

Отримання рослин *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack та *Miscanthus sinensis* Andersson у культурі *in vitro* шляхом непрямого морфогенезу

С. М. Гонтаренко, С. О. Лашук*

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03141, Україна,
*e-mail: masjnka@inbox.ru

Мета. Отримати рослини *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack та *Miscanthus sinensis* Andersson у культурі *in vitro* шляхом непрямого морфогенезу. **Методи.** Біотехнологічні, математико-статистичні. **Результати.** Розроблено склад живильного середовища для індукції калусогенезу з насіння міскантусу з низькою схожістю та життєздатністю проростків – модифіковано середовище Мурасіге–Скуга (МС) за вмістом макроелементів (1/2 дози), до якого включено амінокислоти (глутамінова – 300 мг/л, аспарагінова – 50 мг/л, тірозин – 5 мг/л, аргінін – 3 мг/л, гідроксипролін – 2 мг/л) та регулятори росту (6-БАП – 0,6 мг/л, 2,4-Д – 2,5 мг/л та АБК – 0,3 мг/л). Розроблено склад живильного середовища для регенерації мікророслин з калусу – модифіковано агаризоване середовище МС за вмістом макроелементів (1/2 дози) з додаванням вітамінів: тіаміну (10,0 мг/л), піридоксину (1,0 мг/л), нікотинової кислоти (1,0 мг/л) (за Уайтом), аскорбінової кислоти (1,0 мг/л), глютамінової амінокислоти (250 мг/л), 6-БАП (2,0 мг/л), НОК (0,3 мг/л), на якому отримано стовідсоткову регенерацію *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack та п'ятдесятивідсоткову – *M. sinensis* Andersson. Завдяки модифікації середовищ для ініціації калусогенезу та регенерації мікророслин коефіцієнт розмноження *M. sinensis* підвищено в середньому в 20 разів, *M. sacchariflorus* – в 35–40 разів. **Висновки.** Отримано рослини *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack та *M. sinensis* Andersson у культурі *in vitro* шляхом ініціації калусогенезу та регенерації мікророслин з насіння міскантусу з низькою схожістю та життєздатністю на живильних середовищах певного складу.

Ключові слова: міскантус, калус, біотехнологічні методи, насіння, живильне середовище.

Вступ

Рослини роду *Miscanthus* належать до відділу покритонасінних (Angiospermales), класу однодольні (Monocotyledoneae), ряду (Glumiflorae), родини злакові (Poaceae) [1]. Вони є типовими багаторічними злаками, що поширені на теренах Японії, Південних Курил, Маньчжурії, Кореї, Таїланду, Полінезії та Східного узбережжя США [2]. Аналіз світового досвіду вирощування біоенергетичних культур свідчить, що саме міскантус є пріоритетним серед трав'янистих культур з погляду біоенергетики завдяки своїй високій фотосинтетичній активності, значній кількості біомаси та невибагливості до умов вирощування. Відомо понад 20 видів міскантусу [3] серед яких перше місце в біоенергетичному аспекті займає міскантус гігантський (*Miscanthus × giganteus* J.M.Greef, Deuter ex Hodk., Renvoize) – природний аллотриплоїд, гібрид між міскантусом цукрокрітковим (*Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack) (тетраплоїд) та міскантусом китайським (*Miscanthus sinensis* Andersson) (диплоїд) [4].

Міскантус – геліофіт, належить до групи рослин із C4-типом фотосинтезу. Загальна ефективність трансформації сонячної енергії в біомасу у C4-рослин є значно вищою, ніж у C3-рослин – 4,0 та 3,6% відповідно [5]. Міскантус вважають одним з рекордсменів серед найефективніше синтезуючих організмів [6]. Завдяки цьому, такі рослини мають змогу рости навіть за високої температури та інтенсивного освітлення за закритих продихів, мають своєрідну адаптацію до складних погоднокліматичних умов. Ефективність фотосинтезу у таких рослин є дуже високою, а органічна речовина значною мірою витрачається не тільки на утворення нових пагонів, а й підземної частини – коренів (ризом). Але в зв'язку з тим, що для біоенергетичних потреб набув поширення лише один японський клон – міскантус гігантський, існує ризик неконтрольованих епіфітотій. Пошуки нових клонів або триплоїдного насіння в симпатричних популяціях на острові Хокайдо (Японія) не були результативними, так само як і селекційні роботи з відтворення високопродуктивного триплоїду в умовах теплиць, де як компоненти для гібридизації використовували міскантус цукрокрітковий та міскантус китайський [2, 7]. Тому останніми роками знову повернулися до селекції та біотехно-

Svitlana Gontarenko
<http://orcid.org/0000-0003-0472-720X>
Snizhana Lashuk
<http://orcid.org/0000-0002-9588-7761>

логії міскантусу китайського та цукроквіткового.

Міскантус – рослина короткого дня. В кліматичних умовах Східної Європи рослини міскантусу цвітуть у вересні–листопаді. Суцвіття – волоть, або колосовидна волоть, слабо розвинута. Велика кількість представників роду *Miscanthus* не утворює насіння, що перешкоджає генеративному розмноженню культури та проведенню селекційних робіт [8]. Генотипи, що цвітуть рано – наприкінці літа, використовують як газонні декоративні трави і мають невеликий урожайний потенціал. Утворене насіння має низьку схожість (6–60%), життєздатність його зберігається близько 6 місяців [9]. Маса 1000 насінин міскантусу китайського коливається від 505 до 655 мг, міскантусу цукроквіткового – від 444 до 467 мг. Таке насіння має невелику кількість резервних поживних речовин для проростання та зберігання. Розмноження міскантусу шляхом висіву кондиційного насіння в ґрунт не забезпечує високого коефіцієнта розмноження, тому що з однієї пророслої насінини можна отримати лише одну рослину. До того ж, рослини міскантусу, отримані таким шляхом, є дуже вразливими і майже всі гинуть протягом зимового періоду [10]. Тому існує проблема насінневого розмноження рослин цього роду.

Таким чином, актуальним питанням сьогодення є розроблення нових біотехнологічних методів розмноження міскантусу та створення нових вихідних форм для збільшення генетичного різноманіття наявних видів з погляду використання їх як сировини для біоенергетики.

Відомо, що вперше дослідження сортів *M. sinensis* в умовах *in vitro* проводили N. J. Gawel та ін. [11] у 1987 р., які показали, що недостиглі суцвіття міскантусу є кращими експлантами для калусогенезу, ніж молоді листки, вузлові сегменти, меристематичні тканини чи жіночі статеві клітини. Було встановлено, що морфогенні калуси утворюються успішніше на середовищі з вмістом 2,4-Д, ніж на середовищі з вмістом Піклорамаму, який було запропоновано раніше. За даними авторів, регенерація відбувалася шляхом органогенезу. Перша докладна інформація про культуру *in vitro* щодо утворення калусних тканин з експлантів міскантусу гігантського була опублікована I. Lewandowski та ін. [2]. Holme I. B., Petersen K. K. [12] порівняли живильні середовища N6 та Мурасіге–Скуга (МС) на їхню здатність утворювати швидкорослі та регенераційні клітинні суспензії

міскантусу гігантського з калусів, вирощених з недостиглих суцвіть.

У сучасних дослідженнях для отримання калусних культур використовують різні експланти рослин – бруньки, пагони, квітки та достигле насіння міскантусу [13, 14].

Аналіз літературних джерел та узагальнення вимог до складу живильних середовищ, призначених для індукції калусогенезу різних частин рослин [15–17], свідчать, що найбільшу кількість калусів отримували, використовуючи середовища Гамборга–В5 або Чу, модифіковані за вмістом регуляторів росту, зокрема з додаванням 2 мг/л 2,4-Д. Модифіковане середовище МС використовували як регенераційне: сахароза (20 г/л) + гелірит (3 г/л) + БАП (5 мг/л) + НУК (0,24 мг/л) або 2,4-Д (1 мг/л). Щодо середовищ для отримання калусних ліній та регенерації з них повноцінних рослин із насіння з низькою схожістю та життєздатністю, такі дані відсутні.

Мета досліджень – отримати рослини *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack та *Miscanthus sinensis* Andersson в культурі *in vitro* шляхом непрямого морфогенезу.

Матеріали та методика досліджень

Дослідження проводили в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України протягом 2012–2015 рр. У досліджах використовували насіння *M. sinensis* німецької фірми «Jelitto» та насіння *M. sacchariflorus* російського походження 2008 року репродукції. Лабораторна схожість насіння *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* – 6–8%, проростки є нежиттєздатними. В умовах поля схожість насіння *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* дорівнювала нулю. Кількість сходів *in vitro* – 6–10%, кількість життєздатних проростків – 0,5–1%. Найімовірніше, низька схожість та життєздатність зумовлені віковими змінами зародка, що не дає змоги насінню прорости та розвиватись далі. Стерилізували та пророщували насіння з використанням загальних схем та методів, розроблених для інших культур, які адаптували для роботи з насінням рослин міскантусу в культурі *in vitro* [18–20].

Основою успішного культивування та розмноження рослин міскантусу *in vitro* є правильний добір живильних середовищ. У дослідженнях було проаналізовано та розроблено прописи трьох типів середовищ:

- 1) середовища для ініціації та утворення калусів з насіння з низькою схожістю та життєздатністю;
- 2) середовища для стимуляції морфогенезу та регенерації мікроклонів;

3) середовище для розмноження мікроклонів.

Для введення міскантусу в культуру насіння стерилізували розчином 1–2% гіпохлориду натрію протягом 15–25 хв. Стерильне насіння висаджували на серію середовищ першого типу – модифіковане середовище МС, що містило 1/2 дози макроелементів та повну дозу мікроелементів, вітаміни: тіамін (0,1–1,0 мг/л), піридоксин (0,1–1,0 мг/л), нікотинову кислоту – (0,5–1,0 мг/л) та аскорбінову кислоту (1,0 мг/л), з додаванням амінокислот: глютамінової (200–500 мг/л), аспаргінової (30–50 мг/л), тірозину (1–

10 мг/л), аргініну (2–10 мг/л), гідроксипроліну (2–4 мг/л), регуляторів росту: 6-БАП (0,3–0,8 мг/л) та АБК (0,1–0,4 мг/л), 2,4-Д (1,0–2,5 мг/л) або 2,4-Д (1,0–2,5 мг/л) + ІОК (0,5–1,0 мг/л), або 2,4-Д (1,0–2,5 мг/л) + НОК (0,5–1,0 мг/л), сахарози (40 г/л). Як еталон використовували середовища Гамборга–В5 або Чу, модифіковані за вмістом регуляторів росту (табл. 1). Культивували насіння після висаджування на живильне середовище за температури 22–30 °С та відносної вологості повітря 50–80%. Після проліферації калусу його переносили на другу серію середовищ, яка відрізнялася від

Таблиця 1

Склад живильних середовищ для індукції калусогенезу з насіння міскантусу з низькою схожістю та життєздатністю

Компоненти середовища	Середовища			
	Гамборга – В5 модифіковане за вмістом регуляторів росту	Чу – N6 модифіковане за вмістом регуляторів росту	МС	МС модифіковане
Макроелементи, г/л				
NH_4NO_3	–	–	1650,0	825,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134,0	463,0	–	–
KNO_3	2500,0	2830,0	1900,0	950,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	–	166,0	440,0	220,0
CaCl_2 б/в	113,24	–	–	–
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	–	185,0	370,0	185,0
MgSO_4 б/в	122,0	–	–	–
KH_2PO_4	–	400,0	170,0	85,0
NaH_2PO_4 б/в	130,5	–	–	–
Мікроелементи, г/л				
H_3BO_3	3,0	1,6	6,2	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10,0	4,4	22,3	22,3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,0025	0,0025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,0025	0,0025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0	1,5	8,6	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,025	0,25	0,25
KI	0,75	0,8	0,83	0,83
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,85	27,8	27,8	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,25	–	37,4	37,4
Вітаміни, мг/л				
Тіамін	10,0	3,0	0,1	1,0
Піридоксин	1,0	2,0	0,5	1,0
Нікотинова кислота	1,0	2,0	0,5	1,0
Аскорбінова кислота	–	–	–	1,0
Біотин	–	2,0	–	–
Амінокислоти, мг/л				
Гліцин	–	–	2,0	2,0
Глутамінова	–	–	–	300
Аспаргінова	–	–	–	50,0
Тірозин	–	–	–	5,0
Аргінін	–	–	–	3,0
Гідроксипролін	–	–	–	2,0
Регулятори росту, мг/л				
6-БАП	–	–	–	0,6
Кінетин	0,1	0,5	0,2	–
2,4-Д	2,0	2,0	–	2,5
ІОК	–	–	2,0	–
НОК	–	0,5	–	–
АБК	–	–	–	0,3

Закінчення таблиці 1

Компоненти середовища	Середовища			
	Гамборга – В5 модифіковане за вмістом регуляторів росту	Чу – N6 модифіковане за вмістом регуляторів росту	МС	МС модифіковане
	Інші органічні домішки, г/л			
Мезоінозит	–	0,08	0,1	0,1
Мезоінозитол	0,1	–	–	–
Сахароза	30,0	30,0	30,0	40,0
Мальтоза	–	9,0	–	–
Агар	–	–	8,0	8,0
Гельрīt	3,0	3,0	–	–

першої вмістом вітамінів та регуляторів росту: тіамін (0,1–0,5 мг/л), піридоксин (0,1–0,5 мг/л), ніотинова кислота – (0,5 мг/л), аскорбінова кислота (1,0 мг/л), глютамінова амінокислота (250–300 мг/л), 6-БАП (1,0–3,0 мг/л), НОК (0,3–1,0 мг/л), сахароза (40 г/л) і витримували до появи первинних корінців, бруньок та пагонів. Після того, як пагони досягли заввишки 2–3 см, їх відокремлювали від калусної маси і пересаджували на третю серію середовищ для розмноження або депонування (модифіковане агаризоване середовище МС, що містило 1/2 дози макроелементів та мікроелементи у повній дозі, до складу якого додатково вводили: тіамін (10,0 мг/л), піридоксин, ніотинову кислоту, аскорбінову кислоту (по 1,0 мг/л), глютамінову амінокислоту (250–300 мг/л), 6-БАП (0,3–0,5 мг/л), НОК (0,3–1,0 мг/л) та ГК (0,2 мг/л).

У досліджах підраховували кількість отриманих калусів у відсотках від насіння, що

проросло, визначали частоту регенерації (%), підраховували кількість мікророслин (шт.), отриманих через 4 тижні культивування калусу на регенераційному середовищі.

Результати досліджень

Внаслідок оптимізації та добору складу живильного середовища МС були розроблені прописи живильних середовищ, для індукції калусогенезу (перша серія) з насіння міскантусу з низькою схожістю та життєздатністю, морфогенезу калусів (друга серія) та розмноження (третья серія) мікроклонів міскантусу в умовах *in vitro*. В таблицях 1 і 2 наведено склад цих середовищ порівняно з іншими відомими живильними середовищами.

Результати досліджень свідчать, що найкращі результати з проліферації калусів були отримані під час застосування модифікованого агаризованого середовища МС з додаванням вітамінів (тіаміну, піридоксину,

Таблиця 2

Склад морфогенних живильних середовищ (друга серія) та середовищ для розмноження мікроклонів міскантусу в умовах *in vitro* (третья серія)

Компоненти середовища	Морфогенні середовища		Середовище для розмноження мікроклонів
	МС модифіковане (еталон)	МС модифіковане	
Макроелементи МС	повна доза	1/2 дози	1/2 дози
Мікроелементи МС	повна доза	повна доза	повна доза
	Вітаміни, мг/л		
Тіамін	0,1	10,0	10,0
Піридоксин	0,5	1,0	1,0
Ніотинова кислота	0,5	1,0	1,0
Аскорбінова кислота	–	1,0	1,0
	Амінокислоти, мг/л		
Гліцин	2,0	2,0	2,0
Глутамінова кислота	–	250,0	250,0
	Регулятори росту, мг/л		
6-БАП	5,0	2,0	0,5
НОК	0,24	0,3	0,5
або 2,4-Д	1,0	–	–
ГК	–	–	0,2
	Інші органічні домішки, г/л		
Мезоінозит	0,1	0,1	0,1
Сахароза	20,0	40,0	40,0
Агар	8,0	8,0	8,0
Гельрīt	3,0	–	–

нікотинової та аскорбінової кислот), амінокислот (глютамінової, аспарагінової, тірозину, аргініну, гідроксипроліну) та регуляторів росту (6-БАП, 2,4-Д, АБК) у кількостях, що наведені в таблиці 1, під час використання більшої кількості сахарози (40 г/л), порівняно з еталонними середовищами (30 г/л), без мальтози та гелериту.

Згідно зі спостереженнями, проліферація калусів відбувалася через 13–15 діб після введення насіння міскантусів у культуру *in vitro* (рис. 1).

Отримані калуси (щільні та середньої щільності) мали неоднорідне забарвлення –

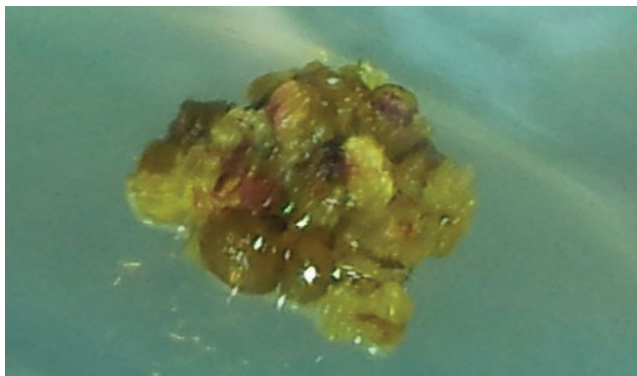


Рис. 1. Калусна тканина міскантусу

від жовто-зеленого до зеленого з антоціановими вкрапленнями. Через 60 діб отримані калуси були пересаджені на нове морфогенне живильне середовище (табл. 2), яке відрізнялося від попереднього більшою кількістю вітаміну В1 (тіаміну) – 10 мг/л замість 1 мг/л, відсутністю 2,4-Д та АБК, застосуванням 6-БАП у більшій кількості (2,0 мг/л) та НОК – 0,3 мг/л.

Внаслідок модифікації живильного середовища вихід калусів становив 100% кількості висадженого насіння *in vitro*.

За спостереженнями, морфогенез калусної тканини починався з ризогенезу – утворення первинних корінців (рис. 2), а через 5–7 діб на поверхні морфогенного калусу утворювалися первинні бруньки та листки (рис. 3) і формувалися первинні мікроклони (рис. 4).

Новоутворені мікроклони міскантусу розміром 0,5–0,7 см пересаджували на середовища для розмноження мікророслин в умовах *in vitro* (третьої серії) з меншою кількістю 6-БАП (0,5 мг/л) та додаванням ГК (0,2–1,0 мг/л), де згодом сформувались повноцінні рослини (рис. 5).

Підрахунки свідчать, що, завдяки стимуляції калусогенезу у насіння з низькою схожістю й життєздатністю та морфогенезу калусів, найвищий коефіцієнт розмноження (60–70 з

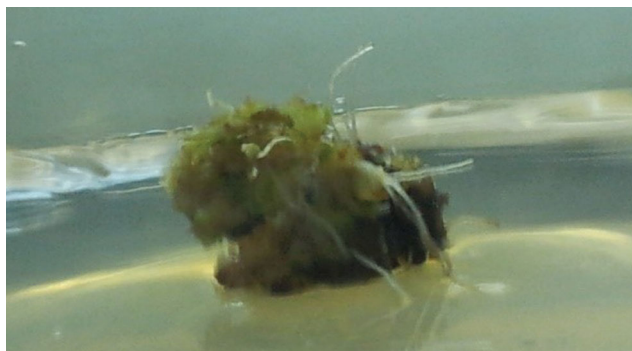


Рис. 2. Морфогенез калусу – утворення первинних корінців



Рис. 3. Калусна тканина. Ріст і розвиток первинних листків



Рис. 4. Мікророслини міскантусу *in vitro*



Рис. 5. Рослини міскантусу, сформовані внаслідок морфогенезу калусів

Вплив складу живильного середовища на калусогенез, частоту регенерації та кількість отриманих мікророслин міскантусу китайського та цукроквіткового

Вид	Склад живильних середовищ для отримання калусів та регенерації рослин	Кількість отриманих калусів у % від насіння, що проросло	Частота регенерації, %	Кількість мікророслин, отриманих через 4 тижні культивування калусу на регенераційному середовищі, шт.
<i>M. sinensis</i>	Чу (Гамборга) модифіковане – еталон	13,3±0,1–31,2±0,2	20±0,3	1,3–3,1
<i>M. sinensis</i>	МС модифіковане	100,0	50,0±0,7	30–35
<i>M. sacchariflorus</i>	МС модифіковане	100,0	100,0	60–70

однієї насінини) був отриманий для міскантусу цукроквіткового, тоді як для міскантусу китайського цей показник був трохи нижчим – 30–35 внаслідок нижчого показника регенерації (50%). На середовищах еталону, де кількість отриманих калусів у відсотках від насіння, що проросло, становила 13,3–31,2%, а показник регенерації – 20%, коефіцієнт розмноження становив 1,3–3,1 (табл. 3).

Таким чином, завдяки модифікації середовищ для ініціації калусогенезу та морфогенезу калусів коефіцієнт розмноження рослин міскантусу цукроквіткового можна підвищити в середньому в 40 разів, міскантусу китайського – в 20 разів.

Рослини міскантусу китайського та цукроквіткового були висаджені в умови відкритого ґрунту без попереднього вирощування в теплиці (рис. 6).

Для поступової адаптації рослин до умов *in vivo* були створені тепличні умови (використовували частини пластмасових пляшок, які щодня знімали з рослин), що дало можливість рослинам повністю адаптуватися до умов довкілля (рис. 7).

Висновки

Внаслідок модифікації середовища Мурасіге–Скуга за вмістом макроелементів, вітамінів, амінокислот та регуляторів росту розроблено склад живильного середовища для індукції калусогенезу з насіння міскантусу з низькою схожістю та життєздатністю проростків. Найкращі результати були отримані у разі використання середовища з 1/2 дози макроелементів, до якого введено амінокислоти: глютамінова (300 мг/л), аспарагінова (50 мг/л), тірозин (5 мг/л), аргінін (3 мг/л), гідроксипролін (2 мг/л) та регулятори росту: 6-БАП (0,6 мг/л), 2,4-Д (2,5 мг/л) та АБК (0,3 мг/л).

Розроблено склад морфогенного живильного середовища для регенерації мікророслин з калусу – модифіковано агаризоване середовище Мурасіге–Скуга за вмістом макроелементів (1/2 дози) та вітамінів (за Уайтом): тіамін



Рис. 6. Адаптація рослин міскантусу до умов *in vivo*



Рис. 7. Рослина *M. sacchariflorus* в умовах *in vivo*

(10,0 мг/л), піридоксин (1,0 мг/л), нікотинова кислота (1,0 мг/л), аскорбінова кислота (1,0 мг/л), з додаванням глютамінової амінокислоти (250,0 мг/л), 6-БАП (2,0 мг/л), НОК (0,3 мг/л), на якому отримано стовідсоткову регенерацію міскантусу цукроквіткового і п'ятдесятивідсоткову – міскантусу китайського.

Розроблено склад живильного середовища для розмноження мікроклонів міскантусу в умовах *in vitro*, яке відрізнялося від попереднього за вмістом регуляторів росту: 6-БАП (0,5 мг/л) та ГК (0,5–1,0 мг/л).

Завдяки модифікації середовищ для ініціації калусогенезу та непрямого морфогенезу коефіцієнт розмноження підвищено: міскантусу цукроквіткового більше ніж у 40 разів, міскантусу китайського – в 20 разів.

Використана література

- Griffiths M. Index of Garden Plant / M. Griffiths. – Portland, OR : Timber Press, 1994. – P. 867–874.
- Lewandowski I. Potential of *Miscanthus* genotypes in Europe: overwintering and yields / I. Lewandowski, J. C. Clifton-Brown, M. Deuter // *Alternative crops for sustainable agriculture : Proc. of Workshop/T. Mela, J. Christiansen, M. Kontturi [et al.] (eds). (BioCity, Turku, Finland, 13–15 June 1999).* – Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities, 1999. – P. 46–52.
- Systematics of *Miscanthus* / T. R. Hodkinson, S. A. Renvoize, M. W. Chase // *Aspects Appl Biol.* – 1997. – Vol. 49. – P. 189–197.
- Cytogenetic analysis of *Miscanthus* × *giganteus* and its parent forms / A. Chramiec-Głabik, A. Grabowska-Joachimiak, E. Sliwiska [et al.] // *Caryologia.* – 2012. – Vol. 3. – P. 234–242. doi: 10.1080/00087114.2012.740192
- Сиваш О. Акумуляція сонячної енергії: фотосинтез чи штучні системи / О. О. Сиваш // *Біотехнологія.* – 2012. – № 6. – С. 27–38.
- Quantifying and mapping the human appropriation of net primary production in Earth's terrestrial ecosystems / H. Haberl, K. Erb, F. Krausmann [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – No. 104. – P. 12942–12947. doi: 10.1073/pnas.0704243104.
- Discovery of natural *Miscanthus* (Poaceae) triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan / A. Nishiwaki, A. Mizuguti, S. Kawabata [et al.] // *Am. J. Bot.* – 2011. – Vol. 98, No. 1. – P. 154–159. doi: 10.3732/ajb.1000258
- Sterility of *Miscanthus* × *giganteus* results from hybrid incompatibility / A. Słomka, E. Kuta, A. Płazek [et al.] // *Acta Biol Cracov Ser Bot.* – 2012. – Vol. 54, Iss. 1. – P. 113–120. doi: 10.2478/v10182-012-0011-1
- Deuter M. Genetic resources of *Miscanthus* and their use in breeding / M. Deuter, J. Abraham // *Biomass for energy and industry : proceedings of the 10th European conference and technology exhibition (8–11 June 1998, Wurzburg, Germany).* – Wurzburg, 1998. – P. 775–777.
- Beale C. V. Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates? / C. V. Beale, S. P. Long // *Plant Cell Environ.* – 1995. – Vol. 18, Iss. 6. – P. 641–650. doi: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00565.x
- Gawel N. J. Propagation of *Miscanthus sinensis* through tissue culture / N. J. Gawel, C. D. Robaker, W. L. Corley // *Hortscience.* – 1987. – Vol. 22. – P. 1137.
- Holme I. B. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus* × *ogiformis* Honda 'Giganteus' / I. B. Holme, K. K. Petersen // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 1996. – Vol. 45, Iss. 1. – P. 43–52. doi: 10.1007/BF00043427.
- Miscanthus*: European experience with a novel energy crop / I. Lewandowski, J. C. Clifton-Brown, J. M. O. Scurlock, W. Huisman // *Biomass Bioenerg.* – 2000. – Vol. 19, Iss. 4. – P. 209–227. doi: 10.1016/S0961-9534(00)00032-5.
- Petersen K. K. Callus induction and plant regeneration in *Miscanthus* × *ogiformis* Honda 'Giganteus' as influenced by benzyladenine / K. K. Petersen // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 1997. – Vol. 49, Iss. 2. – P. 137–140. doi: 10.1023/A:1005808329685
- Płazek A. Improvement of medium for *Miscanthus giganteus* callus induction and plant regeneration / A. Płazek, F. Dubert // *Acta Biol Cracov Ser Bot.* – 2010. – Vol. 52, Iss. 1. – P. 105–110. doi: 10.2478/v10182-010-0013-9
- Establishment of a Regeneration System by Callus Induction from Explants of *Miscanthus sinensis* / E. S. Seong, J. H. Yoo,

- H. Y. Kil [et al.] // *J Korean Soc Appl Biol Chem.* – 2010. – Vol. 53, Iss. 6. – P. 661–667. doi: 10.3839/jksabc.2010.101
- Plant cell and tissue culture: a laboratory manual / J. Reinert, M. M. Yeoman. – Berlin : Springer-Verlag, 1982. – 83 p.
- Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 152 с.
- Калинин Ф. Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнir, В. В. Сарнацкая – К. : Наук. думка, 1992. – 232 с.
- Кушнir Г. П. Микрклональное размножения растений / Г. П. Кушнir, В. В. Сарнацкая. – К. : Наук. думка, 2005. – 271 с.

References

- Griffiths, M. (1994). *Index of Garden Plant*. Portland, OR: Timber Press.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., & Deuter, M. (1999). Potential of *Miscanthus* genotypes in Europe: over-wintering and yields. In T. Mela, J. Christiansen, M. Kontturi, K. Pakkala, A. Partala, M. Sahrmaa, ... K. Pithan (Eds.), *Alternative crops for sustainable agriculture: Proc. of Workshop* (pp. 46–52). June 13–15, 1999, BioCity, Turku, Finland.
- Hodkinson, T. R., Renvoize, S. A., & Chase, M. W. (1997). Systematics in *Miscanthus*. *Aspects Appl Biol.*, 49, 189–198.
- Chramiec-Głabik, A., Grabowska-Joachimiak, A. A., Sliwiska, E., Legutko, J., & Kula, A. (2012). Cytogenetic analysis of *Miscanthus* × *giganteus* and its parent forms. *Caryologia*, 3, 234–242. doi: 10.1080/00087114.2012.740192
- Syvash, O. O (2012). Accumulation of solar energy: photosynthesis or artificial systems. *Biotechnologia* [Biotechnology], 6, 27–38. [in Ukrainian].
- Haberl, H., Erb, K., Krausmann, F., Gaube, V., Bondeau, A., Plutzer, C., ... Fischer-Kowalski, M. (2007). Quantifying and mapping the human appropriation of net primary production in Earth's terrestrial ecosystems. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 104, 12942–12947. doi: 10.1073/pnas.0704243104.
- Nishiwaki, A., Mizuguti, A., Kawabata, S., Toma, Y., Ishigaki, G., Miyashita, T., ... Stewart, J. R. (2011). Discovery of natural *Miscanthus* (Poaceae) triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan. *Am. J. Bot.*, 98(1), 154–159. doi: 10.3732/ajb.1000258
- Słomka, A., Kuta, E., Płazek, A., Dubert, F., Zur, I., Dubas, E., ... Żurek, G. (2012). Sterility of *Miscanthus* × *giganteus* results from hybrid incompatibility. *Acta Biol Cracov Ser Bot.*, 54(1), 113–120. doi: 10.2478/v10182-012-0011-1
- Deuter, M., & Abraham, J. (1998) Genetic resources of *Miscanthus* and their use in breeding. *Biomass for energy and industry: Proc. of the 10th European conference and technology exhibition* (pp. 775–777). June 8–11, 1998, Wurzburg, Germany.
- Beale, C. V., & Long, S. P. (1995). Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates? *Plant Cell Environ.*, 18(6), 641–650. doi: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00565.x
- Gawel, N. J., Robaker, C. D., & Corley, W. L. (1987). Propagation of *Miscanthus sinensis* through tissue culture. *Hortscience*, 22, 1137.
- Holme, I. B., & Petersen, K. K. (1996). Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus* × *ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 45(1), 43–52. doi: 10.1007/BF00043427
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., Scurlock, G. M., & Huisman, W. (2000). *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass Bioenerg.*, 19(4), 209–227. doi: 10.1016/S0961-9534(00)00032-5
- Petersen, K. K. (1997). Callus induction and plant regeneration in *Miscanthus* × *ogiformis* Honda 'Giganteus' as influenced by benzyladenine. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 49(2), 137–140. doi: 10.1023/A:1005808329685

15. Ptažek, A., & Dubert, F. (2010). Improvement of medium for *Miscanthus* × *giganteus* callus induction and plant regeneration. *Acta Biol Cracov Ser Bot*, 52(1), 105–110. doi: 10.2478/v10182-010-0013-9
16. Seong, E. S., Yoo, J. H., Kil, H. Y., Lee, J. G., & Yu, C. Y. (2010). Establishment of a Regeneration System by Callus Induction from Explants of *Miscanthus sinensis*. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 53(6), 661–667. doi: 10.3839/jksabc.2010.101
17. Reinert, J., & Yeoman, M. M. (1982). *Plant cell and tissue culture: a laboratory manual*. Berlin: Springer-Verlag.
18. Butenko, R. G. (1999). *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologiya na ikh osnove* [Biology of higher plant cells in vitro and biotechnology based on them]. Moscow: FBK-PRESS. [in Russian]
19. Kalinin, F. L., Kushnir, G. P., & Sarnatskaya, V. V. (1992). *Tekhnologiya mikroklonal'nogo rozmnozheniya rasteniy* [Microclonal plant propagation technology]. Kiev: Naukova dumka. [in Russian]
20. Kushnir, H. P., & Sarnatska, V. V. (2005). *Mikroklonalne rozmnozheniya roslyn* [Microclonal plant propagation]. Kyiv: Naukova dumka. [in Ukrainian]

УДК 631.681.16

Гонтаренко С. Н., Лашук С. А.* Получение растений *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack и *Miscanthus sinensis* Andersson в культуре *in vitro* путем непрямого морфогенеза // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. – 2017. – Т. 13, № 1. – С. 12–19. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.1.2017.97219>

Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины, ул. Клиничная, 25, г. Киев, 03141, Украина,

*e-mail: masjnka@inbox.ru

Цель. Получить растения *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack и *Miscanthus sinensis* Andersson в культуре *in vitro* путем непрямого морфогенеза. **Методы.** Биотехнологические, математико-статистические. **Результаты.** Разработан состав питательной среды для индукции калусогенеза из семян мискантуса с низкой всхожестью и жизнеспособностью – модифицирована среда Мурасиге-Скуга (МС) по содержанию макроэлементов (1/2 дозы), в которую введены аминокислоты (глутаминовая – 300 мг/л, аспарагиновая – 50 мг/л, тирозин – 5 мг/л, аргинин – 3 мг/л, гидроксипролин – 2 мг/л) и регуляторы роста (6-БАП – 0,6 мг/л, 2,4-Д – 2,5 мг/л и АБК – 0,3 мг/л). Разработан состав питательной среды для регенерации микрорастений из калуса – модифицирована агаризованная среда МС по содержанию макроэлементов (1/2 дозы) с добавлением витаминов: тиамин (10,0 мг/л), пиридоксин (1,0 мг/л), никоти-

новой кислоты (1,0 мг/л) (по Уайту), аскорбиновой кислоты (1,0 мг/л), глутаминовой аминокислоты (250 мг/л), 6-БАП (2,0 мг/л), НОК (0,3 мг/л), на которой получена стопроцентная регенерация микрорастений *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack и пятидесятипроцентная – *M. sinensis* Andersson. Благодаря модификации сред для инициации калусогенеза и морфогенеза калусов коэффициент размножения *M. sinensis* повышен в среднем в 20 раз, *M. sacchariflorus* – в 35–40 раз. **Выводы.** Получены растения *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack и *M. sinensis* Andersson в культуре *in vitro* путем инициации калусогенеза и регенерации микрорастений из семян с низкой всхожестью и жизнеспособностью на питательных средах определенного состава.

Ключевые слова: мискантус, каллус, биотехнологические методы, семена, питательная среда.

UDC 631.681.16

Gontarenko, S. M., & Lashuk, S. O.* (2017). Obtaining plant *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack and *Miscanthus sinensis* Andersson *in vitro* culture by indirect morphogenesis. *Plant Varieties Studying and Protection*, 13(1), 12–19. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.1.2017.97219>

*Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet of NAAS, 25 Klinichna Str., Kyiv, 03141, Ukraine, *e-mail: masjnka@inbox.ru*

Purpose. To obtain *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack and *Miscanthus sinensis* Andersson *in vitro* culture by indirect morphogenesis. **Methods.** Biotechnological procedures, mathematical and statistical analyses. **Results.** Composition of nutrient medium was developed intended for induction of callusogenesis from *Miscanthus* seeds with a poor germination and viability of seedlings – Murashige and Skoog (MS) medium was modified for the amount of macroelements (half-dose) that was supplemented with amino acids (300 mg/l of glutamic acid, 50 mg/l of aspartic acid, 5 mg/l of tyrosine, 3 mg/l of arginine, 2 mg/l of hydroxyproline) and plant growth regulators [2,5 mg/l of 2.4D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), 0,6 mg/l of BAP (6-Benzyl-aminopurine) and 0,3 mg/l of ABA (Abscisic acid)]. Composition of nutrient medium was developed for regeneration of microplants from callus – agar MS medium was modified for the amount of macroelements (half-dose) supplement-

ed with vitamins: 10 mg/l of thiamin, 1,0 mg/l of pyridoxine, 1,0 mg/l of nicotinic acid (by White), 1,0 mg/l of ascorbic acid, 250 mg/l of glutamic acid, 2,0 mg/l of BAP, 0,3 mg/l of NAA (Naphthaleneacetic acid). On this medium, 100% regeneration of *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack and 50% regeneration of *M. sinensis* Andersson was obtained. Due to media modification aimed at initiating callusogenesis and microplants regeneration, reproduction factor of *M. sinensis* was increased 20 times at the average, *M. sacchariflorus* – 35–40 times. **Conclusions.** Plants of *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack and *M. sinensis* Andersson were obtained *in vitro* culture by initiation of callusogenes and microplants regeneration from the *Miscanthus* seeds with poor germination and viability on nutrient media of certain composition.

Keywords: *Miscanthus*, callus, biotechnological methods, seed, nutrient medium.

Надійшла 15.12.2016

Погоджено до друку 14.03.2017