

analyzed. **Results.** Results obtained suggest that biotic elicitor – oxalic acid induces two wheat cultivars (Stolychna and Poliska 90) defense responses against leaf blotch agent *Septoria tritici*. Initiation of defense responses in elicitor-treated plants occurs in a short period of time. The effect of oxalic acid treatment increased the activity of APO, phenol peroxidases and decreased the catalase activity. The effect of oxalic acid also increased the grain quantity in ear and plant height. **Conclusions.** Biochemical nature of defense responses elicitation revealed an increase activity of cytoplasmic peroxidase (CP) which induces lignin synthesis for mechanical strengthening of the cell wall. It is also shown that changes in activity of ascorbateperoxidase (APO) reflect the functioning of the photosynthetic metabolism in leaves cells mesophyllous.

Key words: wheat, *Septoria tritici*, oxalic acid, plant defense responses, antioxidant enzymes.

УДК 633.112.1;602.6:58

ЗАМБРІБОРЩ І.С., ДОБРОВА Г.О., ШЕСТОПАЛ О.Л., ПАЛАМАРЧУК А.І.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Обідіопольська дорога, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

ВПЛИВ ІНДУКЦІЙНОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ФОРМУВАННЯ НОВОУТВОРЕНЬ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ ТВЕРДОЇ

Тверда пшениця *Triticum durum* має велике значення в сільськогосподарській промисловості як сировина для виробництва макаронних та кондитерських виробів. Основним завданням селекції тетраплоїдної пшениці на сьогодні є створення холодостійких і посухостійких сортів з стабільним високим врожаєм якісного зерна. Отримання подвоєних гаплоїдів – це один з найпоширеніших біотехнологічних прийомів, який дозволяє істотно скоротити селекційний процес. Одним з основних методів отримання гаплоїдних рослин є культура пиляків *in vitro*, першим етапом якого є індукція новоутворень [1].

Мета даної роботи – дослідження впливу живильних середовищ на показник індукції новоутворень та розробка оптимальних умов для індукції новоутворень в культурі пиляків *in vitro* сортів і гібридів пшениці твердої Одеського регіону.

Матеріали і методи

До роботи були залучені 13 гібридів другого покоління пшениці твердої яро-озимої та 5 сортів пшениці твердої ярої.

Рослини вирощували на дослідних польових ділянках СГІ-НЦНС. Добір пагонів з колоссям зрізали з донорних рослин, коли вакуолізовані мікроспори пиляків знаходились у середньо-пізній одноядерній фазі розвитку. Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у водному розчині АБК (0,5 мг/л) протягом 3-5 діб при +2 – +4 °С у темряві [2]. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином

гіпохлориту кальцію за прийнятою методикою [3]. Пиляки експлантували на дев'ять варіантів агаризованих поживних середовищ для індукції новоутворень: 190-2 [4], ВAD-1 [5], С17 [6] та М42 [7] та їх модифікації. Модифікацію середовищ проводили за вмістом і складом амінокислот, органічних кислот та вітамінів [8].

Результати і обговорення

Для біотехнологів, що займаються методом культури пиляків *in vitro*, пшениця твердої є досить складним об'єктом дослідження. Насамперед, це пов'язано із низьким рівнем індукції новоутворень на першому етапі технологічного процесу отримання подвоєних гаплоїдів.

За результатами наших попередніх досліджень відмічено низький або нульовий рівень індукції новоутворень з пиляків сортів та гібридів пшениці твердої регіону Півдня України за використання стандартних для культивування пиляків *Triticum durum* живильних середовищ [9]. Тому наше дослідження було спрямоване на модифікацію складу живильних середовищ з метою підвищення досліджуваного показника. За складом і концентрацією гормонів (2,4-Д в концентрації 2 мг/л та кінетин в концентрації 0,5 мг/л [10]) та джерел вуглецю (сахароза в концентрації 60 г/л та глюкоза в концентрації 17,5 г/л [11]) всі експериментальні середовища були ідентичними. Модифікували лише вміст вітамінів, органічних та амінокислот.

Середовище 190-2 використовують як

індукційне для культури пиляків пшениці м'якої [2, 3]. Середовища BAD-1, C17 та M42 за літературними даними [5–7] є оптимальними для індукції новоутворень в культурі пиляків пшениці твердої. Модифікацію середовищ CM, CMн, C17н, C17В та M42н проводили на основі сольового складу стандартних середовищ (табл. 1).

Відомо, що для найбільш ефективного відгуку будь-якого експланту в культурі *in vitro* досліднику необхідно перш за все підібрати оптимальний склад живильного середовища. Як бачимо з таблиці 1, дослідні середовища істотно відрізняються як за загальною концентрацією мінеральних солей, так і за співвідношенням окремих елементів. Так, загальна мінералізація середовищ збільшується в ряду M42 – 190-2 – C17 – BAD-1. Оскільки занизька або завелика концентрація солей у живильному середовищі є лімітуючим фактором, що пригнічує формування новоутворень, а за результатами тогорічних досліджень середовища 190-2 і BAD-

1 виявились не прийнятними для генотипів пшениці твердої нашої зони, в подальшому ми зосередилися на модифікації живильних середовищ C17 та M42 (табл. 2).

Для покращення рівня індукції новоутворень на першому етапі культивування пиляків на основі мінерального складу середовища C17 розробили нове живильне середовище CM (власна назва), яке за складом вітамінів та органічних кислот аналогічне середовищу M42, а також додатково містило пролін та глютамін. З літературних джерел відомо, що вміст саме проліну та глютамінової кислоти стимулює індукцію новоутворень у пшениці м'якої [12]. Додавання даних амінокислот в середовище підвищує рівень індукції і для тетраплоїдних генотипів. Пролін та глютамін також додавали в живильні середовища CMн і C17В. Останнє додатково містило повний набір амінокислот за прописом BAD -1.

Таблиця 1. Сольовий склад індукційних живильних середовищ

Поживне середовище	Загальна концентрація солей, мг/л	Вміст мікроелементів, мг/л			
		К	N	P	Ca
C17	2418,56	655,41	299,06	91,11	132,85
M42	1505,89	147,88	223,56	55,59	179,73
190-2	1830,3	493,28	189,91	68,33	17,37
BAD-1	3216,88	667,11	356,79	77,47	244,80

Таблиця 2. Модифікації індукційних живильних середовищ

Середовище	Макро- та мікроелементи	Вітаміни	Органічні кислоти	Амінокислоти
CM	C17	M42	M42	+Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л
CMн	C17	M42	S M42 - піруват	+Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л
M42н	M42	M42	S M42 - піруват	_____
C17н	C17	C17	S C17 - піруват	_____
C17В	C17	C17	S C17 - піруват	BAD-1 +Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л

У результаті роботи було відмічено, що за рахунок відносно великої концентрації аміно- та органічних кислот у складі дібраних середовищ, після автоклавування вони характеризувались низьким значенням рН (близько 4,9–5,1 рН). Завдяки модифікації середовищ СМн, С17н, С17В та М42н (половинний набір амінокислот та відсутність пірвіноградної кислоти) рН середовища було нормалізовано.

У результаті дослідження 18 генотипів пшениці твердої, які вирощували в умовах Одеського регіону, протестовані на здатність формувати новоутворення на першому етапі культури пиляків *in vitro*. Рівень індукції новоутворень різних генотипів пшениці широко варіював (від 0 до 10,53 шт./100 пиляків) в

залежності від складу індукційного живильного середовища. Оскільки отримана велика кількість експериментальних даних – кожен з 18 генотипів на 5 варіантах живильних середовищ, – показати всі результати дослідження у рамках однієї статі проблематично, наводимо найбільш типові дані для п'яти з протестованих генотипів (табл. 3).

Аналіз даних показав, що на модифікованих середовищах рівень індукції новоутворень вищий, порівняно із стандартними середовищами для більшості генотипів. Максимальну індукцію новоутворень майже для всіх досліджених генотипів спостерігали на модифікованих середовищах СМн та С17В.

Таблиця 3. Вплив складу живильного середовища на індукцію новоутворень в культурі пиляків сортів і гібридів пшениці твердої

Генотип	Середовище	Кількість пиляків, шт.	Кількість новоутворень	
			шт.	шт./100 пиляків
Т1	190-2	104	2	1,92 ± 1,35
	М42н	193	2	1,04 ± 0,73
	С17В	96	3	3,13 ± 1,78
	С17н	122	1	0,82 ± 0,82
	СМ	80	0	0
	СМн	304	19	6,25 ± 1,39
Т4	190-2	45	0	0
	М42 н	55	0	0
	С17	34	0	0
	С17В	116	0	0
	СМ	28	1	2,07 ± 0,50
	СМн	98	1	1,02 ± 1,02
Т5	190-2	91	0	0
	М42	55	0	0
	М42н	307	0	0
	С17	83	0	0
	С17н	479	5	1,04 ± 0,46
	СМн	95	10	10,53 ± 3,15
Т8	190-2	46	0	0
	М42	149	0	0
	М42н	281	1	0,36 ± 0,36
	С17В	193	7	3,63 ± 1,35
	С17н	158	4	2,53 ± 1,25
	СМ	123	2	1,63 ± 1,14
СМн	376	8	2,13 ± 0,74	
Т10	190-2	110	0	0
	М42	107	0	0
	М42н	225	3	1,33 ± 0,76
	С17	106	0	0
	С17В	117	5	4,27 ± 1,87
	С17н	188	4	0,53 ± 0,53
СМн	152	2	1,32 ± 0,92	

Максимальний рівень індукції для різних генотипів на цих середовищах становив: $10,53 \pm 3,15$ (СМн), $6,25 \pm 1,39$ (СМн), $4,27 \pm 1,87$ (С17В) шт./100 пиляків. На стандартних живильних середовищах індукція була нульовою або достовірно нижчою.

Показано, що загалом перші етапи андрогенезу більш інтенсивно (результативно) проходять на живильних середовищах з мінеральним складом, аналогічним середовищу С17 (табл. 1–3). Таким чином, можна зробити висновок, що дане живильне середовище містить збалансований склад макро- та мікроелементів, який є найоптимальнішим серед досліджених для культивування пиляків

пшениці твердої, вирощеної в умовах Півдня України.

Висновки

1. У результаті модифікацій стандартних живильних середовищ розроблено нові середовища СМ, СМн і С17В для індукції новоутворень в культурі пиляків *in vitro* пшениці твердої. Рівень індукції новоутворень на розроблених живильних середовищах вищий, ніж на базових.

2. Виявлено залежність рівня індукції новоутворень від складу індукційного середовища. Цей показник коливався в від 0 до $10,53 \pm 3,15$ шт./100 пиляків у межах одного генотипу залежно від середовища.

Література

1. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.
2. Игнатова С.О., Лобанова К.И., Шестопал О.Л. Способ підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці. Патент України МПК № від 10.04.07. Бюл. № 4.
3. Игнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.И., Шестопал О.Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків. Методичні рекомендації / Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. – Одеса, 2008. – 12 с.
4. Trottier M.C., Collin J., Comeau A. Comparison of media further aptitude in wheat anther culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1993. – N 35. – P. 59–67
5. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. Advances in haploid production in higher plants. // *Springer Science + Business Media B.V.*: The Netherlands. – P. 1–208.
6. Foroughi-Wehr B., Zeller F.J. *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars // *Theor. Appl. Genet.* – 1990. – 79. – P. 77–80.
7. Kao K.N.; Saleem M., Abrams S., Pedras S., Horn D., Mallard C. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods // *Plant Cell Reports*. – 1991. – 9. – P. 595–607.
8. Замбриборщ І.С., Доброва Г.О., Шестопал О.Л., Ружицька О.М. Індукція новоутворень в культурі пиляків тетраплоїдної пшениці *Triticum dicoccum* (schrank) schuebl *in vitro*. – Сборник научных трудов SWorld. – Ивовоно: Маркова А.Д., 2013. – 50. – С. 28–32.
9. Замбриборщ І.С., Доброва А.А. Изучение способности сортов и гибридов твердой пшеницы к андрогенезу *in vitro* // Сборник тезисов международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», 16–21 апреля 2012 г. – Пущино: РАН, 2012. – С. 253.
10. Saidi N., Cherkaoui S., Chlyah A., Chlyah H. Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* anther culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997. – 51. – P. 27–33.
11. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. Doubled haploid production in crop plant // *Double haploid production in Crop plants*. – Netherland: Kluwer Academic Publisher, 2003. – P. 167–172.
12. Chu C.C., Hill R.D. An improvement improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryoids in *Triticum aestivum* L. // *Plant Sci.*, 1988. – 55. – P. 175–181.

ZAMBRIBORSH I.S., DOBROVA H.O., SHESTOPAL O.L., PALAMARCHUK A.I.

The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolska road, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

CULTURE MEDIA INFLUENCE ON THE INDUCTION OF NEW FORMATION CREATION IN *IN VITRO* DURUM WHEAT ANTHER CULTURE

Aims. Durum wheat is the important wide spread agricultural crop. Double haploid obtaining is a biotechnological method in durum wheat breeding. The aims of this work were investigation of culture media influence on the process of induction in durum wheat anther culture and formation of the optimal for Odessa region durum wheat varieties and hybrids induction cultural media. **Methods.** We used the standard protocol of an anther culture method and modified the media composition. **Results.** We used 190-2, C-17,

M42 and BAD-1 basic media and modified the vitamins, amino and organic acids media composition. Standard media cannot be used as induction media for Odessa region durum wheat genotypes since the level of induction on that media was low. Embryo formation frequency on modified media was higher. **Conclusions.** New induction culture media were developed. The induction media composition impacted on the embryo formation frequency.

Key words: durum wheat, anther culture *in vitro*.

УДК 57.088 + 616.7:616-018.1”712.4”

КОВАЛЬЧУК М.В.¹, ГУЛЬКО Т.П.¹, ДРАГУЛЯН М.В.¹, ШУВАЛОВА Н.С.²,
ДЕРЯБИНА Е.Г.², КОРДИУМ В.А.^{1,2}

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,

Украина, 03143, г. Киев, ул. Заболотного, 150, e-mail: kovmv@ukr.net

² ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»,

Украина, 04114, г. Киев, ул. Вишгородская, 67

ИЗМЕНЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖИВОТНЫХ С ИНДУЦИРОВАННЫМ ОСТЕОАРТРИТОМ ПОСЛЕ ВНУТРИСУСТАВНОГО ВВЕДЕНИЯ МСК

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) вызывают в последнее время повышенный интерес, поскольку они имеют способность мигрировать в сайты повреждения тканей, могут дифференцироваться в разные типы клеток, имеют иммуномодулирующие свойства, легко выделяются и масштабируются в условиях *ex vivo*. МСК модулируют иммунные ответы в организме и изменяют течение различных воспалительных заболеваний, поэтому часто терапевтический эффект МСК осуществляется через их иммунорегуляторные функции [1–3].

Тот факт, что МСК *in vitro* могут ингибировать пролиферацию как сингенных, так и аллогенных лимфоцитов, а также уходить от иммунного надзора при трансплантациях, дал надежду на то, что МСК можно использовать в клинике как «универсальные» иммунопривилегированные доноры биологически активных веществ, игнорируя отличия по главному комплексу гистосовместимости (ГКГ). С другой стороны, исследования на лабораторных животных показали, что аллогенные МСК запускают донор-специфические иммунные реакции у реципиента [4, 5].

В частности, МСК человека и ряда других млекопитающих, не экспрессируют антигены II класса ГКГ при нормальных физиологических условиях, тогда как индукция их экспрессии определяется при дифференциации клеток [6]. При введении МСК в поврежденные ткани может наблюдаться их дифференциация, что ведет к появлению или усилению экспрессии антигенов I и II классов ГКГ и синтезу донор-

специфических алло-антител в сыворотке экспериментальных животных, что способствует удалению клеток из тканей реципиента. Встает вопрос о пересмотре концепции иммунопривилегированной природы МСК при алло- и ксенотрансплантациях. Этому также способствуют факты лишь кратковременного выживания трансплантированных МСК у иммунокомпетентного реципиента, а также ряд изменений в субпопуляциях клеток иммунной системы реципиента под действием донорных МСК.

Так как МСК обладают противовоспалительными свойствами и принимают участие в репарации тканей, мы исследовали влияние МСК Вартоновского студня пуповины человека на процесс восстановления хрящевой ткани при индуцированном остеоартрите у крыс. Остеоартрит – наиболее частое ревматическое заболевание, которое характеризуется дегенерацией суставного хряща, в основном, благодаря изменениям в сторону катаболической активности и уменьшению количества хондроцитов. Способность последних восстанавливать матрикс снижается как с возрастом, так и при ряде повреждений [7]. Если происходит восстановление, то часто образуется неполноценный хрящ с пониженным содержанием коллагена второго типа и агрекана. Показано, что МСК защищают хондроциты от дегенерации, связанной с развитием остеоартрита [8].

Целью нашего исследования было