ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

УДК 58.085

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO ТА ПОЛІПЛОЇДИЗАЦІЯ *MISCANTHUS GIGANTEUS*

О. В. МЕЛЬНИЧУК, аспірант*

С. П. ОЖЕРЄДОВ, кандидат біологічних наук

Д. Б. РАХМЕТОВ, доктор сільськогосподарських наук, професор

С. О. РАХМЕТОВА, молодший науковий співробітник

А. С. СЕКАН, молодший науковий співробітник

Г. Я. БАЄР, О. М. ШИША, кандидати біологічних наук

А. І. ЄМЕЦЬ, доктор біологічних наук

Державна установа "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України"

E-mail: olexandr_melnichyk@ukr.net

Анотація. *Міскантус гігантський має великий потенціал для використання у сучасних технологіях виробництва біопалива. Одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського дозволило б вирішити проблему фертильності та підвищити врожайність біомаси. В даній роботі наведено результати розробки протоколів поверхневої стерилізації асептичного рослинного матеріалу, які дозволяють отримати до 82 % стерильних експлантів, та базових протоколів індукції калюсогенезу та подальшого отримання рослин-регенерантів міскантусу гігантського.*

Ключові слова: *міскантус гігантский, введення в культуру in vitro, експлант, поверхнева стерилізация, культура тканин, поліплоїдизация*

Рослини і різноманітні матеріали рослинного походження мають великий потенціал у забезпеченні планети відновлювальною енергією у майбутньому[3]. Поміж перспективних біоенергетичних культур можна виділити міскантус. Рослини відзначаються своєю невибагливістю до ґрунтових умов та високою

*Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор Блюм Ярослав Борисович

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

продуктивністю, яка становить близько 20–25 т/га сухої речовини [1]. Серед представників цього роду міскантус гігантський (*Miscanthus* × *giganteus)* є одним з найбільш перспективних [6]. Міскантус гігантський – це спонтанно утворений гібрид між *Miscanthus sacchariflorus* та *Miscanthus sinensis* і являє собою стерильний алотриплоїд (2n=3x=57) [4].

Одержання поліплоїдних ліній цього виду дало б можливість підвищити врожайність біомаси, вирішити проблему фертильності та дозволити ведення селекції на одержання нових ліній [8]. Поліплоїдизація в умовах *in vitro* із використанням сполук динітроанілінового ряду має перевагу над класичними антимітотичними речовинами завдяки їх високій спорідненості до тубуліну рослин та відносно низькій фітотоксичності [7, 10].

Цей метод вимагає введення міскантусу в культуру *in vitro,* що має певні складнощі, а саме, це високий рівень контамінації експлантів з підземної частини рослин, який в деяких випадках може перевищувати 50 % [5, 9].

Мета дослідження – розробка ефективного методу введення в культуру *in vitro* експлантів з підземної частини рослин міскантусу гігантського з метою отримання матеріалу для подальшого індукування утворення поліплоїдів із використанням перспективних антимітотичних сполук.

Матеріали і методи дослідження. В якості об’єкта дослідження нами було використано рослини *M. giganteus*, сорту «Гулівер», отримані з робочої колекції Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України. Як експланти, використовували кореневі придаткові бруньки з фрагментами ризом. Експланти добирали зі щойно викопаних та ретельно відмитих від ґрунту коренів рослин. Головними критеріями добору експлантів були оптимальний розмір бруньок (0,3–1,0 см), наявність ознак життєздатності та відсутність механічних пошкоджень.

Під час обробки експлантів використовували наступні варіанти поверхневої стерилізації:

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

Варіант 1 передбачав обробку відібраних експлантів 4 %-им розчином Tween 20 протягом 10 хв, з наступним двократним ополіскуванням та подальшою обробкою у 70 %-му розчині етанолу протягом 3 хв при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15 %) із додаванням 2 %-го Tween 20 з експозицією 20 хв. Далі експланти двічі промивали стерильною водою та переносили до 4 %- ого розчину пероксиду водню на 20 хв, постійно помішуючи.

Варіант 2 був ідентичним до попереднього, відрізнявся лише концентрацією пероксиду водню (8 %).

Варіант 3 передбачав обробку відібраних експлантів 4 %-им розчином Tween 20 протягом 10 хв з наступним двократним ополіскуванням. Подальшу обробку здійснювали у 70 %-му розчині етанолу протягом 3 хв при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15 %) із додаванням 2 %-го Tween 20 з експозицією 20 хв, після чого експланти двічі промивали стерильною водою та переносили до розчину гіпохлориту натрію (NaOCl) у концентрації 6 % із додаванням Tween 20 (2 %) на 20 хв. Після стерилізації експланти тричі промивали водою протягом 10 хв кожного разу.

Варіант 4 відрізнявся від попереднього лише концентрацією розчину NaOCl (12 %). Всі інші маніпуляції відповідали попередньому протоколу.

Варіант 5 передбачав обробку відібраних експлантів 4 %-им розчином Tween 20 протягом 10 хв, з наступним двократним відмиванням стерильною дистильованою водою. Подальшу обробку здійснювали у 70 %-му розчині етанолу протягом 3 хв при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15 %) із додаванням 2 %-го Tween 20 з експозицією 20 хв, після чого експланти, двічі промиті водою, переносили до розчину $AgNO_3$ (0,02 %) із додаванням Tween 20 (2 %) на 20 хв.

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

Після стерилізації експланти тричі промивали стерильною дистильованою водою, 10 хв кожний.

Варіант 6 відрізнявся від попереднього концентрацією розчину $AgNO_3$ (0,04 %). Всі інші маніпуляції були ідентичні до попереднього протоколу.

Варіант 7 передбачав попередньою обробку експлантів 50 %-им розчином комерційного препарату «Білизни» (3 %-ий розчин гіпохлориту натрію) протягом 20 хв з постійним помішуванням, тричі промивали стерильною водою та в асептичних умовах із бруньок видаляли поверхневі луски і частину ризом. Підготовлені експланти повторно стерилізували у 50 %-му розчині «Білизни» протягом 20 хв з постійним помішуванням, тричі промивали стерильною водою, протягом 10 хв кожний.

Варіант 8 був аналогічний до варіанту 7 за виключенням другого етапу обробки, який передбачав повторну стерилізацію експлантів у 0,08 %-му розчині нітрату срібла ($AgNO_3$) протягом 20 хв з постійним помішуванням.

Після проведення поверхневої стерилізації просушені на фільтрувальному папері експланти переносили в чашки Петрі, які містили живильне середовище MS (Murashige and Skoog, 1962) без додавання гормонів. Культивування експлантів здійснювали за температури 24°С за умов 16/8 год. фотоперіоду.

Підрахунок контамінованих та стерильних експлантів здійснювали на 7-му добу культивування. Аналіз отриманих даних проводили із використанням програми ANOVA. Статистичний аналіз виконували за допомогою MICROSOFT ® EXCEL 2002.

Результати дослідження та їх обговорення. Як показали результати дослідження найбільш ефективним методом поверхневої стерилізації є протокол поверхневої стерилізації із використанням 50 %-го розчину «Білизни», видаленням зовнішніх лусок бруньок та частини ризом та обробка 0,08 %-им розчином нітрату срібла, як описано у варіанті 8 (Рис. 1). Цей варіант дозволив одержати 82,2 % стерильних експлантів, які були придатними до індукції

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

калюсогенезу та наступної регенерації рослин міскантусу гігантського з калюсу як на середовищі, вільному від антимітотичних агентів, так і на середовищі, доповненому 3 мкМ трифлюраліну та іншими перспективними антимітотичними сполуками.

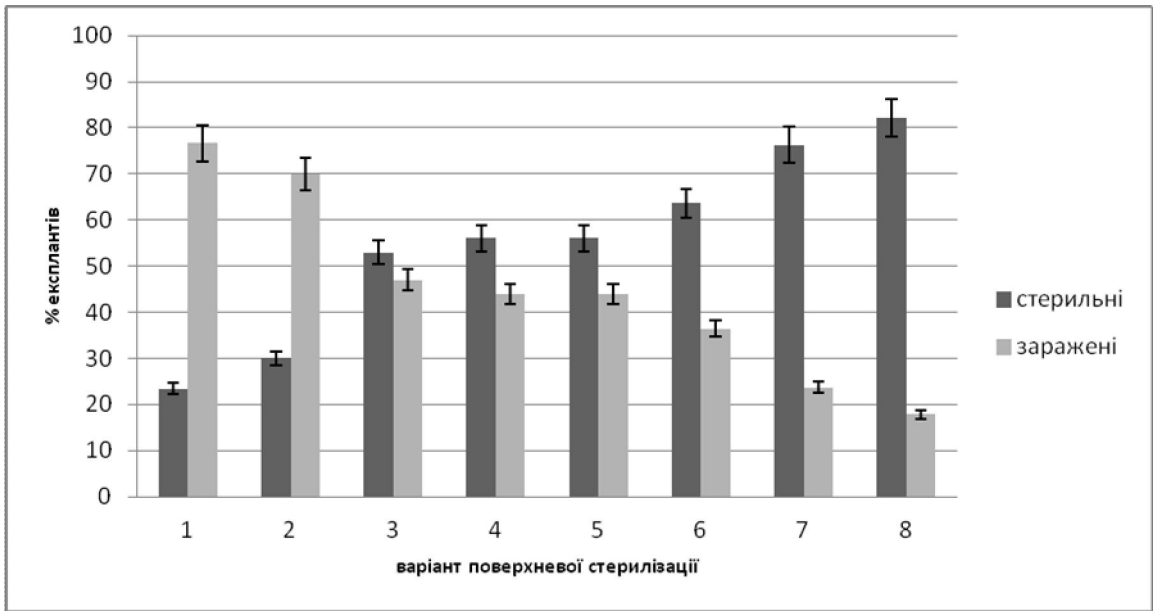

Рис. 1. Ефективність різних протоколів стерилізації експлантів *M. giganteus* (відсоток стерильних і контамінованих експлантів за використання різних варіантів поверхневої стерилізації експлантів)

Відносно ефективним виявився протокол, описаний у варіанті 7 з використанням 50 %-го розчину «Білизни», який дозволяє одержати 76,3 % стерильних експлантів міскантусу гігантського. Використання перекису водню у зазначених концентраціях є неефективним для поверхневої стерилізації експлантів з підземної частини рослин міскантусу гігантського (Рис.1).

Для індукції калусогенезу нами були використані модифіковані середовища MS, які містили ауксини та цитокініни у різних комбінаціях та концентраціях [2]. Для регенерації рослин калюсну культуру культивували на середовище MS, яке містило 2 мг/л БАП. Отримані регенеранти розділяли та переносили на аналогічне середовище для подальшого мікроклонального розмноження.

З метою отримання поліплоїдних рослин під час регенерації, середовище доповнювали трифлюраліном та іншими перспективними антимітотичними сполуками динітроанілінового ряду, такими як: Бр-44, Бр-37, CNA-030 та CNA-017, у концентрації 3 мкМ. Після 20 діб культивування на середовищі з антимітотичними речовинами калюс переносили на живильне середовище, вільне від гербіцидів. Регенеровані з калюсу рослини відокремлювали та переносили на середовища MS, доповнене 2 мг/л БАП для подальшого розвитку та розмноження ліній, які вимагають встановлення рівня плоїдності.

Під час регенерації як на вільному від антимітотичних сполук, так і на середовищі із додаванням динітроанілінів, спостерігали утворення вільних коренів, які за кількістю значно перевищували кількість утворених пагонів. Отже, важливим питанням є оптимізація умов та комбінації регуляторів росту для індукції калюсогенезу та регенерації рослин міскантусу гігантського з калюсної культури.

Висновки

За результатами проведених досліджень відпрацьовано метод введення рослин міскантусу гігантського в культуру *in vitro*, який дозволяє одержати 82,2 % стерильних експлантів, здатних до дедиференціації та органогенезу. Розроблено базові протоколи для індукції калюсогенезу та наступної регенерації рослин з калюсу. Проте, як показали проведені дослідження, вони потребують подальшого доопрацювання з метою підвищення їх ефективності та оптимізації. Також було проведено дослідження з поліплоїдизації мікантусу за використання динітроанілінових сполук.

Планується подальше проведення роботи по відбору найбільш перспективних антимітотичних речовин динітроанілінового задля ефективного отримання поліплоїдних рослин міскантусу.

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

Робота виконувалася в рамках наукового проекту "Створення нових високоврожайних ліній міскантусу як сировини для біоетанолу шляхом отримання поліплоїдів" (2015-2019 р.р.) цільової комплексної науково-технічної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Clifton-Brown J. C., Breuer J., Jones M. B. Carbon mitigation by the energy crop *Miscanthus*/ Global Change Biology. – 2007.– № 11– P. 2296–2307.

2. Gubisova M., Gubis J., Zofajova A., Mihalik D., Kraic J. Enhanced *in vitro* propagation of *Miscanthus x giganteus*// J Ind Crop Prod. – 2013. – № 41. – P. 279–282.

3. Heaton E.A., Dohleman F.G., Miguez A.F., Juvik J.A., Lozovaya V., Widholm J., Zabotina O.A., McIsaac F., David M.B., Voight T.B., Boersma N.N., Long S.P. *Miscanthus*: a promising biomass crop//Adv Bot Res. –2010.– № 56. P. 75–135.

4. Hirayoshi I., Nishikawa K., Hakura A. Cytogenetical forage studies on forage plants: 3- and 4-hybrids raized from the cross, Miscanthus sinensis var. condensatus M. sacchariflorus// Research Bulletin of the Faculty of Agriculture Gifu University. –1960. –№ 12. – P. 82–88.

5. Jain S. M., Dutta Gupta Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops. : Springer Science+Business Media Dordrecht, 2013. – 247 p.

6. Nasir, El Bassam Handbook of bioenergy crops: A complete reference to species, development and applications.: Routledge, Taylor and Francis Group Ltd. Oxford, 2010. – 544 p.

7. Yemets A.I., Blume Ya.B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs // The Open Horticulture J. – 2008. - 1, №1. - P. 15-20.

8. Yu C.Y., Kim H.S., Burn A.L., Widholm J.M., Juvik J.A. Chromosome doubling of the bioenergy crop, Miscanthus×giganteus// Global Change Biology Bioenergy. – 2009. – № 1. – P. 404–412.

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

9. Мельничук О. В. Розробка та відпрацювання методики введення в культуру *in vitro* рослин міскантусу / [О. В. Мельничук, С. П. Ожерєдов, А. С. Секан, та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. - Т. 17. - С. 209-212.

10. Ожередов С. П. Скрининг новых производных 2,4 и 2,6 динитроанилинов на фитотоксичность и антимитотическую активность / [С. П. Ожередов, А. И. Емец, В. Н. Брицун та ін.] // Цитология и генетика. – 2009. – 43, № 5. – С. 3–13.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO И ПОЛИПЛОИДИЗАЦИЯ *MISCANTHUS GIGANTEUS*

О. В. Мельничук, С. П. Ожередов, Д. Б. Рахметов, С. О. Рахметова А. С. Секан, Г. Я. Баер, О. М. Шиша, А. И. Емец

Аннотация. *Мискантус гигантский – это перспективная энергетическая культура, которая обладает большим потенциалом для использования в современных технологиях производства биотоплива. Получение полиплоидных линий мискантуса гигантского даёт возможность повысить урожайность биомассы и решить проблему фертильности. Проведение полиплоидизации в условиях in vitro требует как использования эффективных протоколов введения растений в стерильные условия, индукции каллусогенеза, регенерации растений из каллуса и микроклонального размножения, так и применения высокоэффективных антимитотических соединений с невысоким уровнем фитотоксичности. В данной работе показаны результаты разработки протоколов поверхностной стерилизации асептического растительного материала, позволяющих получить до 82 % стерильных эксплантов, и базовых протоколов для индукции каллусогенеза и получения растений-регенерантов.*

Ключевые слова: *мискантус гигантский, введение в культуру in vitro, эксплант, поверхностная стерилизация, культура тканей, полиплоидизация*

IN VITRO CULTURE ESTABLISHMENT AND POLYPLOIDIZATION OF MISCANTHUS GIGANTEUS

O. Melnychuk, S. Ozheriedov, J. Rakhmetov, S. Rakhmetova, A. Sekan, H. Baier, O. Shysha, A. Yemets

Abstract. *Miscanthus Giganteus is a promising energy crop with a great potential for utilization in contemporary bio-fuel production technologies. Creation of miscanthus*

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com
ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

polyploids could allow us to solve problem with its fertility and to increase yield of its biomass. In vitro polyploidization requires application of effective protocols for in vitro culture establishment, callus induction, plant regeneration and micropropagation as well as treatment with highly efficient anti-mitotic agents with low level of phytotoxicity. Protocols for surface sterilization of root adventitious buds allowing obtaining up to 82% of sterile explants has been found. Basic protocols for callus induction and plant regeneration have been developed. Plants have been regenerated on both, anti-mitotic agents -free media and on media containing the later.

Key words: *Miscantus giganteus, in vitro culture establishment, explants, surface sterilization, tissue culture, polyploidization.*