

РОЗРОБКА ТА ВІДПРАЦЮВАННЯ МЕТОДИКИ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РОСЛИН МІСКАНТУСУ

Серед джерел відновлювальної енергії найбільш перспективним є використання біомаси [1]. Головним джерелом біомаси є біоенергетичні культури, між яких можна виділити міскантус. Завдяки його невибагливості до ґрунтових умов та рекордно високій продуктивності, яка становить близько 20–25 т/га сухої речовини, він може бути використаний в якості джерела сировини для виготовлення твердого біопалива у вигляді пілет, брикетів або тріски на паливо, а також виробництва біоетанолу [2].

Міскантус (*Miscanthus Andersson*) належить до родини багаторічних однодольних рослин родини *Poaceae*. Рослини цього роду походять з Південної і Східної Азії [3], а також поширені у субтропічних і тропічних регіонах Африки. Фотосинтез у рослин міскантусу відбувається за енергетично-ефективним С4 шляхом, що обумовлює високий вміст лігніну та лігноцелюлозних волокон. Ще одним важливим моментом є те, що тривалість комерційного використання плантації міскантусу складає близько 20 років при щорічному одержанні біомаси [4]. Серед представників роду міскантус є лише три види, що мають вагомий інтерес та потенціал як енергетичні культури, а саме: *M. sacchariflorus*, *M. sinensis* та *M. × giganteus* [5].

При введенні в асептичні умови експлантів з надземної частини рослини міскантусу легко стерилізуються. Так, наприклад, частка контамінованих експлантів при стерилізації незрілих суцвіть не перевищує 3 %. Проте при стерилізації частин ризом, які знаходяться у ґрунті, значна їх частка залишається контамінованою, що є головною перешкодою використання підземних органів як експлантів [6]. Одним з варіантів вирішення даної проблеми є додавання антибіотиків у склад живильного середовища. Так, при використанні живильних середовищ без додавання антибіотиків більш 50 % експлантів є контамінованими, а асептичні рослини можуть бути одержані лише з 10 % експлантів [7]. Водночас, додавання цефотаксиму у живильне середовище знижує рівень контамінації експлантів як для міскантусу [7], так і для цукрової тростини [8].

Отже, існує декілька проблем при введенні міскантусу в культуру *in vitro*. По-перше, залежність від сезону одержання високопродуктивних експлантів, таких як незрілі суцвіття для індукції калюсу та високий рівень контамінації експлантів при введенні в асептичні умови підземних органів рослини міскантусу. Це може бути вирішено за рахунок використання експлантів зрілого насіння, але проблема залишається невирішеною для стерильного *M. giganteus*, який нездатний продукувати життєздатне насіння. Вирішення другої проблеми можливе за рахунок використання кореневих придаткових бруньок як експлантів, що, в свою чергу, обумовлює необхідність розробки ефективного протоколу стерилізації підземних органів міскантусу.

Матеріали і методи

З метою розробки ефективного протоколу поверхневої стерилізації експлантів з підземної частини рослин міскантусу для введення в культуру *in vitro* було проведено дослідження з використанням різних схем стерилізації. У дослідженнях було використано три види міскантусу: *M. giganteus*, сорт «Гулівер»; *M. sacchariflorus*, сорт «Снігопад»; *M. sinensis*, сорт «Велетень». Рослинний матеріал для проведення дослідження був наданий з робочої колекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України. Як експланти використовували кореневі придаткові бруньки з невеликими фрагментами ризом. Експланти добиралися зі щойно викопаних та ретельно відмитих від ґрунту коренів рослин. Головними критеріями добору експлантів були оптимальний розмір адвентивних бруньок кореня (від 0,3 до 1,0 см залежно від виду міскантусу), наявність ознак життєздатності та відсутність механічних пошкоджень.

Для поверхневої стерилізації відібраних експлантів нами були застосовані декілька протоколів, які різнилися між собою за набором стерилізуючих агентів.

Варіант 1. Експланти обробляли 70 %-ним етанолом протягом 3-х хвилин при постійному помішуванні, після чого переносили до

0,04 %-ного розчину нітрату срібла (AgNO_3) із додаванням цефотаксиму у концентрації 250 мг/л (експозиція 20 хвилин при постійному перемішуванні). Подальшу обробку експлантів здійснювали у 0,15 %-ному розчині фунгіциду Превікур протягом 15 хв, після чого експланти переносили до 6 %-ного розчину перекису водню, час обробки складав 60 хв при постійному помішуванні. Після стерилізації експланти підсушувалися на стерильному фільтрувальному папері.

Варіант 2. Обробка за даним варіантом відрізнялася від попередньої лише заміщенням розчину нітрату срібла (AgNO_3) на розчин гіпохлориту натрію (NaOCl) у концентрації 9 %.

Варіант 3. Стерилізацію експлантів здійснювали за допомогою сухої обробки газом Cl_2 з експозицією 120 хв.

Варіант 4. Даний варіант передбачав обробку експлантів 70 %-ного розчину етанолу протягом 3 хв, з наступною стерилізацією їх у розчині канаміцину (500 мг/л) протягом 5 хв. та стерилізацією бордоською сумішшю протягом 20 хв при постійному помішуванні.

Варіант 5. передбачав попередню обробку відібраних експлантів у 4 %-ний розчин Tween 20 протягом 10 хв, з наступним двократним ополіскуванням стерильною дистильованою водою. Подальшу обробку здійснювали у 70 %-ному розчині етанолу протягом 3 хв при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами Цефотаксиму (250 мг/л) та Превікуру (0,15 %) із додаванням 2 %-ного Tween 20 з експозицією 20 хв, після чого експланти двічі були промиті стерильною дистильованою водою та перенесені до розчину AgNO_3 (0,02 %) із додаванням Tween 20 (2 %) на 20 хв. Після стерилізації експланти були тричі промиті стерильною дистильованою водою, 10 хв кожний та висушені на стерильному фільтрувальному папері.

Варіант 6. Цей варіант відрізнявся від попереднього лише вдвічі збільшеною концентрацією розчину AgNO_3 (до 0,04 %). Всі інші маніпуляції були ідентичні до попереднього протоколу.

Після поверхневої стерилізації експланти переносилися у чашки Петрі, які містили живильне середовище MS (Murashige and Skoog, 1962) вільне від фітогормонів. Культивування відбувалось за умов 16/8 год. фотоперіоду та температури 24 °С.

Ефективність поверхневої стерилізації експлантів здійснювали на 7-му добу культивування шляхом підрахунку кількості стерильних та контамінованих експлантів. Дані було аналізовано з

використанням програми ANOVA. Статистичний аналіз було виконано за допомогою MICROSOFT® EXCEL 2002.

Результати та обговорення

Первинне тестування всіх протоколів стерилізації здійснювали на додаткових бруньках коренів рослин *M. giganteus*. Як показали результати досліджень, найбільш ефективними протоколами поверхневої стерилізації експлантів з підземної частини рослин міскантусу виявилися варіанти, які передбачали використання нітрату срібла та гіпохлориту натрію у поєднанні з обробкою системним фунгіцидом Превікуром та антибіотиком Цефотаксимом (рис. 1). Так, ефективність обробки експлантів за варіантами 1, 2, 5 та 6 знаходилась у межах від 56 % до 63,8 %. Варіанти 3 та 4, які передбачали обробку експлантів Cl_2 та бордоською сумішшю, відповідно, були менш ефективними. Ефективність поверхневої стерилізації за даними варіантами знаходилась в межах 5,2–16,5 %, що значно нижче за показники у варіантах із використанням нітрату срібла та гіпохлориту натрію.

Порівняння варіантів із використанням нітрату срібла та гіпохлориту натрію свідчить про те, що найбільш ефективним є застосування для стерилізації експлантів з підземної частини рослин протоколів, які передбачають обробку нітратом срібла у концентрації 0,04 %. Ефективність стерилізації за даними протоколами була на рівні 63 %. При використанні нітрату срібла у концентрації 0,02 % ефективність стерилізації була дещо нижчою і знаходилась на рівні варіанта, який передбачав обробку гіпохлоритом натрію у концентрації 9 % (рис. 1).

Досить високий рівень ефективності стерилізації визначали і при обробці експлантів за протоколами відповідно до варіантів 5 та 6, які також

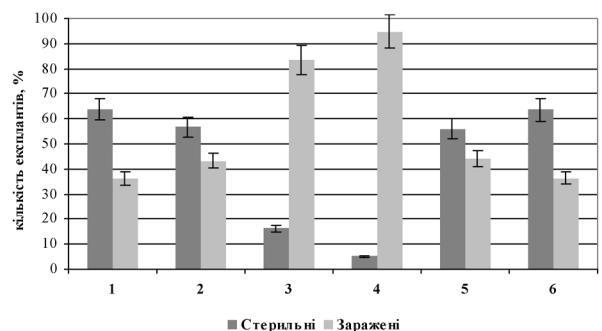


Рис. 1. Ефективність різних протоколів стерилізації експлантів *M. giganteus*

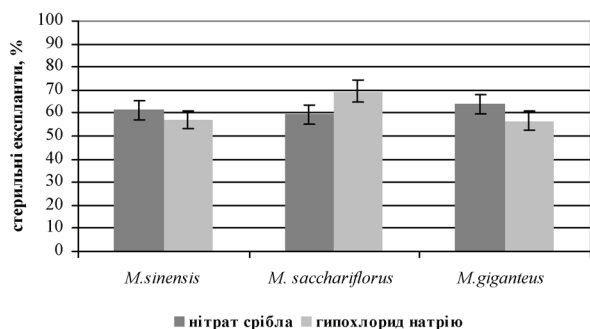


Рис. 2. Ефективність стерилізації експлантів з різних видів міскантусу

передбачали застосування AgNO_3 . Так, при обробці 0,02 %-ним розчином нітрату срібла (Варіант 5) ефективність стерилізації визначалася на рівні 56 % стерильних експлантів *M. giganteus*, а при стерилізації 0,04 % розчином кількість стерильних експлантів зростала до 63,6 %. (рис. 1). Проте використання навіть найбільш ефективних протоколів стерилізації у нашому експерименті дозволили одержати результати, де рівень зараження експлантів був досить високий, але значно перевищував за ефективністю результати інших авторів, де кількість заражених експлантів при введенні міскантусу в культуру *in vitro* із використанням підземних частин рослин значно перевищувала 50 % [6, 7].

Також нами було проаналізовано залежність рівня ефективності найбільш перспективних протоколів стерилізації, що розглянуті вище, від об'єкту. Для цього вони були протестовані на експлантах з підземної частини рослин *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* та *M. giganteus* (рис. 2) Так, нами було встановлено, що для стерилізації експлантів з придаткових бруньок коріння рослин *M. giganteus* та *M. sinensis* найбільш ефективною є протокол стерилізації за варіантом 1, яка передбачає обробку експлантів AgNO_3 у концентрації 0,04 %, фунгіцидом Превікур (0,15 %), антибіотиком Цефотаксим (250 мг/мл) та перекисом водню у концентрації 6 %. Ефективність стерилізації за даним протоколом була на рівні 61,4 % та 63,8 %, відповідно (рис. 2).

Для поверхневої стерилізації експлантів з придаткових бруньок коріння рослин *M. sacchariflorus* найбільш ефективною вияви-

лась схема стерилізації, яка передбачає обробку експлантів гіпохлоритом натрію у концентрації 9 %, фунгіцидом Превікур (0,15 %), антибіотиком Цефотаксим (250 мг/мл) та перекисом водню у концентрації 6 % (Варіант 2). Ефективність стерилізації за даним протоколом була на рівні 69,4 % (рис. 2).

Висновки

У результаті експерименту було встановлено, що найбільш ефективним протоколом поверхневої стерилізації придаткових бруньок коріння рослин *M. giganteus* та *M. sinensis* є обробка експлантів розчином нітрату срібла (AgNO_3) у концентрації 0,04 %, з додаванням у стерилізуючий розчин антибіотика Цефотаксим (250 мг/л) протягом 20 хв, при постійному помішуванні, з наступною обробкою перекисом водню у концентрації 6 %. Використання цього протоколу дозволяє одержати більше ніж 60 % стерильних експлантів. Проте у випадку *M. sacchariflorus* використання цього протоколу поверхневої стерилізації дозволяє отримати лише 59,3 % стерильних експлантів. При введенні в асептичні умови *in vitro* експлантів *M. sacchariflorus* більш ефективною виявилася схема, яка передбачає обробку експлантів розчином гіпохлориту натрія (NaOCl) у концентрації 9 %, доповненим антибіотиком Цефотаксим (250 мг/л) протягом 20 хв, при постійному помішуванні, з наступною обробкою перекисом водню у концентрації 6 %. Використання цього протоколу поверхневої стерилізації експлантів *M. sacchariflorus*, дозволяє отримати 69,4 % стерильних експлантів в умовах *in vitro*.

Можна зробити висновок, що використання ефективного протоколу стерилізації експлантів дозволяє нам введення всіх трьох тестованих в цьому експерименті видів міскантусу в культуру *in vitro*, навіть за умов використання кореневих придаткових бруньок в якості експлантів.

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

ЛІТЕРАТУРА

1. Титко Р., Калініченко В. Відновлювальні джерела енергії (Досвід Польщі для України). – Варшава: OWG, 2010. – 533 с.
2. Макаренко В. Слонова трава – прорив в сільському господарстві // Агро Перспектива. – 2012. – № 1. – С. 32–37.
3. Clifton-Brown J.C., Breuer, J., Jones M.B. ‘Carbon mitigation by the energy crop, *Miscanthus*’ // Global Change Biology. – 2007. – 13, No 11. – P. 2296–2307.
4. Зинченко В., Яшин М. Энергия Мискантуса // Леспроектинформ. – 2011. – № 6. – С. 134–140.
5. Nasir E. Bassam Handbook of bioenergy crops: A complete reference to species, development and applications, Routledge, Taylor and Francis Group Ltd, Oxford. – 2010. – 544 p.
6. Lewandowski I. Micropropagation of *Miscanthus x giganteus* // Biotech Agr Forest. – 1997. – 39. – P. 241–255.
7. Jain S.M., Dutta Gupta S. (eds.) Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops. – Springer: Dordrecht, 2013. – 247 p.
8. Khan S.A., Rashid H., Chaudhary M.F., Chaudhary Z. Optimization of explants sterilization condition in sugarcane cultivars // Pakistan J. Agric. Res. – 2007. – 20. – P. 119–123.

MELNYCHUK O.V., OZHEREDOV S.P., SEKAN A.S., BAYER G.YA., SHYSHA O.M., YEMETS A.I.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: olexandr_melnichyk@ukr.net*

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF METHOD FOR MISCANTHUS *IN VITRO* CULTURE ESTABLISHMENT

Aims. *Miscanthus* is one of the most promising plant species for the second generation technologies of biofuel production. Main advantages of *Miscanthus* are its high vegetative mass with significant content of cellulose, especially in the case of *M. giganteus*, where this parameter exceeds 70 %. Establishment of *miscanthus in vitro* culture has some difficulties due to high contamination rate of explants, especially if the latter are from underground part of plants. This problem was reported by several authors. The aim of the study was to develop an efficient protocol for root adventitious buds sterilization in three *Miscanthus* species, namely, *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* and *M. giganteus*. **Methods.** Root adventitious buds were used as explants for establishment of *in vitro* culture. For sterilization several compounds at different concentrations and different exposure time were tested, sodium hypochlorite (NaOCl) at different concentrations and silver nitrate (AgNO₃) at concentrations 0.02 and 0.04 % among them. In addition, 0.15 % fungicide (previcur) and 250 mg/l of antibiotic (cefotaxime) were present in sterilization solution. Dry sterilization with gas (Cl₂) was tested as well. **Results.** The lowest contamination rate was observed when explants were sterilized in 0.04 % solution of AgNO₃, less efficient yet satisfactory results were obtained after sterilization in 9 % NaOCl solution. **Conclusions.** Application of efficient sterilization protocols allows us to establish *in vitro* culture for all of three *Miscanthus* species tested in the experiment and to use root adventitious buds as explants.

Keywords: surface sterilization, explants, tissue culture, *Miscanthus*, *in vitro* culture, establishment, root adventitious buds.