

УДК 504:620.9

ОСОБЛИВОСТІ ТЕХНОЛОГІЇ КУЛЬТИВУВАННЯ МІСКАНТУСУ В УМОВАХ *IN VITRO*

Р.І. ПРИШЛЯК*

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Розглянуто деякі біологічні особливості рослин роду *Miscanthus* та умови їх вирощування в культурі *in vitro*. Доведено, що культивування міскантусу в умовах *in vitro* є ефективним та доцільним для біоенергетики. Підбрано основні параметри для оптимізації умов стерилізації експлантів та культивування рослин міскантусу.*

Ключові слова: міскантус, біоінженерія, культивування, стерилізація.

Вступ. Енергетичні культури – це рослини, які спеціально вирощуються для використання безпосередньо як паливо або для виробництва біопалива [1]. Джерелом енергетичної сировини можуть бути як побічні продукти рослинного походження (солома, соняшникове лушпиння, стебла кукурудзи тощо), так і спеціальнопризначені для цього рослини – міскантус, світчграс (лозоподібне просо), верба, тополя [2–5]. Рід *Miscanthus* включає 17–20, за іншими джерелами понад 40 морфологічних видів [6,7] та відноситься до родини злакових (*Poaceae*), порядку злакоkwіткових (*Poales*), царства зелених рослин (*Plantae*), домену *Eukaryota*. Систематика роду нестала, постійно переглядається.

В останні роки велике значення має використання біотехнологічних методів в розмноженні високопродуктивних селекційних матеріалів, а також для отримання нових вихідних форм рослин. Метод клонального мікророзмно-

*Науковий керівник – к.б.н. Петюх Г.П.

ження дозволяє отримати оздоровлений матеріал для комерційного використання, дає змогу розмножувати селекційні зразки упродовж року на невеликій лабораторній площі та підвищити коефіцієнт розмноження.

Мета роботи – оптимізувати технологію культивування міскантусу в умовах *in vitro*.

Особливості *in vitro* технології культивування рослин

Процес клонального мікророзмноження можна розділити на чотири етапи: 1 – вибір рослини-донора (донор – рослина, частина якого вводиться в культуру), ізолювання стерильних експлантів (експлант – пагін, брунька, корінь чи кореневище або будь-який фрагмент рослинного організму, ізолюваний та/або відокремлений від материнського організму і перенесений в штучні асептичні умови чи поживне середовище для росту і підтримки життєдіяльності) і отримання добре зростаючої асептичної культури; 2 – власне мікророзмноження, коли досягається отримання максимальної кількості рослин (пагонів); 3 – укорінення розмножених рослин (пагонів) з наступною адаптацією їх до ґрунтових умов, а при необхідності депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (2–10 °С); 4 – вирощування рослин в умовах теплиці та підготовка їх до реалізації або висадки в поле. В більшості випадків, для клонального мікророзмноження використовують середовище Мурасіге-Скуга, котре містить оптимальний склад мінеральних та органічних компонентів [8]. Склад поживного середовища представлений в табл. 1.

Таблиця 1

Склад поживного середовища Мурасіге-Скуга

Компонент	Наважка, г	Температура зберігання, °С	Кількість маточного розчину для приготування 1л середовища, мл
1	2	3	4
Макроелементи, грамів на 1 літр маточного розчину			
KNO ₃	38	4	50
NH ₄ NO ₃	33		
KH ₂ PO ₄	3,4		

Продовження табл. 1

1	2	3	4
MgSO ₄ ·7H ₂ O або	7,4	4	5
MgSO ₄ безводний	3,6		
CaCl ₂ ·2H ₂ O або	13,8		
CaCl ₂ безводний	8,8		
Fe- хелат , міліграмів на 100 мілілітрів маточного розчину			
Fe ₂ SO ₄ · 7H ₂ O	557	4	5
Na ₂ ЕДТА · 2H ₂ O	745		
Мікроелементи , міліграмів на 100 мл маточного розчину			
H ₃ BO ₃	620	4	1
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2230		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860		
KI	83		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5		
Органічні компоненти , міліграмів на 10 мілілітрів маточного розчину			
Мезоінозит	1000	4	1
Нікотинова к-та	5		
Піридоксин HCl	5		
Тіамін HCl	5		
Гліцин	20		
Сахароза	-		
Агар	-	кімнатна	7г/л

Особливості стерилізації експлантів міскантусу

Оскільки *Miscanthus x giganteus* розмножується тільки вегетативно, потрібно визначити оптимальні умови стерилізації, котрі забезпечують хорошу стерилізацію і котрі чинять мінімальний вплив на чутливі ризоми міскантусу. Деякі автори [9] пропонують різноманітні способи стерилізації, що поєднують комплексний підхід для знищення бактеріальних і грибкових форм мікроорганізмів. Проте, для проведення досліджень з новими формами рослин міскантусу необхідно оптимізувати способи стерилізації для кожного

конкретного типу експлантів. Серед рекомендованих способів стерилізації ми використовували наступні варіанти.

№1 – обробка рослинних експлантів 4 %-м розчином Tween 20 упродовж 10 хв, ополіскування водою, подальша обробка в 70 % етанолі упродовж 3 хв. Промивка водою, додавання цефотаксиму (250 мг/л) і превікуру (0,15 %). Експозиція 20 хв. Тричі промивають водою і обробляють 4 розчином пероксиду водню та Tween 20 (2 %) з експозицією 20 хв. Промивка водою.

№2 – ідентичний до попереднього. Відмінністю є концентрація пероксиду водню (8 %).

№3 – обробка рослинних експлантів 4 %-м розчином Tween 20 упродовж 10 хв, ополіскування водою, подальша обробка в 70 % етанолі упродовж 3 хв. Промивка водою, додавання цефотаксиму (250 мг/л) і превікуру (0,15 %). Експозиція 20 хв. Тричі промивають водою після чого переносять в 6 %-й розчин гіпохлориту натрію (NaOCl) і Tween 20 (2 %). Тричі промивають водою упродовж 10 хв.

№4 – ідентичний до попереднього. Відмінністю є концентрація NaOCl – 12 % розчин.

№5 – обробка рослинних експлантів 4 %-м розчином Tween 20 упродовж 10 хв, ополіскування водою, подальша обробка в 70 % етанолі упродовж 3 хв. Промивка водою, додавання цефотаксиму (250 мг/л) і превікуру (0,15 %). Експозиція 20 хв. Тричі промивають водою після чого переносять в 0.02 %-й розчин AgNO_3 із додаванням Tween 20 (2 %). Тричі промивають водою упродовж 10 хв.

№6 – аналогічно до №5, окрім концентрації AgNO_3 . В цьому випадку, концентрація становить 0.04 %.

№7 – двохетапна стерилізація 50 %-м розчином засобу «Білизна» упродовж 20 хв, після котрих відбувалась промивка водою упродовж 10 хв.

№8 – аналогічно до №7, але під час другого етапу використовували 0.08 %-й розчин AgNO_3 .

Для кожного варіанту дослідження використовували по 30 експлантів. Отримані дані представлені на рис. 1.

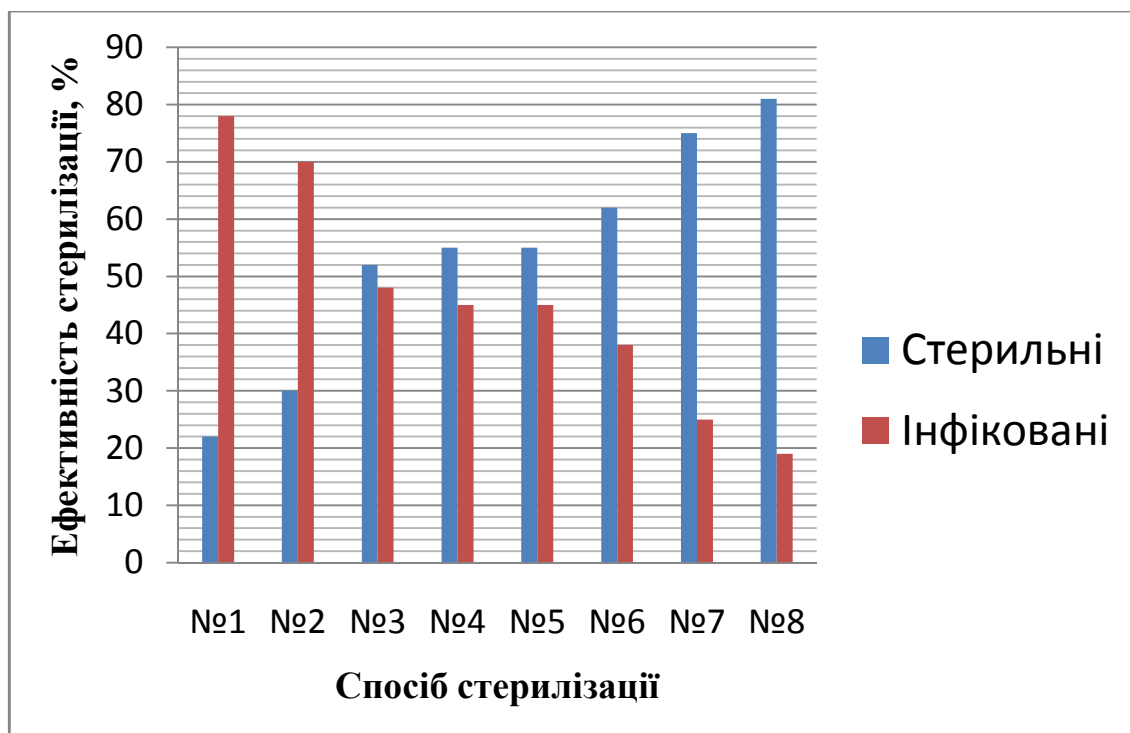


Рис. 1. Ефективність стерилізації рослинних експлантів міскантусу

Отримані результати дозволяють нам зробити висновок, що стерилізація за допомогою засобу «Білізна» та нітрату срібла (варіанти 7 і 8) є більш ефективною, у порівнянні з іншими способами стерилізації.

Модифікація поживного середовища для культивування та укорінення рослинних експлантів

Для проведення розмноження рослин міскантусу рекомендують використовувати різні поживні середовища. Для культивування та укорінення експлантів міскантусу ми використовували поживні середовища за прописом Мурасіге-Скуга [10].

Культивування експлантів проводили на модифікованому нами середовищі Мурасіге і Скуга з додаванням 6-бензиламінопурину (БАП) – 0,5 мг/л, кінетину – 1 мг/л при рН робочого розчину 5,6–5,7.

Укорінення пагонів проводили на модифікованому середовищі Мурасіге і Скуга з додаванням α -нафтилоцтової кислоти (НОК) – 0,8 мг/л, кінетину – 1 мг/л при рН живильного середовища 5,6–5,7.

Кількісні показники культивування міскантусу в умовах *in vitro* представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Кількісні показники культивування міскантусу в умовах *in vitro*

Селекційний номер	Кількість утворених пагонів	Висота пагонів, см	Укорінення пагонів, %	Кількість коренів, шт.
<i>M. x giganteus</i>	8.0	9.5	71.6	4.9
<i>M. sinensis</i>	9.8	10.5	82.6	6.2
<i>M. sacchariflorus</i>	9.9	7.5	98.2	12.5

Вищевказані дані є демонстрацією ефективності використання модифікованих середовищ Мурасіге-Скуга для культивування різних видів міскантусу. Усі види міскантусу демонструють хороший ріст та укорінення пагонів.

ВИСНОВКИ

1. Визначено, що модифіковане середовище Мурасіге-Скуга є оптимальним для культивування рослин міскантусу. Кількість новоутворених пагонів становить 8.0 для *Miscanthus x giganteus*, 9.8 – *M. sinensis* і 9.9 – *M. sacchariflorus*.

2. Порівнявши наведені способи стерилізації, можна зробити висновок, що пероксид водню не забезпечує достатню стерилізацію рослинних експлантів.

3. Найкращі умови стерилізації спостерігаються при комплексній стерилізації з використанням засобу “Білизна” та нітрату срібла.

4. Рекомендовано використовувати для культивування експлантів 6-бензиламінопурин (БАП), який дозволяє отримати достатню кількість додаткових пагонів.

5. Для укорінення пагонів слід використовувати середовище Мурасіге-Скуга з додаванням α -нафтилоцтової кислоти (НОК) у концентрації 0,8 мг/л.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сучасний стан та перспективи розвитку біоенергетики в Україні / [Гелетуха Г.Г., Желєзна Т.А., Кучерук П.П., Олійник Є.М.] // Аналітична записка БАУ. – 2014. – №9. – 32 с.
2. Енергетичні рослини як альтернатива традиційним видам палива / [Хіврич О.Б., Квак В.М., Каськів В.В. та ін.] // Агробіологія. – 2011. – Вип. 6. – С. 153–157.
3. Роїк М.В. Перспективи вирощування енергетичної верби для виробництва твердого біопалива / [Роїк М.В., Гументик М.Я., Мамайсур В.В.] // Біоенергетика. – 2013. – № 2. – С. 18–19.
4. Івахів В. Енергетична верба як рішення для малих міст України [Електронний ресурс] / В. Івахів / – Режим доступу: <http://ua-energy.org/post/27476>.
5. Досвід та перспективи вирощування тополі (*Populus sp.l.*) в південному степу України / [Фучило Я.Д., Сбитна М.В., Фучило О.Я., Літвін В.М.] // Наукові праці Лісової академії наук України: збірник наукових праць. – 2009. – Вип. 7. – С. 66–69.
6. Новая форма мискантуса китайского (Веерника китайского *Miscanthus sinensis* Anders.) как перспективный источник целлюлозо содержащего сырья / [Шумный В.К., Вепрев С.Г., Нечипоренко Н.Н. и др.] // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14, № 1. – С. 122–126.
7. Miscanthus: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production / [Brosse N., Dufour A., Meng X. et al.] // Biofuels, Bioprod. Bioref. – 2012. – Vol. 6, Is. 5. – P. 580–598. – DOI: 10.1002/bbb.1353
8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / Murashige T., Skoog F. // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15, Is. 3. – P. 473–497.
9. Введення в культуру *in vitro* та поліплоїдизація *Miscanthus giganteus* / [Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Рахметов Д.Б. та ін.] // Наукові доповіді НУБіП України. – 2015. – №8. – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/8.pdf

10. Бех Н.С. Клональне розмноження міскантусу, як спосіб отримання посадкового матеріалу / [Бех Н.С., Коцар М.О.] // Біоенергетика. – 2016. – №1 (7). – С. 26–28.

FEATURES OF MISCANTHUS CULTIVATION TECHNOLOGY DUE TO IN VITRO CONDITIONS

R.I. PRYSHLIAK

National Aviation University, Kyiv

Some biological peculiarities of plants of the genus Miscanthus and conditions of their cultivation are considered. It has been proved that the in vitro cultivation of the miscanthus is ineffective and expedient for bioenergetics. Basic parameters for optimization of conditions for sterilization of explants and cultivation of the miscanthus plants were selected.

Keywords: *miscanthus, bioengineering, cultivation, sterilization.*

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИСКАНТУСА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Р.И. ПРИШЛЯК

Национальный авиационный университет, г. Киев

Рассмотрены некоторые биологические особенности растений рода Miscanthus и условия их выращивания в культуре in vitro. Доказано, что культивирование мискантуса в условиях in vitro является эффективным и целесообразным для биоэнергетики. Подобраны основные параметры для оптимизации условий стерилизации эксплантов и культивирования растений мискантуса.

Ключевые слова: *мискантус, биоинженерия, культивирование, стерилизация.*