 соответственно, причем последний титр считается диагностическим. Положительный результат в выявленном титре антител свидетельствует о контакте организма животного с вирусом гриппа. Можно предположить, что в нашем случае наличие антител у белухи (завезенной в Черное море из северных морей) свидетельствует о ранее перенесенной инфекции и приобретенном при этом иммунитете. В сообщениях исследователей есть информация о широком контакте разных видов морских млекопитающих с вирусом гриппа [10].

Как видно из проведенных исследований, нарушение в состоянии здоровья дельфинов, сопровождающееся теми или иными симптомами, обычно регистрируется положительными серологическими тестами либо наличием цитопатогенного действия на инфицированную культуру клеток, что свидетельствует об островом течении инфекции. Серологические анализы также позволили определить и контакт с вирусами в прошлом по наличию антител в крови, то есть по приобретенно-

му иммунитету, как это было в случае обнаружения антител к вирусу гриппа у здорового животного (белухи).

**Выводы.** Вирусологические и серологические исследования материала от подневольных млекопитающих, обитающих в бухтах Севастополя, выявили контакты этих теплокровных с вирусами гепатита С, гриппа и морбіллівірусами. Наши результаты свидетельствуют о том, что вирусы играют определенную роль в патологии черноморских млекопитающих. Однако работы в этом направлении ведутся недостаточно. Необходимы мониторинговые исследования, которые позволят определить иммунологический фон черноморских млекопитающих, изменения которого будут сигнализировать о возможных вспышках, эпизоотиях и других инфекционных состояниях, ведущих к нарушению численности и благополучия этих животных.

- Степанова О.А. // Экология моря. – 1998. – Вып.47. – С.56–60.
- Jensen T., Van-de-Bildt M., Dietz H.H. et al. // Science-Wash. – 2002. – Vol.297, N5579. – P.209.
- Jonston S. // The News letter of Discovery and Innovation. – 1990. – Vol.4, N9. – P.4.
- Биркун А., Кривохижин С. Звери Черного моря. О дельфинах и тюленях и их отношениях с человеком. – Симферополь, 1996.
- Birkun A., Krivokhizhin S., Stamenis A. // European research on cetaceans. – 1996. – Vol.9. – P. 266–268.
- Birkun A., Kuiken Jr.T., Krivokhizhin S. et al. // Veterinary Record. – 1999. – Vol.144, N1. – P. 85–82.
- Bossart G.D., Brawner T.A., Cabral C. et al. // J. Amer. Vet. Med. Assoc. – 1990. – Vol.196, N1. – P. 127–130.
- Dierauf L.A., Lowenstein L.J., Jerome C. // J. Amer. Vet. Med. Assoc. – 1981. – Vol.179, N11. – P. 1194–1197.
- Sharma B., Norrby E., Blixenkrone-Moller M., Kovarik J. // Virus Res. – 1992. – Vol.23, N1–2. – P. 13–25.
- Mandier J., Gorman O.T., Ludwig S. et al. // Virology. – 1990. – Vol.176, N1. – P.255–261.

Поступила в редакцию 29.10.04

УДК 578.245+579.24.

Н.О. Тимошок, канд. біол. наук, З.М. Олевинська, провід. інж.,  
Л.В. Косенко, д-р біол. наук, М.Я. Співак, д-р біол. наук

## ІНДУКЦІЯ ЦИТОКІНІВ РОСЛИННИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Проведено порівняльне дослідження біологічної дії рослинних препаратів (саврац, рагосин, кагоцел та нетоксичних лектинів *Vicia faba L.*, які можуть використовуватись для індукції цитокінів.

*It has been done the comparative investigation of biological action of plants preparations (Savrats, Ragosin and Kagotsel and also non toxic Lectins *Vicia faba L.*, which can be used for cytokines inducers.*

**Вступ.** Інтерферони (ІФН) належать до класу цитокінів і являють собою сімейство білків, яким притаманна антивірусна, імуномодулююча та протипухлини активність [1]. Багаторічний досвід використання препаратів ІФН у клінічній практиці дозволив встановити їхню ефективність для профілактики та лікування вірусних, бактеріальних і деяких онкологічних захворювань [1–3].

Встановлено, що антибактеріальна та атитоксична активність у препаратах інтерферону пов'язана із цитокінами, які при одержанні чистих препаратів ІФН значною мірою елімінуються [2–4]. Синтез більшості цитокінів у клітинах організму здійснюється транзиторно та індукується різними зовнішніми стимулами – індукторами, які активують клітини – продуценти [1, 5–8].

Як перспективні індуктори цитокінів увагу дослідників привертають препарати рослинного походження, які мають низку переваг: більш м'який вплив на імунну систему порівняно з відомими індукторами ІФН та відсутність антигенної активності [7].

У зв'язку із цим завданням нашого дослідження було в різних комбінаціях порівняльно дослідити кінетику продукції цитокінів під впливом рослинних препаратів для одержання природних комплексних препаратів ІФН та цитокінів.

**Об'єкт і матеріали дослідження.** Проведено скринінг біологічних властивостей таких нових індукторів ІФН рослинного походження:

- саврац, рагосин та кагоцел (поліфенольні похідні гіосиполу), які люб'язно надані Ф.І. Єршовим (Інститут епідеміології та мікробіології ім. Н.Ф. Гамалеї РАМН, м. Москва);

- лектин кормових бобів, виділений в ІМВ НАНУ та наданий Л.В. Косенко, та стандартні індуктори ІФН;

- poly(I)-poly(C) (Calbiochem, США). Як стандарт використовували відомі мітогени: конканавалін А (Кон А) (Sigma, США), фітогемаглутинін (ФГА) (Serva, Німеччина).

Для індукції цитокінів в умовах *in vitro* на моношар клітин тестикулів поросяти чи в суспензію лімфоїдних клітин мигдаликових хворих на тонзиліт людей, лейкоцитів людини або спленоцитів мишів вносили досліджувані препарати в дозах 10–500 мкг/мл, як стандарти застосовували відомі рослинні лектини конканаваліну А (Кон А – 10 мкг/мл) або фітогемаглутинін (ФГА – 20 мкг/мл) та інкубували у повітрі (вміст  $CO_2$  6 %) за температури 37°C. Через 6, 24, 48, та 72 год після інкубації клітин у культуральному середовищі (супернатанті) визначали рівень продукованого інтерферону та фактора некрозу пухлин (ФНП). Для контролю спонтанної продукції цитокінів вносили такий самий об'єм середовища.

Клітини інкубували загальноприйнятим методом, застосовуючи поживні середовища 199, Igla, RPMI-1640, в які вносили 10 % прогрітої за 56°C впродовж 30 хв ембріональної сироватки телят та антибіотиків (100 од/мл пенициліну, 100 мкг/мл стрептоміцину).

Біологічну активність ФНП визначали за допомогою цитотоксичного тесту, основаного на здатності даного цитокіну викликати лізис чутливих клітин-мішеней [8].

За калібрувальною кривою, що побудована на основі рекомбінантного ФНП Sigma, значення цитотоксичного індексу переводили в нанограми.

Активність індукованого ІФН оцінювали за пригніченням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) у гомолічній культурі. За одиницю активності ІФН брали величину, обернено пропорційну розведення проби, в якій спостерігався 50 % захист клітин від цитопатичної дії тест-вірусу (ВВС, США) [1].

**Результати та їх обговорення.** Однією з найважливіших характеристик індукторів ІФН, як і біологічно-активних речовин взагалі, є рівень їхньої токсичності. У роботі визначали токсичність інтерфероногенів, препаратів саврац, рагасин, кагоцел і лектину кормових бобів порівняно з відомими інтерфероногенами poly(I)-poly(C), ФГА та Кон А. У дослідах *in vitro* оцінювали залежність токсичності препаратів інтерфероногенів від їхньої дози (25 до 500 мкг/мл), а також від тривалості контакту клітин з препаратом (24–48 год). При цьому враховували як пряму цитотоксичну дію препаратів, так і специфічну відповідь окремих культур клітин, які використовували в роботі, а саме, ПТП, а також лімфоїдних клітин мигдаликових хворих на тонзиліт людей, лімфоцитів периферичної крові донорів.

Виявилось, що препарати саврац, рагасин, кагоцел і лектин кормових бобів у дозах 25, 100, 250 мкг/мл є по-

вністю нетоксичними як для культур клітин ПТП, так і для лімфоїдних клітин мигдаликових хворих на тонзиліт людей, лімфоцитів крові донорів. Токсична дія похідних госиполу – саврацу, рагасину та кагоцелу – виявлялась за дози 500 мкг/мл, при цьому на 48-му годину після контакту із цими препаратами життєздатність клітин ПТП, а також лімфоїдних клітин мигдаликових хворих на тонзиліт людей, лімфоцитів периферичної крові людини зменшувалась на 30 %.

Проведено порівняльну оцінку біологічної активності нових рослинних препаратів в умовах *in vitro*, які можуть використовуватися для індукції цитокінів.

Встановлено, що в даних системах активними інтерфероногенами є препарати саврац, рагасин, кагоцел у дозі 10 мкг/мл: титри ІФН у культуральному середовищі через 24 год після контакту досягають 40–80 од/мл. Проте нетоксичний лектин *Vicia faba L* у дозі 10 мкг/мл у даних системах при інкубації впродовж 72 год стимулював синтез ІФН до 128 од/мл.

Показано, що найбільш високі титри ІФН (до 256 од/мл) у лімфоїдних культурах клітин було одержано у випадку стимуляції мітогеном Кон А у дозі 10 мкг/мл. Стандартний індуктор poly(I)-poly(C) у системі *in vitro* стимулював інтерферон (до 100 од/мл).

Динаміка індукції ІФН під впливом досліджуваних препаратів, що культивувались з клітинами, суттєво відрізнялась (див.рис.).

Титр ІФН, од/мл



Динаміка накопичення ІФН у культуральному середовищі лейкоцитів периферичної крові під впливом рослинних індукторів

Так, у системі *in vitro* крива накопичення ІФН у культуральному середовищі при культивуванні лектину *Vicia faba L* з пізнім піком через 72 год подібна до кривої накопичення імунного ІФН у культурі лімфоцитів при їх обробці мітогенами ФГА та Кон А. Показано, що в системі *in vitro* похідні госиполу саврац, рагасин, кагоцел і лектин *Vicia faba L* стимулюють синтез пізнього ІФН. Максимум продукції ІФН при культивуванні з похідними госиполу припадав на 48-му годину після стимуляції, а лектину *Vicia faba L* – на 72-гу. Препарат кагоцел викликає два піки продукції ІФН, перший через 8–12 год та другий через 48 год.

Супернатанти, які містили ІФН, прогрівали протягом 30 хв за температури 60°C або експонували за pH 2,5 упродовж доби, після обробки проби повторно тестиувались на вміст ІФН. При цьому було показано, що така обробка культурального середовища значно знижувала інтерфероногенну активність зразків. Таким чином, досліджені фізико-хімічні властивості свідчили, що ІФН,

індукований препаратами лектин *Vicia faba L*, Кон А, ФГА, належить до ІФН II типу (ІФН-γ).

Разом з тим, прогрівання зразків супернатантів за сумісного культивування клітин з похідними госиполу – саврацом, рагасином, кагоцелом – та препарату poly(I)-poly(C) протягом 30 хв за температури 60°C або експонування за pH 2,5 упродовж доби не позбавляли їх здатності затримувати репродукцію вірусу в культурі клітин, тобто за своїми фізико-хімічними властивостями одержаний ІФН належав до I типу ( $\alpha/\beta$  – ІФН).

У цілому встановлені відмінності індукторної дії даних препаратів можуть бути пов'язані із фізіологічними особливостями культур клітин та умовами їх культивування.

Унаслідок перехрещення шляхів активації генів препарати кагоцел та лектин *Vicia faba L*, крім продукції ІФН, здатні до стимуляції фактора некрозу пухлин (ФНП). ФНП являє собою цитокін, який відіграє значну роль як в ефекторному, так і в регуляторному ланцюзі імунної реактивності організму.

Так, в експериментах *in vitro* встановлено, що препарати лектин кормових бобів *Vicia faba L* та кагоцел у дозі 20 мкг/мл у суспензії лімфоцитів мигдалин людини індукували ФНП у незначній кількості (1,8 і 1,4 нг/мл відповідно) проти 0,15±0,02 нг/мл у контролі.

У суспензії лейкоцитів периферичної крові людини спостерігалась інша картина. В інкубаційній рідині без препарату визначали 0,15 нг/мл ФНП, тоді як в інкубаційній рідині оброблених Кон А у дозі 20 мкг/мл клітин – 3,2 нг/мл, а у дозі 10 мкг/мл – 2,5 нг/мл. Клітини, які препаратом ФГА у дозі 20 мкг/мл, індукували ФНП у кількості 2,2 нг/мл, а у дозі 10 мкг/мл – 1,8 нг/мл. Клітини, які обробляли лектином кормових бобів *Vicia faba L* у дозі 20 мкг/мл, індукували невелику кількість ФНП – 1,8 ± 1,2 нг/мл, а у дозі 10 мкг/мл – 1,5 ± 0,8 нг/мл. Клітини, які обробляли препаратом кагоцел у дозі 20 мкг/мл – 1,5 нг/мл, а у дозі 10 мкг/мл – 1,5 нг/мл.

Препарат *poly(I)-poly(C)* здатністю до продукції ФНП не відрізняється, тобто рівень ФНП у культуральному середовищі залишався на рівні контролю 0,15 нг/мл.

На підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що індукуюча здатність клітин до продукції ФНП залежала від дози дослідних препаратів.

Істотне підвищення рівня ФНП у супернатантах при культивуванні клітин крові з препаратами спостерігали через 1 год після індукуції, а максимальні рівні ФНП – через 24 год після стимуляції. Слід відмітити ранню, майже одночасну продукцію ІФН- $\alpha/\beta$  та ФНП під впливом кагоцелу. Так, попереднє внесення цього препарату в дозах 5–10 мкг/мл за 12 год до стимуляції рослинними лектинами підвищувало вихід ІФН-у. Одержані ІФН-у при комбінації рослинних індукторів ІФН не потребують додаткового очищення, він є комплексним препаратом, до вмісту якого входять цитокіни ІФН- $\alpha/\beta$  та ФНП.

Отже, рослинні препарати є активними індукторами ІФН та ФНП. Вважають, що ІФН-у відіграє роль першого сигналу, що індукує синтез макрофагами різних монокі-

нів. Активуючі ефекти у – ІФН є опосередкованими через ФНП, якому притаманні такі функції, як підсилення експресії рецепторів до у – ІФН. Найбільш високі титри ІФН при культивуванні з препаратами відмічено при використанні лейкоцитів периферичної крові, лімфоїдних культур мигдаликів хворих на тонзиліт людей або спленоцитів мишів, ці культури містять суміш як Т-, так і В-лімфоцитів. Встановлений факт свідчить про необхідність тісної кооперації між клітинами імунокомпетентної системи для повноцінної інтерферонової відповіді.

**Висновки.** Таким чином, показано, що похідні госиполу саврац, рагосин, кагоцел є малотоксичними сполуками, які виявляють здатність до синтезу ІФН I типу. Нові рослинні препарати кагоцел і лектин *Vicia faba L* у системі *in vitro* мають здатність продукувати ІФН та ФНП. Одночасна здатність препарату кагоцел продукувати медіатори імунітету (ІФН та ФНП), які взаємопідсилюють експресію рецепторів до цих цитокінів, дозволяє використовувати його як кондуктор при біосинтезі ІФН-у. Продукція ФНП під впливом дослідних препаратів у часі випереджає синтез ІФН. Цілеспрямована комбінація нетоксичних, апірогенних індукторів рослинного походження дозволяє підсилити біосинтез природного ІФН-у.

- Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и патологии. – М., 1996.
- Зуєва В.С., Пашутин С.Б., Кузнецов В.П. и др. // Антибиотики и мед. биотехнология. – 1985. – №9. – С. 655–668.
- Кишка Я.Г. // Мікробіол. журн. – 1998. – Т.60, №5. – С.86–98.
- Meager A., Leung H., Wailey J. // J. Immunol. Meth. – 1989. – Vol.118, N1. – P.1–17.
- Амитина Н.Н., Тазулахова Е.Б., Ершов Ф.И. // Вопр. вирусологии. – 1984. – №3. – С. 310–312.
- Думанський В.Д. Розробка промисловотехнології отримання природних інтерферонів I та II типів: Автореф. дис... канд. техн. наук. – К., 1994.
- Тимошок Н.О., Зоценко В.М., Співак М.Я. // Вісн. Київ. ун.-ту. Біологія. – 2001. – Вип. 35. – С.16–19.
- Тимошок Н.О., Зоценко В.М., Лазаренко Л.М., Співак М.Я. // Агроекол. журнал. – 2002. – Спецвип. – С. 73–75.

Надійшла до редакції 01.11.04

УДК 616.98-022.3+576.8.097.3

О.П. Трохименко, канд. біол. наук,  
К.М. Білоткач, асп.,  
І.В. Дзюблік, д-р мед. наук

## ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОПОТЕНЦІЮЧИХ КОМПОНЕНТІВ ДЛЯ РОТАВІРУСНИХ АНТИГЕНІВ – НОВИЙ КРОК ДО СТВОРЕННЯ ВИСОКОІМУНОГЕННОЇ ІНАКТИВОВАНОЇ ПРОТИРОТАВІРУСНОЇ ВАКЦИНИ

Одержано низку платиновмісних поліаніонів ДНК. Деякі з них уперше було застосовано як імунопотенціючі компоненти для ротавірусних антигенів при конструюванні інактивованої протиротавірусної вакцини. У доклінічних випробуваннях на тваринах вакцина виявилась високоімуногенною, безпечною та показала значну протективну дію.

We have created new platinum containing DNA polyanions. Some of them were apply as immunopotentiating components for binding rotavirus antigens for creation new inactivated anti-rotavirus vaccine. In our preclinical tests with the animals our new vaccine was appear high immunogenic, safe and showed high protection.

**Вступ.** Створення високоімуногенної безпечної вакцини для профілактики ротавірусної інфекції (РВІ) на сьогодні залишається надзвичайно актуальним проблемою в усьому світі [1–3]. Значні спалахи РВІ останніх років в Україні зумовили нагальну необхідність створення вітчизняної вакцини для специфічної профілактики цієї інфекції. Проте слід зазуважити, що у зв'язку зі зниженням імунітету в переважної більшості населення України, пов'язаної з техногенным забрудненням довкілля, перевагу матимуть вакцини з інактивованих вірусів або окремих вірусних білків. Такі вакцини мають являти собою мультимерні комплекси, до складу яких, поряд зі специфічними антигенними детермінантами вірусів, повинні входити імунопотенціючі компоненти, що сприятимуть утворенню високих рівнів антитіл навіть у разі зниження імунітету або за генетично зумовленої низької імунологічної відповіді організму [4]. Такі вакцини будуть

здатні забезпечити підвищення імуногенності за рахунок найбільш повного розкриття антигенних детермінант і поліпшення презентації антигенів рецепторам на поверхні імунокомпетентних клітин.

У зв'язку з викладеним вище метою роботи полягала у застосуванні платиновмісних поліаніонів ДНК як імунопотенціючих компонентів для ротавірусних антигенів при конструюванні експериментальної інактивованої протиротавірусної вакцини.

**Об'єкт і матеріали дослідження.** У роботі використовували ротавірус мавп штам SA-11 з інфекційною активністю 6,0 Ig TЦД<sub>50</sub>/мл, який культивували у клітинах поверхневозалежної перешеплюваної клітинної культури свинячої нирки ембріональної версенізованої (СПЕВ) на насадці з високорозвиненою поверхнею рос-

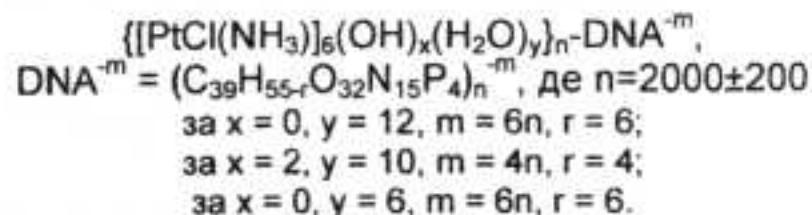
ту, виготовленою з хаотично розміщених стрічок поліетиленової плівки.

Для синтезу платиновмісних поліаніонів ДНК використовували цис-дихлородіамінплатину(II)  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$  (ДДП) виробництва фірми Sigma (США) та ДНК високомолекулярну із селезінки теляти марки А ("Олайн", Латвія).

Токсичність, безпечність, імуногенність і захисну дію одержаної експериментальної вакцини досліджували на лабораторних і сільськогосподарських тваринах. Токсичність та імуногенність вивчали на 80 нелінійних мишиах з масою тіла 18–22 г, на кролях породи шиншила з масою тіла 2,5–3,0 кг. Імуногенність і захисну дію вакцини в дослідах зі штучним зараженням поросят вірулентним штамом ротавірусу свиней в дозі 1000  $\text{LD}_{50}$  вивчали на чотирьох здорових купоросних свиноматках і на 18 одержаних від них поросятах-сисунцях. Імуногенність і захисну дію вакцини в умовах промислового тваринництва вивчали на 60 тільних коровах і 62 одержаних від них телятах у КСП "Перемога" Житомирської області під час сезонних спалахів ротавірусної інфекції у 2000–2002 рр. Протиротавірусну вакцину вводили внутрішньом'язово, двічі з інтервалом 14 днів; мишиам – по 0,2 мл, кролям, свиноматкам і коровам – по 5 мл на кожне введення за 30 і 7 днів до опоросу. Імуногенність вакцини оцінювали за появою та наростианням титрів специфічних антитіл до ротавірусів групи аА в сироватці крові тварин на 10- і 21-шу добу після її введення. Антитіла виявляли та визначали їхні титри в реакції гальмування непрямої гемаглютинації (РГНГА) з рідким еритроцитарним діагностикумом "Ротатест" виробницт-

ва НДІ "Темп-2" (Ростов-на-Дону, Росія) та в реакції нейтралізації (РН). Захисну дію вакцини оцінювали за показником виживання поросят і телят, яких вигодували імунним молоком і молозивом вакцинованих тварин до моменту штучного або природного зараження.

**Результати та їх обговорення.** Для одержання платиновмісних поліаніонів ДНК водно-сольові розчини цис-дихлородіамінплатини (II) (ДДП) і ДНК вводили у взаємодію за температури плавлення біополімеру і відповідного молярного співвідношення компонентів 1 : 1  $10^{-5}$  [5]. Було показано, що в результаті реакції відбувалась повна взаємодія компонентів з утворенням хімічного зв'язку ковалентного типу між атомами платини й азотистими основами нуклеотидів ДНК. При цьому утворювались нові сполуки – платиновмісні поліаніони ДНК загальної формули



Серед деяких одержаних сполук нами було вибрано полі{гексакис[хлороаміноакваплатина(II)]}-μ-дезоксирибонуклеат (МКП) (хімічна формула  $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})]_6\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{O}_{32}\text{N}_{15}\text{P}_{41}$  (МКП)). У таблиці показано, що основні фізико-хімічні та біологічні властивості його істотно відрізнялися від аналогічних властивостей відомих компонентів – ДДП та ДНК.

#### Деякі фізико-хімічні та біологічні властивості ДДП, ДНК та МКП

Фізико-хімічні та біологічні влас- тивості	Значення показника для			Зміна показника для МКП порів- няно з ДНК або ДДП
	ДНК	ДДП	МКП	
Стійкість гіпотонічного розчину за температури 4°C	7 діб	1 доба	365 діб	У 52 рази > за ДНК У 365 разів > за ДДП
Температура плавлення як властивість полімеру	78,0	Не визначається	83,7	На 5,2°C > за ДНК
Молекулярна маса, одиниці маси	$13,0 \cdot 10^6$	300	$7,8 \cdot 10^5$	На 40 % < за ДНК
Максимум поглинання, нм	258,5	ДДП у концентрації $10^{-5}$ моль/л світло не поглинає	266,7	На 8,2 нм > за ДНК
Мінімум поглинання, нм	232,8	Те саме	240,0	На 7,2 нм > за ДНК
Молярний коефіцієнт екстинкції, $E$ , л моль <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	8000	"	$10^5$	На 25 % > за ДНК
$\text{LD}_{50}$ для мишей, мг/кг	>200	8,0	102,0	У 12,75 рази за < ДДП
$\text{LD}_{100}$ для мишей, мг/кг	>200	11,0	126,0	У 11,45 рази за < ДДП
Концентрація МКП, що викликає появу ЦПД у культурі клітин НЕР-2, моль/л	$>10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-4}$	У 10 разів < за ДДП

Після відповідної модифікації одержану сполуку було використано нами як імунопотенціючий компонент для ротавірусних антигенів у складі експериментальної протиротавірусної вакцини. Її застосували у вигляді стерильного цитратно-сольового розчину із вмістом основної речовини від 5,2 до 6,4 г/дм<sup>3</sup> і вмістом платини від 2,0 до 2,2 г/дм<sup>3</sup>. Було розроблено і експериментально обґрунтовано методику, що забезпечувала зв'язування інфекційно активного ротавірусу з імунопотенціючим компонентом. Вона полягала в тому, що до попередньо освітленої культуральної рідини (рН 7,4–7,6), що містила вакцинний штам ротавірусу мавп SA-11 з інфекційним титром не меншим за 6,0 Ig TЦД<sub>50</sub>/мл, додавали неіонний детергент і витримували за температури 37°C впродовж 15 хв. Потім солюбілізований ротавірус вводили у взаємодію з платиновмісним імунопотенціючим компонентом у певному співвідношенні. Реакцію взаємодії компонентів проводили за 37°C впродовж 90 хв і контролювали за показником зниження інфекційної активності ротавірусу аж до моменту його повної інактивації. Динаміку інактивації

ротавірусу під час утворення комплексу імунопотенціючого компоненту й ротавірусних антигенів оцінювали мікрометодом за цитопатичною дією віrusу в культурі клітин СНЕВ.

Було показано, що в результаті поєдання термічної та хімічної інактивації ротавірус повністю втрачав свою інфекційну активність, що підтверджувалось відсутністю ЦПД віrusу впродовж трьох спільних пасажувань у чутливій клітинній культурі.

У загальному вигляді наближена крива інактивації SA-11 відповідала експоненційній функції в часі ( $y = e^{-kt}$ ), а процес інактивації проходив у три етапи. На першому етапі інактивації відбувалась солюбілізація віrusних білків при підвищенні температури розчину до 37°C, підсилені у присутності неіонного детергенту Тритону X-100, та вивільнення РНК з віrusних частинок. На другому етапі, під час швидкої фази інактивації, при додаванні до віrusовмісної рідини імунопотенціючого компонента, в розчині відбувалась його дисоціація на аніони біоліганду й катіони хлораміноакваплатини. Останні взаємодіяли з віrusною РНК, що

раніше вже була дестабілізована й частково вивільнена з вірусних частинок на першому етапі інактивації. Можливість такої взаємодії підтверджується в роботах, що вказують на переважну взаємодію іонів металів зі змінною валентністю (золота, платини) з атомами азоту біолігандів [5–7]. Поряд із цим відбувалась взаємодія аніонів біоліганда із зовнішніми білками капсидів ротавірусів, що вже не містили вірусної РНК. На третьому етапі інактивації реакція сповільнювалась за рахунок поступового зниження концентрації реагуючих речовин. Реакція взаємодії компонентів була необоротною, оскільки комплекси платини з вірусною РНК були дуже міцними. Залишок біоліганда після відщеплення іонів хлораміноакватитані утворював мультимерні комплекси з білками віріонів, формуючи просторово розгалужені мультимерні структури, за рахунок яких, вірогідно, й забезпечувалось збільшення імуногенності ротавірусних антигенів. Одержаній комплекс було нами запропоновано як експериментальну інактивовану протиротавірусну вакцину [8, 9].

Доклінічні випробування вакцини на токсичність, безпечності, імуногеності та захисну дію проводили на лабораторних і сільськогосподарських тваринах. Встановлено, що титри специфічних антитіл у сироватці крові мишей і кролів після дворазової імунізації експериментальною протиротавірусною вакциною на  $2,5\text{--}3,0 \log_2$  перевищували аналогічні показники після імунізації не інактивованим ротавірусом SA-11 і досягали рівня 1 : 1280 – 1 : 512 ГАО/0,25 мл ( $M + m = 1 : 1280 \pm 34,1$ ). На місці введення вакцини не було виявлено ознак запалення або інших патологічних виявів. Дворазова імунізація свиноматок призводила до вираженої сероконверсії. Середні титри вірусонейтралізуючих антитіл після першої імунізації визначались у титрах 1 : 320 ± 10 ГАО/0,25 мл і на день опоросу сягали 1 : 1810 ± 7,5. Аналогічні рівні антитіл виявлялись у тварин на четвертий день після опоросу (на день зараження поросят). Встановлено, що поросята дослідної групи одержували з материнським молоком і молозивом достатню кількість антитіл для захисту від летальної дози вірулентного штаму ротавіруса. Так, поросята піддослідної групи, яких вигодовували молозивом і молоком від імунізованих свиноматок, і поросята контрольної групи, яких вигодовували молоком і молозивом неімунізованих тварин, на четвертий день після народження були одночасно інфіковані вірулентним штамом ротавіруса в дозі 1000 ЛД<sub>50</sub>. Уже через 15 год після інфікування в поросят контролю групи з'явилися перші ознаки інфекційного захворювання, а

через 18–24 год вони загинули від ротавірусної дегідратуючої діареї, що було підтверджено при вірусологічних дослідженнях клінічного та секційного матеріалу.

У піддослідній групі показники збереження поросят були високими і становили 87,5 %. Рівень специфічних антитіл (за даними РГНГА) в сироватці тіньої крові в середньому досягав захисних титрів – 1 : 320 – 1 : 640 ГАО/0,25 мл.

Результати вивчення імуногенності й захисної дії експериментальної вакцини у стаді корів КСП "Перемога" показали наявність специфічних антитіл у титрах 1 : 640 – 1 : 1280 у сироватці крові всіх імунізованих тварин після розтелення. Загибелі телят, одержаних від цих корів і вигодуваних імунним материнським молоком і молозивом, під час сезонних спалахів РВІ не спостерігалось. За даними вірусологічних досліджень, у контрольних групах тварин захворіло від 60 до 80 % телят, з яких 40 % загинули. Найбільша кількість летальних випадків спостерігалась серед телят дуже раннього віку (один–четири дні від народження), у копрофільтратах яких ротавірусний антиген виявляли в титрах, більших за 1 : 512.

**Висновки.** Одержано низку платиномісних поліаніонів ДНК. Деякі з них уперше було застосовано як імунопотенціюючі компоненти для ротавірусних антигенів. Показано, що поряд з імунопотенціюючою дією тає сполуки здатні повністю інактивувати ротавірус мавп штаму SA-11. Одержано експериментальну інактивовану протиротавірусну вакцину, що місить зазначені імунопотенціюючі компоненти й ротавірусні антигени. У доклінічних випробуваннях на тваринах вакцина виявилась високо імуногенною, безпечною та показала значну протективну дію.

1. Васильев Б.Я., Васильева Р.И., Лобзин Ю.В. Острые кишечные заболевания. Ротавирусы и ротавирусные инфекции. – С.-Пб., 2000.
2. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. // Иммунология. – 2000. – №1. – С.61–64.
3. Ротавирусная инфекция: Навч.-метод. посіб. для лікарів / За ред. І.В. Дзюблик. – К., 2004.
4. Петров Р.В., Хайтов Р.М. // Иммунология. – 1998. – №6. – С.4–11.
5. ЕРВ 0097003 A2. Вакцина, приготовленная с использованием соединений платины // Бюлл. Изобр. за рубежом. – 1984. – №18. – С.24.
6. Патент №4845666, США. Вакцина болезни языка (синий язык), приготовленная с использованием соединений платины // Бюлл. Изобр. стран мира. – 1987. – №24. – С.53.
7. Крис Е.Е., Волченкова И.И., Григорьева А.С. Координационные соединения металлов в медицине. – К., 1986.
8. Патент №2095083, Россия. Вакцина ротавирусная инактивированная для иммунизации животных / И.В.Дзюблик, Е.П.Трохименко, В.Н.Гирин, С.А.Шалимов, Л.В.Кейсович // Опубл. в Бюлл. ИСМ. – 1997. – №31. – Ч.2. – С.271)
9. Патент №24024, Україна. Вакцина ротавірусна інактивована для імунізації тварин / І.В.Дзюблик, О.П.Трохименко, В.М.Гирін, С.О.Шалимов, Л.В.Кейсович // Бюл. Пром. власність України. – 1996. – №4.

Надійшла до редактора 8.11.04

УДК 576.8.097.3, 576.8.094.29 або 576.8.097.5, 576.8.094.29

Л.Ю. Вергун, канд. біол. наук, З. Пейсак, д-р вет. наук,  
Ю.А. Собко, канд. вет. наук, О.Т. Шиков, канд. вет. наук

## АНТИТИЛА ДО ВІРУСУ РЕПРОДУКТИВНОГО ТА РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВІНЕЙ У СИРОВАТКАХ СВІНЕЙ

Проведено скринінг сироваток свиней, відібраних у господарствах України й Республіки Білорусь методом ІФА. Показано різну чутливість тест-систем INGENASE і LSI, які використовувались при виявленні антитіл до вірусу PPSSC.

We have screened of pigs serum picking out from farms Ukraine and Belarus Republic by the ELISA. It showed different sensitivity of tests INGENASE and LSI for detection anti-PRRSV antibodies.

**Вступ.** Репродуктивний і респіраторний синдром свиней (PPSSC) – вірусна хвороба, яку вперше зареєстровано в багатьох свинарських господарствах США та Канади в 1987 р. У 1991 р. було повідомлено про появу аналогічного захворювання свиней у країнах Європи. Голландські вчені Г. Венсвурд і С. Терпстра (Центральний ветеринарний інститут, м.Лелістад) виділили вірус у культурах макрофагів легенів свиней і назвали його "агент Лелістад". На

сьогодні встановлено, що збудником хвороби є РНК-вмісний вірус, який належить до роду артерівірусів.

Хвороба характеризується репродуктивними розладами (пізніми абортами, передчасними опоросами, мертвонародженими, муміфікованими й послабленими поросятами), висока смертність поросят і респіраторні зміни під час лактації, в період перевезення й підкорму [1, 2].

Метою роботи було проведення скринінгу сироваток свиней, відібраних у господарствах, на виявлення анти-АТ до вірусу PPCC.

**Об'єкт і матеріали дослідження.** У роботі використовували сироватки свиней з господарств Мелітопольського району Запорізької області, Харківської, Херсонської, Сумської, Тернопільської областей, господарств Брестської області Республіки Білорусь, а також від свиноматок господарств Миронівського району Київської області.

Для тестування сироваток використовували тест-систему для діагностики класичної чуми свиней (кчс) "КЧС – ІФА к" – NPLA, PLA [3, 4], тест-систему для виявлення АТ до вірусу кчс (вкчс) – IDEXX (США – Швеція, batch № 43220-0410), тест-системи для виявлення АТ до вірусу PPCC: INGENASA "INGEZIM PRRS Compars" (Іспанія, batch № 1.1.PRS.K.3) і Laboratoire service International – LSI (Ліон, Франція, batch №5-PRRS-001).

**Результати та їх обговорення.** Отримані результати відображені в таблиці. Сироватки з господарства Мелітопольського району Запорізької області від свиноматок, поросят, які перебували на дорощуванні й бу-

ли привити проти вкчс, тестували ІФМ, використовуючи тест-системи "КЧС – ІФА к" (NPLA, PLA, INGENASA). Було виявлено тільки АТ до вкчс, серопротективний рівень становив 1 : 20 – 1 : 40 івищі. З 15 досліджених сироваток свиней господарств Харківської області в семи зразках було знайдено АТ до вірусу PPCC за допомогою тест-системи INGENASA і тільки у трьох зразках – тест-системи LSI. В усіх 10 сироватках, які було отримано з Брестської області, встановлено АТ до вірусу PPCC тест-системою INGENASA і тільки у восьми – LSI. Вибірково було взято експертизні сироватки з Херсонської, Сумської, Тернопільської областей, які були позитивними при тестуванні IDEXX, і всі досліджені сироватки були також позитивними на АТ до вірусу PPCC. Сироватки, які надійшли з господарства Миронівського району Київської області, від свиноматок, що були привіти проти вкчс, тестували "КЧС – ІФА к" (NPLA) і IDEXX, обидва тести підтвердили серопротективний рівень АТ до вкчс у сироватках. В усіх зразках сироваток було виявлено АТ до вірусу PPCC (тест-система INGENASA) (див.табл.).

Результати дослідження експертизних сироваток свиней ІФА

Регіон	Кількість сироваток, які досліджували	Тест-система, яка використовувалась, і результат дослідження (кількість позитивних)				
		КЧС – ІФА к		IDEXX	INGENASA	LSI (Ліон, Франція)
		NPLA	PLA			
Запорізька область, Мелітопольський район	15	13	0	н.д.	0	н.д.
Харківська область	15	н.д.	н.д.	н.д.	7	3
Запорізька область	5	н.д.	н.д.	н.д.	0	0
Херсонська область	2	н.д.	н.д.	2	2	н.д.
Сумська область	2	н.д.	н.д.	2	н.д.	2
Тернопільська область	1	н.д.	н.д.	1	н.д.	1
Київська область, Миронівський район	5	5	н.д.	5	5	3
Брестська область, Республіка Білорусь	10	н.д.	н.д.	н.д.	10	8

Примітки. н.д. – не досліджували; PLA – тест-система для виявлення в кчс (культура клітин); NPLA – тест-система для виявлення нейтралізуючих антитіл до вкчс (культура клітин).

Наведені результати досліджень підтверджують високу специфічність тест-системи INGENASA (Іспанія) і більш високу чутливість, ніж тест-система LSI (Франція).

Тест-систему INGENASA розроблено для виявлення АТ до європейських ізолятів вірусу PPCC, у цьому випадку чутливість дуже близька до 100 %, також є крос-реактивність з американськими ізолятами, але ця система не є "законною" для американських ізолятів. Тест-систему INGENASA, на відміну від LSI, сконструйовано на основі рекомбінантного білка ORF 7 і моноклональні антитіла (які зв'язані з пероксидазою хрону (ПХ)) до вірусного антигену (АГ). Зразки, які досліджували перед тестуванням, розводять у співвідношенні 1 : 5. В основі тесту LSI лежить специфічний інактивований вірусний АГ, контрольний АГ й антивідовий кон'югат протеїн А-ПХ. Зразки, що досліджують, перед тестуванням розводять у співвідношенні 1 : 200.

Результати скринінгу сироваток з господарств різних областей України і Брестської області Білорусь свідчать

про циркуляцію вірусу в районах, де виявлено АТ до вірусу PPCC у сироватках свиней.

**Висновки.** 1. Результати тестування сироваток свиней дозволяють зробити висновки про те, що тест-система INGENASA найбільш придатна для скринінгу сироваток на АТ до вірусу PPCC. 2. Результати скринінгу сироваток свиней надають основу зробити висновки про циркуляцію вірусу PPCC на територіях, які досліджували.

1. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев В.В., Фоміна Н.В. Вірусні болезні животних. – М., 1998. 2. Oleksiewicz M.B., Bonter A., Madsen K.G., Storgaard T. // Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes // Veter Microbiol. – 1998. – Vol.64. – P. 7–22. 3. Вергун Л.Ю., Собко Ю.А., Білоконь В.І. Тест-система для лабораторної діагностики класичної чуми свиней "КЧС – ІФА к" – К., 2001. – С. 1–10. 4. Вергун Л.Ю., Собко Ю.А., Білоконь В.І. Імунофероксидазний метод для виявлення вірусу класичної чуми свиней (в кчс) та визначення рівня антитіл до нього в сироватках крові тварин // Матер. наук. конф. Нац. аграр. ун-ту. – К., 1998.

Надійшла до редакції 08.11.04

I.В. Волкова, наук. співроб., М.М. Зарицький, канд. біол. наук

## КОНСТРУЮВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ Х-ВІРУСУ КАРТОПЛІ З ВИКОРИСТАННЯМ НОВИХ ІМУНОРЕАГЕНТІВ

Виявлено можливість використання нетрадиційного джерела вірусоспецифічних антитіл молозива корови при конструкції імуноферментних тест-систем для фітовірусологічних досліджень. Запропоновано технологію одержання компонентів тест-системи та оптимізовано умови проведення аналізу.

Possibility of the use of nontraditional antiviruse antibody source (cow milk) in the construction of immunoenzyme test-system for phythovirology has been studied. Production technology has been developed for components of immunoenzyme test-system and the analysis stage conditions have been optimized.

**Вступ.** Вірусні інфекції сільськогосподарських культур ведуть до значних матеріальних збитків і зниження

якості продукції. Ефективність захисних заходів зумовлено ранньою діагностикою вірусних хвороб рослин. Не

менш важливою є діагностика вірусів рослин у селекційній роботі, а також у виробництві безвірусного посадкового матеріалу.

Для масової діагностики фітовірусів широко використовуються імунологічні методи. Завдяки вдалому поєднанню простоти, зручності, специфічності, а також можливості автоматизації процесу зараз на першому місці перебуває метод твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА).

Метою нашої роботи було вивчення можливості отримання нових біологічних компонентів при конструкції імуноферментних тест-систем на основі подвійного "сендвіч"-метода, головною особливістю якого є використання антивірусних антитіл різних видів тварин [1]. При розробці нового варіанту тест-системи як джерело антитіл для першого імунного шару ми використали нетрадиційну для фітовірусологічних досліджень біологічну рідину – молозиво корови. Оскільки тільки корів можна імунізувати, не зашкодивши плоду, після отелення вдається отримати декілька літрів молозива, вміст антитіл в якому перевищує їхню концентрацію в сироватці крові. Цю технологію використовували для отримання антитіл до Н-антігену сальмонел, феритину, Ig G кроля та людини [2, 3]. Вибір тварини для продукування антитіл другого порядку зумовлено напрямком роботи нашої лабораторії, де виробляються діагностикуми фітовірусів на основі кролячих антитіл.

**Об'єкт і методи дослідження.** У своїй роботі ми використовували як модель Х-вірус картоплі. Препарати ХВК для імунізації отримували з листя рослини-накопичувача вірусу *Datura stramonium* L. Заморожене листя гомогенізували з одним об'ємом цитратного буфера (0,05 моль/л, pH 9,0); екстракт освітлювали хлороформом, послідовно хроматографували на колонках із сепадексом G-50 та ДЕАЕ-50. Концентрацію вірусного білка визначали за допомогою спектрофотометра СФ-46. Остаточне концентрування вірусу відбувалося за допомогою поліетиленгліколю.

Для отримання гіперімунної кролячої антисироватки тварин імунізували за розробленою нами схемою з використанням мікродоз. Імунізація включала чотири ін'єкції по 0,2 мг вірусного антигену з чергуванням підшкірних і внутрішньошкірних уведень. Після першої імунізації інтервал становив тиждень, після другої – два дні. Відбір крові відбувався через 7–10 днів після останньої імунізації. Тільки корів імунізували також мікродозами (50 мг антигену/ін'єкція) за сім, шість і два тижні до отелення. Молозиво збирало на другий та третій дні після отелення.

Фракцію кролячих антитіл одержували шляхом триазового осадження насиченим розчином сульфату амонію з подальшою хроматографією на колонці з ДЕАЕ-toyoreagl 650M. Для отримання препарату антитіл з молозива за основу було взято методику Й. Брука та методичні рекомендації Інституту експериментальної ветеринарії в нашій модифікації, яка полягала в концентруванні препарату насиченим розчином сульфату амонію перед хроматографією на колонці з ДЕАЕ-toyoreagl 650M [2, 4]. Крім того, нами було запропоновано оригінальну методику виділення молозивних антитіл, яка передбачала такі етапи:

- 1) емульгування молозива з рівним об'ємом хлорофору з наступним центрифугуванням 20 хв за  $3 \cdot 10^3$  об/хв;
- 2) осадження із супернатанту імуноглобуліні поліетиленгліколем (м. м. 40 кДа) в концентрації 17 % (маса/об'єм), центрифугуванням впродовж 30 хв за  $5 \cdot 10^3$  об/хв;
- 3) осад розчиняли у ФБР (0,1 моль/л, pH 7,4) в об'ємі, що становить 1/10 об'єму молозива, та хроматографували на колонці з ДЕАЕ-50.

Кількісний вміст білка та ступінь чистоти отриманих препаратів контролювались спектрофотометрично за довжини хвиль 260 та 280 нм, специфічність імуноглобулінових фракцій – методом крапельної аглютинації з гомологічними, гетерологічними вірусними антигенами та білками здорових рослин.

Твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА) проводили у двох варіантах – "сендвіч" і подвійний "сендвіч" – на полістиролових планшетах фірми Sarstedt (США), спираючись на стандартні методики [5, 6]. У роботі використовували синтезований нами кон'югат: антикролячі імуноглобуліни кози – пероксидазу хрону. Виявлення ферментативної активності проводили за допомогою ортофенілендіаміну (ОФД) спектрофотометрично за величиною оптичної густини (ОГ) за довжини хвилі 492 нм.

Оптимізація умов проведення ТІФА передбачала порівняння співвідношення оптичної густини позитивного контролю до оптичної густини негативного контролю. Показник свідчить про наявність вірусного антигену в дослідному матеріалі, якщо його значення перевищує 2 [7]. При визначенні ХВК негативним контролем слугував сік здорової рослини картоплі, позитивним – той самий сік з додаванням вірусного антигену.

**Результати та їх обговорення.** У результаті проведеної роботи нами апробовано схеми імунізації тварин мікродозами вірусного антигену. Економічні міркування та методична доступність дозволяють нам пропонувати дані прийоми до широкого застосування.

Наступним етапом був підбір технологічної методики виділення фракції імуноглобулінів з молозива. При використанні модифікованого методу Й.Брука нами отримано з 10 мл молозива 3 мл спектрофотометрично чистого препарату антитіл з концентрацією білка 1 мг/мл. При виділенні імуноглобулінів за оригінальною методикою вихід антитіл становив 4 мг з 10 мл вихідного матеріалу. Крім того, відсутність етапу діалізу дозволяє отримати препарат антитіл за один робочий день.

При розробці нами оптимальних параметрів тест-системи було визначено: концентрацію сенсибілізуючих антитіл молозива (5 мкг/мл), розведення рослинного соку, концентрацію антитіл другого імунного шару (10 мкг/мл), робоче розведення кон'югату (1 : 200). Слід зазначити, що варіант з використанням подвійного "сендвіча" виявився більш чутливим до високих концентрацій встановлюваного вірусного антигену. Для запобігання "хук"-ефекту нами рекомендовано збільшити робоче розведення рослинного соку до 1 : 20.

Оцінку тест-системи з використанням молозивних антитіл у варіанті ТІФА подвійний "сендвіч" ми провели при паралельному аналізі з використанням імуноферментного діагностикума, який виробляється в нашій лабораторії ("сендвіч"-варіант ТІФА з пероксидазним кон'югатом). Результати аналізів наведено в таблиці.

Результати тестування ХВК у різних методичних варіантах ТІФА

Варіанти ТІФА	Показники оптичної густини за 492 нм		
	Позитивний контроль (ОГК+)	Негативний контроль (ОГК-)	ОГК+/ОГК-
"Сендвіч" - метод	$0,511 \pm 0,099$	$0,200 \pm 0,040$	2,5
Подвійний "сендвіч"- метод	$0,310 \pm 0,010$	$0,056 \pm 0,009$	5,5

Відмічено більшу достовірність позитивних і негативних результатів при аналізі методом подвійного "сендвіча". Крім того, ця тест-система виявилася більш чутливою – кінцеве розведення соку, в якому достовірно

діагностувався вірусний антиген, становило 1 : 640 проти 1 : 320 при аналізі за "сандвіч"-методом.

**Висновок.** Таким чином, створений зразок імуноферментної тест-системи демонструє можливість використання нетрадиційного джерела вірусоспецифічних антитіл – молозива корови – для фітовірусологічних досліджень. За пропонованою технологією одержання компонентів тест-системи та оптимізовано умови проведення аналізу.

УДК 573.2

## РОЛЬ СУБЧАСТИНОК РИБОСОМИ В УТВОРЕННІ ПОЛЯ ЗВ'ЯЗНОСТІ АМІНОКИСЛОТ ГЕНЕТИЧНОГО КОДУ

**Розглянуто математичну модель утворення поля зв'язності амінокислот генетичного коду. Побудовано векторне розшарування амінокислот генетичного коду на поля зв'язності великої та малої субчастинок рибосоми.**

**Considered mathematical model of formation of the connection field of amino acids of genetic code. Built vectorial bundles of amino acid of genetic code on the connection fields of large and small subparticles of ribosomes.**

**Вступ.** Відомо, що процес трансляції мРНК у поліпептидний ланцюг проходить за участі рибосоми, тРНК, аміноацил-тРНК-сінтетази й численних допоміжних білків [1]. Раніше [2] нами було показано, що перетворення мРНК на білок безпосередньо пов'язано з ікосаедральною групою A5. Поліпептидні ланцюги визначаються як векторне поле зв'язності із числом векторів 9, 11 або 13. Якщо спостережуване векторне поле молекули білка має 11 векторів, то побудована на її основі білкова оболонка має форму ікосаедра, але не містить у центрі генетичного матеріалу. Для ікосаедральної оболонки із центральним геномом, тобто для простої вірусної частинки, поле зв'язності білка повинне мати дев'ять компонентів. Вірусна частина, що взаємодіє з іншими генетичними молекулами або білками, може мати 13-компонентне поле зв'язності.

Проте не завжди молекули білка об'єднуються з утворенням ікосаедра. Можна припустити, що причиною цього є розшарування поля зв'язності білка уздовж його молекули і саме це розшарування відбувається на рибосомі у процесі зірки поліпептидного ланцюга.

**Об'єкт і методи дослідження.** Малій і великий субчастинці рибосоми відповідають векторні поля

1. Porstmann T. // Dt. Gesund. Wes. – 1980. – Bd. 35. – S. 598–600.
2. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. – М., 1987. 3. Fey H.R., Butler R., Marti F. // Vox Sang. – 1973. – Vol. 25. – P. 245–253. 4. Кленина Н.В., Антонов В.С., Михайлова С.А. Методические рекомендации по выделению иммуноглобулинов. – Х., 1983. 5. Антилена. Методы / Под ред. Д.Кэтти. – М., 1991. – Т.2. 6. Clark M.F., Adams A.N. // J. Gen. Virol. – 1977. – Vol. 34. – P. 475–483. 7. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев и др. – М., 1991.

Надійшла до редакції 22.10.04

Л.П. Бучацький, д-р біол. наук, В.В. Щербик, наук. співроб.

зв'язності, що мають відповідно 8 і 11 компонентів. Щоб це довести, розглянемо векторне розшарування над всіма триплетами генетичного коду. Кожен нуклеотид кодового триплету незалежно перетворимо, використовуючи групи підстановок S4, тим самим змінюючи калібрування амінокислот. Одержані новий вектор амінокислот визначимо як ортогональний до початкового вектора амінокислот генетичного коду за фактор-простором центральних зарядів конформного поля амінокислот [3]. Одержано вісім векторів поля зв'язності малої субчастинки рибосоми з ядром конгруентності 24.

Виконаємо ті самі обчислення над вектором амінокислот генетичного коду, але з додатковою зовнішньою перестановкою нуклеотидів N1N2N3 → N2N1N3 в кожному триплеті. Одержано 11 векторів поля зв'язності великої субчастинки рибосоми.

Мала й велика субчастинки рибосоми містять відповідно 12 і 24 класи ортогональних векторів амінокислот. На рис.1 наведено фрагмент ортогональних векторних полів амінокислот малої та великої субчастинок рибосоми.

### Початковий вектор амінокислот генетичного коду:

FFLLLLILIIIMVVVVSSSSPPPPPNTAAUYY\*\*HHQQNNKKDDEECC\*WRRRRSSRRGGGG

### Векторне поле амінокислот малої субчастинки рибосоми:

HQHQDEDENKNKY\*Y\*RRRGGGGSRSRCWC\*PPPPAAAATTTSSSSLLLLVVVVVIMIIFLFL

### Векторне поле амінокислот великої субчастинки рибосоми:

NNKKIIIMTTTSSRRHHQQLLLPPPPRRRDRDEEVVVVAACGGGGYY\*\*FLLSSSSCC\*W

Рис. 1. Векторне розшарування амінокислот генетичного коду

Різниця між субчастинками рибосоми (комутатор полів зв'язності субчастинок) є трикомпонентним векторним полем зв'язності і має  $3 \times 24$  станів адаптера тРНК. Два поля зв'язності рибосоми можуть вільно об'єднуватися й утворювати повне поле зв'язності додекаедра із числом векторів 19. Велика субчастинка рибосоми містить дуальне поле зв'язності ікосаедра й обидві субчастинки визначають два підпростори формування векторного поля зв'язності білка.

Векторне поле зв'язності адаптера тРНК віднімається від поля зв'язності малої субчастинки, а п'ять векторів, що залишилися, і визначають локальне поле зв'язності кожної амінокислоти генетичного коду. Цей самий модуль розподілу можна одержати, якщо подвоєні кількості векторів поля зв'язності адаптера тРНК відняти від відповідної кількості векторів поля зв'язності великої субчастинки. Решта зовнішніх перестановок

нуклеотидів мРНК по групі S3 не приводить до утворення векторних полів зв'язності амінокислот.

**Результати та їх обговорення.** На основі побудованих векторних полів зв'язності великої та малої субчастинок рибосоми можна стверджувати, що виродженість генетичного коду визначається числом векторів зв'язності кожної амінокислоти. Поле зв'язності ікосаедра утворює фактор-простір, за яким і відбувається розшарування векторного поля амінокислот. І хоч загальноприйнятим є твердження, що тРНК самостійно визначає місце для своєї амінокислоти в поліпептидному ланцюзі, необхідно зазначити, що істинне поле зв'язності з 20 амінокислот утворюється рибосомою.

Особлива роль малої субчастинки рибосоми у формуванні поля зв'язності амінокислот підтверджується тим, що саме з нею пов'язана ініціація трансляції як у прокаріотів, так і в еукаріотів.

Випереджаючу функцію кодон-антикодонного спаровування тРНК можна одержати таким чином. Введемо матрицю  $\psi_b = C^-, U^+, A^-, G^+$  центральних зарядів мРНК відносно лоренц-інваріантного модуля паралельного перенесення нуклеотидів мРНК на амінокислоти генетичного коду P<sup>-</sup>(CCC), F<sup>+</sup>(UUU), K<sup>+</sup>(AAA), G<sup>+</sup>(GGG). Знаки амінокислот встановлюються за протонним зарядом конформного поля: Q(Am) = h(Am)Q<sub>p</sub>(Am). Знаки нуклеотидів матриці  $\psi_b$  підбираються таким чином, щоб ядро конгруентності модуля паралельного перенесення нуклеотидів мРНК на амінокислоти дорівнювало половині числа станів генетичного коду  $Q_p[\psi_b(P, F, K, G)] = 32$ . Тоді рух малої субчастинки рибосоми індукує випромінювання псевдоелектромагнітного далекодіючого поля центральних зарядів мРНК, що призводить до тяжіння тРНК до мРНК. Велика й мала субчастинки рибосоми рухаються уздовж спіралі мРНК повільніше, ніж поширюється інформація про майбутній триплет мРНК.

На рис. 2, 3 показано, як розповсюджується інформація про майбутній триплет мРНК до тРНК і як рухаються субчастинки рибосоми. Суть адаптера тРНК полягає в компенсації коваріантного читання триплетів мРНК.

Нуклеотиди N1N2N3 триплетів мРНК (рис. 2) є нулями функції розповсюдження псевдоелектромагнітного поля, індукованого рухом малої субчастинки рибосоми. Чергування полярності амплітуди хвилі читання відповідає антисиметричному розташуванню радикалів амінокислот у білку.

Нуклеотиди N1N2N3 триплетів мРНК (рис. 3) є нулями функції поширеного неабелевого спірального поля зв'язності великої та малої субчастинок рибосоми. Мала субчастинка рибосоми рухається по середніх нуклеотидах триплетів мРНК (виділено жирною лінією) у верхній напівплощині щодо лінії триплетів мРНК. Велика субчастинка рибосоми здійснює обхід триплета нуклеотідов мРНК за схемою N2 – N1 – N3 – N2. Поле зв'язності великої субчастинки розпадається на два або три підполія зв'язності її внутрішніх частинок, які рухаються у верхній і нижній напівплошинах щодо лінії триплетів мРНК. Неабелеве спіральне поле зв'язності тРНК має три компоненти, які відповідають одному, двом і трьом напівлініям псевдоелектромагнітного поля.

УДК 578.1

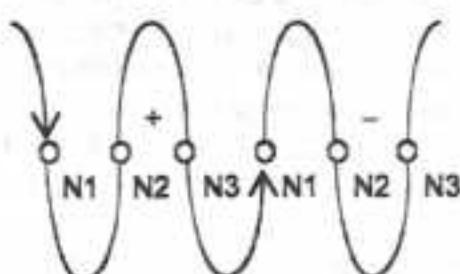


Рис. 2. Хвильове читання триплетів мРНК

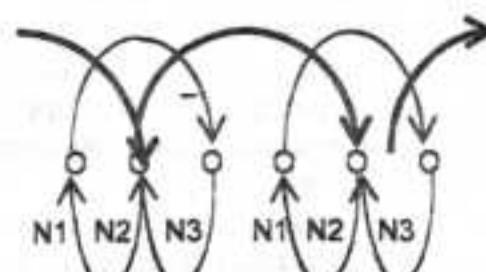


Рис. 3. Коваріантне спіральне читання триплетів мРНК

З рис. 2, 3 випливає, що мала субчастинка рибосоми в нормальному дільнику  $Z_2$  неабелевого спірального поля зв'язності амінокислот генетичного коду. Тому числа векторів поля зв'язності амінокислот, тобто числа вираженості генетичного коду, можуть бути 1, 2, 3 і 2, 4, 6.

**Висновки.** Показано, що велика й мала субчастинки рибосоми безпосередньо визначають числа вираженості генетичного коду. Випереджаюча функція кодон-антикодонного спаровування тРНК пов'язана з рухом малої субчастинки рибосоми, яка індукує випромінювання псевдоелектромагнітного далекодіючого поля центральних зарядів мРНК, що й визначає тяжіння тРНК до мРНК. При коваріантному спіральному читанні триплетів мРНК велика і мала субчастинки рибосоми рухаються повільніше, ніж поширюється хвильова інформація про майбутній триплет мРНК.

1. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: У 2 т. – М., 1998. – Т1. 2. Щербик В.В., Бучацький Л.П. // Вісн. проблем біології і медицини. – 2002. № 5. – С. 39–58. 3. Щербик В.В., Бучацький Л.П. Квантовая генетика. – К., 2003.

Надійшла до редколегії 29.10.04

I. Д. Жунько, асп., Н. В. Ліманська, асп.,  
Б.Н. Мілкус, канд. біол. наук, Л.О. Конуп, канд. біол. наук

## ДІАГНОСТИКА ВІРУСУ МАРМУРОВОСТІ ВИНОГРАДУ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Проведено дослідження клонового та рядового матеріалу винограду різних сортів на наявність вірусу мармурості за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). У ході дослідження застосовано різні концентрації  $Mg^{++}$  (1,3, 1,7 та 2,0 ммол/л) з метою зменшення неспецифічних продуктів ампіліфікації. Температуру відпалу ( $T_{\text{а}}$ ) змінювали у процесі підбору найкращого режиму ампіліфікації, °C: 52, 58, 60, 62. У ході дослідження встановлено оптимальну  $T_{\text{а}}$  (62°C) та з'ясовано оптимальну концентрацію  $Mg^{++}$  у реакційній суміші (1,3 ммол/л).

The clonal and regular grapevine material of different cultivars has been tested for the presence of GFkV by polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR). Different concentrations of  $Mg^{++}$  (1,3 mM, 1,7 mM and 2,0 mM) were applied for decreasing of unspecific amplification products. Annealing temperature ( $T_{\text{а}}$ ) was changed to improve amplification results, °C: 52, 58, 60, 62. The optimal  $T_{\text{а}}$  was established (62°C). Optimal  $Mg^{++}$  concentration in reaction mix (1,3 mM) was found out.

**Вступ.** Вірус мармурості винограду (GFkV) широко розповсюджений у всіх виноградарських районах світу. Це латентний ізометричний флоемолімітований вірус, який не передається механічним шляхом, розміром 28–30 нм, з одноланцюговою позитивно зарядженою молекулою олРНК довжиною 7564 пар основ. Філогенетичний аналіз вірусної реплікації та покривного білка показав, що GFkV, можливо, належать до родів *Tymovirus* та *Marafivirus*. Однак геномна організація вірусу, його

біологія, епідеміологія, цитопатологія та молекулярні властивості відрізняються від вказаних властивостей представників цих родів [1–7].

GFkV входить до переліку вірусних інфекцій, на які, згідно з програмою сертифікації ЄС, виноград обов'язково тестиється при виробництві садівного матеріалу [8].

Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє розпізнати кущі з латентною інфекцією, і з них заготовлюється лоза для вегетативного розмноження рослин.

Багато років діагностика вірусу мармуровості базувалася на щепленні на сорт-індикатор Рупестрис дю Ло. Основна ознака захворювання – посвітління жилок третього порядку та тканин, які до них прилягають. Ріст індикатора пригнічується, листя стає більш хлоротичним, хвилястим [4, 9]. Проте цей метод потребує кількох років дослідження. Необхідно постає діагностика за допомогою сучасних швидких серологічних та молекулярно-генетичних методів аналізу. Метод полімеразної ланцюгової реакції дозволяє в стислі терміни визначити інфікованість кущів винограду вірусом [1, 6, 10, 11].

**Метою** даної роботи була оптимізація методики проведення ЗТ-ПЛР для діагностики вірусу мармуровості та дослідження деяких сортів винограду на наявність даного фітопатогену.

**Матеріали і методи.** Досліджували клоновий і рядовий матеріал прищепних сортів винограду господарств півдня України та Республіки Молдова.

Для тестування кущів клонів винограду на наявність GFKV у серпні–вересні відбирали верхівки молодих пагонів з верхнім листям. З настанням холодів виділення вірусу проводили у здерев'янілих пагонах. Зразки транспортували в лабораторію і досліджували в той самий день або зберігали за температури  $-20^{\circ}\text{C}$  впродовж кількох місяців. Зразки для проведення ПЛР готовували згідно з [12].

Реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції й полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) обсягом 25 мкл містила деіонізовану воду, 2,5 мкл 10-кратного ПЛР буфера (500 ммол/л KCl, 100 ммол/л Тріс-HCl, pH 9,0), 2,5 мкл сахарози (20 %) і крезолу, 2,5 мкл дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP) (2 ммол/л), попередньо змішаних з 1,25 мкл дитіотріетолу (ДТТ) (0,1 моль/л), 1,25 мкл кожного з праймерів (10 ммол/л), 1,25 од. Таq-полімерази (5 од./мкл, "АмпліСенс", Росія), 8 од. ревертази (200 од./мкл, "АмпліСенс", Росія). Було випробовано концентрації  $\text{Mg}^{++}$  1,3, 1,5 і 2 ммол/л. Використовували RD1 (5' С(СТ)СА(AG)СА(CT)AA(AG)GT(ACG)AACGA 3') та RD2 (5' GCGCATGCA(CGT)GT(CG)AG(AG)GGG 3') GFKV праймери [2].

У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка.

Як позитивний контроль використовували інфікований вірусом мармуровості матеріал винограду, люб'язно наданий доктором Д. Босція (Університет Барі, Італія). Як негативні контролі використовували деіонізовану воду (для перевірки якості реагентів) та вільний від віруса рослинний матеріал.

Зворотну транскрипцію проводили в термостаті за  $52^{\circ}\text{C}$  упродовж 30 хв. Ампліфікація включала 35 циклів ( $94^{\circ}\text{C}$  – 30 с,  $56^{\circ}\text{C}$  – 45 с,  $72^{\circ}\text{C}$  – 60 с), а час елонгації в останньому циклі сягав 7 хв (А. Ровгані, особисте повідомлення). Температуру відпалу ( $T_{\text{від}}$ ) змінювали у процесі підбору найкращого режиму ампліфікації,  $^{\circ}\text{C}$ : 52, 58, 60, 62.

Реакція проходила у програмувальному термостаті "Терцик" фірми "ДНК-Технологія" (Росія). Електрофорез проводили в 1,5%-ному агарозному гелі. Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трис-бортного буфера для електрофорезу ("АмпліСенс", Росія). Гель фотографували за допомогою відеосистеми "Samsung" в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм). Для оцінки молекулярної маси ампліфікованих фрагментів використовували маркери 800–200 пар основ ("АмпліСенс", Росія) та маркери фрагменти ДНК фага  $\lambda$  2100–150.

**Результати та їх обговорення.** У ході дослідження методику проведення ПЛР для виявлення вірусу мармуровості винограду було оптимізовано.

У процесі підбору найкращого режиму ампліфікації з даною парою праймерів температуру відпалу змінювали. Було застосовано кілька  $T_{\text{від}}$ ,  $^{\circ}\text{C}$ : 52, 58, 60, 62.

Кращий результат було досягнуто за температури  $62^{\circ}\text{C}$ . Синтезований за цієї температури фрагмент ДНК відповідав довжині амплікону для даної пари праймерів (386 п.о.), крім того, меншою була кількість неспецифічних продуктів реакції, ніж за інших температур відпалу.

З метою виключення неспецифічних продуктів реакції було встановлено оптимальну концентрацію  $\text{Mg}^{++}$  у реакційній суміші для проведення ПЛР. За концентрації 1,3 ммол/л  $\text{MgSO}_4$  і  $T_{\text{від}} = 62^{\circ}\text{C}$  неспецифічні продукти реакції були відсутніми, а кількість ампліфікованих фрагментів достатньою для чіткої візуалізації в агарозному гелі.

За допомогою оптимізованої методики ПЛР проведено тестування зразків рослинного матеріалу. Виявлено, що вірус мармуровості пошириений на різних прищепних сортах винограду.

Дослідження матеріалу винограду показало, що вірус мармуровості виявляється в насадженнях на території України рідше, ніж на території Молдови, де в деяких випадках визначалася стовідсоткова інфікованість рослин певного клону (див. рис.).

1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12

Електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР в агарозному гелі:  
1 – негативний контроль; 2–6, 8–12 – позитивні зразки матеріалу винограду, ураженого вірусом мармуровості;  
7 – позитивний контроль; M – маркери молекулярної маси (2100, 1400, 1000, 600, 470, 280, 150)

Подальше вивчення поширення вірусу мармуровості дозволить отримати дані щодо епідеміології збудника на виноградниках півдня України та Молдови, а також дані щодо якості садівного матеріалу, який інтродукується з-за кордону.

#### Висновки:

1. Оптимізовано методику ЗТ-ПЛР для виявлення вірусу мармуровості винограду, а саме:

– встановлено оптимальну температуру відпалу для праймерів, що застосовувалися у ЗТ-ПЛР;

– з'ясовано оптимальну концентрацію магнію в реакційній суміші для усунення неспецифічних продуктів ПЛР.

2. Зразки матеріалу винограду різних сортів, відбрані на виноградниках півдня України та Молдови, містили збудника вірусу мармуровості винограду.

1. Beaino T. E., Sabanadzovic S., Digiaro M. et al. // Vitis. – 2001. – Vol. 40, № 2. – P. 65–68.
2. Boscia D., Martelli G. P., Savino V., Castellano M. A. // Vitis. – 1991. – Vol. 30. – P. 97–105.
3. Bouilla M., Boscia D., Terlizzi B. et al. // J. Phytopathol. – 1990. – Vol. 129. – P. 151–158.
4. Graft-transmissible diseases of grapevines: Handbook for detection and diagnosis / Ed. by G.P. Martelli. – Rome, 1993.
5. Sabanadzovic N., Saldarelli P., Martelli G.P. // J. Gen. Vir. – 2001. – Vol. 82. – P. 2009–2015.
6. Sabanadzovic S., Abou Ghanem N., Castellano M. A. et al. // Arch. Virol. – 2000. – Vol. 145. – P. 553–5657.
7. Walter B., Martelli G.P. Clonal and sanitary selection of the grapevine // Sanitary selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases. – Paris, 1997. – P. 43–95.
8. Walter B., Martelli G. P. // Vitis. – 1998. – Vol. 37, № 2. – P. 87–90.
9. Вердеревська Т. Д., Маринеску В. Г. Вірусні та мікoplазмennі захворювання плодових культур та винограда. – Кишинів, 1985.
10. Sabanadzovic S., Saldarelli P., Savino V. // Vitis. – 1996. – Vol. 35. – P. 137–140.
11. Schieber O., Seddas A., Belin C., Walter B. // Eur. J. Plant Pathol. – 1997. – Vol. 103. – P. 767–774.
12. Rowhani A., Biardi L., Johnson R. et al. // XIII<sup>th</sup> ICVG Meeting. Abstracts (Adelaide, Australia, 12–17 March 2000). – Adelaide, 2000. – P. 148.

Надійшла до редакції 22.10.04

УДК 578.85/86

А.В. Харіна, канд. біол. наук, І.В. Корнійчук, студ.,  
М.Є. Бисова, студ., В.М. Кокозей, д-р хім. наук, О.В. Нестерова, асп.

## ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ГЕТЕРОПОЛІЯДЕРНИХ КООРДИНАЦІЙНИХ СПОЛУК ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ НА РІЗНИХ РІВНЯХ ВЗАЄМОДІЇ ВІРУС-РОСЛИНА

Наведено результати дослідження антивірусної активності гетерополіядерних координаційних сполук переходних металів на різних рівнях взаємодії вірус-рослина. Досліджено вплив координаційних сполук на інфекційність ВТМ. За допомогою електронної мікроскопії показано, що сполуки зумовлюють формування вірусних агрегатів. Встановлено антивірусну активність сполук у культурі тканин.

The results of investigation of antiviral activity of heteropolymeric coordination compounds on different levels plant-virus relationships are presented. It was shown an impact of coordination compounds on TMV infection activity. Using electron microscopy it was demonstrated that investigated compounds caused a formation of virus aggregates. Coordination compounds reduced development of viral infection in TMV-tissue culture test system.

**Вступ.** Особливістю вірусних інфекцій рослин є той факт, що рослина, інфікована вірусом, залишається носієм вірусу на все життя. Особливо гостро проблема фітovірусних інфекцій постає у випадку рослин, що розмножуються вегетативно, оскільки при розмноженні рослин вірус передається з покоління в покоління [1]. Тому в наш час актуальними є питання хіміотерапії вірусних інфекцій рослин та отримання безвірусного посадкового матеріалу.

Відомі кілька класів речовин, здатних пригнічувати репродукцію віруса в рослині. До них належать рибавірин [2], азацидин [3] та похідні олігоаденілатів [4]. Крім речовин з прямою антивірусною активністю, інтенсивно досліджуються індуктори резистентності. Ці речовини природного та синтетичного походження мають непрямий антивірусний ефект. Проте за наявності великої кількості антифітovірусних сполук з тих чи інших причин жодну з них не було застосовано проти широкого кола вірусів [5]. Пошук активних сполук серед інших класів є перспективним напрямом досліджень, і будь-яка інформація про антивірусну активність нових сполук має величезне значення для встановлення закономірності хімічний склад-активність.

Перспективними щодо біологічної активності є гетерополіядерні координаційні сполуки переходних металів, оскільки після включення міді, цинку та інших металів в органічну основу можуть відбутися неочікувані зміни активності цих металів з можливим набуттям новими антивірусних властивостей. З огляду на це метою нашої роботи було дослідження антифітovірусної активності координаційних сполук.

**Методи та матеріали досліджень.** Нами досліджувались гетерометальні координаційні сполуки, отримані шляхом прямого синтезу на кафедрі неорганічної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка [6]. Вивчались такі сполуки:

№718	Cu <sub>2</sub> Ni <sub>3</sub> Cl <sub>4</sub> (HDea) <sub>6</sub> ·2ДМФА
РО39	[Cu(En)2ZnCl <sub>4</sub> ]·ДМСО
РО80	[Cu(En)2Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>4</sub> ]
РО172	[Cu(En)2ZnCl <sub>4</sub> ]·ДМФА
РО239	[Cu(En)2CdCl <sub>4</sub> ]·ДМФА
№221	Cu <sub>2</sub> CoCo <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> Tea) <sub>2</sub> ]·2CH <sub>3</sub> COOH

Вплив координаційних сполук на ВТМ вивчали за допомогою методу рослин-індикаторів. Для цього вірус обробляли комплексними сполуками в 1, 0,1 та 0,01 %-ному розведенні та інкубували 1 год. Після інкубації проводили механічне ураження половинок листкових пластинок рослин Nicotiana tabacum (сорт Імунний-580). Одну половину інокулювали обробленим комплексною сполукою вірусом, іншу – необробленим вірусом. Як абразив використовували карборунд. Рослини для екс-

перименту брали на стадії чотирьох дорослих листків. Кожен дослід проводили у трьох повторностях.

Для встановлення можливого токсичного впливу на рослину здійснювали інокуляцію листкових пластинок рослин відповідними розведеннями препаратів. Облік результатів проводили на сьомий день після інокуляції.

Для дослідження антивірусної активності комплексних сполук при регенерації рослин з калюсної тканини як джерело експлантів було використано вірусоінфіковані рослини (приблизно чотири тижні після інокуляції ВТМ). Для індукування калюсної тканини *in vitro* простерилізований та оброблений у 0,7 %-му розчині досліджуваної речовини рослинний матеріал переносили на поживне середовище MS-1. Калюсну тканину, на якій почався процес регенерації пагонів, розділяли та пересаджували на середовища, що містили 0,1, 0,01 та 0,001 %-ні концентрації сполуки. Паралельно робили контроль. Шматки ізольованого калюсу тестували на присутність вірусу методом рослин-індикаторів чи за допомогою імуноферментного аналізу. Регенеровані пагони переносили на безгормональне поживне середовище MS [7].

При дослідженні впливу комплексних сполук на систему ВТМ – культура тканин *Nicotiana tabacum* шляхом регенерації рослин з пазушних бруньок експланти (меживузля з бруньками), що були отримані з дорослих нестерильних інфікованих рослин, підлягали стерилізації та обробці досліджуваною сполукою (0,7 %-ний розчин).

Після цього експланти було висаджено на калюсогенне поживне середовище. Через 10 днів з'явилися нові пагони, які в подальшому пересаджували на середовища, що містили різні концентрації досліджуваної речовини (0,1, 0,01 та 0,001 %-ну). Паралельно виконували контроль. Через деякий час регенеровані пагони переносили на безгормональне поживне середовище для вкорінення. Кожен дослід проводили у трьох повторностях.

Для дослідження можливого впливу препаратів на захисні механізми рослинні їх попередню обробляли сполукою з наступною інокуляцією вірусом.

Для вивчення впливу координаційних сполук на розвиток вірусної інфекції в рослинному організмі проводили непрямий імуноферментний аналіз [8]. Вплив координаційних сполук на морфологію віріонів вивчали за допомогою електронної мікроскопії.

**Результати та їх обговорення.** У різних модельних системах сполуки значно знижували за ступенем антифітovірусної активності. Так, показано віруліцидний ефект препаратів №221, РО39 та РО172 (див.табл.). Тоді як препарат РО80 не впливав на інфекційну активність ВТМ, сполука № 718 виявила високий рівень фітотоксичності в усіх концентраціях.

При дослідженні впливу сполуки №221 на ВТМ за допомогою електронної мікроскопії спостерігали утворення вірусних конгломератів. окремо вірусні частинки не зустрічалися. У контролі вони були рівномірно розта-

шовані на поверхні плівки. Таким чином, препарат спричиняє агрегацію вірусних частинок між собою, що, можливо, може викликати ускладнення депротеїнізації ВТМ при інфікуванні рослин. У результаті обробки сполукою №221 структура вірусних частинок не змінюється, та їхні модальні величини залишаються в межах норми для ВТМ, яка становить  $300 \pm 10 \times 18 \pm 2$  нм. Швидше за все, комплексні сполуки, агрегуючись навколо вірюонів, спричиняли блокування поверхневих груп капсидного білка вірусу, які відіграють важливу роль у процесі його депротеїнізації. Для вивчення вірусних препаратів без додаткової фіксації було застосовано атомно-силову мікроскопію, за допомогою якої було підтверджено дані електронної мікроскопії.

#### Зниження інфекційності ВТМ під впливом координаційних сполук

Номер з/п	Зниження інфекційності ВТМ, %		
РО80	-	-	-
РО172	t	$35,3 \pm 3,8$	$39 \pm 7,6$
№ 221	t	$81,1 \pm 3,2$	-
РО39	$79,3 \pm 5,2$	$82,5 \pm 6,2$	$85,0 \pm 4,4$

t – токсичність.

У модельній системі ВТМ – культура тканини *Nicotiana tabacum* високу ефективність показала обробка сполукою РО80 експлантів перед посадкою на калюсогенне середовище. Встановлено  $74,2 \pm 5,6$  %-ну редукцію вмісту вірусу в калюсі, отриманому з оброблених експлантів. Проте при додаванні цієї сполуки в середовище для регенерації пагонів відмічено фітотоксичний ефект 0,1 та 0,01 %-ної концентрації препарату. Найменша концентрація досліджуваної речовини (0,001 %) не впливалась на розвиток інфекції при регенерації рослин з вірусомісного калюсу.

Сполука РО172 виявила антифітовірусну активність у даній системі. Обробка експлантів речовиною викликала зменшення кількості вірусу в калюсі приблизно на  $49,9 \pm 3,7$  % порівняно з контролем. При додаванні сполуки в поживне середовище в 0,1 %-ній концентрації спостерігалась негативна дія останньої на процес регенерації рослин. У 0,01 %-ній концентрації речовина РО172 пригнічувала розвиток вірусу на  $42,3 \pm 3,8$  %.

Речовини РО39 та РО239 не впливали на розвиток вірусної інфекції в калюсній тканині. Показано, що при культивуванні калюсу на середовищах, які містили різні концентрації сполуки №РО39 (0,1, 0,01 та 0,001 %), спостерігалась негативна дія препаратору на подальший процес регенерації рослин, про що свідчило почорніння нижньої частини стебла та повна зупинка росту при пересадці регенерантів на безгормональне середовище. Найбільша концентрація досліджуваної речовини спричинила відмиряння калюсу через кілька днів. Отже, сполука №РО39 не виявила антивірусної дії і, навпаки, пригнічувала процес регенерації рослин.

Однією з найбільш ефективних у культурі тканин є сполука № 718. Результати ІФА свідчать про зниження вмісту вірусу в калюсі, отриманому з оброблених експлантів (на  $49,7 \pm 4,4$  %). Значної затримки розвитку симптомів фітотоксичної інфекції було досягнуто при регенерації рослин зі сплячих бруньок у присутності цієї речовини (див.рис.).

Речовина № 221 показала високий рівень фітотоксичності вже на перших етапах досліджень – затримка утворення калюсу на 10–40 днів порівняно з контролем. Після посадки калюсу на поживне середовище зі сполукою спостерігалось його відмиряння.

Для дослідження можливого впливу препарату РО172 на захисні механізми рослин проводили обробку рослин *Nicotiana tabacum* препаратом за сім і одну добу до інокуляції вірусом. У результаті проведених експериментів встановлено зниження кількості ВТМ в оброблених рослинах на 16–47 % залежно від концентрації препарату (див.рис.).



Пригнічення розвитку вірусної інфекції в системі ВТМ – *Nicotiana tabacum* під впливом сполуки РО172

При порівнянні віруліцидної активності *in vitro* та активності *in vivo* координаційних сполук варто звернути увагу на той факт, що різні препарати по-різному поводять себе в умовах *in vitro* та *in vivo*. Так, деякі препарати, які не дали позитивних результатів *in vitro* у зв'язку з високим рівнем їхньої фітотоксичності, виявили високу активність *in vivo*. Типовими прикладами цих сполук є РО172 та №718, при втиранні яких у листкові пластинки спостерігалось формування некротичних плям. Проте при внесенні в поживні середовища вони поводять себе інакше. Особливо перспективною виявилась сполука РО172. Цікавими є результати, отримані при дослідженні сполуки РО80, яка взагалі не виявила віруліцидної активності та фітотоксичного ефекту в системі ВТМ–рослина. Проте обробка даною речовою експлантів перед посадкою на поживне середовище дала позитивний ефект, значно редукуючи концентрацію вірусу в отриманому калюсі.

Отже, порівняння активності *in vitro* та *in vivo* свідчить на користь того, що комплексні сполуки здатні впливати на фітовіруси та розвиток фітотоксичної інфекції. Так, деякі з них прямо впливають на віруси, інактивуючи його (віруліцидний ефект). Інші сполуки здатні пригнічувати розвиток вірусної інфекції в рослині. Можна узагальнити, що залежно від складу сполуки даного ряду здатні об'єднувати в собі властивості декількох класів хіміопрепаратів (віруліцидних, етіотропних антивірусних та індукторів резистентності). Послідовний аналіз великої кількості гетерометальних комплексних сполук із заміною одного чи кількох компонентів в їхньому складі може допомогти створенню хіміотерапевтичних агентів з оптимальним хімічним складом.

**Висновки.** 1. У модельних системах ВТМ–*Nicotiana tabacum* віруліцидну активність виявляють препарати №221, РО39 та РО172. 2. Встановлено, що при дії на вірюони ВТМ *in vitro* координаційні сполуки зумовлюють формування вірусних конгломератів (№718, №221). 3. Гетерополіядерні координаційні сполуки перехідних металів (РО172, РО80 та №718) знижують концентрацію вірусу в калюсній тканині *Nicotiana tabacum* від 47 до 74 % залежно від препарату та можуть бути застосовані для обробки експлантів перед уведенням в культуру і додавання в середовище для регенерації рослин.

- Hadidi A., Khetarpal R., Koganezawa H. Plant virus control. – St.Paul, 1998. – P. 346-373.
- Toussaint A., Kummet J., Maroquin C. et al. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1993. – Vol.32. – P. 303–309.
- Hansen A. Antiviral chemicals for plant disease control // Critic. Rev. Plant Scienc. – 1989. – Vol.8. – P. 45–68.
- Ткачук З.Ю., Артеменко В.С., Семерникова Л.И. // Біополімеры и клетка. – 1993. – №2. – С.9–18.
- Nascimento L., Pio-Ribeiro G., Willadino L., Andrade G. // Sci. agric. – 2003. – Vol.3. – P. 525–530.
- Pryma O., Petrusenko S., Kokozay V. et al. // Eur. J. Inorg. Chem. – 2003. – Vol.5. – P. 1426–1432.
- Murashige T., Skoog F. // Physiol. plantarum. – 1962. – Vol.15. – P. 473–497.
- Laemmli U. // Nature. – 1970. – Vol.227(15). – P. 608–685.

Надійшла до редакції 18.10.04

## CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY ANALYSIS OF THE E2 TRANSACTIVATION DOMAIN FROM BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 1 (BPV-1)

*N*-термінальний трансактиваційний домен білка E2 віруса папіломи великої рогатої худоби типу 1 (ВПВРХ-1) було закристалізовано методом *hanging drop vapour diffusion*. Кристали належать до просторової групи P6.22 з елементами  $a=b=61.54\text{ \AA}$ ,  $c=236.32\text{ \AA}$ . Асиметрична одиниця складається з двох молекул при вмісті розчинника 55%. Максимальна роздільність дифракції складала 2.8\text{\AA}, що є достатнім для вирішення структури білка та побудування її моделі. Отримання цієї структури сприятиме кращому розумінню функцій та ролі білка E2 в життєвому циклі віруса.

The N-terminal transactivation domain of the E2 protein from bovine papillomavirus type 1 has been crystallized by vapour diffusion. Crystals belong to the space group P6.22 with unit-cell dimensions  $a = b = 61.54$ ,  $c = 236.32\text{ \AA}$ . There is one molecule per asymmetric unit with a solvent content of 55%. Crystals diffract to at least 2.8\text{\AA} resolution and complete X-ray data to 3.4\text{\AA} have been collected on a conventional laboratory source. A knowledge of the structural basis of these multiple interactions should lead to a fuller understanding of the mechanism of action of this key regulator of the BPV life cycle.

**Introduction** Papillomaviruses are an extended group of small DNA viruses, discovered in all species of higher vertebrates analysed so far. While the vast majority of papillomaviruses cause proliferative epithelial lesions such as warts, certain types are associated with the development of tumours, for example HPV-16, which is strongly implicated in the development of cervical cancer. Indeed, over 90% of cervical carcinomas contain HPV DNA from 'high risk' (for cancer) viruses [1]. In cancer cells, the viral genomes are normally integrated into the cellular chromatin at random human chromosomal locations, but the HPV E2 open reading frame is very frequently interrupted by this integration event [2]. The E2 proteins of papillomaviruses are the major virally encoded regulators of papillomaviral transcription and replication. E2 proteins are highly conserved nucleophosphoproteins with molecular weights of 45–48 kDa, which bind as dimers to specific DNA sequences found in the viral genome. The E2 proteins have two functional domains: an N-terminal domain of about 200 amino acids, which is highly conserved and functions in HPV gene transactivation and viral replication, and a C-terminal domain of about 70 highly conserved amino acids, responsible for DNA binding and dimerization. The domains are connected by a hinge or flexible linker of variable sequence [3, 4].

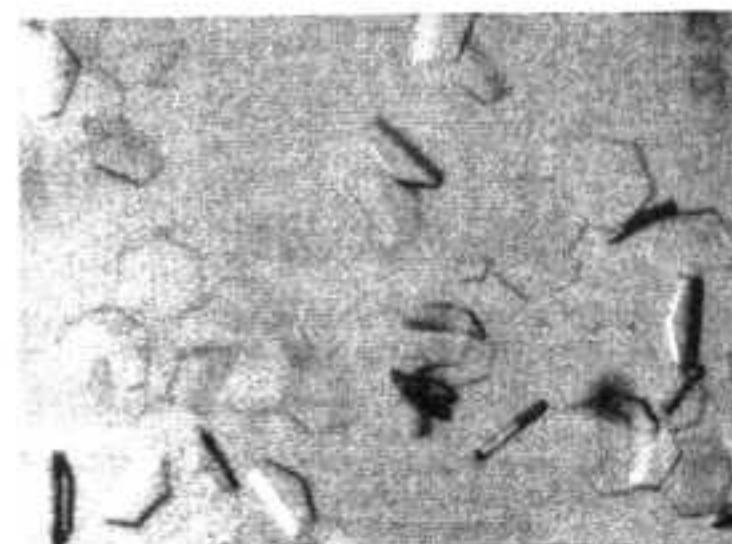
There are four E2 binding sites located in the upstream regulatory region (URR), of the PV genome. This region also contains binding sites for a number of cellular transcription factors, and the p97 promoter, from which expression of the viral oncogenes E6 and E7 is initiated [5–7]. Expression of E6 and E7 is strongly implicated in the transformation of cells to malignancy [6]. However, experiments *in vitro* cannot confirm whether E2 acts as a repressor or activator of these genes [7, 9–12], but in

cervical tissue samples E2 expression declines as early premalignant lesions progress to cancer [13, 14].

Most studies of E2 function have used the E2 protein of bovine papillomavirus (BPV-1) as a prototype for all papillomaviruses, but important functional and possibly structural differences do exist between the human and bovine forms [13]. The crystal structure of the BPV-1 E2 C-terminal DNA binding and dimerization domain has been previously determined [15], but to date no structure for the N-terminal domain has been reported. The gene transactivation and replication functions associated with this domain both require interaction with other viral [16–18] or cellular proteins [19–21]. Determining the protein structure of this part of E2 may give important clues as to how it fulfils these functions.

**Subject and methods of investigation.** Crystallization of the bovine papillomavirus E2 N-terminal transcriptional activation domain was carried out using the hanging-drop vapour-diffusion method. Prior to crystallization the purified protein was concentrated using a 10 K ultrafiltration membrane (Filtron) to 15–16 mg ml<sup>-1</sup> in 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 300 mM NaCl. The selection of proper conditions was carried out by using standard solutions of Crystal screen II (Hampton Research) and then protein was crystallized in larger scale. Crystals were grown from drops where 1\text{ }\mu\text{l of protein solution at an initial concentration } 15\text{ mg/ml was mixed with } 1\text{ }\mu\text{l of precipitant solution that contained } 0.1\text{ M Tris-buffer pH } 8.5, 0.3\text{ M NaCl and } 18\text{--}22\% \text{ tertiary butanol as a precipitating agent. Flat hexagonal crystals grew in } 8\text{--}10 \text{ hours and turned out to be very quick to degrade. Maximum dimensions were about } 0.2 \times 0.2 \times 0.01 \text{ mm.}

Crystallization was only successful with very fresh protein preparations. After 3–4 days from final purification, protein samples no longer produced satisfactory crystals. This is probably reflected in the limited lifetime of the crystals themselves (described below).



Hexagonal crystals of BPV-1 E2 N-terminal transactivation domain (see text for details)

The crystals were characterized using Cu K X-ray radiation from a Rigaku RU200 rotating-anode generator with MAR Research image-plate scanner as a detector. The crystals were frozen at 120 K using a cryocooling system (Oxford Cryosystems Cryostream). Crystals were transferred into the cryoprotectant solution containing 60% tert-butanol, 300mM NaCl and 10 mM Tris pH 8,5.

**Results and discussion.** Crystals belong to the space group  $P6_{1}22$  with cell dimensions  $a = b = 61,54$ ,  $c = 236,32$  Å. Assuming one 22 kDa protein molecule in the asymmetric unit the specific volume  $V_M$  is  $2,4 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  (Matthews, 1968) and the solvent content is 55%. The crystals diffract to at least 2,8 Å, and complete data have been collected to 3,4 Å resolution on the above source. Data were processed using the programs DENZO and SCALEPACK [22]. 7094 individual measurements were reduced into 5828 unique reflections giving an average redundancy for each reflection of 2,8. The data are 99,2% complete with an overall merging  $R$  factor of 10,9%. As stated above, crystals could only be grown from very freshly prepared protein samples. In addition, after growing to maximum size in 2-3 d, the crystals deteriorated in terms of diffraction quality in less than one week. This problem was addressed by cryogenic freezing and storage of crystals immediately after growth. A comparable approach will also be necessary for the heavy-atom derivative search. E2 is a sensitive and inherently flexible protein. It proved very difficult over several years to create a construct which was amenable to crystallization. However, recent advances in cryogenic freezing have proved essential to this project, which would have been intractable only a few years ago.

**Conclusions** Obtained crystals of E2 transactivation domain form BPV-1 were proved to be of admissible quality for the collection of more detailed diffraction data set using synchrotron radiation. Solved structure of this protein will provide the information about its oligomerization pattern, folding and important functional sites and determinants. These data enable comparative analysis of E2 proteins from different papillomaviruses and therefore leads to creating of the model of their functional activity.

**Acknowledgements** We thank Yorkshire Cancer Research and the BBSRC for financial support.

1. zur Hausen H. // Biochim. Biophys. Acta – 1996. – Vol.1288. – P F55-F78.
2. Choo, K.B., Pan, C.C., Han S.H. // Virology. – 1987. – Vol.161. – P. 259–261.
3. Antson A.A., Burns J.E., Moroz,O.V. et al. // Nature. – 2000. – Vol.403. – P.805–809.
4. McBride A. A., Romanczuk H., Howley P. // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol.266. – P.18411–18414.
5. Meissner J. // Human Papillomaviruses. – New Mexico, 1997.
6. Munger K., Phelps W., Bibb V. et al. // J. Virol. – 1989. – Vol. 63. – P.4417–4421.
7. O'Connor M., Chan S.-Y., Bernard H.-U. // Human Papillomaviruses. – Los Alamos, 1995.
8. Bouvard V., Storey A., Pim, D., Banks, L. // EMBO J. – 1994. – Vol.13. – P 5451–5459.
9. Dong G., Broker T. R., Chow L.T. // J. Virol. – 1994. – Vol.68. – P. 1115–1127.
10. Phelps W.C., Howley P.M. // J. Virol. – 1987. – Vol.61. – P. 1630–1638.
11. Thierry F., Howley P.M. // New Biologist. – 1991. – Vol.1. – P. 90–100.
12. Ushikai M., Lace M.J., Yamakawa Y. et al. // J. Virol. – 1994. – Vol.68. – P. 6655–6666.
13. Sanders, C.M., Stern, P.L., Maitland, N.J.// Virology. – 1995. – Vol. 211. – P. 418–433.
14. Stoler M.H., Rhodes C.R., Whitbeck A. et al. // Hum. Pathol. – 1992. – Vol.23. –P. 117–127.
15. Hegde R. S., Grossman S. R., Laimins L. A., Sigler P. B. // Nature. – 1992 – Vol.359. – P.505–512.
16. Storey A., Piccini A., Massimi P. et al. // J. Gen. Virol. –1992. – Vol.76. – P. 819–826.
17. Winokur P.L., McBride A.A. // Virology. – 1996. – Vol.221. – P. 44–53.
18. Yasugi T., Benson J.D., Sakai H. et al. // J. Virol. – 1997. – Vol.71. – P. 891–899.
19. Breiding D.E., Sverdrup F., Grossel M.J. et al. // Mol. Cell. Biol. – 1997. – Vol.17. – P. 7208–7219.
20. Yao J.M., Breiding D.E., Androphy E.J. // J. Virol. – 1998. – Vol.72. –P. 1013–1019.
21. Li R., Knight J.D., Jackson S. P. et al. // Cell. – 1991. – Vol.65. – P.493–505.
22. Otwinowski Z., Minor W. // Methods Enzymol. – 1997. – Vol.276. – P. 307–326.

Надійшла до редколегії 29.10.04

Наукове видання



# ВІСНИК

КІЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

## БІОЛОГІЯ

Випуск 44

Редактор Н. Витвицька  
Технічний редактор Р. Титов

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власників імен та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та дискети не повертаються.

Засновник та видавець – Київський національний університет імені Тараса Шевченка. Свідоцтво Міністерства інформації України про державну реєстрацію засобів масової інформації КІ № 251 від 31.10.97. Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", директор Г.Л.Новікова. Адреса ВПЦ: 01033, Київ, б-р Тараса Шевченка, 14, кімн. 43. ☎ (38044) 239 3172, 239 3222; факс 234 2290



Підписано до друку 03.02.05. Формат 60x84<sup>1/16</sup>. Вид. № 21. Гарнітура Arial. Папір офсетний.  
Друк офсетний. Наклад 500. Ум. друк. арк. 6,51. Обл.-вид. арк. 10,0. Зам. № 25-2396.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"  
01033, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43,  
☎ (38044) 239-3222; (38044) 239-3172; факс (38044) 224-0105.  
e-mail: [vydav\\_poligraph@univ.kiev.ua](mailto:vydav_poligraph@univ.kiev.ua)  
<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02.



Наукова бібліотека  
ім. М. Максимовича

**КНУ**

ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА



**2827JB**

45 - чит зал періодики та дисерт

8.00

ISSN 1728-3817

A standard linear barcode is positioned vertically on the left side of the page. It consists of vertical black bars of varying widths on a white background.

35>

9 771728 381009