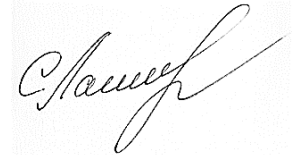


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА**

ЛАШУК СНІЖАНА ОЛЕКСАНДРІВНА



УДК: 633.282:577.3:631.527

**СТВОРЕННЯ ВИХІДНИХ СЕЛЕКЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ
ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ МІСКАНТУС МЕТОДОМ РЕГУЛЯЦІЇ ЇХ
РЕПРОДУКТИВНОГО РОЗВИТКУ ТА ЗАСТОСУВАННЯМ
БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ**

06.01.05 – селекція і насінництво

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Умань – 2024

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААНУ впродовж 2012–2023 рр.

Науковий керівник:

ГОНТАРЕНКО

Світлана Миколаївна

кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу селекції, генетики та цитології

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

Офіційні опоненти:

ПОЛЩУК

Валентин Васильович

доктор сільськогосподарських наук, професор, член-кореспондент НААН України, декан факультету лісового і садово-паркового господарства,

Уманський національний університет садівництва МОН України

КИРИЛЕНКО

Віра Вікторівна

доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, заступниця директора з наукової роботи,

Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла НААН України

Захист відбудеться: «12» квітня 2024 року о 10:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 74.844.04 в Уманському національному університеті садівництва за адресою: м. Умань, вул. Інститутська, 1, адмінкорпус, конференц-зал; телефон: 098 344 58 20

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Уманського національного університету садівництва за адресою: м. Умань, вул. Інститутська, 1 та на веб-сайті, де розміщено матеріали:

<https://science.udau.edu.ua/ua/d-74.844.04.html>

Автореферат розіслано «11» березня 2024 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,
доктор філософії

Вячеслав ЯЦЕНКО

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми дослідження. Міскантус як енергетична культура має низку переваг над іншими багаторічними культурами, що полягають в його швидкому рості, високому врожаї біомаси та низькому вмісті мінеральних речовин.

Для енергетичних цілей використовують триплоїдний гібрид міскантусу з пізнім цвітінням, який не утворює насіння. Ресинтез нових триплоїдних клонів способом створення симпатричних популяцій *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* пов'язаний з проблемою асинхронності цвітіння цих компонентів гібридизації. Тому, крім вегетативного розмноження (ризомами), використовують мікроклональне, суттєвим недоліком якого є вимерзання рослин впродовж зимового періоду в разі висаджування міскантусу у відкритий ґрунт. У країнах Європи з метою запобігання ушкодженню та загибелі рослин для їх адаптації та підрощування використовують тепличні комплекси, що збільшує вартість розсади та ускладнює технологію вирощування.

Саме тому актуальним є не лише розроблення методів мікроклонального розмноження в культурі *in vitro* (введення в культуру, стимуляція росту та розвитку, клонування, ризогенезу), а й способів збереження рослин на першому році вирощування у відкритому ґрунті, а також розроблення методу синхронізації цвітіння батьківських компонентів, що дасть поштовх для вітчизняної селекції та забезпечить ринок кондиційним насінням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. В основу дисертації покладено дослідження, виконані в рамках науково-дослідної роботи Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України протягом 2012–2023 рр. згідно з такими програмами:

- ПНД «Теоретичні основи створення джерел біоенергетичної рослинної сировини та технології її переробки», підпрограма «Нові види рослин та побічна продукція рослинництва для виробництва твердого біопалива, технології їх виробництва та підготовки до спалювання», завдання «Розробити методи експресії репродуктивного розвитку та отримання кондиційного насіння, вдосконалити методи вегетативного розмноження, створити нові вихідні селекційні матеріали представників роду *Miscanthus*» (номер державної реєстрації 0111U002767);

- ПНД 16 «Селекція, насінництво і розсадництво та технологія вирощування біоенергетичних культур, як сировини для виробництва рідких, твердих і газоподібних видів палива», завдання «Розробити нові методи створення *in vivo* та *ex vitro* вихідних селекційних матеріалів представників роду *Miscanthus*, їх симпатричних популяцій та отримання кондиційного насіння, поповнити колекцію та банк герма плазми представників триби *Andropogoneae* (номер державної реєстрації 0116U003150).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було розробити методи створення, розмноження та оцінки нових вихідних селекційних матеріалів представників роду *Miscanthus* із залученням методів біотехнології.

Для досягнення поставленої мети програмою досліджень передбачено вирішити такі завдання:

- розробити метод отримання селекційного матеріалу (калюсних ліній) *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* способом ініціації калюсогенезу, регенерації мікророслин з калюсу та підвищити коефіцієнт розмноження цих видів міскантусу;
- розробити метод збереження висаджених з культури *in vitro* в умови відкритого ґрунту мікророслин міскантусу без використання тепличних комплексів;
- провести оцінювання новостворених калюсних ліній *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* з погляду генетичної однорідності каріотипу за рівнем плоідності методом протокової цитофлуориметрії;
- удосконалити схеми, режими стерилізації насіння та бруньок з ризом, методи мультиплікації *in vitro* *M. sacchariflorus*, *M. sinensis* та *M. giganteus*;
- розробити метод синхронізації цвітіння рослин *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* в умовах відкритого ґрунту;
- здійснити фенологічні та морфометричні дослідження, визначити структуру загальної продуктивності, провести морфо-біометричні та цитологічні дослідження генеративних органів (маточок, пиляків, пилку) трьох видів міскантусу – *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus*;
- створити вихідний селекційний матеріал міскантусу.

Об'єкт дослідження – процес створення селекційного матеріалу рослин роду *Miscanthus* видів *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack, *Miscanthus sinensis* Andersson, *Miscanthus giganteus* J.M.Greif, Deuter ex Hodk., Renvoize.

Предмет дослідження – методи створення, розмноження та оцінки селекційних матеріалів *in vitro* і збереження їх в умовах відкритого ґрунту, процеси росту, розвитку, цвітіння та репродукції насіння міскантусу.

Методи дослідження. Лабораторні методи дослідження (біотехнологічний, морфологічний, молекулярно-генетичний, біохімічний, цитологічний, спектрофотометричний), польові (дослідження з визначення основних морфологічних ознак та ступенів їх проявлення, випробування в умовах *ex vitro* з адаптації рослин, агротехнічний і фізіологічний спосіб регуляції цвітіння), математико-статистичні (оцінка достовірності отриманих результатів).

Наукова новизна одержаних результатів.

Уперше:

- розроблено метод отримання селекційного матеріалу (калюсних ліній) *M. sacchariflorus* і *M. sinensis* з насіння із низькою схожістю та

життєздатністю способом ініціації калюсогенезу та регенерації мікророслин з калюсу;

- розроблено метод розмноження і стимуляції росту ризом *in vitro* та збереження рослин міскантусу в умовах відкритого ґрунту;
- розроблено метод визначення рівня плоїдності рослин міскантусу із використанням протокової цитофлуориметрії та здійснено оцінювання створених калюсних ліній *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* з погляду генетичної однорідності каріотипу за рівнем плоїдності;
- розроблено метод синхронізації цвітіння рослин *M. sacchariflorus* і *M. sinensis* в умовах відкритого ґрунту за використання фізіологічного методу стимуляції цвітіння *M. sacchariflorus* та агротехнічного способу гальмування цвітіння *M. sinensis*.
- Удосконалено схеми та режими стерилізації насіння *M. sacchariflorus*, *M. sinensis* і бруньок з ризом *M. sacchariflorus*, *M. giganteus*, прописи живильних середовищ для пророщування, розмноження, калюсогенезу та утворення ризом, методи мультиплікації *in vitro* досліджуваних видів міскантусу.

Набули подальшого розвитку:

- прискорене розмноження селекційних ліній міскантусу та швидке впровадження їх у виробництво чи селекційний процес, гарантоване збереження розмножених із культури *in vitro* рослин при адаптації та акліматизації у зимовий період;
- визначення плоїдності та генетичної однорідності каріотипу ліній міскантусу при залученні їх у селекційний процес;
- створення гібридів методом синхронізації цвітіння ліній *M. sacchariflorus* і *M. sinensis*, що дає змогу отримати гібридне насіння та створити новий високопродуктивний селекційний матеріал міскантусу для потреб біоенергетики.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційну роботу виконано автором самостійно. Здійснено глибокий аналіз вітчизняних та іноземних літературних джерел за темою дисертації, розроблено програму і схеми досліджень згідно з чинними методиками, проведено лабораторні, польові дослідження, узагальнено отримані експериментальні дані та здійснено їх статистичний аналіз, сформульовано висновки й розроблено рекомендації для селекційної практики. Автором (у співавторстві) отримано патенти та опубліковано методичні рекомендації.

За результатами проведених досліджень самостійно та у співавторстві опубліковано наукові праці (частка авторського внеску становить 55–100 %).

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати досліджень викладено й обговорено на щорічних звітах методичної комісії Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН (2013–2017 рр.) та апробовано у виступах на VII Міжнародній науково-практичній конференції

«Results of modern scientific research and development» (Мадрид, Іспанія, 21 вересня 2021 р.); VIII Міжнародній науково-практичній конференції «Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects» (Берлін, Німеччина, 23–25 січня 2022 р.); V Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Новітні технології вирощування сільськогосподарських культур» (м. Київ, 29–30 вересня 2016 р.); VII Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, 19 квітня 2019 року).

Публікації. Основні положення дисертації висвітлено в 15 наукових працях, зокрема, чотири – фахові видання України, одна – у виданні, внесеному до міжнародної наукометричної бази Web of Science, чотири тези доповідей на наукових конференціях, три патенти України на корисну модель, три методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 168 сторінках комп'ютерного тексту. Вона складається зі вступу, розділів (огляд літератури, умови, вихідний матеріал і методика проведення досліджень, чотири розділи експериментальних досліджень, їх обговорення й аналіз результатів), висновків, рекомендацій для селекційної практики, списку використаних джерел наукової літератури (191 найменування, з них 138 латиницею), містить 21 таблицю, 73 рисунки, 6 додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ ТА РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН МІСКАНТУСУ ЗА ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Проаналізовано й опрацьовано літературні джерела вітчизняних та іноземних авторів щодо походження, біоенергетичного потенціалу, розроблення нових біотехнологічних методів розмноження міскантусу в умовах *in vitro*, оцінки, добору кращих ліній батьківських компонентів для гібридизації, а також щодо проблем створення нових вихідних форм для збільшення генетичного різноманіття існуючих видів і використання їх як сировини для біоенергетики.

УМОВИ, ВИХІДНИЙ МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили впродовж 2012–2017 рр. в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН (ІБКіЦБ).

Лабораторні дослідження здійснювали в лабораторіях біотехнології та біотехнологічних досліджень; польові – на дослідному полі ІБКіЦБ; молекулярно-генетичні – в центрі колективного користування конфокальної мікроскопії «Конфокал» Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна. Рослини

міскантусу, отримані мікроклональним розмноженням, висаджували в умови відкритого ґрунту на дослідному полі ІБКіЦБ.

Клімат району, де виконано дослідження – помірно континентальний. Погодні умови, що склались у роки проведення досліджень, загалом були сприятливими для вирощування рослин міскантусу.

У дослідях використовували насіння *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* (диплоїдні та тетраплоїдні форми) урожаю 2008 та 2012 рр., бруньки з ризом тетраплоїда *M. sacchariflorus* та *M. giganteus* – алотриплоїдного гібриду, які введено до культури *in vitro*. Мікророслини міскантусу отримували методом морфогенезу та подальшого мікроклонального розмноження відповідно до методики (Білько Д. І. та ін., 2017; Мельничук М. Д. та ін., 2003) та патенту (Гонтаренко С. М. та ін., 2014). Клони міскантусу з культури *in vitro* висаджували з колб у ґрунт без попереднього підрощування та адаптації в умовах теплиці, згідно з патентом (Гонтаренко С. М. та ін., 2016). Плоїдність рослин міскантусу визначали методом протокової цитофлуориметрії за використання цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytometer COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer SYSTEM II™ Software з лазерним джерелом випромінювання та чотирма каналами детекції. Фенологічні та морфологічні особливості отриманих ліній рослин міскантусу аналізували згідно з методикою проведення фенологічних досліджень дерев'янистих і трав'янистих рослин (Лапін П. І., 1972). Вміст сухої речовини в рослинах, хлорофілів *a* та *b*, каротиноїдів у листках визначали за методикою (Починок Х. М., 1976). Цитологічні дослідження генеративних органів міскантусу здійснювали за методикою М. Е. Держинського та ін. (2011). Статистичний аналіз даних проводили за методиками Є. С. Єременко та ін. (2013) та А. М. Єріна (2001).

ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ МІСКАНТУСУ *IN VITRO* ТА УМОВИ ПРОРОЩУВАННЯ НАСІННЯ НА ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Оптимізовано умови отримання асептичної культури міскантусу для введення в культуру *in vitro*. Визначено, що оптимальною схемою стерилізації насіння *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* ($2n$) було застосування 70 % спиртового розчину впродовж 1–3 хв, 2 % розчину гіпохлориту натрію – 25 хв, та 3 % розчину пероксиду водню – 10 хв, що забезпечило стерильність 96,9–100 % знезараженого насіння зі схожістю 89,0–92,0 % для кондиційного насіння. Кращі результати за кількістю знезаражених бруньок із ризом *M. sacchariflorus* ($4n$) та *M. giganteus* (96,0–98,0 %) із найбільшою чисельністю неушкоджених життєздатних бруньок (89,0–93,0 %) отримано завдяки застосуванню схеми та режиму стерилізації, що включали: мильний розчин – 30 хв, 0,05 % розчин перманганату калію – 10 хв, і 0,2 % розчин сулеми – 30 хвилин.

У процесі тестування живильних середовищ для пророщування насіння *M. sacchariflorus* і *M. sinensis* в умовах *in vitro* кращий результат було отримано

із застосуванням модифікованого середовища Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням комплексу вітамінів: тіамін (В₁) – 10,0 мг/л, піридоксин (В₆), нікотинової (РР) та аскорбінової кислоти (С) по 1,0 мг/л; амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аргініну – 30 мг/л, триптофану – 3 мг/л, тирозину – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л; фітогормонів: 6-БАП – 0,2 мг/л і ГК – 1,0 мг/л, що забезпечило підвищення схожості насіння, у порівнянні з середовищем-контролем без гормонів, амінокислот і вітамінів, на 13,0 % – *M. sinensis* репродукції 2008 р., 13,0 % – *M. sacchariflorus* репродукції 2008 р., та на 12,0 % – *M. sinensis* репродукції 2012 р. Кількість пророслого насіння завдяки використанню розробленого нами середовища збільшилася на 11,0–13,0 % залежно від виду міскантусу та року репродукції насіння.

ОТРИМАННЯ КАЛЮСНИХ ЛІНІЙ ТА КЛОНУВАННЯ МІСКАНТУСУ В УМОВАХ *IN VITRO*, АДАПТАЦІЯ РЕГЕНЕРАНТІВ У ВІДКРИТОМУ ҐРУНТІ

Для отримання калюсних ліній використовували насіння *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* репродукції 2008 року, схожість якого в умовах *in vitro* була 6–10 %, кількість життєздатних проростків – 0,5–1,0 %.

Для ініціації калюсогенезу стерильне насіння висаджували на середовища першого типу – модифіковане середовище МС з додаванням вітамінів (В₁, В₆, РР, С по 1,0 мг/л), комплексу амінокислот (глютамінової – 300,0 мг/л, аспарагінової – 50,0 мг/л, тирозину – 5,0 мг/л, аргініну – 3,0 мг/л, гідроксипроліну – 2,0 мг/л), регуляторів росту (6-БАП – 0,6 мг/л, АБК – 0,3 мг/л, НОК – 2,5 мг/л) та більшої кількості сахарози (40 г/л), порівнюючи з контрольними середовищами (30 г/л). За контроль використовували середовища Гамборга–В5 або Чу, модифіковані за вмістом регуляторів росту. Проліферація калюсів відбувалася через 13–15 діб після введення насіння в культуру *in vitro* (рис. 1). Через 30–60 діб калюси пересаджували на морфогенне живильне середовище (другий тип), яке відрізнялося від попереднього більшою кількістю тіаміну – 10 мг/л, відсутністю АБК, застосуванням 6-БАП у більшій кількості (2,0 мг/л) та α -НОК – 0,3 мг/л. Унаслідок модифікації живильного середовища вихід калюсів становив 100 % від кількості висадженого пророслого насіння *in vitro*.

Морфогенез калюсної тканини починався з ризогенезу (рис. 2), через 5–7 діб на поверхні морфогенного калюсу з'являлися первинні бруньки та листки (рис. 3) і формувалися первинні мікроклони (рис. 4). Пагони висотою 2–3 см відокремлювали від калюсної маси і пересаджували на середовище третього типу для розмноження (модифіковане середовище МС з 1/2 дози макроелементів, до складу якого додатково вводили вітаміни В₁ – 10,0 мг/л, В₆, РР, С – по 1,0 мг/л, глютамінову амінокислоту – 250–300 мг/л, 6-БАП – 0,5 мг/л, НОК – 0,5 мг/л та ГК – 0,2 мг/л), де згодом формувалися повноцінні рослини (рис. 5)

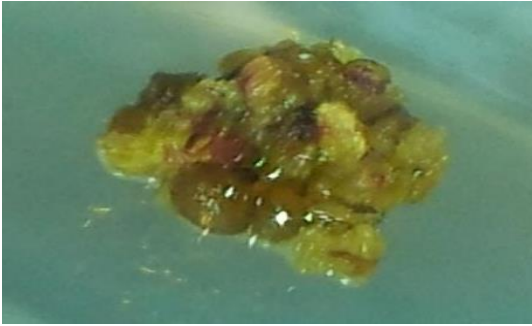


Рис. 1. Калюсна тканина
M. sacchariflorus



Рис. 2. Морфогенез калюсу – утворення
первинних корінців



Рис. 3. Калюсна тканина –
ріст і розвиток первинних
листіків

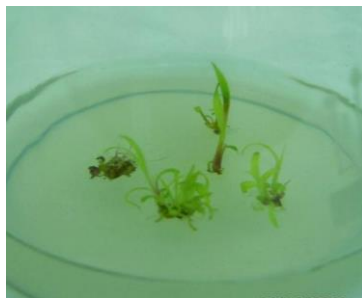


Рис. 4. Первинні мікроклони
міскантусу *in vitro*



Рис. 5. Рослини міскантусу,
сформовані внаслідок
морфогенезу калюсу

Найвищий коефіцієнт розмноження (60–70 з однієї насінини) отримано в рослин *M. sacchariflorus* (частота регенерації – 100 %), тоді як у *M. sinensis* цей показник був вдвічі нижчим – 30–35 (частота регенерації – 50 %). За використання середовища-еталону коефіцієнт розмноження мікророслин становив 1,3–3,1 при частоті регенерації 20 %. Отже, завдяки модифікації середовищ коефіцієнт розмноження рослин *M. sacchariflorus* можна підвищити в середньому в 40 разів, а *M. sinensis* – у 20 разів.

Для масштабованої мультиплікації міскантусів оптимізовано склад живильного середовища МС для їх мікроклонального розмноження за вмістом та дозуванням цитокинінів. Так, якщо на середовищі з БАП – 0,4 мг/л кількість утворених клонів становила 3,4–6,1 шт., то додавання до складу живильного середовища аденіну (0,5 мг/л) сприяло підвищенню їхньої кількості на 20–30 %, а застосування ще й кінетину (0,5 мг/л) збільшило ці показники на 32–50 %. Кращим для клонування міскантусів в умовах *in vitro* виявилось модифіковане середовище МС з фітогормонами (6-БАП – 0,4 мг/л, кінетин – 0,5 мг/л, аденін – 0,5 мг/л, ГК – 0,2 мг/л), яке забезпечує отримання максимальної кількості клонів з однієї рослини що три тижні (8,0 клонів *M. giganteus*, 8,5 клонів *M. sinensis* та 7,6–8,3 – *M. sacchariflorus*).

Проведено розрахунки з мультиплікації у процесі клонування міскантусу за розробленими нами методами за рік, де теоретично можна отримати 2 502 517 млрд мікроклонів *M. giganteus*, 16 926 млрд мікроклонів *M. sacchariflorus* ($4n$) та 233 212 млрд мікроклонів *M. sinensis*. Застосовуючи для розмноження

калюсогенез, теоретично можна отримати 300 866 486 млрд мікроклонів *M. sacchariflorus* ($2n$) та 33 000 000 000 млрд мікроклонів *M. sinensis* за рік мультиплікації. Встановлено, що розрахункова швидкість мультиплікації з калюсу була в 120 разів більшою для *M. sacchariflorus* та в 142 рази більшою для *M. sinensis*, порівнюючи з розмноженням із проростка насіння.

Для розроблення методу адаптації міскантусу у відкритому ґрунті без використання тепличних комплексів стерильне насіння та бруньки з ризом висаджували на модифіковані середовища для стимуляції утворення й пролонгації ризом з мінеральною частиною за МС (1/2 макроелементів та повною – мікроелементів), вітамінами (V_1 – 10,0 мг/л, V_6 , РР, С – по 1 мг/л), амінокислотами (глутамінова – 250,0 мг/л, аспарагінова – 30,0 мг/л, тирозин – 3,0 мг/л, аргінін – 2,0 мг/л, гідроксипролін – 2,0 мг/л), регуляторами росту (ГК – 0,5–1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2 мг/л, α -НОК – 0,1 мг/л) у різних варіаціях: Рр – 6-БАП – 0,2 мг/л, α -НОК – 0,1 мг/л; Рр1 – ГК – 0,5, 6-БАП – 0,2 мг/л; Рр2 – ГК – 1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2 мг/л; Рр3 – ГК – 1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2 мг/л, α -НОК – 0,1 мг/л.

Найкращі результати отримано за використання середовища Рр2 із регуляторами росту ГК – 1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2 мг/л без α -НОК (рис.6). Введення до складу живильних середовищ гібереліну стимулювало ріст ризом та сприяло збільшенню їхньої довжини в середньому в 5–7 разів, порівнюючи з контролем (Рр).

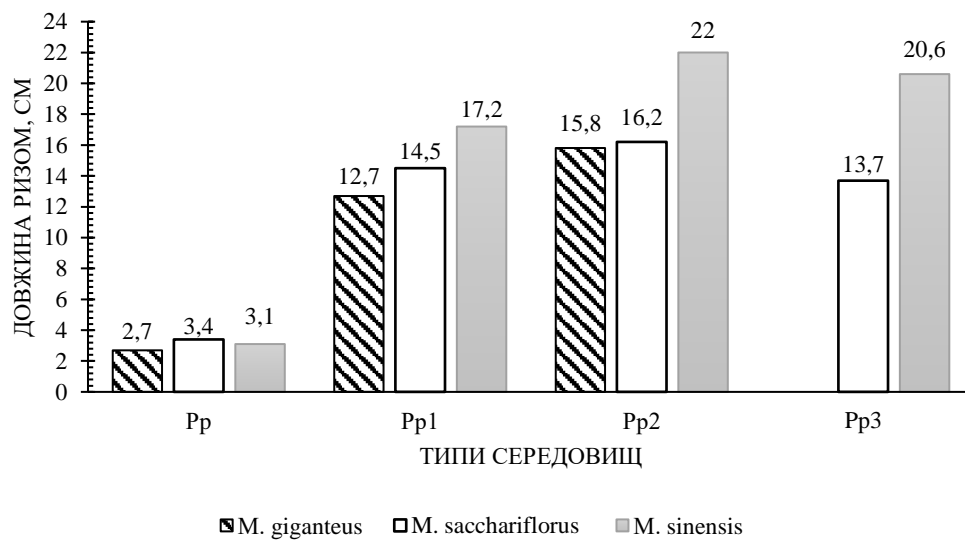


Рис. 6. Довжина ризом різних видів міскантусу з культури *in vitro* залежно від складу живильного середовища, см

Стимуляція утворення та пролонгації ризом на модифікованих середовищах перед висаджуванням рослин *M. giganteus*, *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* у відкритий ґрунт сприяла їхній 100% адаптації та виживанню в зимовий період без застосування тепличних комплексів як проміжної ланки для адаптації та підрощення мікророслин.

ФЕНОЛОГО-МОРФОЛОГІЧНІ, ЦИТОЛОГІЧНІ Й ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РІЗНИХ ВИДІВ МІСКАНТУСУ ТА ОЦІНКА ЇХНЬОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ

Встановлено фенологічні відмінності між рослинами *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* (4n), *M. sacchariflorus* (2n) і *M. giganteus*, розмноженими *in vitro*, та *M. giganteus*, розмноженими ризомами. Ці відмінності проявлялися у більш ранньому (на 7–15 діб) настанні фаз відростання, куціння у рослин *M. sacchariflorus* (2n) і *M. sacchariflorus* (4n), порівняно з *M. giganteus*. Фаза виходу в трубку, поява волоті та цвітіння у рослин *M. sacchariflorus* (4n) починалась на 30–35 діб раніше, порівнюючи з *M. sinensis*, і на 56–62 доби раніше, ніж у *M. giganteus*. Фази появи волоті та цвітіння у *M. sacchariflorus* (4n) відбувалися на місяць раніше ніж у *M. sinensis*, а вид *M. sacchariflorus* (2n) в умовах Лісостепу України характеризувався відсутністю фази виходу в трубку і, відповідно, появи волоті, цвітіння та плодоношення.

Визначено, що найвищі морфометричні показники за висотою рослини (380,3 см), діаметра пагонів (14,5 мм), кількості міжвузлів (17,0 шт.), кількості та довжини листків (16,5 шт. та 65,7 см відповідно), площі листків (123,1 см²), довжини, ширини волоті (38,1 см і 19,6 см відповідно) були у *M. giganteus* (*ex vitro*). Рослини *M. giganteus* (*in vitro*) поступалися рослинам *M. giganteus* (*ex vitro*) за висотою – на 31,5 %, за кількістю стебел у куці – на 123 %, довжиною листків – на 17,1 %, площею листків – на 17,1 %. Найбільша кількість стебел у куці – 62,6 шт. – була у *M. sinensis* (*in vitro*), що в 1,7 раза перевищувало показники *M. giganteus* (*ex vitro*) та в 3,8 раза – *M. giganteus* (*in vitro*). Найнижчою висотою рослин – 43,2 см, кількістю стебел у куці – 5 шт., довжиною та шириною листків – 27,9 та 1,3 см відповідно, площею листків – 27,2 см², характеризувалися рослини *M. sacchariflorus* (2n) (*in vitro*). Ці показники різко вирізняються на фоні показників всіх досліджуваних видів міскантусу, зокрема й тетраплоїдної форми *M. sacchariflorus* (4n).

Установлено, що найбільша надземна маса рослини (2950,6 г) була у *M. giganteus* (*ex vitro*), у *M. giganteus* (*in vitro*) – у 2,1 рази меншою. Надземна маса *M. sinensis* (*in vitro*) була у 2,2 раза меншою ніж у *M. giganteus* (*ex vitro*), однак лише на 21 % меншою ніж у *M. giganteus* (*in vitro*). Надземна маса *M. sacchariflorus* (4n) (*in vitro*) становила 412,4 г, що в 3,2 раза менше за показники *M. sinensis* (*in vitro*), в 3,7 раза менше ніж у *M. giganteus* (*in vitro*) та в 7,1 раза менше ніж у *M. giganteus* (*in vitro*). Найменшою (50,1 г) видмычено надземну масу у *M. sacchariflorus* (2n) (*in vitro*), яка у 8,2 раза поступалася *M. sacchariflorus* (4n) (*in vitro*). З'ясовано, що в структурі загальної продуктивності міскантусу маса стебел має найбільшу частку. Зокрема, на масу стебел *M. giganteus* (*ex vitro*) припадає 68,8 % загальної варіабельності цього показника, *M. giganteus* (*in vitro*) – 64,7 %, *M. sinensis* (*in vitro*) – 67,1 %, *M. sacchariflorus* (4n) (*in vitro*) – 61,9 %, *M. sacchariflorus* (2n) (*in vitro*) – 51,9 %. Частка маси листків у *M. giganteus* (*ex vitro*) становила 29,5 %, *M. giganteus* (*in vitro*) – 29,5 %, *M. sinensis* (*in vitro*) – 29,5 %, *M. sacchariflorus* (4n) (*in vitro*) – 29,5 %, *M. sacchariflorus* (2n) (*in vitro*) – 29,5 %.

vitro) – 32,4 %, *M. sinensis (in vitro)* – 34,1 %, *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)* – 32,3 %, *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)* – 48,1 %. Найменша частка загальної варіабельності продуктивності припадає на масу волоті: у *M. giganteus (ex vitro)* – 1,7 %, *M. giganteus (in vitro)* – 3,2 %, *M. sinensis (in vitro)* – 2,5 %, *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)* – 5,2 %.

Згідно з результатами визначення морфометричних показників і показників продуктивності, для використання в біоенергетиці рекомендовано *M. giganteus (in vitro)*, *M. giganteus (ex vitro)* та *M. sinensis (in vitro)*. Важливими для селекційної практики слід вважати *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)* та *M. sinensis (in vitro)* як батьківські форми майбутніх триплоїдних гібридів. Вид *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)*, який не цвіте в умовах України, можна використовувати як декоративну культуру.

Для цитологічних досліджень використовували маточки, незапліднені насінневі зачатки, пиляки та пилок *M. sinensis*, *M. giganteus* і *M. sacchariflorus (4n)*. Встановлено, що тичинки міскантусу мають довгі тичинкові нитки та продовгуваті пиляки, тканина яких складається з видовжених клітин (рис. 7). Маточка у міскантусів, яка складається із зав'язі з двох стовпчиків, має довгі розгалужені перисті приймочки (рис. 8, 9). Визначено, що пилок різних видів міскантусу різняться за якісними та кількісними ознаками (розмірами, гомо- чи гетерогенністю). Так, пилок *M. sacchariflorus (4n)* і *M. sinensis* характеризується округлими формами, вирівняністю та майже однорідністю розмірів – 43–48 мкм у діаметрі (рис. 10, 11), тоді як пилок *M. giganteus* більш гетерогенний, варіює за розміром, діаметр – 23–45 мкм, кількість дрібних мікроспор становить 5–10 % від їхньої загальної кількості (рис. 12).

Отримані дані дають змогу оцінити розміри та розгалуженість приймочки маточки, розміри та гетерогенність пилку, які слід враховувати в селекційній роботі з отримання ди- та триплоїдних гібридів міскантусу.



Рис. 7. Пиляки *M. sacchariflorus (4n)*

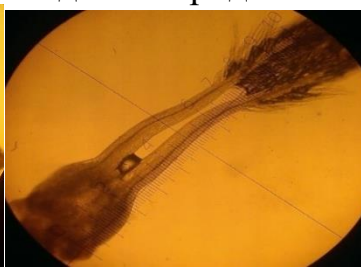


Рис. 8. Маточка *M. sacchariflorus (4n)*

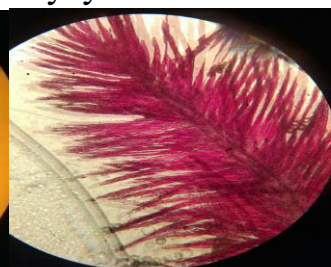


Рис. 9. Приймочка маточки *M. sacchariflorus*



Рис. 10. Пилек *M. sacchariflorus (4n)*

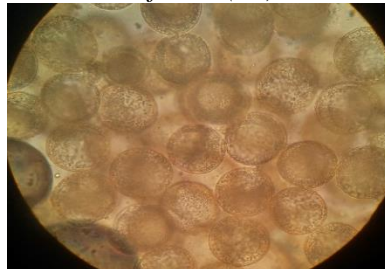


Рис. 11. Пилек *M. sinensis*

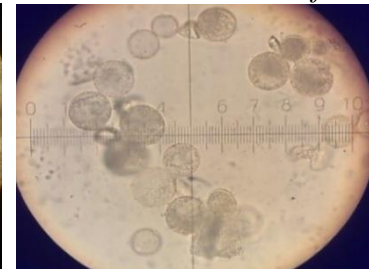


Рис. 12. Пилек *M. giganteus*

Уміст сухої речовини в надземній масі рослин *M. giganteus* (*in vitro*) та *M. giganteus* (*ex vitro*) становив 76,5–78,4 %. У рослинах *M. sinensis* (*in vitro*) та *M. sacchariflorus* (*4n*) (*in vitro*) сухої речовини було на 17,7–22,4 % менше. Визначено, що в стеблах міскантусів міститься більше сухої речовини (56–81,6 %) ніж у листках (46,7–67,5 %). Значна маса листків, яка становить залежно від виду міскантусу 30–50 % надземної маси, та швидке її наростання дають підставу рекомендувати до використання міскантусу не лише як енергетичну, а й як кормову культуру.

Встановлено більш високий уміст суми хлорофілів *a* та *b* в листках *M. sacchariflorus* і *M. sinensis* (1,74–1,84 мг/г сирої речовини), порівнюючи з *M. giganteus* (1,40 мг/г сирої речовини), при застосуванні екстрагентом 96 % спирту.

У дослідах за використанням екстрагентом ацетону, де було виключено процеси розтирання рослинного матеріалу в ступці та подальшої фільтрації розчину, що призводило до втрат пігментів, отримано вдвічі більшу кількість хлорофілу (3,21 мг/г сирої речовини). Вміст каротиноїдів в листках *M. giganteus* становив 1,44 мг/г сирої речовини.

Розрахунки з кількості хлорофілу *a+b* в листках рослин досліджуваних видів міскантусу на гектар площі із застосуванням екстрагентом етилового спирту свідчать, що з листків різних видів міскантусу можна отримати від 4,9 до 24,4 кг/га хлорофілу, тоді як за екстракції ацетоном цей показник можливо збільшити вдвічі. Отже, можна рекомендувати вирощування міскантусу також і для застосування його у виробництві хлорофілу для потреб медицини.

ВИЗНАЧЕННЯ ОДНОРІДНОСТІ КАРІОТИПУ НОВОСТВОРЕНИХ ЛІНІЙ ТА РЕГУЛЯЦІЯ ЦВІТІННЯ МІСКАНТУСУ

Проведено оцінювання створених калюсних ліній *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* з погляду генетичної однорідності каріотипу за рівнем плоідності рослин методом протокової цитофлуориметрії за використання цитофлуориметра нового покоління COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytometer COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer SYSTEM II™ Software з лазерним джерелом випромінювання та чотирма каналами детекції, який широко застосовують у медицині.

Порівняння позицій піків на цитограмах, отриманих у процесі аналізування вмісту ДНК в інтерфазних ядрах *M. sinensis* (еталон) та рослин *M. sinensis*, одержаних із калюсних ліній *in vitro*, плоідність яких була нам невідома, показало їхню ідентичність, тобто цитограми мали по одному піку та були розташовані в одній зоні як при застосуванні логарифмічної шкали FL2 log, так і FL4 log. Цитограми інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер диплоїдних рослин *M. sacchariflorus* (*2n*) відмічали досить схожими на цитограми диплоїдних рослин *M. sinensis* (еталон) та рослин *M. sinensis*, отриманих із калюсних ліній *in vitro* (рис. 13–15). Цитограми тетраплоїдних

рослин *M. sacchariflorus* (4n) суттєво відрізнялися за формою параболічної кривої з більш видовженою її правою стороною та наявністю невеликих піків на ній. Схожі візуальні розбіжності форми параболічної кривої мали цитограми *M. giganteus* (3n), але з деякими відмінностями у формі правої сторони з невеличкими піками на параболічній кривій (рис. 16–18).

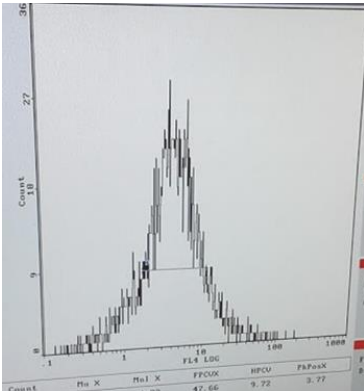


Рис. 13. Цитограма інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер *M. sinensis* (еталон), FL4log

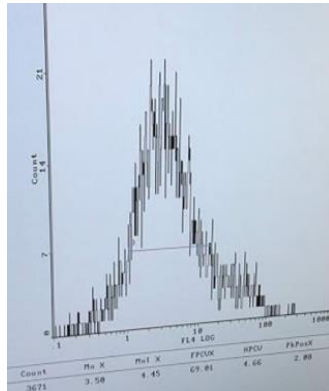


Рис. 14. Цитограма інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер *M. sinensis*, калюсної лінії Б, FL4 log

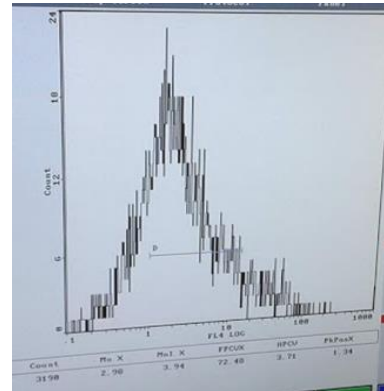


Рис. 15. Цитограма інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер *M. sinensis* калюсної лінії С, FL4 log

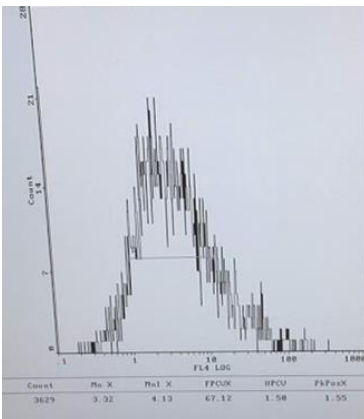


Рис. 16. Цитограма інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер *M. sacchariflorus* (2n), FL4 log

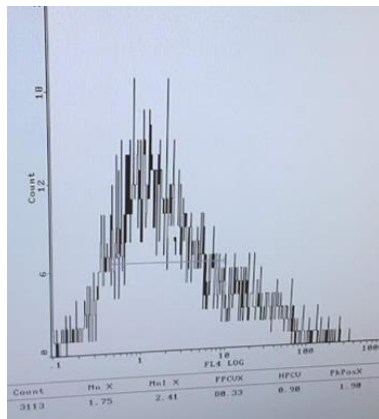


Рис. 17. Цитограма інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер *M. sacchariflorus* (4n), FL4 log

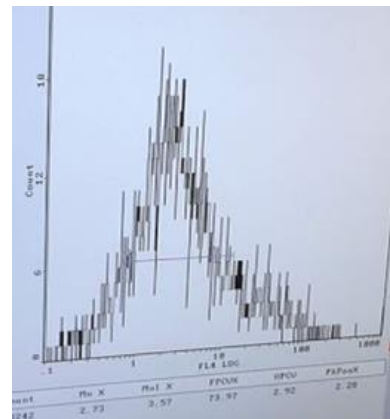


Рис. 18. Цитограма інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер *M. giganteus* (3n), FL4 log

Визначено, що отримані калюсні лінії *M. sinensis* мали диплоїдний стан геному, як і рослини *M. sinensis*, розмножені безпосередньо з насіння. Встановлено візуальну ідентичність цитограм інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер диплоїдного *M. sacchariflorus* (2n) з цитограмами *M. sinensis* (еталон) і *M. sinensis*, отриманих із калюсних ліній *in vitro*, та суттєву відмінність їх від цитограм тетраплоїдних *M. sacchariflorus* (4n) і триплоїдних *M. giganteus* (3n) за формою параболічної кривої.

У селекційній практиці отримання нових гібридів міскантусу стримується відсутністю синхронності цвітіння компонентів гібридизації *M. sacchariflorus* і *M. sinensis*. Саме тому нами було розроблено спосіб синхронізації цвітіння цих

видів міскантусу при створенні їх симпатричних популяцій в умовах відкритого ґрунту для отримання гібридного насіння. Для цього необхідно затримати цвітіння *M. sacchariflorus* і стимулювати початок цвітіння *M. sinensis*. З метою затримки цвітіння ризоми *M. sacchariflorus* висаджували в ґрунт восени (наприкінці вересня – початку жовтня) біля рослин *M. sinensis*. А для стимуляції початку цвітіння *M. sinensis* у рік синхронізації один-два рази обробляли 0,0001–0,0005 % 6-БАП в останню декаду липня. Завдяки застосуванню таких способів регулювання цвітіння *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* починали цвісти синхронно у першій-другій декаді серпня на наступний рік (табл. 1).

Таблиця 1

Фази генеративного розвитку рослин *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* без використання методу синхронізації цвітіння та за його застосування

Вид міскантусу	Фази генеративного розвитку батьківських компонентів гібридизації без використання методу синхронізації цвітіння, ±доба:		
	Вихід у трубку	Поява волоті	Цвітіння
<i>M. sinensis</i>	17.08±6	23.08±5	31.08±4
<i>M. sacchariflorus</i>	06.07±5	22.07±4	30.07±5
Вид міскантусу	Фази генеративного розвитку батьківських компонентів гібридизації за використання методу синхронізації цвітіння, ±доба:		
	Вихід у трубку	Поява волоті	Цвітіння
<i>M. sinensis</i>	07.08±5	11.08±5	19.08±5
<i>M. sacchariflorus</i>	26.07±4	08.08±4	17.08±3

Впровадження цього способу синхронізації цвітіння значно прискорить селекційний процес створення нових триплоїдних гібридів міскантусу та сприятиме значній економії ресурсів при проведенні селекції в умовах поля, а не в умовах теплиці, як це відбувається зазвичай в європейських країнах та США.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукового завдання, що полягає в розробленні методів створення, розмноження та оцінки нових вихідних селекційних матеріалів представників роду *Miscanthus* із залученням методів біотехнології.

1. У результаті порівняння різних схем і режимів стерилізації насіння *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* ($2n$) вдосконалено метод стерилізації насіння міскантусу на основі застосування 70 % спиртового розчину, 2 % розчину гіпохлориту натрію та 3 % розчину пероксиду, що забезпечило отримання майже 100 % знезараженого зі збереженням високих показників кількості схожого насіння. Визначено, що кращі результати зі знезараження бруньок із ризом

M. sacchariflorus (4n) та *M. giganteus* отримано при застосуванні схеми стерилізації, що включала мильний розчин, 0,05 % розчин перманганату калію та 0,2 % розчин сулеми.

2. Для пророщування насіння *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* в умовах *in vitro* рекомендуємо застосовувати модифіковане середовище МС з додаванням комплексу вітамінів (В₁ – 10 мг/л, В₆, РР, С по 1 мг/л), амінокислот (глутаміну – 250 мг/л, аргініну – 30 мг/л, триптофану – 3 мг/л, тірозину – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л) і 6-БАП – 0,2 мг/л, яке забезпечить підвищення кількості схожого насіння, порівняно з еталоном-середовищем, на 11,7–13,0 %, залежно від виду міскантусу та року репродукції насіння.

3. З'ясовано, що кращі результати з клонування міскантусів в умовах *in vitro* забезпечує використання модифікованого середовища МС із вмістом 6-БАП – 0,4 мг/л, кінетину – 0,5 мг/л, аденіну – 0,5 мг/л, ГК – 0,2 мг/л, за додавання амінокислот: глутаміну – 250 мг/л, аргініну – 30 мг/л, триптофану – 3 мг/л, тірозину – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л і комплексу вітамінів: В₁ – 10 мг/л, В₆, РР, С по 1 мг/л. Такий склад живильного середовища дає змогу отримувати максимальну кількість клонів кожні 3 тижні: понад вісім клонів *M. giganteus*, девять – *M. sinensis* та вісім клонів *M. sacchariflorus*.

4. Удосконалено прописи живильних середовищ для індукції калюсогенезу з насіння міскантусу, морфогенезу калюсів та утворення мікроклонів міскантусу. Застосування модифікованих середовищ для ініціації калюсогенезу та морфогенезу калюсів (відрізнялося від попереднього більшою кількістю вітаміну В₁ – 10 мг/л замість 1 мг/л, відсутністю 2,4 Д та АБК, застосуванням 6-БАП у більшій кількості (2,0 мг/л) та НОК – 0,3 мг/л дає змогу підвищити коефіцієнт розмноження мікророслин *M. sacchariflorus* у середньому в 40 разів, *M. sinensis* – у 20 разів, порівняно з іноземними аналогами.

5. Встановлено, що теоретична швидкість мультиплікації при клонуванні міскантусу за розробленими методами калюсогенезу у виду *M. sacchariflorus* була у 120, а в *M. sinensis* – у 142 рази більшою порівняно з розмноженням із проростка насіння.

6. Розроблено метод розмноження міскантусу *in vitro* та адаптації у відкритому ґрунті, який передбачає стимуляцію росту ризом із застосуванням прописів живильних середовищ, до складу яких було введено гіберелін (ГК) – 0,5–1,0 мг/л та регулятори росту – 6-БАП – 0,2 мг/л та НОК – 0,1 мг/л. Встановлено, що такий склад живильного середовища сприяє збільшенню довжини ризом на живильних середовищах, забезпечуючи у такий спосіб гарантоване 100 % збереження розмножених з культури *in vitro* мікророслин при адаптації та акліматизації у зимовий період.

7. На основі порівняння фенологічних особливостей різних видів міскантусу встановлено, що фази відростання та кушіння наставали на 7–15 діб раніше у рослин *M. sacchariflorus* (2n) і *M. sacchariflorus* (4n), порівнюючи з рослинами *M. giganteus* (*in vitro*) та *M. giganteus* (*ex vitro*). На 30–35 діб раніше

починалася фаза виходу в трубку, поява волоті та цвітіння у *M. sacchariflorus* (4n) порівняно з *M. sinensis* (*in vitro*) і на 56–62 доби, порівнюючи з *M. giganteus* (*in vitro*) і *M. giganteus* (*ex vitro*). У рослин *M. sacchariflorus* (2n) в умовах Лісостепу України фаза виходу в трубку, а, відповідно, й поява волоті, цвітіння та плодоношення відсутні.

8. Проведено аналіз морфометричних показників видів міскантусу, де найвищі результати за показниками висоти рослини, діаметра пагонів, кількості міжвузлів, кількості та довжини листків, площі листків, довжини, ширини волоті встановлено у *M. giganteus* (*ex vitro*). Найнижчі показники мали рослини *M. sacchariflorus* (2n) (*in vitro*), які істотно відрізнялися від показників всіх інших диплоїдних видів міскантусів та тетраплоїдної форми *M. sacchariflorus* (4n). Найбільшу кількість стебел у куці виявлено у *M. sinensis* (*in vitro*). Згідно з аналізом морфометричних показників і показників продуктивності, для використання в біоенергетиці придатні *M. giganteus* (*in vitro*), *M. giganteus* (*ex vitro*) і *M. sinensis* (*in vitro*). Як батьківські форми майбутніх триплоїдних гібридів у селекційний процес рекомендовано залучати *M. sacchariflorus* (4n) (*in vitro*) і *M. sinensis* (*in vitro*), а *M. sacchariflorus* (2n) (*in vitro*) слід використовувати як декоративну культуру.

9. Встановлено, що надземна маса у рослин *M. giganteus* (*in vitro*) і *M. sinensis* (*in vitro*) у 2,2 раза менша, порівняно з рослинами *M. giganteus* (*ex vitro*). У рослин *M. sacchariflorus* (4n) (*in vitro*) цей показник майже у 3,5 раза менший, ніж у *M. sinensis* (*in vitro*) і *M. giganteus* (*in vitro*). Найменшою була надземна маса у рослин *M. sacchariflorus* (2n) (*in vitro*), яка у 8,2 раза поступалася *M. sacchariflorus* (4n) (*in vitro*).

З'ясовано, що в структурі загальної продуктивності міскантусу маса стебел має найбільшу частку варіабельності ознаки – 51,9–68,8 %, частка маси листків становила 29,5–48,1% залежно від виду міскантусу. Найменша частка загальної продуктивності припадає на масу волоті – 1,7–5,2 %.

10. За результатами цитологічних досліджень генеративних органів *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus* встановлено їх відмінності за якісними та кількісними ознаками (кольором, розміром, формою). Визначено, що пилки *M. sacchariflorus* (4n) та *M. sinensis* характеризувався округлими формами та майже однорідністю розмірів – 43–48 мкм у діаметрі, натомість пилки *M. giganteus* був більш гетерогенний, варіювався за розміром (діаметр 23–45 мкм), кількість дрібних мікроспор становила 5–10 % від загальної. Широкий діапазон розмірів пилки *M. giganteus* пов'язаний з різним рівнем плоїдності. Результати цих досліджень слід враховувати в подальшій селекційній роботі з отримання ди- та триплоїдних гібридів міскантусу.

11. Визначено вміст сухої речовини в рослинах досліджуваних видів міскантусу та з'ясовано, що максимальний її відсоток містився в надземній масі рослин *M. giganteus* (*ex vitro*) і *M. giganteus* (*in vitro*). З огляду на значну масу листків, яка становила, залежно від виду міскантусу, від 30 до 50 % надземної

маси, рослини міскантусу доцільно рекомендувати до використання рослини міскантусу не лише як енергетичну, а й як кормову культуру.

12. Вдосконалено метод виділення хлорофілу та каротиноїдів за використання ацетону, який є менш енергозатратним та більш ефективним. Впровадження методу дало змогу отримати істотно більшу (майже в 2 рази) кількість хлорофілу та визначити вміст каротиноїдів в листках *M. giganteus*.

На основі розрахунків зі вмісту хлорофілу $a+b$ у листках рослин міскантусу за застосування різних екстрагуючих речовин на гектар площі визначено, що у разі використання екстрагентом етилового спирту з листків рослин *M. sacchariflorus* ($4n$) (*in vitro*) можна отримати 4,9 кг/га хлорофілу, *M. sinensis* (*in vitro*) – 16,8 кг/га, *M. giganteus* (*ex vitro*) – 24,4 кг/га. У разі екстракції ацетоном з листків рослини *M. giganteus* (*ex vitro*) вихід хлорофілу $a+b$ буде майже в два рази більшим. Це відкриває можливість застосування міскантусу у виробництві хлорофілу для потреб медицини.

13. Проведено оцінювання створених калюсних ліній *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* з погляду генетичної однорідності каріотипу за рівнем плоїдності рослин методом протокової цитофлуориметрії за використання цитофлуориметра з лазерним джерелом випромінювання та чотирма каналами детекції. Дискримінація цитограм вмісту ДНК в інтерфазних ядрах рослин *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* ($2n$), отриманих з калюсних ліній, вказала на їх абсолютну ідентичність з цитограмами флуоресценції ізольованих ядер *M. sinensis* (еталон). Натомість, цитограми тетраплоїдних рослин *M. sacchariflorus* та триплоїдного *M. giganteus* мали суттєві відмінності за формою параболическої кривої. З'ясовано, що отримані рослини калюсних ліній *M. sinensis* мають диплоїдний стан генома, як і рослини *M. sinensis*, що розмножені безпосередньо з насіння.

14. Розроблено спосіб синхронізації цвітіння рослин *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*. Стимуляція цвітіння *M. sinensis* в рік синхронізації і висадка ризом *M. sacchariflorus* восени (наприкінці вересня – початку жовтня), синхронізує цвітіння цих двох видів міскантуса, яке починається у першій–другій декаді серпня на наступний рік. Цей спосіб може значно прискорити селекційний процес створення нових триплоїдних гібридів міскантусу та сприятиме значній економії ресурсів у результаті проведення селекції в умовах поля, а не в умовах теплиці, як це відбувається в європейських країнах та США.

15. Створено симпатричні популяції *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* з регульованим цвітінням компонентів, які в майбутньому дадуть змогу отримувати гібридне насіння та створити новий високопродуктивний селекційний матеріал міскантусу для потреб біоенергетики.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЙНОЇ ПРАКТИКИ

1. Для прискороного розмноження селекційних ліній міскантусу та швидкого впровадження їх у виробництво або у селекційний процес рекомендовано використовувати наукові розробки патенту на корисну модель № 97957 «Спосіб розмноження рослин міскантусу з насіння з низькою схожістю та життєздатністю».

2. Користуватися результатами патенту на корисну модель № 111300 «Спосіб розмноження в культурі *in vitro* та адаптації міскантусу у відкритому ґрунті» для гарантованого збереження розмножених із культури *in vitro* рослин при адаптації та акліматизації у зимовий період.

3. Для визначення плоїдності та генетичної однорідності каріотипу ліній міскантусу, при залученні їх у селекційний процес, рекомендовано використовувати метод ідентифікації плоїдності рослин шляхом протокової цитофлуориметрії, що дасть змогу швидко та точно виявити нетипові генетичні зразки за формою параболічної кривої.

4. Доцільно використовувати в селекційній практиці для створення гетерозисних гібридів та в цілях комбінаційної селекції дослідження наукових розробок патенту № 127650 «Спосіб синхронізації цвітіння компонентів гібридизації міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського в польових умовах», що дасть змогу отримати гібридне насіння та створити новий високопродуктивний селекційний матеріал міскантусу для потреб біоенергетики.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

Статті у закордонних виданнях, проіндексованих у базі даних

Web of Science Core Collection:

1. **Lashuk S.**, Gontarenko S., Herasymenko G. Characteristics of reproductive organs of *Miscanthus sinensis* anderss., *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack, *Miscanthus x giganteus* j.m.greef denterex hodk., renvoize. *International Journal of Botany Studies*. 2021. Vol. 6 (4). P. 351–356 (частка участі автора –90 %).

Статті у наукових виданнях, включених до Переліку наукових

фахових видань України:

2. Роїк М. В., Гонтаренко С. М., **Лашук С. О.** Сучасний стан розвитку селекції та реєстрації представників роду *Miscanthus* в Україні та світі. *Наукові праці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків*. 2014. № 21. С. 249–254 (частка участі автора –80 %).

3. Гонтаренко С. М., **Лашук С. О.** Отримання рослин *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hanck та *Miscanthus sinensis* Andersson у культурі *in vitro* шляхом непрямого морфогенезу. *Plant Var. Stud. Prot.* 2017. Т. 13, № 1. С. 12–20. Doi: [10.21498/2518-1017.13.1.2017.97219](https://doi.org/10.21498/2518-1017.13.1.2017.97219) (частка участі автора –90 %).

4. Гонтаренко С. М., **Лашук С. О.** Метод розмноження, стимуляції росту ризом у культурі *in vitro* та адаптації у відкритому ґрунті представників роду *Miscanthus*. *PlantVar. Stud. Prot.* 2017. Т. 13, № 3. С. 230–238. Doi: [10.21498/2518-1017.13.3.2017.110703](https://doi.org/10.21498/2518-1017.13.3.2017.110703) (частка участі автора –85 %).

5. **Лашук С. О.** Біоморфологічна характеристика селекційних зразків представників роду *Miscanthus*, отриманих в умовах *in vitro*. *Plant Var. Stud. Prot.* 2019. Т. 15, № 2. С. 163–170. Doi: [10.21498/2518-1017.15.2.2019.173566](https://doi.org/10.21498/2518-1017.15.2.2019.173566) (частка участі автора –100 %).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Лашук С. О.**, Худолій Л. В. Характеристика генеративних органів вихідного селекційного матеріалу представників роду *Miscanthus*. *Results of moderns scientific research and development, (Madrid, Spain 21 September 2021)*. Мадрид, 2021. С. 13–18 (частка участі автора –95 %).

7. Гонтаренко С. М., **Лашук С. О.** Протокова цитофлуориметрія калюсних ліній міскантусу китайського та міскантусу цукроквіткового. *Proceedings of VIII International Scientific and Practical Conference, (Berlin, Germany 23-25 January 2022)*. Берлін, 2022. С. 22–30 (частка участі автора –90 %).

8. Гонтаренко С. М., **Лашук С. О.** Метод розмноження міскантусу в культурі *in vitro* та адаптації у відкритому ґрунті. *Новітні технології вирощування сільськогосподарських культур: Матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених. (м. Київ, 29–30 вересня 2016 р.)*. Вінниця, 2016. С. 98–99 (частка участі автора –85 %).

9. **Лашук С. О.** Отримання рослин міскантусу в умовах *in vitro* та адаптація їх у відкритому ґрунті. *Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: Матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів. (19 квітня 2019 року, с. Центральне)*. 2019. С. 64 (частка участі автора –100 %).

Наукові праці, які додатково відображають результати дисертації

Отримання українських охоронних документів на об'єкти інтелектуальної власності:

10. Гонтаренко С. М., **Лашук С. О.** Патент на корисну модель № **97957** Україна, МПК: A01B 79/00. Спосіб розмноження рослин міскантусу з насіння з низькою схожістю та життєздатністю. Заявник та патентовласник Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН № u 2014 12015; заявл. 06.11.2014, опубл. 10.04.2015, бюл. № 7 (частка участі автора –55 %).

11. Гонтаренко С. М., **Лашук С. О.** Патент на корисну модель № 111300 Україна, МПК: A01H 4/00. Спосіб розмноження в культурі *in vitro* та адаптації міскантусу у відкритому ґрунті. Заявник та патентовласник Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН № u 2016 03754; заявл. 08.04.2016, опубл. 10.11.2016, бюл. № 21 (частка участі автора –55 %).

12. Гонтаренко С. М., **Лашук С. О.**, Герасименко Г. М. Патент на винахід № 127650 Україна, МПК: А01Н 1/04. Спосіб синхронізації цвітіння компонентів гібридизації міскантусу цукрокріткового та міскантусу китайського в польових умовах. Заявник та патентовласник Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН № а 2021 03120, заявл. 07.06.2021, опубл. 15.11.2023, бюл. № 46 (частка участі автора –55 %).

Методичні та науково-практичні рекомендації:

13. Зінченко В. О., Роїк М. В., Рахметов Д. Б., Гонтаренко С. М., Щербакова Т. О., Курило В. Л., Гументик М. Я., Ганженко О. М., Квак В. М., **Лашук С. О.** Методика проведення експертизи сортів міскантусу гігантського (*Miscanthus & giganteus J.M. Greef & Deuterex Hodkinson & Renvoize*) на відмінність, однорідність та стабільність. Український інститут експертизи сортів рослин./За ред. Ткачик С. О. – 2-ге вид., випр. і доп. – Вінниця: ФОП Корзун Д. Ю., 2016 – 501 с. (частка участі автора –25 %).

14. Роїк М. В., Рахметов Д. Б., Гонтаренко С. М., Щербакова Т. О., Курило В. Л., Гументик М. Я., Блюм Я. Б., Рахметова С. О., Зінченко В. О., Андрющенко О. Л., Квак В. М., **Лашук С. О.** Методика проведення експертизи сортів міскантусу цукрокріткового (*Miscanthus sacchariflorus (Maxim) Benth.*) на відмінність, однорідність та стабільність. Український інститут експертизи сортів рослин./За ред. Ткачик С. О. – 2-ге вид., випр. і доп. – Вінниця: ФОП Корзун Д. Ю., 2016 – 529 с. (частка участі автора –25 %).

15. Роїк М. В., Рахметов Д. Б., Гонтаренко С. М., Щербакова Т. О., Курило В. Л., Гументик М. Я., Рахметова С. О., Квак В. М., Кривицький К. М., **Лашук С. О.** Методика проведення експертизи сортів міскантусу китайського (*Miscanthus sinensis Anderss.*) на відмінність, однорідність та стабільність. Український інститут експертизи сортів рослин./За ред. Ткачик С. О. – 2-ге вид., випр. і доп. – Вінниця: ФОП Корзун Д. Ю., 2016 – 514 с. (частка участі автора –25 %).

АНОТАЦІЯ

Лашук С. О. Створення вихідних селекційних матеріалів представників роду міскантус методом регуляції їх репродуктивного розвитку та застосуванням біотехнологічних методів – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 «Селекція і насінництво» – Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків, Київ, 2024.

У дисертації наведено теоретичне обґрунтування та методичні розробки нових сучасних біотехнологічних методів розмноження міскантусу та створення нових вихідних форм для збільшення генетичного різноманіття існуючих видів з погляду використання їх як сировини для біоенергетики.

Удосконалено методичні основи біотехнології міскантусу, зокрема, схеми та режими стерилізації насіння та бруньок із ризом, прописи живильних середовищ для пророщування насіння та мікроклонального розмноження міскантусу в умовах *in vitro*.

Розроблено метод отримання калюсних ліній *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* в умовах *in vitro* із застосуванням ініціації калюсогенезу та регенерації мікророслин з калюсу, що дає змогу підвищити коефіцієнт розмноження мікророслин *M. sacchariflorus* в середньому в 40 разів, *M. sinensis* – у 20 разів, порівнюючи з іноземними аналогами.

Розроблено метод адаптації регенерантів міскантусу у відкритому ґрунті, який передбачає стимуляцію росту ризом із застосуванням прописів живильних середовищ, до складу яких було введено як основний фітогормон гіберелін. Використання цього фітогормону сприяє збільшенню довжини ризом на живильних середовищах та забезпечує гарантоване збереження розмножених із культури *in vitro* мікророслин при адаптації у відкритому ґрунті без використання тепличних комплексів.

З'ясовано, що в структурі загальної продуктивності міскантусу маса стебел має найбільшу частку – 51,9–68,8 %, частка маси листків становить 29,5–48,1 % залежно від виду міскантусу.

Встановлено істотні відмінності у фенологічних, морфометричних показниках, а також цитологічні особливості генеративних органів, зокрема пилку, який відрізняється за якісними та кількісними ознаками (кольором, розміром, формою) у різних видів міскантусу.

Проведено оцінювання отриманих калюсних ліній *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* та *M. giganteus* з погляду генетичної однорідності каріотипу за рівнем плоідності рослин методом протокової цитофлуориметрії. З'ясовано, що отримані калюсні лінії *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* мають диплоїдний стан геному, як і рослини *M. sinensis*, розмножені безпосередньо з насіння.

Теоретично обґрунтовано та розроблено спосіб синхронізації цвітіння *M. sacchariflorus* і *M. sinensis*, створено симпатричні популяції *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* з регульованим цвітінням компонентів, які в майбутньому дадуть змогу отримати гібридне насіння та створити новий високопродуктивний селекційний матеріал міскантусу для потреб біоенергетики.

Ключові слова: міскантус, експланти, калюс, регенерація, ризоми, живильне середовище, пилки, цитологія, протокова цитофлуориметрія, цвітіння, симпатричні популяції.

ANOTATION

Lashuk S. O. Creation of initial selection materials of representatives of the genus Miscanthus by the method of regulation of their reproductive development and the use of biotechnological methods - Qualification research paper with manuscript rights.

Dissertation for the degree of Candidate of Agricultural Sciences, specialty 06.01.05 "Breeding and seed production" – Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet, Kyiv, 2024.

The dissertation presents the theoretical justification and methodical development of new modern biotechnological methods of miscanthus propagation and the creation of new initial forms to increase the genetic diversity of existing species from the point of view of their use as raw materials for bioenergy.

The methodical foundations of miscanthus biotechnology have been improved, in particular, schemes and modes of sterilization of seeds and buds with rhizomes, prescriptions of nutrient media for seed germination and microclonal propagation of miscanthus *in vitro*.

A method of obtaining callus lines of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus in vitro* using initiation of callusogenesis and regeneration of microplants from callus has been developed, which makes it possible to increase the multiplication factor of microplants of *M. sacchariflorus* by an average of 40 times, *M. sinensis* – by 20 times, comparing with foreign counterparts.

A method of adaptation of miscanthus regenerants in open ground has been developed, which involves stimulating the growth of rhizomes with the use of nutrient media prescriptions, which included gibberellin as the main phytohormone. The use of this phytohormone helps to increase the length of rhizomes on nutrient media and ensures the guaranteed preservation of micro-plants propagated from *in vitro* culture during adaptation in open ground without the use of greenhouse complexes.

It was found that in the structure of the total productivity of miscanthus, the mass of stems has the largest share – 51.9–68.8%, the share of the mass of leaves is 29.5–48.1%, depending on the type of miscanthus.

Significant differences in phenological, morphometric indicators, as well as cytological features of generative organs, in particular pollen, which differs in qualitative and quantitative characteristics (color, size, shape) in different species of miscanthus, were established.

The obtained callus lines of *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* and *M. giganteus* were evaluated in terms of the genetic homogeneity of the karyotype according to the ploidy level of the plants by the method of ductal cytofluorimetry. It was found that the obtained callus lines of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus* have a diploid state of the genome, just like *M. sinensis* plants propagated directly from seeds.

A method of synchronizing the flowering of *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* was theoretically substantiated and developed, sympatric populations of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus* with regulated flowering of components were created, which in the future will make it possible to obtain hybrid seeds and create a new highly productive miscanthus breeding material for the needs of bioenergy.

Key words: *miscanthus, explants, callus, regeneration, rhizomes, nutrient medium, pollen, cytology, ductal cytofluorimetry, flowering, sympatric populations.*

Підписано до друку 06.03.2024. Формат 60×90/16
Обсяг 0,9 умов. друк. арк. Наклад 100 прим.
Замовлення № 449

ВПЦ «Візаві»
20300, м. Умань, вул. Тищика, 18/19
Свідоцтво об'єкта видавничої справи
ДК № 2521 від 08.06.2006