

УДК 633.282:575.22:575.8

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ В РОЗМНОЖЕННІ ТА ОЦІНЦІ *MISCANTHUS GIGANTEUS*

Г.П. ПЕТЮХ, Р.І. ПРИШЛЯК

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Дана стаття присвячена короткому огляду способів відтворення рослин біоенергетичної культури міскантусу, у тому числі, за використання біотехнологічних методів, а також основним напрямкам досліджень при проведенні порівняльної оцінки різних рослинних матеріалів *Miscanthus x giganteus* молекулярно-генетичними методами.*

Ключові слова: *біоенергетичні культури, *Miscanthus x giganteus*, способи розмноження, біотехнологічні та молекулярно-біологічні методи, молекулярно-генетичний поліморфізм.*

Протягом останніх років у світі для вирішення проблем в області забезпечення потреб людства у відновлювальних джерелах енергії набув широкого поширення новий напрям енергетики – біоенергетика, активний розвиток якого дозволить Україні значно зменшити залежність нашої держави від природних джерел енергії (вугілля, нафти і газу), які імпортуються з інших країн і, в першу чергу, з Росії. Надзвичайно бурхливий розвиток біоенергетики у світі і в Україні спричинив до широкого використання нових культур, що раніше не були об'єктом сільгоспвиробників, та які стали називати біоенергетичними (іноді – фітоенергетичними) культурами. До переліку таких культур відносять трав'янисті рослини міскантус, світчграс, ятрофу, а також дерев'янисті рослини, такі як вербу, тополю, павловнію. Крім згаданих нових видів рослин, для різних цілей в біоенергетиці та паливній галузі використовують існуючі сільськогосподарські культури: цукрові буряки,

кукурудзу, цукрове сорго – для виробництва біоетанолу, а також олійний ріпак та олійну сою – для виробництва біодизелю.

Найбільшого поширення серед переліку нових культур для потреб біоенергетики набув міскантус, який за таксономічною класифікацією відносять до роду *Miscanthus*. Рослини міскантусу – це висока багаторічна трава, яка протягом останніх 10–15 років була оцінена в Європі як новий біоенергетичний матеріал. Міскантус іноді помилково називають «травою слонів», плутаючи зі справжньою «травою слонів» (*elephant grass*), або "Е-травою", яка має іншу ботанічну назву – *Pennisetum purpureum*. Більшість сортів міскантусу, запропонованих як комерційні культури в Європі, це стерильні гібриди *Miscanthus x giganteus*, що походять з Японії. Існує також низка декоративних різновидів міскантусу, які існують під різними загальними назвами. Рослини міскантусу характеризуються відносно високою врожайністю – у середньому від 8 до 15 т / га сухої ваги, низьким вмістом вологи (15–20 %, якщо збирати в кінці зими або навесні). При цьому, щорічні урожаї забезпечують регулярний річний дохід для виробників та забезпечують хороший баланс енергії та співвідношення показників у порівнянні з деякими іншими варіантами біомаси, а також містять низький вміст мінеральних матеріалів, що покращує якість палива [1].

Рід *Miscanthus* відноситься до триби *Andropogoneae* родини просових (*Poaceae*), порядку злакоkwіткових (*Poales*), до царства зелених рослин (*Plantae*), домену *Eukaryota*. Систематика роду нестала, постійно піддається перегляду. Рід *Miscanthus* включає за одними даними 17–20, а за іншими джерелами – понад 40 морфологічних видів [2, 3], які включають сотні генотипів у межах кожного виду, що відрізняються розмірами кущів, стебел, забарвленням суцвіть, тощо. Найбільш поширеними формами міскантусу для використання в біоенергетиці є міскантус китайський (*Miscanthus sinensis*), міскантус цукроkwітковий (*Miscanthus sacchariflorus*), міскантус гігантський (*Miscanthus x giganteus*).

Рослини міскантусу мають основне (гаплоїдне) число хромосом рівне 19. Вид *Miscanthus sacchariflorus* містить у своєму геномі 38 хромосом, тобто є диплоїдом, *Miscanthus sinensis* містить у своєму геномі 76 хромосом, тобто є тетраплоїдом. У той же час, генотип *Miscanthus x giganteus* характеризується 57 хромосомами, тобто є триплоїдом. На даний час вважають, що *Miscanthus x giganteus* є аллотриплоїдом: спонтанним природним міжвидовим гібридом між *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* [4], хоча однозначно достовірного наукового підтвердження даному факту поки що не існує та й штучно отримати подібний триплоїд поки що не вдалося. Як наслідок триплоїдної природи, *Miscanthus x giganteus* є стерильним і не може утворити функціональне насіння [5]. Саме тому однією з проблем активного впровадження рослин міскантусу у сільськогосподарське виробництво є відсутність зручного, швидкого та недорогого способу розмноження.

Поширеність міскантусу в Європі

Рослини міскантусу вперше культивували в Європі в 1930-х роках після їх інтродукції з Японії, як декоративну культуру. Багато інших декоративних різновидів міскантусу також існують під різними загальними назвами. Потенціал культури міскантусу для виробництва целюлозного волокна був досліджений наприкінці 1960-х років у Данії. Широкі польові випробування *Miscanthus x giganteus* для потреб виробництва теплової енергії розпочалися в Північній Європі з 1983 року. Спочатку такі випробування стартували у Данії у 1983 р., пізніше їх провели у Німеччині в 1987 р., а в подальшому – і в інших європейських країнах. Перевагами рослин міскантусу при вирощуванні є їх здатність до нагромадження біомаси в умовах відносно низького забезпечення поживними речовинами і водою, оскільки для них властивий C₄-тип фотосинтезу. У той же час, вони характеризуються відносною толерантністю до холодного помірною клімату. Таким чином, міскантус потенційно вважають майже ідеальною енергетичною культурою, тому що його річний цикл вирощування забезпечує щорічний регулярний приріст вегетативної маси, на

відміну від деревних культур, які можна використовувати лише кожні 2–4 роки) [6].

Потенціал прибутковості даної нової культури було визначено суттєвим, проте певні проблеми та недоліки, пов'язані з її використанням, такі як відносно високі витрати на розмноження та поки що її вузька генетична база залишаються недостатньо вирішеними. Найбільший збір біомаси у даного гібрида на кінець вегетаційного періоду становить до 20 – 30 т / га сухої ваги, проте, процес подальшого підсихання вегетативної маси протягом зими до остаточного збирання для подальшої переробки на паливні потреби, що рекомендується згідно технологічних вимог вирощування, супроводжується втратами біомаси до 30–50 % [1] (рис.1).

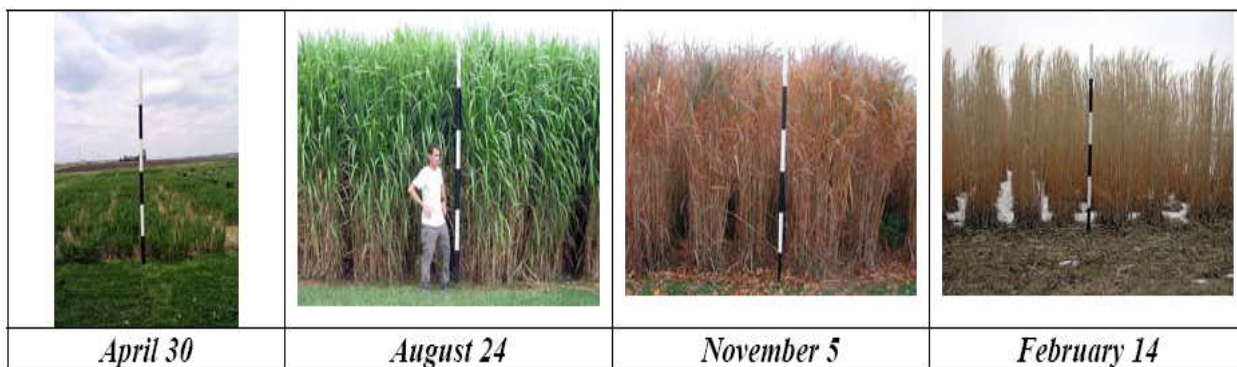


Рис. 1. Етапи формування урожаю рослин *Miscanthus x giganteus* протягом вегетаційного періоду в умовах штату Іллінойс (США). Фото використано з [7]

Незважаючи на перераховані проблеми, переважну більшість випробувань в європейських країнах проводили на клонах *M. x giganteus*, оскільки останній характеризувався найбільшим виходом біомаси у порівнянні з іншими видами міскантусу. Типовий максимально допустимий індекс площі листя для європейських випробувань (пізнього літа) становить близько 8 м² / м². Типова максимальна висота листового купола становить близько 4,0 м, хоча після перезимування і падіння листя сухі стебла навряд чи будуть більш ніж 2,5–3,0 м у висоту. Завдяки фотосинтезу, міскантус демонструє чудове поєднання високої ефективності використання світла, води та азоту. Його

фотосинтетичний механізм, як видається, краще пристосований до низьких температур, ніж для багатьох інших культур з C₄-фотосинтезом, що визначає його високу продуктивність при порівняно невисокому рівні суми позитивних температур [8].

Для подолання деяких проблем в країнах Євросоюзу був сформований Європейський проект поліпшення міскантусу (*European Miscanthus Improvement project – EMI*). Даний проект має на меті розширити генетичну базу міскантусу, максимізувати рівень продуктивності та адаптивності даної культури, а також розробити методи для досягнення таких цілей. У 1997 році розпочалися великі випробування з залученням 15 генотипів у 5 різних локальностях в Європі, від Швеції до Португалії [6].

Особливості розмноження

Оскільки, *M. x giganteus* є стерильним гібридом, він не утворює насіння і може бути лише вегетативно розмножений. Розмноження відбувається методом механічного поділу кореневищ, які у міскантусу називають ризомами, або шляхом мікророзмноження пагонів в культурі *in vitro*. Методи механічного поділу ризом, який називають методом макророзмноження, були вперше розроблені в Данії [9]. Згідно з цим методом, на ділянках розмноження регулярно (2 рази кожні 2–3 роки) механічно розділяють кореневища міскантусу на 20 шматочків по 100 г кожний. Шматочки кореневища, які являють собою групи ризом, збирають за допомогою спеціальних пристроїв. Кореневища та побрібнені шматочки не повинні висихати і, отже, зберігання має бути якомога коротшим, а ризоми необхідно висаджувати відразу після збирання врожаю [10]. Це може бути зроблено за допомогою звичайних машин для садівництва, але нещодавно був розроблений агрегат Hvidsted Energy Forest, який може обробляти приблизно біля 5 т вирощених кореневищ, котрі після обробки механізовано висаджують рядами [10]. Такий спосіб макророзмноження дає коефіцієнт розмноження біля 50, у порівнянні з коефіцієнтом розмноження приблизно 100, який досягають при розрізанні ризом із цілих рослин ручним способом [11]. Використання ще одного

пристрою для розмноження ризом, зокрема, дискових борон з подальшим збором шматочків ризом автоматичним збирачем каменю, призводить до ще більшого зниження коефіцієнта множення [12].

Зрозуміло, що такою технікою, як Hvidsted Energy Forest, оснащені не так багато господарств, які займаються вирощуванням міскантусу, особливо в Україні. У той же час, найбільша проблема не тільки у розробці методів, які б забезпечили достатньо високі коефіцієнти розмноження. Як відомо, з досвіду багаторічного використання вегетативно розмножуваного матеріалу, наприклад, картоплі та іншого садивного матеріалу, з роками у такому матеріалі накопичуються віруси, акумулюються збудники бактеріальних та грибних хвороб, а також накопичуються внутрішньогеномні зміни у соматичних клітинах.

Використання культури тканин

Порівняльна оцінка різних способів розмноження рослинного матеріалу *M. x giganteus* дозволяє стверджувати, що найбільш ефективними методами клонового розмноження є культура клітин і тканин. Головною метою використання культури тканин для стерильного триплоїда *M. x giganteus* є прискорене відтворення рослинних популяцій з високим коефіцієнтом розмноження. Мікророзмноження рослин в культурі *in vitro* дозволяє отримати за декілька місяців біля мільйона рослин з однієї рослини. Такої ефективності неможливо досягнути ні при якому іншому способі розмноження (рис. 2).

Іншою проблемою при розмноженні будь-якого рослинного матеріалу вегетативним способом – пагонами і кореневищами, на наш погляд, є проблема поступового «виродження» вегетативно розмножуваного матеріалу, що може проявитися і для *M. x giganteus*.



Рис. 2. Мікророзмноження рослин *M. x giganteus* з використанням культури *in vitro*: а) 7 – 10-й день культивування рослинних експлантів на живильному середовищі для мікророзмноження; б) 14 – 21-й день культивування; в) 40 – 50-й день культивування

Наявна на даний час наукова інформація про походження існуючих клонів *M. x giganteus* свідчить, що існуюча популяція даного гібриду, фактично, являє собою вегетативне потомство одного клону. А якщо врахувати досить велику кількість циклів вегетативного розмноження субпопуляцій *M. x giganteus*, які пройшли з часу його виникнення та використовуються в даний час у виробництві, можна припустити, що через деякий час загальний пул наявного матеріалу даного гібрида, який характеризується високими продуктивними показниками збору біомаси, може суттєво зменшитися, незважаючи на розширені площі вирощування.

Для подолання даної проблеми необхідно використовувати культуру *in vitro*, що дозволить отримати цінні колекційні зразки, які дозволили б «законсервувати» даний високо продуктивний генотип, тобто – культура тканин дозволить зберегти генетичний потенціал даного гібрида на довгий період. Подібну колекцію, яку можна назвати «рослинним банком», доповнених «банком ізольованих меристем», можна створити лише з використанням методів культури тканин.

Ще однією з проблем при використанні методу макророзмноження, тобто розмноження у польових умовах, є чутливість клонів до пізніх весняних та ранніх осінніх заморозків [13], оскільки, незважаючи на відносну холодостійкість, як вважають деякі дослідники, завдяки частині генома

M. sinensis, на жаль, *M. x giganteus* не має стійкості до заморозків. Способи відтворення рослинного матеріалу шляхом мікророзмноження дозволяють подолати і дану проблему.

Надзвичайно актуальним підходом на перспективу має бути розробка способів розмноження рослин *M. x giganteus* ботанічним насінням. Для реалізації даної мети можливо використати два підходи: розробити експериментальний метод отримання гібридів *M. x giganteus* з використанням методів гібридизації вихідних форм або видів [14].

Альтернативним підходом є отримання функціонального насіння у вегетативно розмножуваних клонів з використанням поліплоїдизації шляхом колхіцинування [15]. Реалізація такої задачі виглядає дуже проблематичною без використання культури *in vitro* та молекулярно-генетичного аналізу (рис. 3а і 3б) [16].

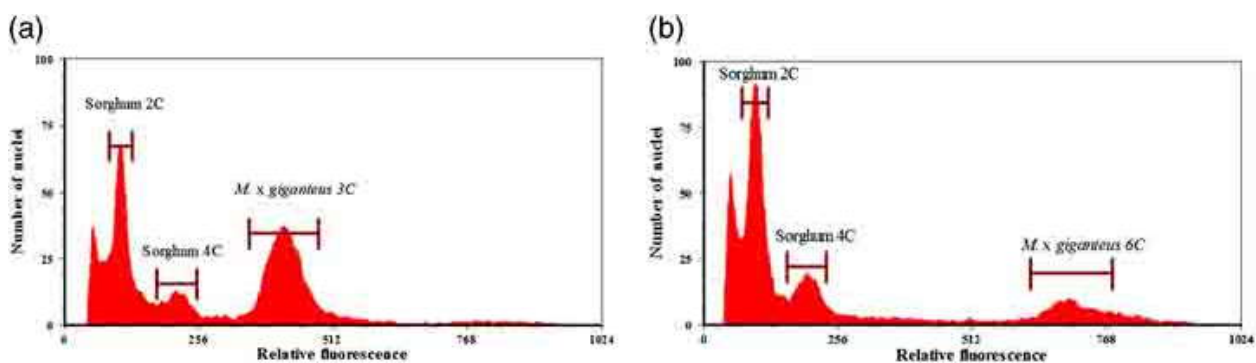


Рис. 3а. Гістограма ядер з тканин листків контрольних триплоїдних (недуплікованих) рослин (а) та гексаплоїдних (дуплікованих) рослин (б), регенерованих з експлантів незрілої тканини суцвіття *M. x giganteus*, після обробки орисаліном у концентрації 15 мкм протягом 2 діб. Ядра були забарвлені пропідієм йодиду, а відносний рівень плоїдності кожного піка вказаний як 3 С або 6 С (величина С означає відносну кількість ДНК)

Як видно з рисунка, після обробки поліплоїдизуючим агентом, яким у даному експерименті виступає не колхіцин, а орисалін, автори спостерігали суттєвий пік збільшеної у два рази кількості ДНК, у порівнянні з контрольними піками, що свідчить про двократне збільшення плоїдності даного рослинного

матеріалу та означає про отримання гексаплоїдних форм міскантусу з триплоїдної форми *M. x giganteus*.

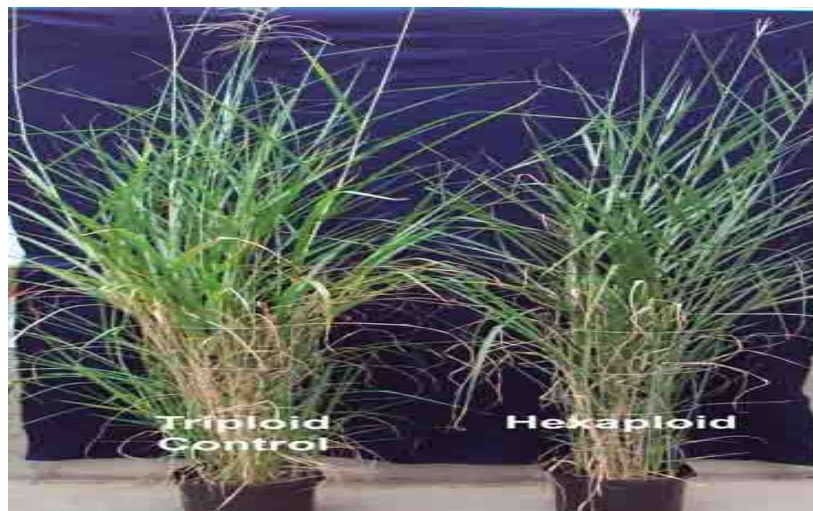


Рис. 3б. Регенований з культури тканин гексаплоїд (праворуч) та рослина триплоїдного контролю (ліворуч) *M. x giganteus*

Однією з серйозних перепон при зберіганні та відтворенні *M. x giganteus* є досить вузький діапазон генетичної різноманітності серед клонів, які використовуються для отримання біомаси [17], що спонукає до розробки методів розширення такої різноманітності. І тут у нагоді стане культура клітинних ліній, зокрема: калюсні культури, культура протопластів і суспензійна культура, які дозволять суттєво розширити діапазон існуючої генетичної мінливості за рахунок соматоклональної мінливості. Використання методів клітинної селекції, генного та геномного мутагенезу *in vitro* і, звичайно, сучасні методи генетичної інженерії дозволять отримати новий генетичний матеріал *M. x giganteus* з новими технологічно доцільними та адаптивними ознаками, у тому числі, з ознаками стійкості до біотичних та абіотичних стресових факторів.

Використання молекулярно-генетичних методів

Водночас з активним використанням нової культури у виробництві, було розпочато вивчення її генетичних характеристик. Генетичні ресурси для рослин роду *Miscanthus* були розглянуті в роботах Ходкінсона [18]. Після проведення

каріотипової оцінки видів міскантусу розпочали цикл досліджень з аналізу послідовностей ДНК.

Першим етапом такого аналізу став аналіз однієї з найбільш консервативних зон спадкового матеріалу, якою є рибосомальна і хлоропластна ДНК. Саме тому перші молекулярно-генетичні дослідження видів міскантусу, зокрема, *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* і, зрозуміло, *M. x giganteus* були проведені у даному напрямку [19]. Так, при аналізі внутрішньої транскрипційної проміжної області ядерної рибосомальної ДНК (ярДНК), зокрема ділянок внутрішнього транскрибованого спейсера (ВТС) та ділянок хлоропластної ДНК (хлДНК), зокрема тРНК-лейцинового інтрону (*trnL intron*) та міжгенних спейсерних ділянок (*trnL-F*), виявили взаємозв'язки між різними видами роду, проте, не змогли виявити відмінностей між сортами та різновидностями роду *Miscanthus* [20–22].

Мінливість пластомної компоненти геному міскантуса, зокрема хлДНК, також оцінювали з використанням послідовностей області району *trnL-F* [20–22]. Стало можливим ідентифікувати ряд різних типів ДНК пластид (хлДНК), які використовували для оцінки філогенетичних зв'язків видів [20] та материнського походження *M. x giganteus* [22]. Пластидна ДНК, як правило, успадковується по материнській лінії, і даний аналіз показав, що генотип *M. x giganteus* має пластидний тип *M. sachariflorus*. Таким чином, автори роблять висновок, що алотриполоїд *M. x giganteus* успадкував пластидну ДНК від *M. sachariflorus*, а ядерний геном – від видів *M. sachariflorus* та *M. sinensis*.

При аналізі ДНК пластид було відібрано шість маркерних локусів, що містили прості повторювані послідовності мікросателітної хлДНК (*cpSSRs*), а також характеризувалися одиночним нуклеотидним поліморфізмом (*SNPs*), на основі яких були створені праймери для аналізу рівнів поліморфізму серед хлДНК у різних представників роду *Miscanthus*. В результаті було перевірено колекційні зразки 164 генотипів *Miscanthus* і 14 видів підродини *Panicoideae*. Результати продемонстрували високий рівень поліморфізму за маркерами мікросателітної хлДНК, що становила від 10 до 16 алелей на один локус [23].

Для шести маркерних локусів мікросателітної хлДНК гібрид *M. x giganteus* практично не продемонстрував змін, у порівнянні з його передбачуваними батьками *M. sinensis* і *M. sacchariflorus*. Запропоновані маркери по оцінці одиночного нуклеотидного поліморфізму (*SNPs*) дозволили диференціювати більшість різновидів *Miscanthus* та визначити внутрішньовидову мінливість для рослин роду *Miscanthus*, що створює великий потенціал такого підходу для цілей практичної селекції [23].

Останнім часом набув великого поширення інший підхід в дослідженні поліморфізму спадкового матеріалу – вивчення анонімних послідовностей ДНК, локалізованих в мікросателітній ДНК. Так, деякі автори проводили аналіз поліморфізму довжин ампліфікованих фрагментів (ПДАФ) з метою оцінки генетичного різноманіття трьох видів міскантусу [24]. У той же час, використання ПДАФ та аналізу розподілу локусів з використанням ISSR-ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) дозволило оцінити понад 1000 поліморфних маркерних локусів [21]. Розроблені маркери надали можливість розрізнити види, різновидності, сорти та, навіть, клоновий матеріал. Вони були корисні для оцінки видів деяких таксонів, таких як *M. condensatus* та *M. yakushimanum*, які раніше не демонстрували поліморфізму, у порівнянні з *M. sinensis*. Однак, *M. transmorrisonensis*, ендемік з Тайваню, явно відрізнявся від *M. sinensis*.

Японські вчені також використали ПДАФ для вивчення генетичної структури *M. sinensis ssp. condensatus* на острові Міяке, який був зруйнований вулканічним виверженням 2000 року. В результаті вони ідентифікували три регіональні групи, в яких провели оцінку генетичної мінливості у природних популяціях *Miscanthus* [25].

Походження та генетичні зміни аллотриплоїду *M. x giganteus* було вивчено з використанням змін у послідовностях ДНК методом геномної дактилоскопії (ПДАФ та ISSR-ПЛР) та молекулярних цитогенетичних методів [21, 22]. Аллотриплоїдне походження *M. x giganteus* було показано шляхом сиквенування ВТС ярдНК. Два аллельних варіанти ВТС ярдНК були виявлені в продуктах ПЛР у *M. x giganteus*. Клонування цих продуктів показало, що один з них

відповідає локусу, наявному у геномі *M. sinensis*, а інший – *M. sachariflorus*. Далі, були використані молекулярні цитогенетичні прийоми флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) та геномної гібридизації *in situ* (GISH) для дослідження геному *Miscanthus*, які, проте, не змогли диференціювати різні батьківські геноми, присутні в *M. × giganteus*, що вказує на факт надзвичайної подібності цих двох геномів, принаймні, на рівні повторювальної ДНК.

Для порівняльного аналізу 18 представників роду *Miscanthus*, отриманих з різних світових колекцій, зокрема, 4 форм *M. × giganteus*, 2 екотипів *M. sachariflorus* та 12 сортів *M. sinensis*, було проведено цитофотометричне дослідження з метою підтвердження рівнів плоїдності для кожного з даних генотипів та оцінка генетичного поліморфізму з використанням аналізу ПДАФ для послідовностей, локалізованих між простими повторами (ISSR-аналіз), а також при довільній ампліфікації поліморфної ДНК (RAPD-аналіз). Частина результатів, які демонструють рівень поліморфізму для досліджених форм, представлена на рис. 4 [26].

Незважаючи на те, що в межах кожної групи видів спостерігали певний рівень поліморфізму, проведений авторами кластерний аналіз підтвердив наявність трьох груп кластерів, специфічних для кожного виду. Крім того, даний аналіз продемонстрував, що форма міскантусу, яку відносили до виду *M. floridulus*, насправді виявилася різновидом *M. × giganteus*, яку автори перейменували на *M. × giganteus* «Floridulus».

Ще одне цікаве дослідження було проведено для визначення походження форм *M. x giganteus* [27]. Автори прагнули визначити, чи сорти *M. x giganteus*, які культивуються у Північній Америці були схожими за походженням і наскільки вони близькі за генетичною конституцією до сортів, інтродукованих в Європі. З цією метою для аналізу були використані 64 ядерних та 5 хлоропластних простих повторюваних послідовностей (SSR), як маркери для оцінки генетичної подібності для 27 форм *M. x giganteus* з Північної Америки у їх порівнянні з шістьма формами *M. x giganteus*, які культивуються в Європі.

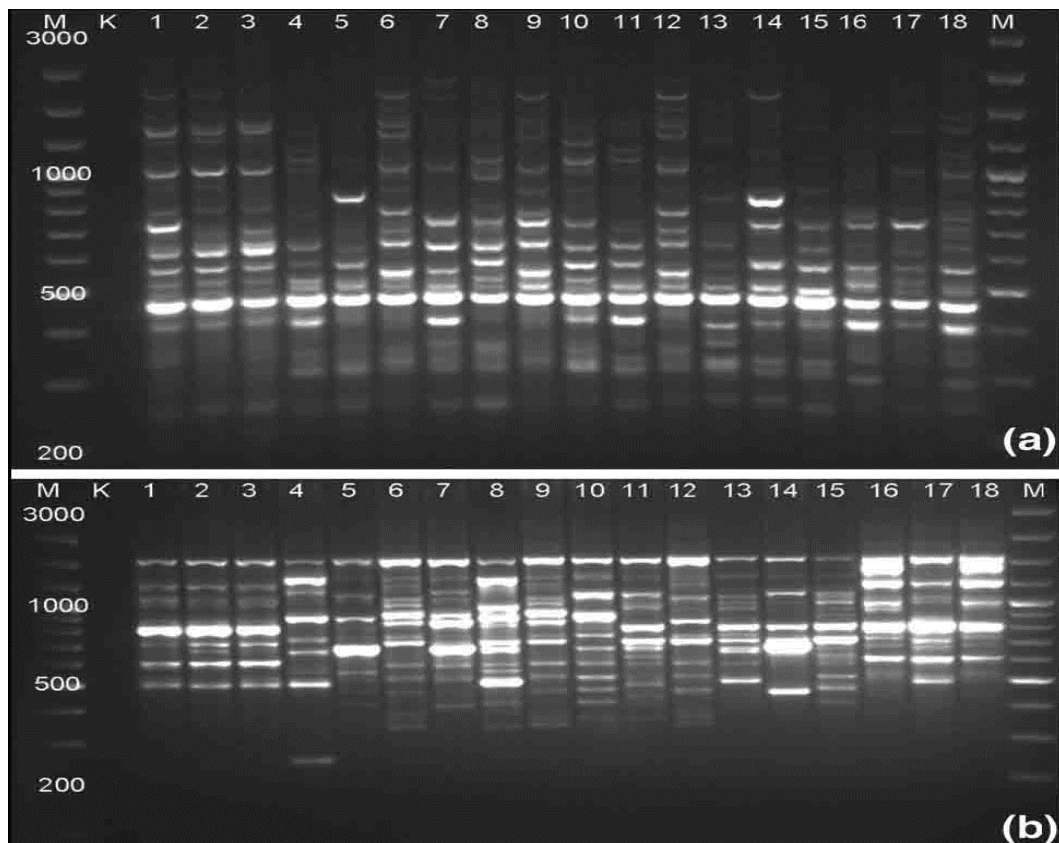


Рис. 4. Продукти ампліфікації, отримані для 18 форм міскантусу з використанням праймерів для ISSR-аналізу (а) та RAPD-аналізу (б).
 Умовні позначення: трек «М» – маркер ДНК, треки ДНК: «К» – негативний контроль ДНК; 1 – *M. × giganteus* «Канада»; 2 – *M. × giganteus* «Німеччина»; 3 – *M. × giganteus* «Великобританія»; 4 – *M. sinensis* «Flamingo»; 5 – *M. sinensis* «Goliath»; 6 – *M. sinensis* «Gracillimus»; 7 – *M. sinensis* «Graziella»; 8 – *M. sinensis* «Kleine Fontane»; 9 – *M. sinensis* «Kleine Silberspinne»; 10 – *M. sinensis* «Malepartus»; 11 – *M. sinensis* «Punktchen»; 12 – *M. sinensis* «Rotsilber»; 13 – *M. sinensis* «Sirene»; 14 – *M. sinensis* «Variegatus»; 15 – *M. sinensis* «Zebrinus»; 16 – *M. sachariflorus* (екотип I); 17 – *M. sachariflorus* (екотип II); 18 – *M. × giganteus* «Floridulus»

Для частини досліджуваних форм було проведено сиквенування ДНК для сайт-рестриційних асоційованих послідовностей (RAD-seq), а також було оцінено потенціал нових схрещувань з метою збільшення генетичної різноманітності *M. x giganteus* шляхом порівняння восьми нових триплоїдних форм *M. x giganteus*, вирощених з насіння, поряд зі зразками батьківських видів

M. sachariflorus і *M. sinensis*. Статистичний аналіз дозволив оцінити коефіцієнти помилок генотипування, що було необхідним для розмежування експериментальної похибки та справжніх генотипових відмінностей серед проаналізованих форм міскантусу [27]. В результаті проведених досліджень автори дійшли висновків, що всі існуючі сорти *M. x giganteus* були отримані шляхом вегетативного розмноження з одного клону, тобто мають одну базову генетичну конституцію. У той же час, форми *M. x giganteus*, отримані з насіння, мали різний рівень генетичної подібності до базового генотипу, яка коливається від 46 % до 56 %. І хоча генетична різноманітність серед існуючих сортів *M. x giganteus* критично низька, нові схрещування фертильних триплоїдних форм можуть забезпечити необхідний для виробників діапазон мінливості для ефективною селекційної роботи. Частина результатів даного дослідження представлена на рис. 5 [27].

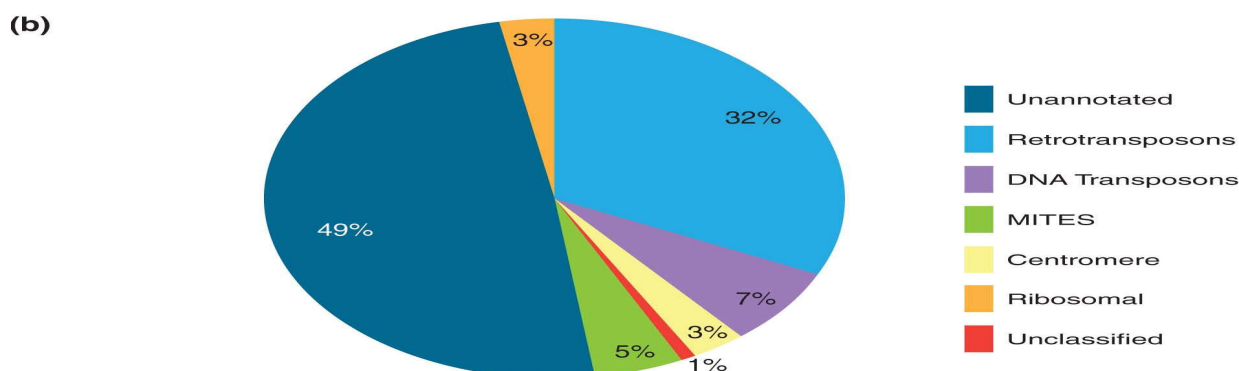
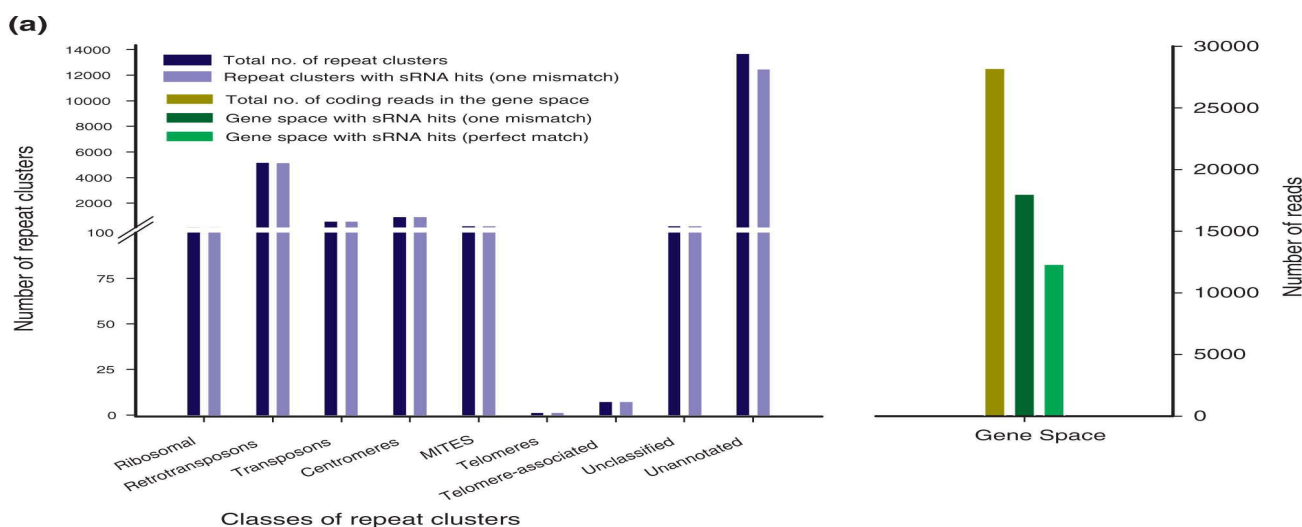


Рис. 5. Значна частина транскриптоми sRNA (мала РНК) *M. x giganteus* відповідає високій кількості копій геномних повторів. (а) Кількість повторів *M. x giganteus* або генних спейсерних послідовностей відповідає sRNA, як визначено відповідними повторюваними послідовностями, отриманих з трьох тканин *M. x giganteus*, шляхом сиквенуванням sRNA. Повтори анотовані за широкою категорією, де це відомо. Некласифіковані повтори відповідають послідовності в базі даних без визначеної категорії; не встановлені повтори не мають відповідності в базах даних. (b) Відсоток sRNA, створених різними класами повторів. Була розрахована за спеціальними критеріями та нормалізована велика кількість дрібних послідовностей sRNA. У доповнення до наведених даних, теломеро-асоційовані повтори разом складають 0,09% від загальної кількості sRNA, що являє собою дуже малу величину і тому вони не показані на діаграмі.

ВИСНОВКИ

Широке використання нових культур призвело до створення популяцій біоенергетичних рослин, походження яких, почасти, точно не визначене, а то й, взагалі, відсутнє. Крім того, відтворення та підтримання популяцій таких культур у достатній кількості, необхідних для економічно доцільного їх використання потребує використання нових методичних підходів для вирішення перелічених проблем. Це стає можливим лише за використання біотехнологічних методів, зокрема – культури тканин для прискореного розмноження нових форм та створення банків рослин, а також для отримання сортів і гібридів з новими господарсько-корисними ознаками.

Дослідженнями багатьох авторів встановлено, що поліморфізм, який притаманний повторювальній ДНК, відображає філогенетичні взаємовідносини між різними таксонами, а локалізація відповідних локусів в геномі дозволяє розробляти ДНК-маркери, які корелюють з певними господарсько-цінними ознаками, такими як біологічна продуктивність, толерантність до біотичних і абіотичних чинників.

Аналіз наукової інформації свідчить про те, що найбільш доцільно застосувати ISSR-ПЛР, хоча в деяких випадках можна використовувати для порівняльної оцінки генотипів міскантусу також RAPD-ПЛР методики. Дані методологічні підходи передбачають використання в якості праймерів різні послідовності олігонуклеотидів ДНК. Простота, висока чутливість та відтворюваність обумовили перспективність та широке застосування даних методів.

Серед основних напрямків при розробці систем молекулярного маркування для проведення оцінки молекулярно-генетичного поліморфізму у біоенергетичних культур і, зокрема, для рослин міскантусу, можна виділити наступні: пошук систем праймерів для мультилокусного аналізу різних форм і генотипів, оптимізація умов при проведенні ідентифікації генотипів та генетичного аналізу виділених перспективних для селекційної роботи матеріалів, а також для проведення експертизи генотипів та генетичної паспортизації з метою збереження прав на інтелектуальну власність.

Майбутні дослідження по вивченню генетичної організації та генетичного потенціалу рослин *Miscanthus* × *giganteus* мають бути спрямовані на вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму на внутрішньовидовому та міжвидовому рівні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Scurlock J.M.O. *Miscanthus*: A Review of European Experience with a Novel Energy Crop, Environmental Sciences Division Publication [Електронний ресурс] / J.M.O. Scurlock. – 1999. – Р.18. – Режим доступу до ресурсу: <https://bioenergy.ornl.gov/reports/toc.html>

2. Новая форма мискантуса китайского (Веерника китайского *Miscanthus sinensis* Anders.) как перспективный источник целлюлозо содержащего сырья / [В.К. Шумный, С.Г. Вепрев, Н.Н. Нечипоренко и др.] // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14, № 1. – С. 122–126.

3. *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
4. Greef J.M. Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus* / Greef J.M., Deuter M.// Angewandte Botanik. – 1993. – V. 67. – P. 87–90.
5. Linde-Laursen I.B. Cytogenetic analysis of *Miscanthus`Giganteus'*, an interspecific hybrid / I.B. Linde-Laursen // Hereditas. – 1993. – V.119. – P. 297–300.
6. Lewandowski I. EMI: European *Miscanthus* Improvement – the results of the first year of a *Miscanthus* breeding project // Biomass for Energy and Industry / [Ed. by Kopetz H., Weber T., Palz W. et al.] / Proceedings of the 10th European Biomass Conference. – Würzburg, Germany: 8-11 June 1998. – CARMEN Publishers. – Rimpar, Germany. – P. 930–932.
7. Growing Giant *Miscanthus* in Illinois, University of Illinois [Электронный ресурс] / [Pyter R., Voigt T., Heaton E. et al.] – Режим доступа до ресурсу: <https://www.miscanthus.illinois.edu/wp-content/uploads/growersguide.pdf>
8. Walsh M. *Miscanthus* handbook / Walsh M., McCarthy S.// Biomass for Energy and Industry / [Ed. by Kopetz H., Weber T., Palz W. et al.] / Proceedings of the 10th European Biomass Conference. – Würzburg, Germany: 8-11 June 1998. – CARMEN Publishers. – Rimpar, Germany. – P. 1071–1074.
9. Jorgensen U. Macropropagation of *Miscanthus* // In: Symposium *Miscanthus* Biomassebereitstellung, energetische und stoiche Nutzung: Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoe. – Vol. 4. – Munster, Germany: Landwirtschaftsverlag. – 1995. – P. 27–30.
10. Low cost establishment and winter survival of *Miscanthus x giganteus* / [Schwarz K-U., Kjeldsen J.B., Munzer W., Junge R.] // Biomass for energy and the environment: Proceedings of the 10th European Bioenergy Conference / Ed. by Kopetz H., Weber T., Palz W. et al. – Würzburg, Germany: 8–11 June 1998. – CARMEN Publishers. – Rimpar, Germany. – P. 947–950.
11. Huisman W. Technical and economic feasibility of the complete production – transport chain of *Miscanthus x giganteus* as an energy crop / Huisman W.,

Kasper G.J., Venturi P. // Paper presented at First European Energy Crops Conference. – Enschede: The Netherlands, 30th September–1st October 1996.

12. Wilkins C. Biomass production for energy and industry in the far South-West of England / Wilkins C., Redstone S. // Biomass for energy and the environment: Proceedings of the Ninth European Bioenergy Conference / [Ed by. Chartier P., Ferrero G.L., Henius U.M. et al.], Copenhagen, Denmark, 24–27 June 1996. New York: Pergamon, 1996. – P. 799–806.

13. Late Emergence and Rapid Growth Maximize the Plant Development of *Miscanthus* Clones / [Zub H.W., Rambaud C., Bethencourt L., Brancourt-Hulmel M.] // Bioenergy Res. – 2012. – V.5. – P. 841–854.

14. Discovery of natural *Miscanthus* (*Poaceae*) triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan / [Nishiwaki A., Mizuguti A., Kuwabara Sh. et al.] // American Journal of Botany. – 2011. – V. 98, №1. – P. 154–159.

15. Głowacka K. Polyploidization of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus x giganteus* by plant colchicine treatment / Głowacka K., Jezowski S., Kaczmarek Z. // Industrial Crops and Products. – 2009. – V. 30, Is. 3. – P. 444–446.

16. Chromosome doubling of the bioenergy crop, *Miscanthus x giganteus* / [Yu C.Y., Kim H.S., Rayburn A.L. et al.] // GCB Bioenergy. – December 2009. – V.1. – Is. 6. – P. 404–412.

17. Hodkinson T.R. Nomenclature of *Miscanthus .giganteus* (*Poaceae*) / Hodkinson T.R., Renvoize S. // Kew Bull. – 2001. – V. 56. – P. 759–760.

18. Hodkinson T.R. Genetic resources of *Miscanthus* / Hodkinson T.R., Chase M.W., Renvoize S.A. // Aspect. Appl. Biol. – 2001. – V. 65. – P. 239–248.

19. Clifton-Brown J. *Miscanthus*: Genetic Resources and Breeding Potential to Enhance Bioenergy Production / Clifton-Brown J., Chiang Yu-Ch., Hodkinson T.R. // Genetic Improvement of Bioenergy Crops / Ed. by W. Vermerris. – Berlin: Springer Science–Business Media, 2008. – P. 273–294.

20. Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (*Saccharinae*, *Andropogoneae Poaceae*) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal

DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers / [Hodkinson T.R., Chase M.W., Lledo M.D. et al.] // J. Plant Res. – 2002. – V. 115. – P. 381–392.

21. Hodkinson T.R. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (*Saccharinae*, *Andropogoneae*, *Poaceae*) using AFLP and ISSR PCR / Hodkinson T.R., Chase M.W., Renvoize S.A. // Ann. Bot. – 2002. – V. 89. – P. 627–636.

22. The use of DNA sequencing (ITS and trnL-F), AFLP, and fluorescent *in situ* hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (*Poaceae*) / [Hodkinson T.R., Chase M.W., Takahashi C. et al.] // Am. J. Bot. – 2002. – V. 89. – P. 279–286.

23. Cesare M. Chloroplast DNA markers (cpSSRs, SNPs) for *Miscanthus*, *Saccharum* and related grasses (*Panicoideae*, *Poaceae*) / Cesare M. de, Hodkinson T.R., Barth S. // Mol Breeding. – 2010. – Vol. 26, Is. 3. – P. 539–544.

24. Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting / [Greef J.M., Deuter M., Jung C., Schondelmaier J.] // Genetic Res. Crop Evol. – 1997. – V. 44. – P. 185–195.

25. Iwata H. Genetic structure of *Miscanthus sinensis* ssp. *condensatus* (*Poaceae*) on Miyake Island: implications for revegetation of volcanically devastated sites / Iwata H., Kamijo T., Tsumura, Y. // Ecol. Res. – 2005. – V. 20. – P. 233–238.

26. Cichorz S. *Miscanthus*: Genetic Diversity and Genotype Identification Using ISSR and RAPD Markers / Cichorz S., Goska M., Litwiniec A. // Mol. Biotechnol. – 2014. – V.56. – P. 911–924.

27. Genetic variation in *Miscanthus x giganteus* and the importance of estimating genetic distance thresholds for differentiating clones / [Głowacka K., Clark LV., Adhikari Sh. et al.] // Bioenergy. – 2015. – V.7. – P. 386–404.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В РАЗМНОЖЕНИИ И ОЦЕНКЕ *MISCANTHUS GIGANTEUS*

Г.П. ПЕТЮХ, Р.И. ПРИШЛЯК

Национальный авиационный университет, г. Киев

*Представленная статья посвящена короткому обзору способов воспроизводства растений биоэнергетической культуры мискантуса, в том числе, с использованием биотехнологических методов, а также основным направлениям исследований при проведении сравнительной оценки разных растительных материалов *Miscanthus x giganteus* молекулярно-генетическими методами.*

Ключевые слова: *биоэнергетические культуры, *Miscanthus x giganteus*, способы размножения, биотехнологические и молекулярно-биологические методы, молекулярно-генетический полиморфизм.*

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES IN PROPAGATION AND EVALUATION OF *MISCANTHUS GIGANTEUS*

G.P. PETJUCH, R.I. PRYSHLIAK

National Aviation University, Kyiv

*The paper describe brief review of plant multiplication approaches of bioenergy crop miscanthus, including using of biotechnology methods, as well as main directions of researches to carry out comparative analysis for different plant materials of *Miscanthus x giganteus* by molecular genetic methods.*

Key words: *bioenergy crops, *Miscanthus x giganteus*, plant multiplication approaches, biotechnology and molecular biology methods, molecular genetic polymorphism.*