

УДК 633.63..631.581.3

ПЕРСПЕКТИВИ Й МЕТОДИ ПОЛІПЛОЇДНОЇ СЕЛЕКЦІЇ НОВИХ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ КЛОНІВ МІСКАНТУСІВ У ПРИРОДНО-КЛІМАТИЧНИХ УМОВАХ УКРАЇНИ

РОЇК М.В.,

академік НААН, д. с.-г. наук, ІБКіЦБ;

КОВАЛЬЧУК Н.С.,

зав. лаб. цитогенетики, с.н.с., ІБКіЦБ;

ЗІНЧЕНКО О.А.,

учений секретар адміністративного управління ІБКіЦБ к.с.-г. наук;

ГУМЕНТИК М.Я.,

зав.лаб. технології вирощування біоенергетичних культур ІБКіЦБ, к.с.-г. наук;

ГОНЧАРУК Г.С.,

зав.лаб.технології вирощування біоенергетичних культур Ялтушківської ДСС, к.с.-г. наук.

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН, вул. Клінічна, 25, Київ, 03110, Україна.

Тел. (044) 275-50-00, факс (044) 275-50-00. E-mail: sugarbeet@ukr.net, www.sugarbeet.com.ua.

Постановка проблеми

Через високу врожайність і відсутність несприятливих факторів для екології, енергетичні злакові трави, такі як представники роду *Miscanthus*, є важливою енергетичною культурою для виробництва. Польові експерименти країн Європи демонструють, що міскантус може дати більший вихід енергії з одиниці площі в порівнянні з іншими енергетичними культурами, такими як однорічні сільськогосподарські культури й деревні породи та різні види багаторічних трав [1,2,3,4]. За класифікаційними характеристиками види міскантусів відносять до родини Poaceae роду *Miscanthus* Anderss [5]. Під нараховує близько 12 видів, серед яких найбільш цінними для виробництва біомаси є *M. sacchariflorus*, *M. sinensis*, *M. x giganteus*, і *M. floridulus* [6]. У Європі культивування *Miscanthus* — це вирощування, головним чином, *M. x giganteus* тропічного та субтропічного походження [6, 7]. *M. x giganteus* ($2n=3x=57$) — міжвидовий гібрид, отриманий від природної гібридизації диплоїдного виду *M. sinensis* ($2n=2x=38$) і тетраплоїда *M. sacchariflorus* ($2n=3x=76$). Висока продуктивність біомаси отриманого триплоїда, за результатом аналізу літературних джерел, визначається насамперед ефектом гетерозису й об'єднанням трьох геномів, який виникає в гібридних комбінаціях [8]. Як наслідок, стерильний *M. x giganteus* відтворюється тільки вегетативним спо-

собом — ризомами, проростками кореневищ або в культурі *in vitro* [9, 10]. Особливість розмноження обмежує ризик його виходу з екосистеми та призводить до вкрай обмеженої генетичної різноманітності [11].

На даний час основними пріоритетними галузями є пошук дешевої біосировини, пошук нових вихідних матеріалів та нової зародкової плазми міскантусу, які б забезпечували, як високий приріст біомаси, так і високу її біоенергетичну цінність.

Селекція міскантусу ведеться, як в Західній Європі, так і в Америці. Згідно літературних даних, найінтенсивніша селекція гібридів міскантусу проводиться в трьох країнах — Швеції, Данії та Німеччині [12]. Використовуючи генотипи *Miscanthus sinensis* та *Miscanthus sacchariflorus* в селекційних центрах у вищезгаданих країнах були створені 15 гібридів міскантусу, що випробовувалися в різних кліматичних зонах Європи [13]. Визнано, що *Miscanthus sinensis* є найбільш зимостійким, ніж *Miscanthus giganteus* та *Miscanthus sacchariflorus* і більш підходить для Північної Європи. Найбільш продуктивними виявилися триплоїди — гібриди *Miscanthus sinensis* (4x) та *Miscanthus sacchariflorus* (2x) [14]. Для України такі дані відсутні. Селекціонери Medel Biotechnology та Tinplant Biotechnik створили два гібридних сорти міскантусу "Amur1" і "Nagara" з селекційної програми Tinplant в 2006 році. Ці нові сорти є результатом схрещування гібридів між *Miscanthus sacchariflorus* і *Miscanthus sinensis* та виявляють більшу ступінь зимостійкості, ніж *Miscanthus giganteus*.

Авто- і алополіплоїди відігравали певну роль у еволюції міскантусів і поліплоїдія, на думку дослідників біоенергетичних культур, швидше за все має центральне значення для розвитку селекції. Крім того вважають, що варіації терміну цвітіння, включаючи квітки короткого дня, дозволять селекціонерам оптимізувати місцеву адаптацію та вихід біомаси міскантусу, як це було зроблено для кукурудзи, сорго й арахісу [15]. Давно визнано, що поліплоїдизація амфідиплоїдів може привести до нових ізольованих видів за одну генерацію.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

За результатами проведених молекулярно-генетичних досліджень амери-

канських, корейських, китайських і європейських вчених, видоутворення міскантусу — складний і динамічний процес [16] Lindsay V. Clark et al (2015) показали рівень інтрогресії від тетраплоїдного *Miscanthus sinensis* (2x) до триплоїдного *M. sacchariflorus* (по всій Японії, так як більшість тетраплоїдів мали деяку кількість ДНК *M. sinensis*). Виявлені та ідентифіковані з використанням ДНК-технологій рідкісні диплоїдні форми з півночі Японії походження *M. sacchariflorus*. Більш того встановлено, що інтрогресія генів між диплоїдними та тетраплоїдними популяціями від диплоїдів до тетраплоїдів відбувається через нередуковані гамети або хромосомні перебудови (мости) і може мати великі еволюційні наслідки (Wang et al., 2014) [17]. Встановлено, що на материковій Азії в основному поширений диплоїдний *M. sacchariflorus* і він природно схрещується з *M. sinensis*, утворюючи диплоїдні гібриди, які раніше були названі *M. purpurascens* (Glowaska et al., 2014), але генетична структура залежала від природної ізоляції та ареалу поширення [18]. На відміну від інтрогресії між диплоїдними видами в північному Китаї, природний добір за результатами цитогенетичних та молекулярно-генетичних досліджень Lindsay V. Clark et al (2015) в умовах помірного морського клімату сприяв у південній Японії рекомбінації й, скоріше всього, геномним мутаціям, як результат складних тривалентних хромосомних асоціацій, спонукаючи до утворення біотипів з тетраплоїдним рівнем плоїдності геному та інтрогресією частини геному міскантусу китайського [16].

Серед вихідних матеріалів для дослідження в біоенергетичному процесі України — поліплоїдні ряди міскантусу, серед них *Miscanthus giganteus* (3x), *Miscanthus sinensis* (2x), *Miscanthus sacchariflorus* (2x). Сьогодні в Україні інтродуковані різні види міскантусу та інші енергетичні культури лише іноземного походження. На особливу увагу заслуговує клональне мікророзмноження міскантусу в умовах культури *in vitro* клонами та *in vivo* ризомами.

Miscanthus x giganteus ($3n=57$) є високопродуктивним триплоїдним гібридом, який був виявлений в Японії в 1935 р. і завезений в Європу датським колекціонером рослин [12]. На даний час він поширений в багатьох країнах світу й має

значний потенціал в якості джерела енергії. За літературними джерелами, в світовій біоенергетиці вирощується два або три ідентичні клони, але, на думку дослідників, існує величезна ймовірність того, що широкомасштабне вирощування міскантусу на біомасу в Європі базується на використанні лише одного клону [6]. Аналогічна ситуація спостерігається в Північній Америці, де культивовані генотипи *M. x giganteus* були отримані за допомогою вегетативного розмноження від одного клону європейського походження [11]. Використовуючи ДНК-технології, Greef і ін. (1997) за методом AFLP, відібрали 31 зразок *M. x giganteus*, 11 клонів *M. sinensis* і 2 клони *M. sacchariflorus*, доцільних для вирощування в ботанічних садах і розсадниках Центральної Європи [8]. Незважаючи на відмінні ознаки, описані ботаніками та систематиками, генотиповий пул *M. x giganteus* не відзначається різноманітністю, і тільки три зразки з використанням ДНК-технологій вдалося ідентифікувати за молекулярно-генетичними маркерами [6]. Враховуючи ризики ідентичності єдиного клона цього гібриду в плані адаптаційного потенціалу та стійкості до епіфітотій, іноземні вчені активно проводять пошук нових клонів цього гібрида, який утворився від природного схрещування видів *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) ($4x=76$) і *Miscanthus sinensis* Anderss ($2x=38$) із залученням адаптованих до природних умов нових селекційних матеріалів [19].

За допомогою цитологічних методів Honda також ідентифікував два природних триплоїда *Miscanthus* в районі міст Akashi і Sasayama (Японія), проте слід зазначити, що натепер не має інформації про нові популяції природних триплоїдів в Японії та в інших частинах Східної Азії. Методом хромосомного аналізу декілька рослин *M. sacchariflorus* зібрані від Північної до Південної Японії, і Hirayoshi звітував, що всі зразки *M. sacchariflorus* ($2x=76$) були тетраплоїдами, які відрізнялись за рівнем плоідності від *M. sacchariflorus* в Китаї [19]. За результатом цитологічного аналізу польських дослідників якраз *M. sacchariflorus* ($2x$) поширений в Європі в ботанічних садах, але у нього є різні варіанти плоідності, аж до гексаплоїдного [6]. Аналіз методом проточної цитофотометрії, проведений в тих же умовах, показав, що $2C$ і $4C$ піки еко-типів на гістограмах *M. sacchariflorus* і 11 різновидів *M. sinensis* були розташовані на тому ж каналі АП «Partec», що й диплоїдний стандарт [6].

В Європі й Азії проводяться селекційні дослідження для створення нових сортів міскантусу, так як усі потенційні

можливості цієї культури ще не вивчені. Стрімко зростає кількість зареєстрованих сортів з кожним роком, що свідчить про інтенсивність ведення селекційного процесу. Найбільш інтенсивні селекційні роботи проводять з отримання нових гібридів міскантусу в Данії, Німеччині та США. Серед основних не вирішених завдань в селекції міскантусу:

- вдосконалення систем розмноження з насіння;
- створення нових поліплоїдних вихідних матеріалів, які б забезпечили необхідні потреби селекційного процесу.

Адаптація до умов України на даний час диплоїдних видів міскантусу (*Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus*) можуть при подвоєнні хромосом поповнити поліплоїдні ряди, забезпечуючи в процесі гібридизації отримання нових триплоїдних клонів.

Метою дослідження є переведення на поліплоїдний рівень *Miscanthus sinensis* ($2x=38$) *Miscanthus sacchariflorus*, в умовах *in vitro* та створення поліплоїдних рядів міскантусу на основі диплоїдних інтродукованих видів, колекційних зразків Ялтушківської ДСС європейського походження.

Поліплоїдизація, розмноження та вкорінення отриманих методом експериментальної поліплоїдії нових тетраплоїдних форм *Miscanthus sinensis* і *Miscanthus sacchariflorus* проведено в лабораторії цитогенетики Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, стабілізація за рівнем плоідності геному після індукції колхіцином та вдосконалення технологій вкорінення в ґрунті — у лабораторії вирощування біоенергетичних культур Ялтушківської ДСС (Україна).

Матеріали і методи досліджень

Серед вихідних матеріалів для поліплоїдизації, розмножені мікроклонально *in vitro*, ідентифіковані за рівнем плоідності види іноземного походження, з використанням цитологічних і цитометричних методик:

— *Miscanthus sinensis* ecotype 1 «Poland» $2x=38$;

— *Miscanthus sacchariflorus* ecotype 1 «Poland» $2x=38$;

— *Miscanthus sinensis* new «Germany» ecotype 2 фірма «Jelitto» $2x=38$;

— *Miscanthus giganteus* (три клони походження ecotype 1 «Poland», ecotype 2 «Austria», ecotype 3 «Great Britain») $3x=57$;

3 опису різних видів міскантусу ЯДСС ІБКІЦБ і біоенергетичних культур ІБКІЦБ:

Miscanthus sacchariflorus ecotype 1 «Poland» — міскантус цукровітковий є тетраплоїдним видом і компонентом схрещування для алотриплоїдного кло-

на *Miscanthus giganteus*. За ботанічними ознаками та характеристиками *M. sacchariflorus* має повзуче широке й товсте кореневище, поверхня листа густо опушена, міжвузля видно на стадії цвітіння волоті, має дрібне коричневе насіння, квітконіжка виростає на головному суцвітті з деяким розгалуженням, що співпадає з основними ботанічними ознаками та характеристиками Ka Yeon Lee (2012), Sacks (2013), Maksimović (2014) [6, 15, 20]. На думку корейських і американських дослідників міскантусів, для селекції продуктивних гібридів якраз *M. sacchariflorus* ($2x=38$) може привести до отримання високої схожості насіння триплоїдних гібридів [6, 15, 20].

Miscanthus sinensis ecotype 1 «Poland» і ecotype 2 «Germany» фірма «Jelitto» — міскантус китайський на дослідному полі ІБКІЦБ упродовж першого року вегетації сформували стебла висотою 1,5–1,7 м. Мають ризоми довжиною 5–10 см. За гістограмами ДНК інтерфазних ядер у 2016 р. визначено диплоїдний рівень геному даного виду в порівнянні зі стандартним генотипом сорго зернове (вид *Sorghum bicolor* $2x=20$). Волоть *M. sinensis* забарвлена в пурпуровий колір, кожна квітка виростає на головному суцвітті без розгалуження, нижня поверхня листа має білувату помітну середню жилку, міжвузля приховані листками.

Miscanthus giganteus ecotype 1 «Poland», ecotype 2 «Austria», ecotype 3 «Great Britain» — міскантус гігантський. Рослини цього виду дуже високі — до 5 м. Це природний триплоїд із кількістю хромосом ($2x=57$). Триплоїдний рівень плоідності геному всіх досліджувальних рослин міскантусу підтверджений за результатами аналізу на АП «Partec» і за кількістю хромосом апікальних меристем проростків підземних кореневищ (ризом).

Методики визначення рівня плоідності геному видів роду *Miscanthus*

Узгоджена та нормалізована з раніше опублікованими основними систематичними показниками рівня плоідності геному видів роду *Miscanthus*, методика визначення еталону за масою ядерної ДНК, яка передбачає контроль за кількістю хромосом на цитологічних препаратах та інтенсивність флюорисценції за гістограмами ДНК інтерфазних ядер АП «Partec». [21]

Цитологічні методи дослідження плоідності підземних кореневищ і колекційних зразків насіння

Вихідні матеріали для поліплоїдизації визначали за кількістю хромосом, а також встановлювали еталон маси ДНК для цитометричних досліджень на АП «Partec» у представників роду *Miscanthus*:

із використанням методик розроблених в ІБКіЦБ [21, 22]. Зовнішнім стандартом були використані:

— диплоїдні вітчизняні сорти сорго зернового ($2x=20$) сорт «Дніпровський», рід *Sorghum* — вид *Sorghum bicolor*;

— *Miscanthus sinensis* ecotype 1 «Poland» ($2x=38$);

— *Miscanthus giganteus* ecotype 1 «Poland», ecotype 2 «Austria», ecotype 3 «Great Britain».

Метод флюорисцентної цитофотометрії для визначення плоідності представників роду *Miscanthus* в умовах in vitro та в польових умовах.

Найбільш повне представлення про плоідність клітин рослинних тканин може дати цитофотометричне вивчення вмісту ДНК в клітинних ядрах. Метод проточної цитофотометрії дозволяє визначити мінливість за рівнем плоідності геному в рослинних тканинах і не залежить від випадковості поділу клітини, як цитологічний. Для достовірності контролю тетраплоїдного та міксоплоїдного рівня геному ми використовували інтродуковані триплоїдні колекційні зразки Ялтушківської ДСС (Україна) *Miscanthus giganteus* ecotype 1 «Poland» ($2n=3x=57$), ecotype 2 «Austria» $3x$, ecotype 3 «Great Britain» $3x$ різного еколого-географічного походження.

Встановлено, що для дослідження плоідності міскантусів можна використовувати вегетативні пагони, ризоми, листя, генеративні пагони, а також листки клонів із культури in vitro [21].

Опис ДНК гістограм різних видів міскантусу із колекційних зразків Ялтушківської ДСС, як вихідного матеріалу для виділення поліплоїдних.

Аналізували гістограми представників *Sorghum* ($2x=20$) та диплоїдні колекційні зразки міскантусів *Miscanthus sinensis* ecotype 1 «Poland» $2x=38$ і три-

плоїди *Miscanthus giganteus* ecotype 1 «Poland», ($3x=57$) ecotype 2 ecotype 3 «Great Britain» ($3x=57$) визначені за кількістю хромосом. Збільшення значення підсилення (FL1) підбираємо таким чином, щоб G1 пік досліджуваних ядер виділених із зовнішнього стандарту, в даному випадку диплоїдного сорго зернового (*Sorghum bicolor*), спостерігавсь на каналі 50 од. (G1) і 100 од. (G2) (рис. 1 а).

Встановлено, що для виду *Miscanthus sinensis* ecotype 2 «Germany» ($2x=38$) відносно маси ДНК інтерфазних ядер зовнішніх стандартів, диплоїдному рівню геному відповідає кількісний клас на каналі 150 од. і клас клітинної субстанції (G2) синтетичного й постсинтетичного періоду клітинного циклу на каналі 300 од. (рис. 1 а, б, в). В якості об'єкту для аналізу були використані генеративні пагони, проростки кореневищ (ризоми), відібрані в сформованій симпатричній популяції на основі колекційних зразків Ялтушківської ДСС. *Miscanthus giganteus* ($3x$) ecotype 1 «Poland» і *Miscanthus giganteus* ($3x$) ecotype 2 «Austria». Вони характеризувались розподілом за кількісним вмістом ядерної ДНК на каналах 200 од. (G1) і 400 од. (G2) згідно зовнішнього стандарту сорго зернового *Sorghum bicolor* (рис. 1 в).

Створення колекції різних видів роду *Miscanthus* в умовах культури in vitro

Для введення в стерильну культуру та розмноження клонами видів роду *Miscanthus* із метою колхіцинування й створення поліплоїдних рядів в умовах in vitro використана методика ІБКіЦБ (Роїк М. В., 2012 р.). Вводили в стерильну культуру найбільш важливі три види *Miscanthus sacchariflorus* ecotype 1 «Poland», *Miscanthus sinensis* ecotype 1 «Poland», *Miscanthus sinensis*

ecotype 2 «Germany», *Miscanthus giganteus* ecotype 1 «Poland» і ecotype 2 «Austria».

Для клонального мікророзмноження в якості первинних експлантів використані проростки насіння й паростки кореневищ (ризом) та рідкі селективні середовища з модифікацією складу макро- і мікросолей Мурасіре-Скуга з додаванням сахарози 30000 мг/л, БАП 0,2–0,5 мг/л, кінетину 0,2–0,5 мг/л, гібереліну 0,1 мг/л.

Диплоїдні й триплоїдні клони після 3–4 пасажів перенесли на селективне середовище з колхіцином для поліплоїдизації.

Індукція нових тетраплоїдних форм представників роду *Miscanthus* in vitro

Поліплоїдизація різних видів роду *Miscanthus* в умовах рідких живильних середовищ з колхіцином

Для поліплоїдизації в умовах in vitro мікропагонів експериментального матеріалу застосовано рідкі селективні середовища з колхіцином, відсоткова частка якого складає 0,05%. Досліджуваний термін експозиції від двох годин до трьох діб на середовищі з колхіцином. Через 14 діб паростки перенесли на середовище для регенерації клонів і стимулювання ростових процесів.

Експериментальний матеріал після дії колхіцину розмножували впродовж 3 пасажів на агаризованих середовищах із додаванням гормонів, біологічно активних речовин, сахарози для відновлення ростових процесів і відбирали за плоідністю з використанням АП «Partec». Тиражування виділених тетраплоїдних пагонів провели на живильних середовищах із додаванням 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л гібереліну та 0,15 мг/л кінетину.

Методика вкорінення й акліматизації, переведення в умови відкрито-

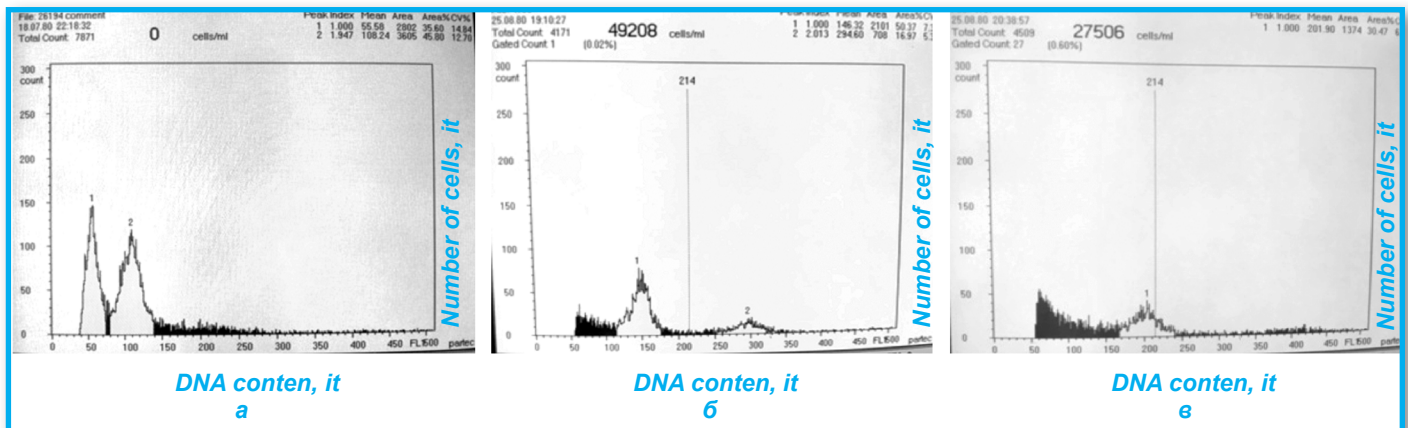


Рис. 1 Визначення плоідності представників роду *Miscanthus*: а) *Sorghum bicolor* ($2x=20$) сорт «Дніпровський» як еталон визначення плоідності міскантусів за гістограмами ДНК інтерфазних ядер АП «Partec», б) гістограма ядерної ДНК *Miscanthus sinensis* ecotype 1 «Poland» з інтенсивністю флюорисценції тах ДНК на каналах 150 од. і 300 од.; в) гістограми ядерної ДНК *Miscanthus giganteus* ecotype 2 «Austria» з тах ДНК на каналах 200 од. і 400 од.

го ґрунту селекційно-тепличного комплексу

Пагони регенеровані й мікроклонально розмножені після дії колхіцину відбирали за морфологічним розвитком листків і переносили на середовище для вкорінення з додаванням фітогормонів НОК 1 мг/л, ІОК 0,2 мг/л, сахарози 20000 мг/л, агару 7,5 г/л і активованого вугілля 0,3 мг/л. Рослини вирощували в культуральній кімнаті при температурі 27 °С в фотоперіоді 16/8 год із холодним білим люмінесцентним освітленням. Коріння утворювалося впродовж 10–14 днів, в цей час рослини акліматизували протягом 7 днів в тепличних умовах ЯДСС для пересадки. Пересажували в ґрунтову суміш зі складом: на 100 кг ґрунту аміачної селітри (34%) — 40–50г, суперфосфату (19%) — 100–110 г, калійної солі (40%) — 30–40 г із приживлюваністю 99% за умов вологості 60–70% і температури повітря від 25 до 35 °С.

Морфологічні спостереження.

Після 14 діб акліматизації й вкорі-

нення в теплиці в умовах закритого ґрунту тетраплоїдні та диплоїдні пагони були пересаджені у вегетаційні сосуди й польові умови.

В ґрунтовій секції теплиці впродовж вегетаційного періоду температурні показники змінювались впродовж 2017–2019 років:

квітень-травень — від +16 °С до +20 °С;

червень — від +18 °С до +25 °С;

липень-серпень — від +30 °С до +55 °С;

вересень — від +25 °С до +30 °С;

жовтень — від +18 °С до +22 °С.

Рослини вирощували в квітні-жовтні та вимірювали висоту, кількість пагонів, ширину листової пластинки, особливості закладки генеративних пагонів, терміни цвітіння, розміри, фертильність і стерильність пилкових зерен. Для дослідження ефективності поліплоїдизації був використаний коефіцієнт подвоєння, що раніше визначався в процесі індукції тетраплоїдних форм міжвидових

гібридів *Allium fistulosum*, *Zyzipus jujuba*, *Paulownia tomentosa* [23].

Методика визначення фертильності та стерильності пилкових зерен *M. sinensis* (2x, 4x) і *M. sacchariflorus* (2x, 4x).

Розвиток чоловічого гаметофіта, фертильність пилкових зерен і здатність до запліднення вивчали з використанням модифікованих нами класичних методик оцетокармінового забарвлення, а також із залученням барвника метиленового синього (1980). Розчин метиленового синього готували в дистильованій воді з відсотковою часткою барвника 0,09%, 4%-оцетокармін готували у 45% оцтової кислоті та витримували на водяній бані впродовж 1 години за методикою Паушева (1980 рік) [24].

Препарати готували на предметному склі, відділяли пінцетом пиляки та переносили в розчин, накривали покривним склом і переглядали під мікроскопом за зб. 12x10; 12x20 "Polam" № 225 43 PZO Warshava. Розмір пилкових зерен вивча-

Таблиця 1.

Показники життєздатності та індукції тетраплоїдів *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* залежно від терміну експозиції в рідких живильних середовищах Мурасіге і Скуга з колхіцином 0,05%

Вихідний матеріал, рік експозиції	Кі-сть досліджених клонів, шт	Термін експозиції, (год, доба)	Кількість експериментальних пагонів, (Тс), шт	із них життєздатних (Sc), шт	відсоток життєздатних пагонів** (S%) р±mp	Кі-сть регенованих***, шт	Аналіз плоідності отриманих регенерантів			Ефект поліплоїдизації**** (Db%)
							2x	4x	2x,4x	
<i>M. sinensis</i> ecotype 1 "Poland", 2017 контроль *	125	2 год	30	30	100±0	39	27	-	-	
		6 год	15	15	100±0	25	14	-	-	
		1 доба	30	30	100±0	37	29	-	-	
		2 доби	50	50	100±0	57	19	-	-	
<i>M. sinensis</i> ecotype 1 "Poland", 2017	197	2 год	21	15	71,42±9,85	20	5	7	8	35,0
		6 год	35	22	62,85±8,16	28	15	3	10	10,71
		1 доба	53	10	18,86±5,37	16	12	-	4	-
		2 доби	48	-	-	-	-	-	-	-
Miscanthus sinensis new «Germany» ecotype 2, фірми «Jelitto» 2018	175	2 год	29	19	65,52±8,82	22	4	6	12	27,3
		6 год	37	14	37,84±7,9	13	5	1	7	7,69
		1 доба	34	5	14,71±6,07	10	7	-	3	-
		2 доби	49	-	-	-	-	-	-	-
Miscanthus sacchariflorus ecotype 1 «Poland» №1 (2017)	184	2 год	31	27	87,09±6,02	26	21	-	5	4,76
		6 год	27	19	70,37±8,73	21	9	2	11	14,28
		1 доба	56	29	51,78±6,51	16	-	3	14	21,42
		2 доби	49	7	18,36±5,57	14	7	-	4	-
Miscanthus sacchariflorus ecotype 1 «Poland» №2, 2018	145	2 год	25	22	88,0±6,49	20	17	-	3	8,8
		6 год	23	19	82,17±7,9	17	6	2	10	9,09
		1 доба	35	17	48,57±8,4	22	7	5	13	31,25
		2 доби	23	9	39,13±10,17	16	1	-	10	-
		3 доби	39	1	2,56±5,26	2	2	-	-	-

Примітка:

* контроль — культивування пагонів *Miscanthus sinensis* без дії колхіцину залежно від терміну експозиції в рідкому живильному середовищі;

** відсоток життєздатності клонів (S%) = [кількість життєздатних пагонів після дії колхіцину (Sc) / кількість оброблених експлантів (Тс) x 100];

*** кількість пагонів регенованих упродовж двох пасажів

**** Ефект поліплоїдизації (Db%) = [кількість 4x пагонів / кількість регенованих пагонів 2x; 4x] x 100%

Таблиця 2.

Показники ефективності ризогенезу тетраплоїдних клонів *Miscanthus sacchariflorus* та *Miscanthus sinensis* залежно від експозиції на селективному середовищі з додаванням НОК 1 мг/л та ІОК 0,2 мг/л

Вихідний матеріал	Плоїдність	Експериментальні номери	Кількість висаджених пагонів, шт	Із них вкорінені, % \pm mp
M. sinensis ecotype 1 "Poland"	(4x)	2/3-10-5, 2/3-10-3, 2/3-10-1	200	40,7 \pm 3,47
M. sinensis new «Germany» ecotype 2	(4x, 2x)	2/3-10, 2/1	100	31,5 \pm 4,66
M. sacchariflorus ecotype 1 «Poland»	(4x)	3/8-4, 3/8-2, 3/3, 3/4	200	91,5 \pm 1,97
M. sinensis ecotype 1 "Poland"	(2x)	Msin2	50	56,7 \pm 7,01
M. sacchariflorus ecotype 1 "Poland"	(2x)	Msac 4	50	33,4 \pm 6,66

ли з використанням об'єкт-мікрометра й окуляр-мікрометра, ціна поділки об'єкт-мікрометра 0,01 мм=10 мкм, 1 окул/мкм=2,5 об'єкт-мікрометра, що дорівнює 25 мкм.

Досліджували по 10 вегетуючих рослин диплоїдів і тетраплоїдів *M. sinensis* і *M. sacchariflorus*. Аналізували 10 квіток для кожної рослини. Визначали середнє значення кількості пилоквих зерен для кожної окремої рослини й відсоткове значення стерильних, фертильних і недорозвинених пилоквих зерен у п'яти полях зору з використанням світлового мікроскопу "Polam" № 225 43 PZO Warshava.

Аналіз експериментальних даних

Для визначення достовірності різниці за життєздатністю кельтуральних погонів, стерильністю та фертильністю пилок-

вих зерен між диплоїдними контрольними рослинами й тетраплоїдними формами *M. sacchariflorus* і *M. sinensis*, отриманими в результаті дії мутагенної поліплоїдируючої речовини колхіцину, розраховували похибку репрезентативності:

$$m_p = \pm \sqrt{\frac{P(100-P)}{N}}$$

Визначали t_d для встановлення t_{St} (Стюдента) й достовірності різниці між двома дослідженими варіантами за формулою:

$$t_d = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$



Рис. 2. Депонування та вкорінення в тетраплоїдних клонів *M. sacchariflorus* (4x=76) та *M. sinensis* (4x=76) *in vitro*: а) вкорінення *Miscanthus sinensis* ecotype 1 "Poland" на агаризованих середовищах з НОК 1 мг/л, ІОК 0,2 мг/л; б) розмноження та вкорінення тетраплоїдної форми *Miscanthus sacchariflorus*.

Значні відмінності спостерігались для контрольних диплоїдних видів міскантусів після індукції нових тетраплоїдних форм за середнім відсотковим значенням стерильних і фертильних пилоквих зерен на рівні достовірності 95 ($P=0,05$). Відсоток життєздатності кельтуральних пагонів після індукції колхіцину визначали: життєздатність ($S\%$) = [кількість розвинених пагонів (Sc)] / [кількість експериментальних пагонів (Tc) * 100%], ефект поліплоїдизації ($Db\%$) = [кількість 4x пагонів (Db)] / [кількість 2x і 4x пагонів (Sp)] * 100% за раніше розробленими методиками [23].

Результати і обговорення

Серед розмножених пагонів після дії колхіцину з відсотковою часткою 0,05%, показник життєздатності залежав від терміну експозиції в умовах рідких живильних середовищ. Для диференціації за рівнем плоїдності, виділення диплоїдних, тетраплоїдних і міксоплоїдних кельтуральних пагонів використана й узгоджена із зарубіжними методика флюорисцентної цитофотометрії з комп'ютерним забезпеченням АП "Partec" [21]. Показники життєздатності та ефективності поліплоїдизації для двох досліджуваних диплоїдних видів *M. sacchariflorus* і *M. sinensis* у зрівнянні з *M. sinensis* ecotype 1 "Poland" (2x=38), без внесення колхіцину, представлені в табл. 1.

Серед розмножених пагонів більшу життєздатність після дії колхіцину спостерігали у *M. sacchariflorus* ecotype 1 "Poland", відсоткова частка регенераційно-здатних кельтуральних рослин за терміну експозиції 1 доба становила: у 2017 році — 51,78 \pm 6,51 і у 2018 році — 48,57 \pm 8,4. У *M. sinensis* за терміном експозиції 1 доба життєздатні пагони мали значення, відповідно по роках, 18,86 \pm 5,37 і 14,71 \pm 6,07. Після відбору за плоїдністю впродовж 3 термінів пасажу та ідентифікації експериментального матеріалу за кількісним вмістом ДНК інтерфазних ядер виділені тетраплоїдні й міксоплоїдні форми та розмножені *in vitro* (рис. 2.).

Виділені тетраплоїдні й міксоплоїдні клони за селекційними номерами:

Miscanthus sacchariflorus (4x): 3/8-4, 3/8-2, 3/3, 3/4;

Miscanthus sinensis (4x): 2/3-10-5, 2/3-10-3, 2/3-10-1;

Miscanthus sinensis (4x, 2x): 2/3-10, 2/1.

Найкращі результати для вкорінення були отримані на середовищі з додаванням фітогормонів НОК 1 мг/л, ІОК 0,2 мг/л. Показники ефективності ризогенезу тетраплоїдних і диплоїдних клонів *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* наведені в таб. 2.

Всього в 2017 році вкоріне-

но тетраплоїдних клонів *Miscanthus sacchariflorus* — 169 шт, *Miscanthus sinensis* — 51 шт.

На основі міксоплоїдних пагонів стабілізованих за тетраплоїдним рівнем плоїдності геному в умовах рідких живильних середовищ у 2018 році виділені та вкорінені тетраплоїдні рослини *M. sinensis* в кількості 100 шт.

Для проведення гібридизації в ґрунтових умовах СТК Ялтушківської ДСС вкорінені також вихідні диплоїдні форми: *Miscanthus sinensis* (2x) — 17 шт., *Miscanthus sacchariflorus* (2x) — 10 шт.

Особливості росту й розвитку культуральних пагонів різного рівня плоїдності *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* у ґрунтових умовах СТК ЯДСС

Експериментальний матеріал був переданий у квітні 2017 року на ЯДСС і висаджений в ґрунт в польових умовах і в умовах СТК.

Для формування симпатричних популяцій вкорінені вегетуючі рослини були ізольовані в селекційні бокси. Запропоновані схеми валентних схрещувань:

M. sinensis (4x) x *M. sinensis* (2x);

M. sacchariflorus (4x) x *M. sinensis* (2x);

M. sinensis (4x) x *M. sacchariflorus* (2x).

На ефективність гібридизації впливають температурні показники й якість пилоквих зерен. Раніше встановлений термін формування триплоїдного ембріону від 7 тижнів до 11 тижнів від появи генеративних пагонів (К. Y. Lee, 2012). В умовах СТК ЯДСС активне цвітіння спостерігалось лише в диплоїдних клонів *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*. Оскільки для представників роду *Miscanthus* є характерне перехресне запилення (запилення вітром) і самонесумісність, гібридизація може привести за даними дослідників міскантусу до високого відсотку схожості отриманого насіння за умов подолання температурних бар'єрів (Ка Yeon Lee, 2012).

Морфологічні особливості розвитку вегетативної маси нових тетраплоїдних біотехнологічних ліній міскантусів упродовж квітня 2017 року — вересня 2018



Рис. 3 Ріст і розвиток вегетативної маси тетраплоїдних форм різних видів міскантусів на основі вкоріненних пагонів *in vitro* в умовах СТК: а) *M. sacchariflorus* (4x) 140–195 см; б) *M. sinensis* (4x) 130–160 см.

року зображено на рис. 3 (а, б).

Визначали кількість пагонів, висоту та ширину листків і термін цвітіння в умовах СТК і польових умовах в кінці першого й другого року вегетації.

Диплоїдні рослини *M. sinensis* (2x) досягали висотою 90–100 см, ширина листової пластинки 5–6 мм. Висота рослин тетраплоїдної форми впродовж першого року вегетації становила 100–120 см, кількість пагонів — 6–10 шт, максимальна ширина листової пластинки — 7–10 мм і не відрізнялась від диплоїдів, а впродовж другого року вегетації кількість пагонів у *M. sinensis* (4x) змінювалась від 39 шт до 50 шт, а висота вегетуючих рослин — від 130 см до 160 см.

Диплоїдні рослини *M. sacchariflorus* (2x) досягали висотою 110–130 см, ширина листової пластинки — 12–13 мм, кількість пагонів — від 11 шт. до 15 шт, а для тетраплоїдної форми висота рослин змінювалась від 140 до 195 см, кількість пагонів — 41–75 шт., максимальна ширина листової пластинки — 12–15 мм. Формування генеративних пагонів і волоті на перший рік вегетації спостерігалось лише в диплоїдних форм *M. sinensis* (2x) та *M.*

sacchariflorus (2x). У польових умовах тетраплоїдні форми міскантусів зацвіли на другий рік вегетації в кількості 50% від загального експериментального поліплоїдного матеріалу. В тепличних умовах зацвіли всі тетраплоїдні форми *M. sinensis* та 30% біотипів 4x *M. sacchariflorus*.

Особливості формування генеративної сфери були досліджені з використанням цитологічних методів, аналізу фертильності й стерильності пилоквих зерен, залежно від таймінгу, температурних показників кінця вересня 25–30 °С — і на початку жовтня 18–22 °С.

Серед основних ботанічних характеристик вкорінені тетраплоїдні культуральні пагонів другого року вегетації ми спостерігали:

M. sinensis (4x): компактне й менш розгалужене кореневище, нижня поверхня листа має помітну серединну жилку, густо опушена. Основа листа гладенька, міжвузля приховані листовими пластинками впродовж всієї вегетації, колоски мають квітконіжки на головному суцвітті без розгалуження;

M. sacchariflorus (4x): кореневище широкі та повзуче, основа листа гладенька,

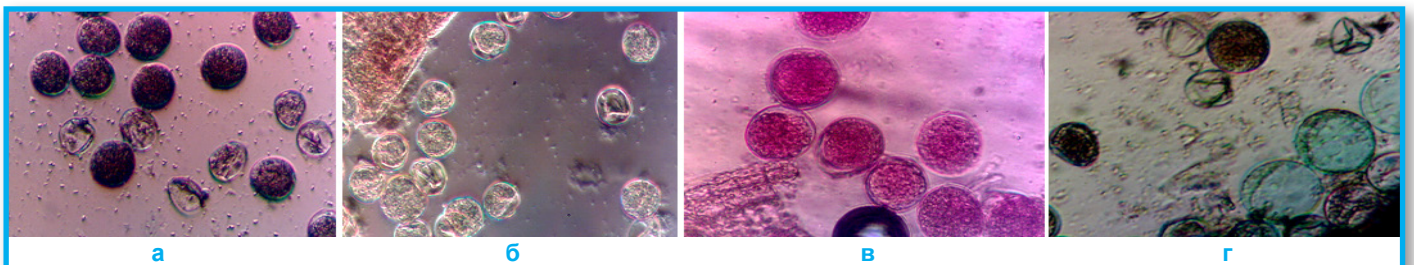


Рис. 4 Зображення фертильних і стерильних пилоквих зерен диплоїдних і тетраплоїдних форм *M. sinensis* та *M. sacchariflorus*: а) фертильні пилокві зерна розміром від 2,5 до 30 мкм у *M. sacchariflorus*; б) стерильні пилокві зерна в *M. sinensis* (2x) № 3; в) фертильні пилокві зерна в тетраплоїда *M. sacchariflorus* (4x); г) стадія вакулізації та високий відсоток дегенованих пилоквих зерен у *M. sinensis* (4x).

Таблиця 3.

Аналіз особливостей розвитку чоловічого гаметофіту тетраплоїдних форм *M. sinensis* (4x) та *M. sacchariflorus* (4x) в період цвітіння від 25 до 30 вересня 2019 року

Походження вихідного матеріалу	Плоїдність	Кількість рослин, шт	Всього пилкових зерен*, шт	із них, %		
				Стерильних $R \pm m$	нерозвинених** $R \pm m$	Фертильних $R \pm m$ ***
<i>M. sinensis</i> ecotype 1 «Poland»	2x	10	2104	8.61±0.61	-*	79.99±0.87
<i>M. sinensis</i> ecotype 1 «Poland»	4x	10	1505	56.5±1.27	20.0±1.03	13.5±0.44
<i>M. sacchariflorus</i> ecotype 1 «Poland»	2x	10	2851	9.54±0.17	-	90.46±0.55
<i>M. sacchariflorus</i> ecotype 1 «Poland»	4x	10	1015	35.8±1.48	30.7±1.45	35.5±1.5

міжвузля видно на стадії цвітіння, колоски мають квітконіжки на головному суцвітті з розгалуженням.

Встановлено, що розмір фертильних пилкових зерен у *M. sinensis* (2x) та *M. sacchariflorus* змінюється від 10 окул/мкм до 12 окул/мкм і варіює від 25 мкм до 30 мкм. У тетраплоїдних форм розмір пилкових зерен змінювався від 15 до 16 ок-мкм або 37,5–40 мкм. Фертильні та стерильні пилкові зерна диплоїдних і тетраплоїдних генеративних пагонів міскантусів зображено на рис. 4 (а, б, в, г).

Високі показники фертильності пилку спостерігали в період від 20 до 25 вересня з температурними показниками 25–30 °C і недорозвинуті були характерні для тетраплоїдних рослин за терміном цвітіння волоті від 10 до 15 жовтня.

Всі тетраплоїдні форми *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* за стерильністю й фертильністю пилкових зерен розділились на три типи:

1. З присутністю фертильних пилкових зерен і розміром від 15–16 окул/мкм

або 37,5–40 мкм (рис. 4 в). Високофертильних форм не виявлено. Часто пиляки заповнені пилковими зернами, проте їх розтріскування та висипання не спостерігали.

2. Із дегенерацією тетраплоїдних пилкових зерен на стадії вакулізації й одноядерній стадії в процесі гаметогенезу (рис. 4 г).

3. Із стерильними пиляками та пилковими зернами.

Аналіз показників якості пилкоутворюючої здатності тетраплоїдних форм *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* у порівнянні з диплоїдними вихідними формами на другий рік вегетації наведено в таблиці 3.

* всього пилкових зерен — враховане середнє значення кількості пилкових зерен у 10 вегетуючих рослин (досліджено 10 квіток в 5 полях зору за збільшення мікроскопа 12,5*20);

** нерозвинені — враховано дегенерація пилкових зерен на стадії одноядерній і стадії вакулізації;

*** $R \pm m$ — значення середнього від-

сотку R для кожної з 10 рослин за фертильними, стерильними та нерозвиненими пилковими зернами.

За результатами цитологічних досліджень, морфологічні особливості пилкових зерен від 20 по 25 вересня у вкорінених диплоїдних пагонів *M. sacchariflorus* і *M. sinensis* не відрізнялись упродовж першого й другого року вегетації, а відсоток фертильного пилку для *M. sacchariflorus* (2x) мав значення 90.46±0.55%, і для *M. sinensis* (2x) — 79.99±0.87%, і був значно вищим у порівнянні з тетраплоїдними формами, відповідно, 35.5±1.5% і 13.5±0.44% (табл. 3).

Висновки

Розроблені селективні середовища з колхіцином 0,05% і вмістом сахарози 30000 мг/л, БАП 0,2–0,5 мг/л, кінетину 0,2–0,5 мг/л, гібереліну 0,1 мг/л для індукції тетраплоїдних біотехнологічних ліній *Miscanthus sinensis* (2n=4x=76) і *Miscanthus sacchariflorus* (2n=4x=76). Найкращі показники індукції тетраплоїдів для *Miscanthus sinensis* спостерігали за терміном експозиції колхіцину 2 доби з ефективністю поліплоїдизації (Db%) — 31,25% і 21,42%, а для *Miscanthus sacchariflorus* — 2 години і 6 годин із показниками 35,0% і 27,3%. Вкорінені тетраплоїдні лінії відрізнялись від диплоїдів більшою кількістю вегетативних пагонів, які впродовж двох років вегетації, змінювались для *Miscanthus sinensis* (4x) від 39 до 50 шт, з висотою рослин від 130 до 160 см, а для *Miscanthus sacchariflorus* (4x) від 41 до 75 шт, із висотою рослин від 140 см до 195 см та більшою шириною листової пластинки *Miscanthus sinensis* (4x) 7–10 мм, а *Miscanthus sacchariflorus* (4x) — 12–15 мм.

Для формування анізоплоїдних популяцій і гібридизації міскантусів різної плоїдності необхідно враховувати таймінг цвітіння нових тетраплоїдних форм *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* упродовж останньої декади вересня другого року вегетації в природно-кліматичних умовах України.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Heaton E. A., Clifton-Brown J., Voigt T. B., Jones M. B. & Long S. P. (2004). *Miscanthus* for renewable energy generation: European Union experience and projections for Illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9, 433–451. DOI: 10.1023/B:MITI.0000038848.94134.be
2. Stampfl P. F., Clifton-Brown J. C., & Jones M. B. (2007). European-wide GIS-based modelling system for quantifying the feedstock from *Miscanthus* and the potential contribution to renewable energy targets. *Global Change Biology Bioenergy*, 13, 2283–2295. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2007.01419.x
3. Hastings A., Clifton-Brown J., Wattenbach M., Mitchell C. P., Stampfl P. & Smith P. (2009). Future energy potential of *Miscanthus* in Europe. *Global Change Biology Bioenergy*, 1, 180–196. DOI: 10.1111/j.1757-1707.2009.01012.x
4. Heaton E. A., Voigt T. & Long S. P. (2004). A quantitative review

comparing the yields of two candidate C4 perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water. *Biomass and Bioenergy*, 27, 21–30. DOI: 10.1016/j.biombioe.2003.10.005

5. Hodkinson T. R., Chase M. W., Lledo M. D., Salamin N. & Renvoise S. A. (2002). 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. *Plant Research*, 115, 381–392. DOI: 10.1007/s10265-002-0049-3

6. Maksimović J., Pivić R., Stanojković-Sebić A., Vučić-Kišgeci M. (2014). Planting density impact on weed infestation and the yield of *Miscanthus* grown on two soil types/Mol Biotechnol., Doi: 10.17221/234/2016-PSE

7. Zub H. W. & Brancourt-Hulmel M. (2010). Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30, 201–214. DOI: 10.1007/978-94-007-0394-0_21

8. Greef J. M., Deuter M., Jung C. & Schondelmaier J. (1997). Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 185–195. <https://doi.org/10.1023/A:1008693214629>

9. Atkinson C. J. (2009). Establishing perennial grass energy crops in the UK: A review of current propagation options for *Miscanthus*. *Biomass and Bioenergy*, 33, 752–759. DOI: 10.1016/j.biombioe.2009.01.005

10. Gubis'ova M., Gubis' J., Z'ofajova A., Miha'lik D. & Kraic J. (2013). Enhanced in vitro propagation of *Miscanthus 9 giganteus*. *Industrial Crops and Products*, 41, 279–282. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.05.004

11. Rayburn A. L., Crawford J., Rayburn C. M. & Juvik J. A. (2009). Genome size of three *Miscanthus* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27, 184–188. DOI: 10.1007/s11105-008-0070-3

12. Lewandowski I. Combustion quality of biomass: practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*/ Lewandowski I, Kicherer A. // *European Journal of Agronomy*.— 1997. — № 6. — P.163–177. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(96\)02044-8](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(96)02044-8)

13. Huisman W. Modeling of the equilibrium moisture content (EMC) of *Miscanthus (Miscanthus x giganteus)* / W. Huisman// *Biomass for energy, environment, agriculture and industry*. Oxford: Elsevier.— 1998.— P. 361–371

14. Chramiec-Głębik A. Cytogenetic analysis of *Miscanthus x giganteus* and its parent forms/ Chramiec-Głębik A., Grabowska-Joachimiak A., Sliwinka E., Legutko J., Kula A. *Caryologia*.— 2012.— 65, 3.— P. 234. DOI: 10.1080/00087114.2012.740192

15. Sacks E. J., Juvik J. A., Lin Q., Stewart J. R. & Yamada T. (2013). The gene pool of *Miscanthus* species and its improvement. In A. H. Paterson (Ed.), *Genomics of the Saccharinae* (Vol. 11, pp. 73–100)., *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* New York: Springer. DOI: 10.1007/978-1-4419-5947-8_4

16. Clark L. V., (2015) Genetic structure of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus sacchariflorus* in Japan indicates a gradient of bidirectional but asymmetric introgression. Clark L. V., Stewart J. R., Nishiwaki A., Toma Y., Kjeldsen J. B., Jørgensen U., Zhao H., Peng J., Yoo Ji H., Heo K., Yu Ch. Y., Yamada T. and Sacks E. J. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/eru511

17. Wang N, Borrell J. S., Bodles W. J. A., Kuttapitiya A., Nichols R. A., Buggs R. J. A. (2014). Molecular footprints of the Holocene retreat of dwarf birch in Britain. *Molecular Ecology* 23, 2771–2282, DOI: 10.1111/mec.12768.

18. Glowacka K, Clark LV, Adhikari S et al. (2014). Genetic variation in *Miscanthus x giganteus* and the importance of estimating genetic distance thresholds for differentiating clones. *GCB Bioenergy* doi: 10.1111/gcbb.12166.

19. Nishiwaki A. Discovery of natural *Miscanthus (Poaceae)* triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan./ Mizuguti A., Kawabata S, Yo Toma, Genki Ishigaki, Tomomi Miyashita, Toshihiko Yamada, Hiroya Matuura, Sachi Yamaguchi, A. Lane Rayburn, Ryo Akashi, J. Ryan Stewart. // *American Journal of Botany*.— 2011.-V.98.— P. 154–159. Doi:10.3732/ajb.1000258

20. K. Y. Lee. Botanical and germinating characteristics of *Miscanthus* species native to Korea/ Lee K. Y., Zhang L., Lee G.-J.// *Horticulture, Environment, and Biotechnology*.— 2012.— № 53.— P.49–54. DOI: 10.1007/s13580-012-0137-9

21. Roik M. V. *Miscanthus*: genetic diversity and a method of ploidy variability identification using fluorescent cytophotometry/ Roik M. V., Kovalchuk N. S. / *Agricultural Science and Practice* 2017/11, p. 19–27, ISSN: 2312–3370, DOI: <https://doi.org/10.15407/agrisp4.03.019>

22. Ковальчук Н. С., Роїк М. В., Недяк Т. М. Державний патент — Спосіб визначення структури каріотипу садивного матеріалу видів роду *Miscanthus* при вегетативному розмноженні підземними кореневищами та ризомами. — № u201805791 заявлено 24.05.2018, к/м 130413

23. Tang Zh.-Q., Chen D.-L., Song Zh.-J., He Y.-Ch., Cai D.-T. (2010). In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102:213–220. DOI 10.1007/s11240-010-9724-6

24. Pausheva Z. P. Practical course on plant cytology. Moscow: Kolos. 1980: p. 300.

АНОТАЦІЯ

УДК 633.63.631.581.3

Перспективи й методи поліплоїдної селекції нових високопродуктивних клонів міскантусів у природно-кліматичних умовах України
Роїк М. В., академік НААН, д. с.-г. наук, ІБКІЦБ;
Ковальчук Н. С., зав. лаб. цитогенетики, с. н. с., ІБКІЦБ;
Зінченко О. А., учений секретар адміністративного управління ІБКІЦБ, к. с.-г. наук;

Гументик М. Я., зав. лаб. технології вирощування біоенергетичних культур ІБКІЦБ, к. с.-г. наук;

Гончарук Г. С., зав. лаб. технології вирощування біоенергетичних культур Ялтушківської ДСС, к. с.-г. наук.

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН, вул.

Клінічна, 25, Київ, 03110, Україна

Тел. (044) 275–50–00, факс (044) 275–50–00. E-mail: sugarbeet@ukr.net; www.sugarbeet.com.ua.

Мета. Розширити ознакову колекцію вихідних матеріалів представників роду *Miscanthus* (Anderson) і генетичну базу для нових алотриплоїдних клонів, шляхом переведення на тетраплоїдний рівень компонентів для гібридизації, природних диких видів *Miscanthus sinensis* і *Miscanthus sacchariflorus*. **Методи.** Цитологічні, біотехнологічні, флюоресцентної цитофотометрії, польові, лабораторні. **Результати.** Встановлено ефективність поліплоїдизації для індукції нових тетраплоїдних форм міскантусів у рідких живильних середовищах із колхіцином, відсоткова частка якого складає 0,05%, а для стабілізації міксоплоїдних пагонів 0,005% упродовж 6 годин культивування. Досліджувальний термін експозиції для *Miscanthus sinensis* ($2n=2x=38$) і *Miscanthus sacchariflorus* ($2n=2x=38$) від 2 годин до 3 діб залежно від генетичного походження матеріалу, з переведенням на безгормональне середовище. Найкращі показники індукції тетраплоїдів для *Miscanthus sinensis* спостерігали за терміном експозиції колхіцину 2 доби з ефективною поліплоїдизації (Db%) — 31,25% і 21,42%, а для *Miscanthus sacchariflorus* — 2 години і 6 годин з показниками 35,0% і 27,3%. Вдосконалено технологію переведення вкоріненних культуральних пагонів у ґрунт в умовах СТК Ялтушківської ДСС і встановлено склад ґрунтової суміші, що забезпечувала 99% вкорінення культуральної розсади за умов вологості від 60–70% і температури повітря від 35 °С до 55 °С. **Висновки.** Створені нові тетраплоїдні біотехнологічні лінії *Miscanthus sinensis* ($2n=4x=76$) і *Miscanthus sacchariflorus* ($2n=4x=76$) в умовах рідких живильних середовищ із колхіцином із вагою часткою 0,05%. Досліджено, що цвітіння нових тетраплоїдних клонів спостерігається в умовах України на другий рік вегетації впродовж останньої декади вересня та початку жовтня з формуванням фертильних пилкових зерен.

Ключові слова: *Miscanthus giganteus*, *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus*, аналізатор плідності (АП) «Partec», колхіцин, рівень плідності геному, культура in vivo та in vitro, біоенергетика, гістограми ядерної ДНК.

ABSTRACT

UDC633.63.631.581.3

Prospects and methods of polyploid selection of new high-yielding miscanthus clones in the natural climatic conditions of Ukraine.

M. V. Roik, Academician of NAAS, Doctor of Agricultural Sciences, IBCSB;

N. S. Kovalchuk, head of the Laboratory of Cytogenetics, IBCSB;
O. A. Zinchenko, Secretary of the Administrative Department of the IBCSB, Candidate of Agricultural Sciences;

M. Ya. Humentyk, head of the Laboratory of the Cultivation Technologies for Bioenergy Crops, IBCSB, Candidate of Agricultural Sciences;

H. S. Honcharuk, head of the Laboratory of the Cultivation Technologies for Bioenergy Crops, Yaltushkiv EBS of the IBCSB, Candidate of Agricultural Sciences.

Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beets NAAS, 25 Klinichna St. Kyiv 03110, Ukraine

Tel. (+380) 44 275 50 00, (+380) 275 50 00. Email: sugarbeet@ukr.net; www.sugarbeet.com.ua

Purpose. Expanding the breeding trait collection of breeding genotypes of the genus *Miscanthus* (Anderson) and the genetic basis for new allotriploid clones by transferring components for hybridization of natural wild species *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus sacchariflorus* to the tetraploid level.

Methods. Cytological, biotechnological, fluorescent cytophotometry, field, laboratory. **Results.** The efficiency of polyploidisation for induction of new tetraploid forms of *Miscanthus* in liquid nutrient media supplemented with colchicine (0.05% mass) and for stabilization of myxoploid shoots (0.005% mass) for 6 h of cultivation is examined. The period of exposure for *Miscanthus sinensis* ($2x=2x=38$) and *Miscanthus sacchariflorus* ($2x=2x=38$) varied from 2 hours to 3 days depending on the genetic origin of the material, with transfer to a hormonal environment. The best indicators of tetraploid induction for *Miscanthus sinensis* were observed for the exposure period of 2 days with polyploidization efficiency (Db%) of 31.25% and 21.42%, and for *Miscanthus sacchariflorus* 2 and 6 hours with 35.0% and 27.3%, respectively. The technology of transferring rooted shoots into the soil on the Yaltushkiv Experimental Breeding Farm was improved and the composition of the soil mixture that provided 99% rooting of culture seedlings at a humidity of 60–70% and air temperature of 35–55 °C was found. **Conclusions.** New biotechnological tetraploid lines of *Miscanthus sinensis* ($2xn=4x=76$) and *Miscanthus sacchariflorus* ($2xn=4x=76$) were created in the conditions of liquid nutrient media supplemented with colchicine (0.05% mass). It is investigated that flowering of new tetraploid clones in the conditions of Ukraine for the second year of vegetation occurs from late September to early October with formation of fertile pollen grains.

Keywords: *Miscanthus giganteus*, *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus*, PARTEC ploidy analyzer (PA), colchicine, genome ploidy level, in vivo and in vitro culture, bioenergy, nuclear DNA histograms.