

# КЛОНАЛЬНЕ МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ МІСКАНТУСУ, ЯК СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ

БЕХ Н.С. - ст.н.с.,  
 КОЦАР М.О. - м.н.с.

(Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України)

**Вступ.** Екологічні проблеми та зменшення кількості традиційних джерел енергії створюють необхідність пошуку нових енергетичних ресурсів. Серед найбільш продуктивних біоенергетичних культур з високим адаптивним потенціалом є міскантус [1]. Міскантус використовують як декоративну культуру, для озеленення, для боротьби з ерозією ґрунтів, у целюлозно-паперовій промисловості, для виробництва будівельних матеріалів та в якості біоенергетичного палива.

Для комерційного використання на біопаливо вирощують переважно *Miscanthus x giganteus*, який є триплоїдним гібридом, не утворює насіння, бо має стерильний пилок і розмножується вегетативно – ризомами. Рослини, отримані поділом кореневищ, відтворюють генотип триплоїдного гібрида, але мають невеликий коефіцієнт розмноження.

Тому ефективність вегетативного розмноження *Miscanthus x giganteus* та інших видів міскантусу значною мірою залежить від умілого використання традиційного методу поділу кущів на ризоми з біотехнологічним методом клонального мікророзмноження, який дозволить збільшити кількість посадкового матеріалу і зберегти при цьому генетичну ідентичність вихідної форми [2].

Метод клонального мікророзмноження з успіхом використовують для розмноження й отримання посадкового безвірусного матеріалу у різних видів рослин [3]. За даними досліджень на багатьох культурах встановлено, що у репродукованої культури тканин не зустрічаються видимі морфологічні відхилення. Зберігається специфіка вуглеводного обміну, який характерний для вихідної материнської форми. Упродовж культивування майже не змінюється якісний склад білків. Генетична стабільність ізольованих клонів спостерігається навіть після багатьох пасажів, що відкриває великі можливості для відтворення та збереження генофонду рослин [4, 5].

Метод клонального мікророзмноження дозволяє використовувати для подальшого множення різні експланти: сплячі бруньки, листя, міжвузля, проростки, насіння. Але таке множення потребує конкретизації методу для кожної

Таблиця 1.

Клональне розмноження міскантусу *in vitro*

Селекційний номер	Кількість новоутворених пагонів, шт.	Висота пагонів, см	Укорінення пагонів, %	Кількість коренів, шт.	Довжина коренів, см
M.x giganteus	8,0	9,5	71,6	4,9	1,3
M. sinensis	9,8	10,5	82,6	6,2	1,1
M. sinensis Early	11,9	5,6	94,2	14,7	1,4
M. sacchariflorus	9,9	7,5	98,2	12,5	2,2
M. sinensis Late	7,3	6,8	92,9	14,3	1,4
M. sinensis New	7,8	10,0	84,9	7,0	1,2
HIP05	5,04	1,96		2,29	0,33

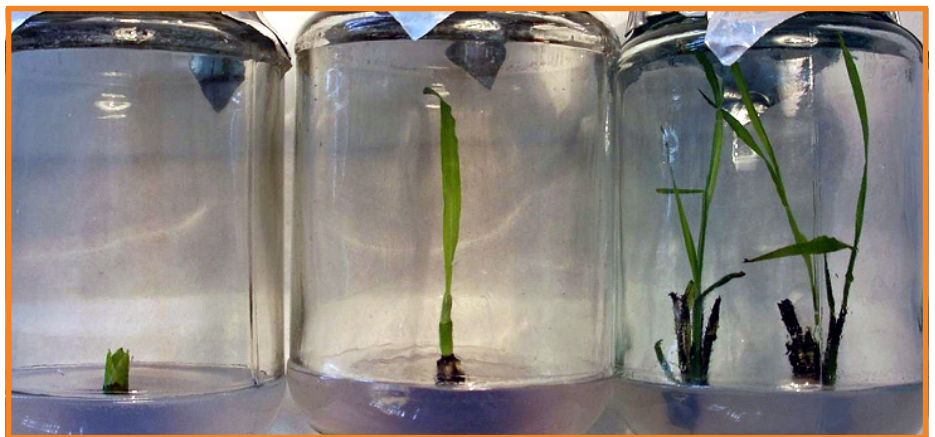


Рис. 1. Клональне мікророзмноження міскантусу із ризом

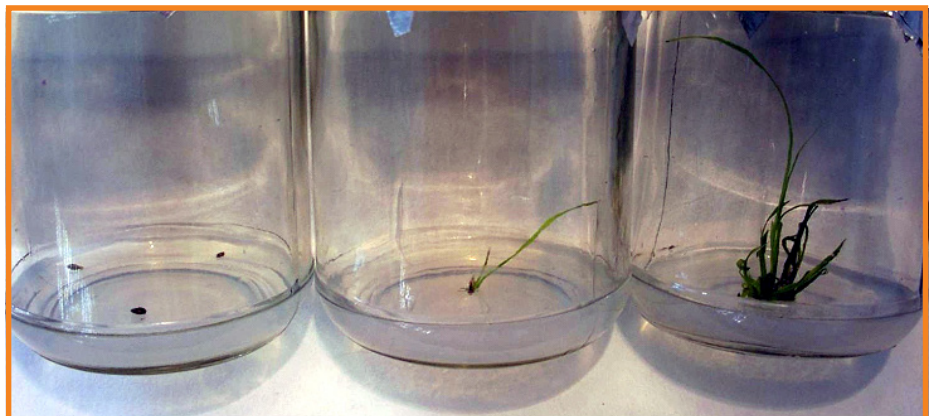


Рис. 2. Отримання культури міскантусу з насіння



Рис. 3. Культура *Miscanthus sinensis* ( $2n=38$ )

Рис. 4. Ризогенез в культурі міскантусу



Рис. 5. Вегетаційна ділянка міскантусу – другого року вегетації

культури в зв'язку з особливостями її генотипу. Важливу роль для клонування *in vitro* мають такі фактори, як сортові та видові особливості, стан і походження експланта, склад живильного середовища та умови культивування експлантів. Метою досліджень є розробка методу клонального мікророзмноження міскантусу для отримання додаткового посадкового матеріалу.

#### Матеріали і методика досліджень.

Дослідження проводили в секторі культури клітин і тканин *in vitro* та на вегетаційній ділянці «Батиева гора» Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків у 2012-2014 роках.

Вихідним матеріалом для отримання пагонів використовували ризоми зі сплячими бруньками 2 року життя триплоїдного гібриду *Miscanthus x giganteus* ( $3x=57$ ) та насіння диплоїдних форм *Miscanthus sinensis* ( $2n=38$ ), *M. sacchariflorus* ( $2n=38$ ), *M. sinensis Late* ( $2n=38$ ), *M. sinensis Early* ( $2n=38$ ), *M. sinensis New* ( $2n=38$ ).

Для стерилізації сплячих бруньок, видалених з ризом, використовували розчин сулеми, масовою часткою 0,2%. Для стерилізації насіння – розчин відбілювача «Білізна», масовою часткою 30% за різних експозицій. Перед введенням в стерильну культуру експланти витримували 30 хв. у мильному розчині з аерацією на струнувачі. Для видалення мильного розчину з поверхні експлантів їх промивали 3-4 рази дистильованою водою. Для підвищення ефекту стерилізації застосовували додаткову обробку (10 хв.) в слабкому розчині  $KMnO_4$ . Після стерилізації експланти промивали 4 рази з інтервалом 15 хв. стерильною дистильованою водою.

Для клонального мікророзмноження міскантусу була розроблена схема зміни живильних середовищ від першого пасажу до отримання укорінених рослин. Спочатку вільні від інфекції експланти висаджували на живильне середовище Мурасіге і Скуга без гормонів – МС№1. На ньому відбирали стерильні проростки. Для клонування асептичні пагони пересаджували на модифіковане середовище – МС№2, яке містило БАП – 0,8 мг/л, кінетин – 1 мг/л, мезоінозит – 100 мг/л, цукроза – 30 г/л.

Останній пасаж перед укоріненням проводили на середовищі без БАП – МС№3. Отримані пагони переносили на середовище для укорінення – МС№4 з НОК – 0,5 мг/л, ІОК – 0,5 мг/л, мезоінозит – 100 мг/л, цукроза – 30 г/л.

Культивування проводили в термальном приміщенні при температурі  $24 \pm 2^\circ C$ , освітленні 3 тис. люкс, відносній вологості – 70-75%. Інтервал між пасажми – 2 місяці.

Посадку рослин у ґрунт проводили безпосередньо з культури *in vitro*. Вирощування рослин міскантусу проводили



без внесення мінеральних добрив на світло-сірому лісовому слабко кислому ґрунті (рН=5,4), за умов регулярного зрошення.

Отримані результати обробляли згідно загальноприйнятих методів [6].

**Результати досліджень.** Як показали дослідження, для звільнення від інфекції ризом доцільно проводити стерилізацію розчином сулеми з експозицією 90 хв., що забезпечує 92% звільнення від інфекції бруньок, здатних до проростання (рис. 1). Для стерилізації насіння оптимальною є експозиція 50-60 хв. За даних умов було отримано 82,0-93,7% вільного від інфекції насіння (рис. 2).

При клонуванні *in vitro* селекційних зразків міскантусу встановили вплив генотипу на органогенез. Спостерігали варіювання показників коефіцієнту розмноження, висоти пагонів та здатності до ризогенезу (табл. 1).

Проведений дослід показав, що диплоїдні генотипи міскантусу мають більший коефіцієнт розмноження, ніж триплоїдна форма *M. x giganteus*. Найкращий результат пагоноутворення отримано у *M. sinensis* - 9,8 шт., *M. sacchariflorus* - 9,9 шт., *M. sinensis Early* - 11,9 шт. Кількість новоутворених пагонів у *M. x giganteus* становив 8,0 шт. За однакових умов культивування висота пагонів різних генотипів коливалась в межах 5,6-10,5 см (рис. 3).

Ефективність середовища МС№4 була досить високою, утворення коренів спостерігали на 10-14 добу у всіх дослідних генотипах. Більшу коренеутворюючу здатність мали *M. sinensis Late*, *M. sinensis Early*, *M. sacchariflorus* - 92,9-98,2%. Клони даних селекційних зразків утворювали від 12,5 до 14,7 коренів на один пагін, при довжині 1,4-2,2 см (рис. 4). Коренеутворююча здатність пагонів *M. x giganteus* була теж достатньою і становила 71,6% укорінених рослин, які мали до 4,9 коренів довжиною 1,3 см.

Вегетаційний дослід було закладено у травні 2013 року. При посадці рослин з культури *in vitro* у ґрунт необхідною умовою є накривання їх ізоляційними ковпачками для створення мікроклімату на 7-10 діб. Польові дослідження показали, що приживлюваність культуральних рослин без адаптації була досить високою у всіх генотипів і становила 88,0-98,3% (табл. 2). В кінці вегетаційного періоду висота рослин різних форм міскантусу варіювала в межах 65-127 см, при цьому кількість пагонів становила від 6 до 12 шт.

На зимовий період однорічні рослини міскантусу з *in vitro* залишили не укритими. Підрахунок живих рослин проводили у квітні 2014 року. Кількість рослин, що вимерзли була незначною. Коефіцієнт витривалості до холоду становив 79-99% (рис. 5).

Таблиця 2.

Розвиток рослин міскантусу з *in vitro* в умовах *in vivo* без акліматизації

Селекційний номер	*, %	Місяць вегетації	К-сть пагонів, шт..	Висота рослин, см	К-сть листків, шт..	Довжина листків, см	Ширина листка, см	** , %
M. giganteus	88,3	I	4	38	7	20	0,6	89
		II	5	69	9	36	0,8	
		III	11	70	10	42	0,9	
M. sinensis	98,3	I	4	35	5	21	0,4	99
		II	7	77	8	41	0,6	
		III	12	127	8	68	0,8	
M. sinensis Early	88,0	I	3	17	5	11	0,5	79
		II	4	38	6	20	0,7	
		III	7	95	8	47	1,2	
M. sacchariflorus	92,5	I	4	31	5	20	0,6	98
		II	5	48	6	33	0,8	
		III	9	65	6	44	0,9	
M. sinensis Late	93,3	I	3	26	5	16	0,6	94
		II	3	46	7	26	0,8	
		III	6	75	8	39	1,1	
HIP05			1,38	7,10	1,91	2,53	0,16	

\* - коефіцієнт приживлюваності, \*\* - коефіцієнт витривалості до холоду

**Висновки**

Розроблений метод клонального мікророзмноження міскантусу дозволяє отримати з одного введенного експланту до тисячі укорінених рослин.

Рослини міскантусу з культури *in vitro*

мають високі показники приживлюваності і витривалості до зимового періоду в умовах північної України, що дозволить використовувати метод клонування для отримання якісного посадкового матеріалу.

**Використана література**

- Гументик М. Я. Перспективи вирощування багаторічних злакових культур для виробництва біопалива // Цукрові буряки. – 2010. - №4. – С. 21-22.
- Муромцев Г. С., Бутенко Р. Г., Тихоненко Г. И., Прокофьев М. И Основы сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: Агропромиздат. – 1990 – 384 с.
- Hussey G. Vegetative propagation of plants by tissue culture // Plant Cell Culture Technology. - Oxford e.a. – 1989. – p. 29-66.
- Зубенко В. Ф. Состояние и перспективы использования биотехнологических методов в селекции сахарной свеклы. Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. - М.: Агропромиздат. – 1989. – С. 3-7.
- Ильенко И. И. Микроразмножение и сохранение селекционного материала сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Физиология и биохимия культ. раст. – 1983.- Т.15. –№ 4. – С. 351-355.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М., 1985. – 315 с.

**Анотація**

У статті наведено результати дослідження по клональному мікророзмноженню різних форм міскантусу та адаптації рослин з умов *in vitro* в ґрунт. Наведені коефіцієнти розмноження *in vitro*, коефіцієнти приживлюваності *in vivo*, показники наростання рослин міскантусу першого року вегетації.

**Ключові слова:** міскантус, *in vitro*, *in vivo*, клонування, адаптація.

**Аннотация**

В статье приведены результаты исследования по клональному микроразмножению различных форм мискантуса и адаптации растений из условий *in vitro* в почву. Приведены коэффициенты размножения *in vitro*, коэффициенты приживаемости *in vivo*, показатели нарастания растений мискантуса первого года вегетации.

**Ключевые слова:** мискантус, *in vitro*, *in vivo*, клонирование, адаптация.

**Abstract**

The article presents the results of studies on clonal micropropagation of different forms of miscanthus and plant adaptation when transferring from *in vitro* conditions in the soil. Reproduction factor *in vitro*, survival rate coefficients *in vivo*, and productivity of miscanthus plants of the first year of vegetation are presented.

**Keywords:** miscanthus, *in vitro*, *in vivo*, cloning, adaptation.