

МЕЛЬНИЧУК О. В.^{1✉}, ОЖЕРЄДОВ С. П.¹, РАХМЕТОВ Д. Б.², РАХМЕТОВА С. О.², БАЄР О. О.¹, ШИША О. М.¹, ЄМЕЦЬ А. І.¹, БЛЮМ Я. Б.¹

¹ Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: olexandr_melnichuk@ukr.net

² Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України, Україна, 01014, м. Київ, вул. Тімірязєвська, 1

✉ olexandr_melnichuk@ukr.net, (050) 938-96-58, (098) 938-96-58

ПОЛІПЛОЇДИЗАЦІЯ *MISCANTHUS SINENSIS* ЗА ДОПОМОГОЮ ДИНІТРОАНІЛІНІВ З НИЗЬКОЮ ФІТОТОКСИЧНІСТЮ

Мета. Метою роботи було отримання поліплоїдних ліній міскантусу китайського (*Miscanthus sinensis*) з використанням сполук динітроанілінового ряду з низькою фітотоксичністю. **Методи.** Експерименти проводили в умовах *in vitro*. Асептичні пагони *M. sinensis* культивували на середовищах за наявності різних сполук динітроанілінового ряду, використовуючи як контроль раніше вже апробовані динітроаніліни – оризалін та трифлуралін. **Результати.** За умов культивування асептичних пагонів *M. sinensis* на середовищі з додаванням оризаліну та трифлураліну у концентрації 10 мкМ виживання експлантів становило від 23,52 до 44,4 %. Проте за додавання в середовище тестованих динітроанілінів (N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметил-феніл]пропіл) морфолін та 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідро хлорид) у концентрації 10 мкМ виживання експлантів було в межах 95–96,5 %. **Висновки.** Досліджено можливість використання нових антимиотичних сполук динітроанілінового ряду з низьким рівнем фітотоксичності з метою отримання поліплоїдних ліній *M. sinensis* для подальшого їх використання у селекційному процесі. Зроблено висновок, що N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметил-феніл]пропіл) морфолін та 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид) можуть розглядатися як перспективні індуктори поліплоїдизації міскантусу китайського у порівнянні з відомими класичними сполуками динітроанілінового ряду (оризалін та трифлуралін).

Ключові слова: динітроаніліни, *in vitro*, поліплоїдизація, *Miscanthus sinensis*.

Рід Міскантус (слонова трава, або віяльник) (*Miscanthus Anderss*) об'єднує багаторічні трав'янисті рослини з родини тонконогових (Poaceae), серед яких найбільшого розповсюдження набув міскантус гігантський (*Miscanthus giganteus*). Саме міскантус гігантський, як рослина з фотосинтезом по C₄-шляху, стала надзвичайно популярною серед енергетичних культур для регіонів із помірним кліматом завдяки багатьом показникам, а саме високому рівню врожайності за біомасою, невибагливості до ґрунтових умов та холодостійкості [1]. Ця культура є гібридом міскантусу китайського (*M. sinensis*) та міскантусу цукроцвітного (*M. sacchariflorus*), який за своєю природою є нефертильним триплоїдом. Щоб вирішити цю проблему, періодично здійснюються спроби вирішити проблему ефективною поліплоїдизацією міскантусу гігантського [2].

Поліплоїдні рослини здебільшого переважають диплоїдні форми, маючи кращі показники продуктивності [3], і тому широко використовуються у сільському господарстві [3, 4]. Оскільки останнім часом один із батьківських видів *M. giganteus*, а саме міскантус китайський, також став привертати увагу як потенційне джерело целюлозомісткої сировини [5], його поліплоїдизація також могла би розглядатися як можливість біоенергетичної продуктивності цієї культури. Враховуючи наш попередній успішний досвід із поліплоїдизації міскантусу гігантського, метою нашого нинішнього дослідження стало отримання поліплоїдних ліній *M. sinensis* із використанням нових антимиотичних речовин динітроанілінового ряду, які вже зарекомендували себе як ефективні індуктори поліплоїдизації.

© МЕЛЬНИЧУК О. В., ОЖЕРЄДОВ С. П., РАХМЕТОВ Д. Б., РАХМЕТОВА С. О., БАЄР О. О., ШИША О. М., ЄМЕЦЬ А. І., БЛЮМ Я. Б.

Матеріали і методи

Як вихідний матеріал у дослідях із поліплоїдизації *M. sinensis* використовували рослини сорту «Велетень», отримані з робочої колекції Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України. Як експланти використовували кореневі придаткові бруньки з невеликими фрагментами ризом. Матеріал добирали зі свіжих та ретельно відмитих від ґрунту коренів рослин. Головними критеріями їх відбору були оптимальний розмір адвентивних бруньок кореневищ (0,3–1 см), наявність ознак життєздатності та відсутність механічних пошкоджень. Поверхневу стерилізацію експлантів проводили в ламінарному боксі. Процедура стерилізації передбачала їх попередню обробку 50 %-ним розчином комерційного препарату «Білизна» (3 %-ний розчин гіпохлориту натрію) протягом 20 хв з постійним помішуванням, промивку стерильною водою та видалення поверхневих лусок і частини ризом із бруньок в асептичних умовах. Підготовлені експланти повторно стерилізували у 0,08 %-ному розчині нітрату срібла (AgNO_3) протягом 20 хв із постійним помішуванням, тричі промивали стерильною водою (протягом 10 хв кожного разу) [2, 6]. Стерилізовані експланти культивували на твердому середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [7], використовуючи цукрозу (30 г/л) як джерело вуглецю. Для зниження рівня накопичення фенольних сполук середовище доповнювали 50 мг/л цистеїну [8]. Культивування відбувалося за умов 16/8 год фотоперіоду за температури 24°C.

Із метою одержання необхідної кількості пагонів для поліплоїдизації шляхом культивування асептичних пагонів на середовищах, доповнених динітроанілінами, використовували тверде середовище МС з додаванням як джерела вуглецю 30 г/л цукрози. Середовище доповнювали 50 мг/л цистеїну [8]. Для активного формування адвентивних бруньок, пагоноутворення та росту пагонів у середовище додавали 6-бензиламінопурин (БАП) у концентрації 2 мг/л. Культивування відбувалося за умов 16/8 год фотоперіоду за температури 24°C.

У дослідженнях використовували нові сполуки динітроанілінового ряду $\text{N}'\text{-(N}'\text{''-[2,6-динітро-4-трифторметил-феніл]пропіл)}$ морфолін (сполука 1) та $1\text{-}\{3\text{-}\{2\text{-}(2,6\text{-динітро-4-трифторметил-феніламіно})\text{-етил}\}\text{-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}\}\text{-етанон гідроклорид}$ (сполука 2) [9]. Для порівняння їх

ефективності використовували оризалін та трифлуралін.

Поліплоїдизацію *M. sinensis* проводили шляхом культивування асептичних пагонів на середовищах для мікроклонального розмноження з додаванням антимиотичних речовин у концентрації 10 мкМ протягом 7 та 14 діб із наступним перенесенням їх на вільне від антимиотичних речовин середовище. Культивування відбувалося за умов 16/8 год фотоперіоду за температури 24°C. Облік живих пагонів здійснювали на 30-ту добу після початку культивування. Отримані пагони після обліку сепарували на окремі лінії та розмножували для проведення подальшого підрахунку кількості хромосом.

Визначення рівня плоїдності отриманих ліній міскантусу проводили шляхом підрахунку кількості хромосом у клітинах апікальної меристеми коренів. Зразки обробляли фіксатором Кларка (суміш 96 %-ного етилового спирту та льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1) протягом 18 год. за температури 18–20°C та відмивали 70 %-ним розчином етилового спирту [10]. Надалі корені проростків мацерували в 1Н НСІ та фарбували 1 %-ним розчином орсеїну або карміну в 45 %-ній оцтовій кислоті. Тимчасові давлені препарати готували в 45 %-ному розчині молочної кислоти [11]. Дослідження проводили з використанням мікроскопа Axioscop 40 (Zeiss, ФРН). Фотографії були зроблені камерою AxioCam MRC 5 (Zeiss) та оброблені за допомогою програмного забезпечення Axivision Rel. 4.7.

Результати та обговорення

Через 30 днів після початку культивування пагонів *M. sinensis* на середовищі з динітроанілінами пагони, що вижили та були вегетативно розмножені, сепарували на окремі лінії та переміщували до пробірок зі свіжим живильним середовищем. Як свідчать отримані результати, експериментальні динітроанілінові сполуки виявляли суттєво нижчий рівень фітотоксичності у порівнянні з оризаліном та трифлураліном. Так, пагони, які культивували на середовищі з додаванням оризаліну, мали більш пригнічений вигляд та істотно поступалися за розмірами пагонам, що культивувалися на середовищах із новими динітроанілінами за коефіцієнтом вегетативного розмноження (рис. 1).

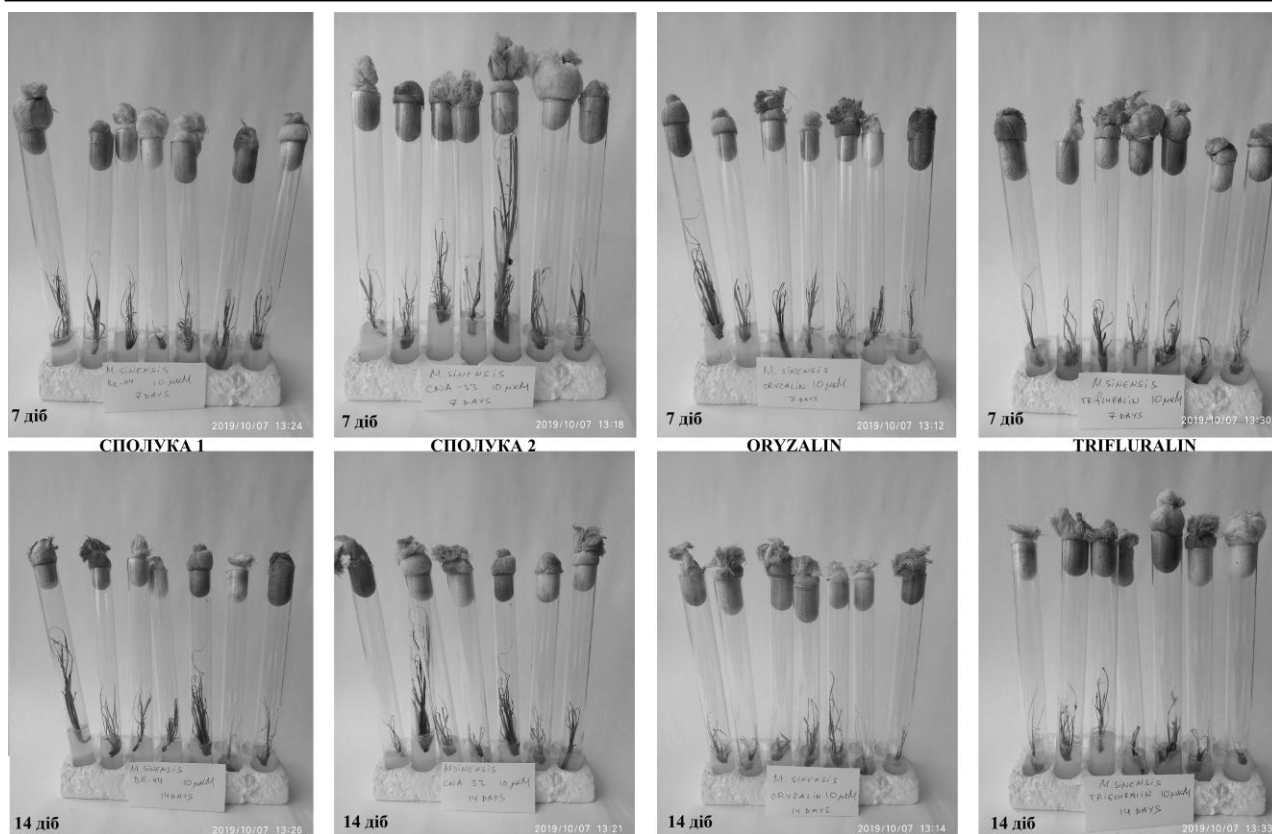


Рис. 1. Пагони *M. sinensis* після культивування на середовищах з динітроанілінами у концентрації 10 мкМ та тривалістю 7 і 14 діб (на 30 добу після початку культивування).

Крім того, за використання досліджуваних динітроанілінових сполук рівень виживання експлантів виявився істотно вищим у порівнянні з використанням класичних сполук динітроанілінового ряду. Так, за культивування асептичних пагонів протягом 7 діб на середовищі з додаванням оризаліну або трифлураліну у концентрації 10 мкМ виживання експлантів складало 32,53 та 44,4 % (рис. 2). Збільшення часу експозиції експлантів на середовищі із додаванням цих динітроанілінів у тій же концентрації до 14 діб призводило до зменшення кількості життєздатних експлантів до 23,52-24 % (рис. 3). Водночас рівень виживання експлантів за культивування їх на середовищі із додаванням нових експериментальних динітроанілінів у концентрації 10 мкМ та тривалістю культивування 7 діб був у межах 95,6–96,5 % (рис. 2). Збільшення часу експозиції експлантів на середовищі з новими сполуками динітроанілінового ряду до 14 днів не призводило до істотного зниження рівня виживання. Так, за культивування експлантів на середовищі з додаванням сполуки 1 (N^1 -(N^{22} -[2,6-динітро-4-трифторметил-феніл]пропіл)морфолін) рівень їх виживання складав 95 %, а під час застосування сполуки 2 (1-{3-[2-(2,6-

динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид) цей показник був на рівні 95,4 % (рис. 3).

Найнижчий рівень виживання експлантів було зафіксовано за додавання до середовища оризаліну, що свідчить про високий рівень його фітотоксичності. Аналогічні результати були отримані іншими дослідниками під час проведення поліплоїдизації різних видів міскантусу, в тому числі і *M. sinensis* в культурі *in vitro* із використанням оризаліну [12–14].

Найвищий відсоток експлантів, котрі виживали після культивування на середовищах із динітроанілінами, спостерігався за додавання в середовище сполуки 2 (1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид). Так, за обробки експлантів такою сполукою з експозицією 7 діб цей показник становив 96,5 %, а за збільшення експозиції до 14 діб виживання експлантів складало 95,4 %. Загалом у результаті проведених експериментів було отримано 465 ліній *M. sinensis*, які після накопичення достатньої кількості матеріалу будуть проаналізовані на рівень плідності.

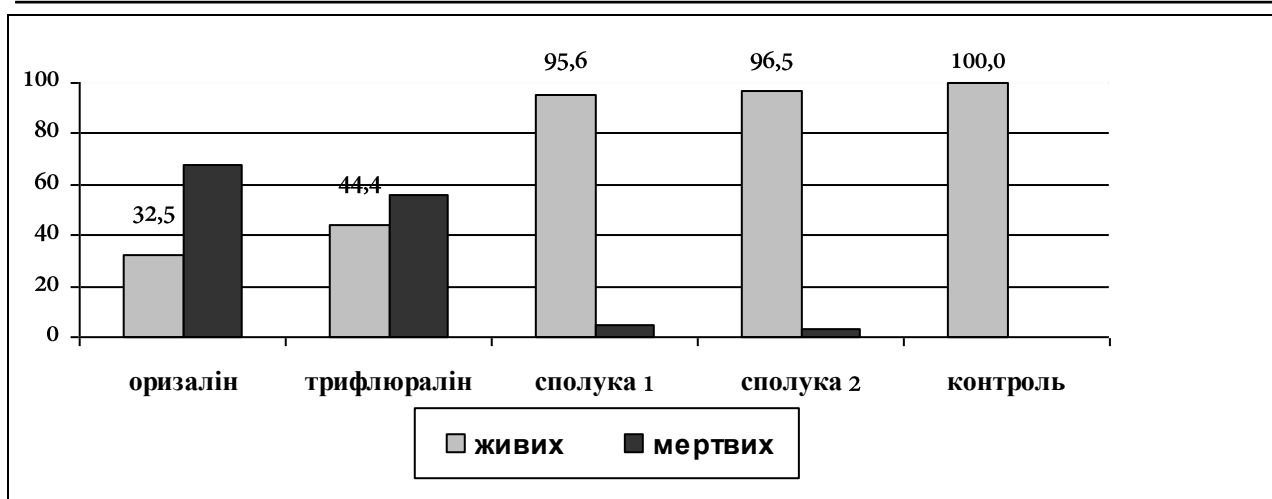


Рис. 2. Вживання експлантів *M. sinensis* після культивування на середовищах із динітроанілінами у концентрації 10 мкМ та тривалістю 7 діб (на 30 добу після початку культивування), %.

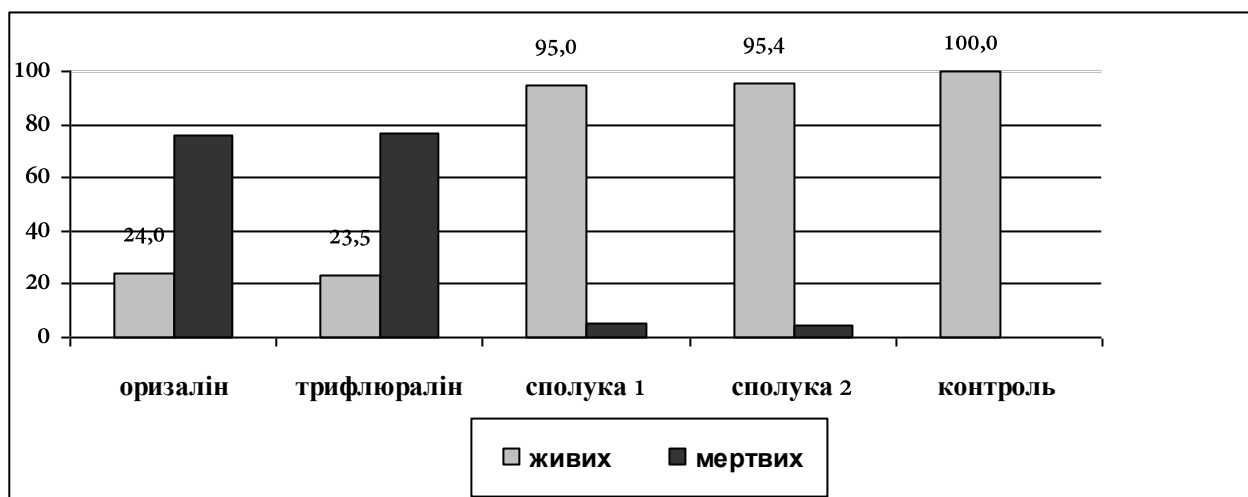


Рис. 3. Вживання експлантів *M. sinensis* після культивування на середовищах із динітроанілінами у концентрації 10 мкМ та тривалістю 14 діб (на 30 добу після початку культивування), %.

Висновки

За результатами дослідження отримано 465 ліній *M. sinensis*, що потребують подальшого аналізу. Встановлено, що такі речовини динітроанілінового ряду з антимітотичною активністю, як (N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметил-феніл]пропіл) морфолін) та (1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид), мають низький рівень фітотоксичності порівняно з класичними динітроанілінами. Також з'ясовано, що використання цих сполук є більш ефективним порівняно з класичними сполуками динітроанілінового ряду щодо вживання експлантів. Так, за додавання в

середовище нових динітроанілінів у концентрації 10 мкМ рівень вживання експлантів був у межах 95–96,5 %, тоді як за обробки експлантів класичними динітроанілінами цей показник коливався від 23,52 до 44,4 %. Наразі триває аналіз рівня плоідності та морфометричних показників отриманих ліній *M. sinensis*.

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».

References

1. Heaton E.A., Dohleman F.G., Miguez A.F., Juvik J.A., Lozovaya V., Widholm J., Zabolina 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. Vol. 56. P. 75–135.
2. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Rakhmetov D.B., Rakhmetova S.O., Sekan A.S., Bayer G.Y., Shysha O.M., Yemets A. I. *In vitro* culture establishment and polyploidization of *Miscanthus giganteus*. *Sci. Reports of NULES of Ukraine*. 2015. Vol. 57, № 8. [in Ukrainian] / Мельничук О.В., Ожередов С.П., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Секан А.С., Баєр Г.Я., Шиша О.М., Ємець А.І. Введення в культуру *in vitro* та поліплоїдизація *Miscanthus giganteus*. *Наукові доповіді Нац. ун-тету біоресурсів і природокористування України*. 2015. Т. 57, № 8. URL: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/8.pdf (дата звернення: 1.04.2019).
3. Yemets A., Blume Ya. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. *The Open Horticulture J.* 2008. Vol. 1 (1). P. 15–20.
4. Zhang K., Wang X., Cheng F., 2019. Plant polyploidy: origin, evolution, and its influence on crop domestication. *Hortic. Plant J.* 2019. Vol. 5, No. 6. P. 231–239. doi: 10.1016/j.hpj.2019.11.003.
5. Shumnyy V.K. Novaia forma miskantusa kitayskogo (veernika kitayskogo *Miscanthus sinensis* Anders.) kak perspektivnyy istochnik tselliulozosoderzhashchego syr'ia. *Vestnik VOGiS*. 2010. Т. 14, No. 1. S. 122–126. [in Russian] / Шумный В.К. Новая форма мискантуса китайского (веерника китайского *Miscanthus sinensis* Anders.) как перспективный источник целлюлозосодержащего сырья. *Вестник ВОГиС*. 2010. Т. 14, № 1. С. 122–126.
6. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Sekan O.S., Bayer G.Ya., Shysha O.M., Yemets A.I. Development and application of method for miscanthus *in vitro* culture establishment. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2015. Vol. 17. P. 209–212. [in Ukrainian] / Мельничук О.В., Ожередов С.П., Секан А.С., Баєр Г.Я., Шиша О.М., Ємець А.І. Розробка та відпрацювання методики введення в культуру *in vitro* рослин мискантусу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 17. С. 209–212.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 1962. № 15. P. 473–497.
8. 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.
9. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Rakhmetov D.B., Yemets A.I., Blume Ya.B. Screening of nitroanilines for their affinity to miscanthus α -tubulin for further *in vitro* polyploidization of miscanthus species. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2016. Vol. 18. P. 212–216. [in Ukrainian] / Мельничук О.В., Ожередов С.П., Рахметов Д.Б., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Скринінг нітроанілінів на спорідненість до α -тубуліну мискантусу для їх використання у поліплоїдизації рослин цього роду. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Т. 18. С. 212–216.
10. Kundelchuk O.P., Tarasenko L.V., Blume Ya.B. Comparison of effect of amiprofosmetil on the structure of root cells in sensitive and resistant lines of *Nicotiana plumbaginifolia* (in Russ.). *Russ. J. Plant Physiol*. 2002. Т. 49, № 3. С. 425–430.
11. Pausheva Z.P. *Workshop on Plant Cytology* (in Russ.). Moscow: Agropromizdat, 1988.
12. Yu C.Y., Kim H.S., Burn A.L., Widholm J.M., Juvik J.A. Chromosome doubling of the bioenergy crop, *Miscanthus x giganteus*. *Global Change Biol. Bioenergy*. 2009. Vol. 1. P. 404–412.
13. Petersen K., Hagberg P., Kristiansen K. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. *Plant Breed.* 2002. Vol. 121. P. 445–450.
14. Petersen K., Hagberg P., Kristiansen K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2003. Vol. 73. P. 137–146.

MELNYCHUK O.V.¹, OZHEREDOV S.P.¹, RAKHMETOV D.B.², RAKHMETOVA S.O.², BAYER O.O.¹, SHYSHA O.M.¹, YEMETS A.I.¹, BLUME Ya.B.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskoho str., 2a, e-mail: olexandr_melnichyk@ukr.net

² M.M. Hryshko National Botanical Garden, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 02000, Kyiv, Tymiryazevska str., 1

POLYPLOIDIZATION OF *MISCANTHUS SINENSIS* USING DINITROANILINES WITH LOW PHYTOTOXICITY

Aim. The aim of the work was to obtain polyploid lines of *Miscanthus sinensis* with enhanced biomass productivity using new dinitroaniline compounds. **Methods.** The work was carried out in *in vitro* conditions. Aseptic *M. sinensis* shoots were cultured on shoot multiplication medium containing various compounds of dinitroanilines class. Classic dinitroanilines (oryzalin and trifluralin) were used as a control. **Results.** When aseptic shoots were cultured on medium supplemented with oryzalin and trifluralin at concentration 10 mM, survival rate of explants was between 23.52 and 44.40%. However, when the medium was supplemented with tested dinitroanilines at the same concentration, survival rate of explants was in the range of 95.0–96.5%. **Conclusions.** Possibility of new compounds of dinitroanilines class utilization for *M. sinensis* polyploidization has been studied. In terms of explants survival rate, application of new compounds of dinitroanilines class appeared to be significantly effective than application of classic dinitroanilines.

Keywords: dinitroanilines, *in vitro*, polyploidization, *Miscanthus sinensis*.