

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ С. О. Лашук

Науковий керівник
канд. с.-г. наук, с.н.с.
Гонтаренко Світлана Миколаївна

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Лащук 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 проаналізовано та узагальнено значний обсяг наукової літератури з питань біоенергетики, біотехнології перспективної біоенергетичної культури міскантусу, надано ботанічну характеристику роду *Miscanthus* та окреслено можливості використання міскантусу в біоенергетиці. В роботі 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 *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* ($2n$), а саме: застосування 70 % спиртового розчину впродовж 1–3 хв, далі – 2 % розчину гіпохлориду натрію впродовж 25 хв та 3 % розчину пероксиду водню з експозицією 10 хв. Цей метод забезпечив 96,9–100 % знезараженого насіння зі збереженням високих показників, на рівні 89,1–92,2 %, кількості схожого кондиційного насіння. Кращі результати зі знезараження бруньок із ризом *M. sacchariflorus* ($4n$) та *M. giganteus* становили 96,4–97,6 % стерильних експлантів, серед яких найбільшу кількість неушкоджених життєздатних бруньок (89,0–92,7 %) отримано із застосуванням схеми стерилізації, що містила мильний розчин – 30 хв; 0,05 % розчин перманганату калію – 10 хв, та 0,2 % розчин сулеми – 30 хв.

За результатами досліджень створено метод отримання калюсних ліній *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* в умовах *in vitro* способом ініціації калюсогенезу та

регенерації мікророслин з калюсу, метод розмноження міскантусу в умовах *in vitro* способом експлантації насіння або бруньок із ризом на живильне середовище та практичне розв'язання проблеми калюсних культур. Отже, кращі результати з ініціації утворення калюсів з насіння міскантусів *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* отримано за використання модифікованого середовища МС з ½ мікроелементів, комплексу вітамінів В₁, В₆, РР, С по 1 мг/л, амінокислот: глютамінової – 300 мг/л, аспарагінової – 50 мг/л, тірозину – 5 мг/л, аргініну – 3 мг/л, проліну – 2 мг/л, фітогормонів: 6-БАП – 0,6 мг/л, 2,4 Д – 2,0–2,5 мг/л, АБК – 0,3 мг/л, що забезпечило 100 % вихід калюсів з насіння міскантусу, яке проросло.

Визначено, що найкращим морфогенним середовищем є модифіковане середовище МС, яке характеризується підвищеною кількістю вітаміну В₁ – 10 мг/л, відсутністю 2,4 Д та АБК, застосуванням 6-БАП у кількості 2,0 мг/л та α-НОК – 0,3 мг/л. Це забезпечило 50 % частоту регенерації *M. sinensis* та 100,0 % – *M. sacchariflorus* і сприяло отриманню 30–35 шт. мікроклонів *M. sinensis* та 60–70 шт. мікроклонів *M. sacchariflorus* через 4 тижні культивування калюсу на регенераційному середовищі. Тому прописи живильних середовищ для індукції калюсогенезу з насіння міскантусу, морфогенезу калюсів та утворення мікроклонів міскантусу в умовах *in vitro* за ефективністю суттєво переважають відомі іноземні аналоги.

Проведено скринінг живильних середовищ для пророщування насіння *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* в умовах *in vitro*, який показав, що кращий результат за кількістю схожого насіння можна отримати, застосовуючи модифіковане середовище МС з додаванням комплексу вітамінів: В₁ – 10 мг/л, В₆, РР, С по 1 мг/л, амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аргініну – 30 мг/л, триптофану – 3 мг/л, тірозину – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л, фітогормонів: 6-БАП – 0,2 мг/л та ГК – 1,0 мг/л, яке забезпечило збільшення кількості схожого насіння, порівнюючи з середовищем–еталоном без гормонів, амінокислот та вітамінів, на 11,7–13,0 % залежно від виду міскантусу та року репродукції насіння.

Встановлено, що кращі результати з клонування міскантусу в умовах *in vitro* отримано за використання модифікованого середовища МС зі вмістом 6-БАП – 0,4 мг/л, кінетину – 0,5 мг/л, аденіну – 0,5 мг/л, ГК – 0,2 мг/л, з додаванням амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аргініну – 30 мг/л, триптофану – 3 мг/л, тірозину – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л, та комплексу вітамінів: В₁ – 10 мг/л, В₆, РР, С по 1 мг/л. Такий склад живильного середовища забезпечує отримання що 3 тижні більш як 8 клонів з однієї рослини *M. giganteus*, 9 клонів *M. sinensis* та 8 клонів *M. sacchariflorus*.

Розроблено метод розмноження міскантусу *in vitro* та адаптації у відкритому ґрунті, який включає стимуляцію росту ризом із застосуванням прописів живильних середовищ, до складу яких було введено як основний гормон гіберелін (ГК) – 0,5–1,0 мг/л, та як допоміжні гормони – 6-БАП – 0,2 мг/л, та НОК – 0,1 мг/л. Використання цих гормонів сприяє збільшенню довжини ризом на живильних середовищах та забезпечує гарантоване збереження розмножених із культури *in vitro* мікророслин у процесі адаптації.

У результаті фенологічних спостережень за рослинами *M. sinensis in vitro*, *M. sacchariflorus (4n) in vitro*, *M. sacchariflorus (2n) in vitro*, *M. giganteus in vitro* та рослиною *M. giganteus*, розмноженими ризомами (*ex vitro*), встановлено фенологічні відмінності, які полягають у більш ранньому (на 7–15 діб) настанні фаз відростання, куціння в рослин *M. sacchariflorus (2n)* та *M. sacchariflorus (4n)*, порівнюючи з *M. giganteus in vitro*, *M. giganteus (ex vitro)*, та більш ранніх (на 30–35 діб) строках проходження фази виходу в трубку, появи волоті та цвітіння у *M. sacchariflorus (4n)* порівняно з *M. sinensis in vitro*, та на 56–62 доби, порівнюючи з *M. giganteus in vitro* та *M. giganteus (ex vitro)*. Також встановлено, що рослини *M. sacchariflorus (2n)* в умовах Лісостепу України протягом вегетаційного періоду перебувають лише у фазі розетки, а фази виходу в трубку і, відповідно, появи волоті, цвітіння та плодоношення не настають. Визначено, що фази появи волоті та цвітіння у *M. sacchariflorus (4n) in vitro*, які припадають на останню декаду липня – першу декаду серпня, починалися на місяць раніше

ніж у *M. sinensis in vitro*. Цвітіння цих видів міскантусу асинхронне, тому отримання гібридного насіння проблематичне.

Надано морфологічну та цитологічну характеристику генеративних органів селекційного матеріалу трьох видів міскантусу – *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus in vitro*, а саме: маточок, пиляків, пилку. Встановлено, що тичинки міскантусів мають довгі тичинкові нитки та продовгуваті пиляки. Пиляки міскантусів *M. sinensis* та *M. giganteus* мають світло-жовте, жовте чи жовто-рожеве забарвлення, у *M. sacchariflorus (4n)* переважно жовто-рожеве. Пилок *M. sacchariflorus(4n)* та *M. sinensis* характеризується округлими формами, вирівняністю та майже однорідністю розмірів – 43–48 мкм у діаметрі, тоді як пилок *M. giganteus* більш гетерогенний, варіюється за розміром, діаметр – 23–45 мкм, але кількість мілких мікроспор невелика – 5–10 % від загальної в полі зору. Пилкове зерно має одну округлу орнаментовану пору з внутрішнім діаметром 2,7–4,0 мкм.

Визначення вмісту сухої речовини в рослині, який є важливим показником її фотосинтетичної активності, показало, що найбільший відсоток сухої речовини (76,5–78,4 %) міститься в надземній масі *M. giganteus ex vitro* та *M. giganteus in vitro*, тоді як у *M. sinensis in vitro* та у *M. sacchariflorus (4n) in vitro* цей показник на 17,7–22,4 % менший. Значна маса листків, яка становить залежно від виду міскантусу від 30 до 50 % надземної маси рослини, дає змогу рекомендувати використання рослини міскантусу не лише як енергетичної, а й як кормової культури.

У процесі досліджень визначено вміст хлорофілу та каротиноїдів у асимілюючих органах рослин різних видів міскантусу. Найвищий вміст суми хлорофілів *a* та *b* виявлено в листках *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* – 1,78–1,84 мг/г сирої речовини відповідно, що на 21,3–22,2 % більше, ніж у *M. giganteus*. За вмістом хлорофілу *a* значних відмінностей у досліджуваних видів міскантусу зафіксовано не було. Тоді як показники вмісту хлорофілу *b* у *M. giganteus* суттєво відрізнялися від визначених у листках *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*. Різниця становила 32,5 %, порівнюючи зі вмістом хлорофілу *b* у

листках *M. sacchariflorus*, та 39,7 % – з *M. sinensis*. Найбільший показник співвідношення хлорофілу a/b було визначено у *M. giganteus* – 2,13, що вказує на високу активність фотосистеми I, яка активна в довгохвильовій частині спектра, тоді як фотосистема II активується світлом з довжиною менш ніж 680 нм; у *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* цей показник був значно меншим – на рівні 1,77.

Висвітлено питання щодо оцінювання отриманих калюсних ліній *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* з погляду генетичної однорідності каріотипу за рівнем плідності рослин способом протокової цитофлуориметрії з використанням цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytometer COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer SYSTEM II™ Software. Встановлено, що отримані нами рослини калюсних ліній *M. sinensis* мають диплоїдний стан генома з кількістю хромосом $2n=38$, як і рослини *M. sinensis*, розмножені безпосередньо з насіння.

Теоретично обґрунтовано та розроблено спосіб синхронізації цвітіння *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*, який включає одно- або дворазову обробку 0,0001–0,0005 % 6-БАП рослин *M. sinensis* в останню декаду липня, що стимулює цвітіння цього виду міскантусу, яке починається на 1–1,5 тижня раніше, та висаджування ризом *M. sacchariflorus* восени (наприкінці вересня – початку жовтня), що затримує початок цвітіння *M. sacchariflorus* на 2–3 тижні наступного року.

Застосування таких способів регулювання синхронізує цвітіння *M. sinensis* та *M. sacchariflorus*, які почнуть цвісти синхронно у першій–другій декаді серпня на наступний рік, що значно прискорить селекційний процес створення нових триплоїдних гібридів міскантусу та сприятиме значній економії ресурсів в результаті проведення селекції в умовах поля, а не в умовах теплиці, як це відбувається зазвичай в країнах Європи та США.

Створено симпатричні популяції *M. sinensis* та *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, пилок, цитологія, протокова цитофлуориметрія, цвітіння, симпатричні популяції.

ANNOTATION

Lashuk S.O. Creation of new 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 scientific work with manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of candidate of agricultural sciences, specialty 06.01.05 «Breeding and seed production» - Institute of bioenergy crops and sugar beets. - Kyiv, 2022.

The dissertation analyzed and summarized a significant volume of scientific literature on bioenergy, biotechnology of the promising bioenergetic miscanthus crop, provided botanical characteristics of the genus *Miscanthus* and the possibilities of using miscanthus in bioenergy. The paper 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 using them as raw materials for bioenergy.

The methodical foundations of miscanthus biotechnology have been improved, in particular, the schemes and modes of sterilization of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus* seeds ($2n$), namely, the use of 70 % alcohol solution for 1–3 min., then – 2 % sodium hypochlorite solution for 25 min. and 3 % hydrogen peroxide solution with exposure for 10 minutes. This method provided 96.9–100 % of decontaminated seeds while maintaining high indicators of the number of similar conditioned seeds at the level of 89.1–92.2%. The best results for disinfection of buds with the rhizome of *M. sacchariflorus* ($4n$) and *M. giganteus* were 96.4–97.6% of sterile explants, among which the largest number of intact viable buds (89.0–92.7%) was obtained with the use of sterilization scheme, which included a soapy solution - 30

min.; 0.05% solution of potassium permanganate - 10 min. and 0.2% sulema solution - 30 min.

Based on the results of research, a method of obtaining callus lines of *M. sinensis*, *M. sachariflorus* (*in vitro*) by initiating callusogenesis and regeneration of micro-plants from callus and a method of propagating miscanthus *in vitro* by explanting seeds or buds with rhizomes on a nutrient medium and a practical solution to the problem were created callus cultures. Thus, it was established that the best results from the initiation of callus formation from the seeds of miscanthus *M. sinensis* and *M. sachariflorus* were obtained using a modified MS medium with ½ trace elements, a complex of vitamins B1, B6, PP, C at 1 mg/l, amino acids: glutamine – 300 mg/l, aspartic – 50 mg/l, tyrosine – 5 mg/l, arginine – 3 mg/l, proline – 2 mg/l, phytohormones: 6-BAP – 0.6 mg/l, 2,4 D – 2.0–2.5 mg/l, ABA – 0.3 mg/l, which ensured 100% yield of calli from germinated miscanthus seeds.

It was determined that the best morphogenic medium is a modified MS medium, which is characterized by an increased amount of vitamin B1–10 mg/l, the absence of 2,4 D and ABA, the use of 6-BAP in the amount of 2.0 mg/l and α -NUK - 0, 3 mg/l. This ensured a 50% regeneration frequency for *M. sinensis* and 100.0% for *M. sacchariflorus* and contributed to obtaining 30–35 pcs. microclones of *M. sinensis* and 60–70 pcs. microclones of *M. sacchariflorus* after 4 weeks of callus cultivation on regeneration medium. Therefore, prescriptions of nutrient media for the induction of callusogenesis from miscanthus seeds, callus morphogenesis and the formation of miscanthus microclones *in vitro* are significantly more effective than known foreign analogues.

Screening of nutrient media for the germination of *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* seeds *in vitro* was carried out, which showed that the best result in terms of the number of similar seeds can be obtained using a modified MS medium with the addition of a complex of vitamins: B1 – 10 mg/l, B6, PP, C – 1 mg/l, amino acids: glutamine – 250 mg/l, arginine – 30 mg/l, tryptophan – 3 mg/l, tyrosine – 3 mg/l, hydroxyproline – 2 mg/l, phytohormones: 6- BAP – 0.2 mg/l and HA –1.0 mg/l, which ensured an increase in the number of similar seeds, compared to the standard medium

without hormones, amino acids and vitamins, by 11.7 – 13.0%, depending on species of miscanthus and year of seed reproduction.

It was established that the best results from miscanthus cloning in vitro were obtained using a modified MC medium containing 6-BAP – 0.4 mg/l, kinetin – 0.5 mg/l, adenine – 0.5 mg/l, HA – 0.2 mg/l, with the addition of amino acids: glutamine – 250 mg/l, arginine – 30 mg/l, tryptophan – 3 mg/l, tyrosine – 3 mg/l, hydroxyproline – 2 mg/l and a complex of vitamins: B1 – 10 mg/l, B6, PP, C 1 mg/l each. This composition of the nutrient medium ensures obtaining every 3 weeks more than 8 clones from one *M. giganteus* plant, 8.5 clones of *M. sinensis* and 7.6 clones of *M. sacchariflorus*.

A method of propagation of miscanthus in vitro and adaptation in open ground has been developed, which includes stimulation of rhizome growth with the use of prescriptions of nutrient media, which included, as the main hormone, gibberellin (HA) - 0.5–1.0 mg/l, and as auxiliary hormones – 6-BAP – 0.2 mg/l and NOK – 0.1 mg/l. The use of these hormones 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.

According to the results of phenological observations, plants of *M. sinensis* in vitro, *M. sacchariflorus* (4n) in vitro, *M. sacchariflorus* (2n) in vitro, *M. giganteus* in vitro and plants of *M. giganteus*, propagated by rhizomes (*ex vitro*), established phenological the differences, which consist in the earlier (by 7–15 days) onset of the regrowth, tillering phases in *M. sacchariflorus* (2n) and *M. sacchariflorus* (4n) plants, compared to *M. giganteus* in vitro, *M. giganteus* (*ex vitro*) and earlier (by 30–35 days) periods of passage of the tube emergence phase, panicle appearance and flowering in *M. sacchariflorus* (4n) compared to *M. sinensis* in vitro and by 56–62 days, compared to *M. giganteus* in vitro and *M. giganteus* (*ex vitro*). Also, it was noticed that plants of *M. sacchariflorus* (2n) in the conditions of the forest-steppe of Ukraine lack the phase of emergence into the tube, and accordingly, the appearance of panicles, flowering and fruiting. It was determined that the phases of panicle appearance and flowering in *M. sacchariflorus* (4n) in vitro, which fall on the last decade of July-first decade of August,

occurred a month earlier than in *M. sinensis in vitro*. The flowering of these types of miscanthus is asynchronous, so obtaining hybrid seeds is problematic.

The morphological and cytological characteristics of the generative organs of the breeding material of three species of miscanthus – *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus in vitro* – pistils, anthers, and pollen are given. Miscanthus stamens have been found to have long filaments and elongated anthers. Anthers of miscanthus *M. sinensis* and *M. giganteus* are light yellow, yellow or yellow-pink in color, in *M. sacchariflorus (4n)* it is mostly yellow-pink. Pollen of *M. sacchariflorus(4n)* and *M. sinensis* is characterized by rounded shapes, alignment and almost uniform size – 43–48 μm in diameter, while *M. giganteus* pollen is more heterogeneous, varies in size, diameter – 23–45 μm , but the amount of small microspores is small - 5–10% of the total in the field of view. The pollen grain has one rounded ornamented pore with an inner diameter of 2.7–4.0 μm .

The determination of the dry matter content in the plant, which is an important indicator of the photosynthetic activity of plants, showed that the highest percentage of dry matter (76.5–78.4%) is contained in the aerial mass of *M. giganteus ex vitro* and *M. giganteus in vitro*, while in *M. sinensis in vitro* and in *M. sacchariflorus (4n) in vitro* by 17.7–22.4% less. The significant mass of leaves, which, depending on the type of miscanthus, is from 30 to 50% of the above-ground mass of the plant, makes it possible to recommend the use of miscanthus plants not only as an energy source, but also as a fodder crop.

In the course of the research, the content of chlorophyll and carotenoids in the assimilating organs of plants of different types of miscanthus was determined. The highest content of the sum of chlorophyll a and c was determined in the leaves of *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* – 1.78–1.84 mg/g of raw material, respectively, which is 21.3–22.2% more than *M. giganteus*. There were no significant differences in the content of chlorophyll a in the studied miscanthus species. Then, as an indicator of the content of chlorophyll in the leaves of *M. giganteus*, they differed significantly from those determined in the leaves of *M. sacchariflorus* and *M. sinensis*. The difference was 32.5% in comparison with the chlorophyll content in the leaves of *M.*

sacchariflorus and 39.7% in *M. sinensis*. The highest ratio of chlorophyll a/b was determined in *M. giganteus* – 2.13, which indicates the high activity of photosystem I, which is active in the long-wavelength part of the spectrum, while photosystem II is activated by light with a wavelength of less than 680 nm, and in *M. sacchariflorus* and *M. sinensis*, this indicator was much lower - at the level of 1.77.

The issue of evaluating the obtained callus lines of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus* from the point of view of the genetic homogeneity of the karyotype according to the ploidy level of the plants by means of flow cytometry using the flow cytometer COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytometer COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer SYSTEM II™ Software is highlighted. It was established that the *M. sinensis* callus plants obtained by us have a diploid state of the genome with the number of chromosomes ($2n=38$), 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, which includes a one-time treatment of 0.0001–0.0005% 6-BAP of *M. sinensis* plants in the last decade of July, which stimulates the flowering of this species of miscanthus, which begins 1–1.5 weeks earlier and planting rhizomes of *M. sacchariflorus* in autumn - late September - early October, which delays the start of *M. sacchariflorus* flowering for 2–3 weeks next year.

The use of such methods of regulating the flowering of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus* synchronizes the flowering of these miscanthus species, which begin to bloom synchronously in the first-second decade of August next year, which will significantly speed up the selection process of creating new triploid hybrids of miscanthus and contribute to a significant saving of resources as a result of carrying out selection in field conditions, and not in greenhouse conditions, as is usually done in European countries and the USA.

Sympatric populations of *M. sinensis* and *M. sacchariflorus* with regulated flowering components were created, which in the future will allow obtaining hybrid seeds and creating a new high-yield breeding material of miscanthus for the needs of bioenergy.

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

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 додатково відображають результати дисертації

Отримання українських охоронних документів на об'єкти

інтелектуальної власності:

6. Гонтаренко С. М., Лашук С. О. Патент на корисну модель № 97957 Україна, МПК: [A01B 79/00](https://www.wipo.int/patentclassifications/2006/classifications/mcs/mcs01b07900.html). Спосіб розмноження рослин міскантусу з насіння з

низькою схожістю та життєздатністю. Заявник та патентовласник Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН № у 2014 12015; заявл. 06.11.2014, опубл. 10.04.2015, бюл. № 7 (частка участі автора –55 %).

7. 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 № у 2016 03754; заявл. 08.04.2016, опубл. 10.11.2016, бюл. № 21 (частка участі автора –55 %).

8. Гонтаренко С. М., Лашук С. О., Герасименко Г. М. Патент на винахід № 127650 Україна, МПК: A01H 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:

9. 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 %).

10. 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 %).

11. 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 %).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

12. 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 %).

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

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

15. 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 %).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
1.1. Походження рослин роду <i>Miscanthus</i>	27
1.2. Ботанічна характеристика роду <i>Miscanthus</i>	30
1.3. Використання міскантусу в біоенергетиці.....	35
1.4. Створення вихідного селекційного матеріалу та розмноження рослин із використанням біотехнологічних методів.....	37
1.5. Історичні аспекти використання методів біотехнології в селекції міскантусу, стан розвитку селекції міскантусу у світі.....	40
1.6. Стан та напрями селекції міскантусу в Україні.....	42
1.7. Способи розмноження міскантусу.....	44
1.8. Створення вихідного селекційного матеріалу методом непрямого морфогенезу в рослин роду <i>Miscanthus</i>	46
1.9. Синхронізація цвітіння рослин міскантусу китайського та міскантусу цукроквіткового в симпатричних популяціях.....	48
РОЗДІЛ 2. ВИХІДНИЙ МАТЕРІАЛ, УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІЖЕНЬ.....	51
2.1. Вихідний матеріал.....	51
2.2. Умови проведення досліджень.....	51
2.3. Методика проведення досліджень.....	54
2.3.1. Розроблення методики проведення експертизи сортів міскантусу гігантського (<i>Miscanthus X giganteus</i> J.M.Greef & Deuter ex Hodkinson Renvoize), міскантусу цукроквіткового (<i>Miscanthus sacchariflorus</i> Maxim), міскантусу китайського (<i>Miscanthus sinensis</i> Anderss) на відмінність, однорідність і стабільність.....	55
2.3.2. Фізіолого-біохімічні дослідження.....	55
2.3.3. Біотехнологічні дослідження.....	55

2.3.4. Дослідження з біоморфології, феноритмики та продуктивності вихідного селекційного матеріалу представників роду <i>Miscanthus</i>	58
2.3.5. Молекулярно-генетичні дослідження.....	59
2.3.6. Цитологічні дослідження.....	60
2.3.7. Дослідження з розроблення методу синхронізації цвітіння міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського.....	60
РОЗДІЛ 3. ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ МІСКАНТУСУ <i>IN VITRO</i> ТА УМОВИ ПРОРОЩУВАННЯ НАСІННЯ НА ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ.....	61
3.1. Отримання асептичної культури міскантусу <i>in vitro</i>	61
3.2. Пророщення насіння міскантусу в умовах <i>in vitro</i>	69
РОЗДІЛ 4. ОТРИМАННЯ КАЛЮСНИХ ЛІНІЙ ТА КЛОНУВАННЯ В МІСКАНТУСУ В УМОВАХ <i>IN VITRO</i> , АДАПТАЦІЯ РЕГЕНЕРАНТІВ У ВІДКРИТОМУ ҐРУНТІ.....	73
4.1. Отримання калюсних ліній та клонування <i>M. sinensis</i> та <i>M. sacchariflorus</i> в умовах <i>in vitro</i>	73
4.2. Мультиплікація та порівняльна характеристика методів мікроклонального розмноження міскантусу в умовах <i>in vitro</i>	83
4.3. Адаптація регенерантів міскантусу у відкритому ґрунті.....	87
РОЗДІЛ 5. ФЕНОЛОГО-МОРФОЛОГІЧНІ, ЦИТОЛОГІЧНІ Й ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РІЗНИХ ВИДІВ МІСКАНТУСУ ТА ОЦІНКА ЇХНЬОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ.....	95
5.1. Фенологія та морфометричні показники різних видів міскантусів.....	95
5.2. Морфометричні та цитологічні дослідження генеративних органів міскантусу.....	106
5.3. Визначення вмісту сухої речовини, хлорофілу та каротиноїдів у рослинах міскантусу.....	116
РОЗДІЛ 6. ВИЗНАЧЕННЯ ОДНОРІДНОСТІ КАРІОТИПУ НОВОСТВОРЕНИХ ЛІНІЙ ТА РЕГУЛЯЦІЯ ЦВІТІННЯ МІСКАНТУСУ.....	122

6.1. Протокова цитофлуориметрія калюсних ліній <i>M. sacchariflorus</i> (4n), <i>M. sinensis</i> та розмноженого <i>in vitro</i> <i>M. giganteus</i>	122
6.2. Регуляція цвітіння міскантусів <i>M. sacchariflorus</i> (4n) та <i>M. sinensis</i>	130
ВИСНОВКИ.....	134
РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЙНОЇ ПРАКТИКИ.....	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	140
ДОДАТКИ.....	160

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

1. Пг – пікограми.
2. С-4 – цикл Хетча — Слека — шлях зв'язування вуглецю, характерний для вищих рослин, першим продуктом якого є чотиривуглецева щавелевооцтова кислота.
3. МС – живильне середовище Мурасіге і Скуга.
4. ІОК – індолілоцтова кислота.
5. НОК – нафтилоцтова кислота.
6. БАП – 6-бензиламінопурин.
7. 2,4 Д – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота.
8. ГК – гіберелова кислота.
9. α -НОК – α -нафтилоцтова кислота.

ВСТУП

Актуальність теми. Міскантус – швидкоросла тростина з родини злакових, є найбільш перспективною культурою для виробництва енергії в Україні. 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. Міскантус практично не вимагає затрат при вирощуванні, тому що після посадки майже не потребує догляду. Посадки міскантусу не конкурують з виробництвом продовольчих культур через те, що ці рослини можна висаджувати на землях, які вийшли з сільськогосподарського користування.

Для енергетичних цілей використовують триплоїдний гібрид міскантусу з пізнім цвітінням, який не дає насіння, тому, крім вегетативного (ризوماми), застосовують мікроклональне розмноження міскантусу. Суттєвим недоліком цього методу є вимерзання рослин протягом зимового періоду в разі висаджування міскантусу у відкритий ґрунт на першому році вегетації. З метою запобігання ушкодження та загибелі рослин у країнах Європи для їх адаптації та підрощування використовують тепличні комплекси, що збільшує вартість розсади й ускладнює технологію вирощування. Тому актуальним є не тільки розроблення методів мікроклонального розмноження в культурі *in vitro*, зокрема, введення в культуру, стимуляції росту та розвитку в умовах *in vitro* способом модифікації складу живильних середовищ та умов культивування, добору та оптимізації середовищ для кожного виду міскантусу, індукції ризогенезу, а й розроблення способів збереження рослин на першому році вирощування у відкритому ґрунті, які дадуть змогу уникнути використання тепличних комплексів і набагато здешевлять технологію мікроклонального розмноження.

Проте розповсюдження отримав тільки один японський клон, тому існує ризик неконтрольованих епіфітотій. Пошуки нових клонів або триплоїдного насіння в симпатричних популяціях міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського в Японії не були результативними, так само як і селекційні роботи з відтворення високопродуктивного триплоїда в умовах теплиць, за використання

компонентів для гібридизації цих двох видів – міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського.

Тому на тепер існує проблема отримання нового селекційного матеріалу способом створення симпатричних популяцій міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського. Для регуляції цвітіння та відтворення рослин в останні роки знову звернулися до селекції та біотехнології міскантусів китайського та цукроквіткового.

Відомо, що велика кількість видів роду *Miscanthus* не утворює насіння, що створює перешкоди для генеративного розмноження культури та проведення селекційних робіт. Ті генотипи, що цвітуть рано – наприкінці літа, використовуються як газонні декоративні трави і мають невеликий врожайний потенціал. Насіння, що утворюється, має низьку схожість (6-60 %), життєздатність його зберігається приблизно 6 місяців.

Ресинтез нових триплоїдних клонів способом створення симпатричних популяцій міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського пов'язаний із проблемою асинхронності цвітіння компонентів гібридизації.

Розроблення фізіологічних методів стимуляції цвітіння рослин у літній період і синхронізація цвітіння батьківського та материнського компонентів не тільки дадуть поштовх для вітчизняної селекції, а й при комерціалізації проекту забезпечать ринок кондиційним насінням, вартість якого на сьогодні досить висока і становить від 30 до 50 американських доларів за 1000 насінин.

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:

– програма наукових досліджень (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» на 2011–2015 рр., за завданням «Розробити методи експресії репродуктивного розвитку та отримання кондиційного насіння, вдосконалити

методи вегетативного розмноження, створити нові вихідні селекційні матеріали представників роду *Miscanthus*», номер державної реєстрації № ДР 0111U002767;

– ПНД «Теоретичні основи створення джерел біоенергетичної рослинної сировини та технології її переробки», підпрограма «Сорти та гібриди та технології вирощування цукроносних культур для виробництва біоетанолу» на 2011–2015 рр., за завданням «Розробити методи розмноження та тривалого збереження представників роду *Miscanthus* в умовах *in vitro*, створити їх колекцію та банк герма плазми представників триби *Andropogonaceae*», № ДР 0111U002768;

– ПНД 16 «Селекція, насінництво і розсадництво та технологія вирощування біоенергетичних культур як сировини для виробництва рідких, твердих і газоподібних видів палива» на 2012–2020 рр., за завданням «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 *Andropogonaceae*», № ДР 0116U003150.

Мета досліджень – розробити методи створення, розмноження та оцінки нових вихідних селекційних матеріалів представників роду *Miscanthus* із залученням методів біотехнології *in vitro*.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

- розробити метод отримання селекційного матеріалу (калюсних ліній) *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* способом ініціації калюсогенезу, регенерації мікророслин із калюсу та підвищити коефіцієнт розмноження цих видів міскантусу;
- розробити метод збереження висаджених із 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 плоїдності методом протокової цитофлуориметрії;
- розробити метод синхронізації цвітіння рослин *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* в умовах відкритого ґрунту;
- удосконалити схеми, режими стерилізації насіння та бруньок з ризом, методи мультиплікації *in vitro* *M. sacchariflorus*, *M. sinensis* та *M. giganteus*;
- провести фенологічні та морфометричні дослідження, визначення структури загальної продуктивності, морфо-біометричні та цитологічні дослідження генеративних органів (маточок, пиляків, пилку) трьох видів міскантусу – *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus*;
- визначити вміст сухої речовини, хлорофілу *a*, хлорофілу *b* та каротиноїдів у листках міскантусу;
- створити вихідний селекційний матеріал міскантусу.

Об’єкт дослідження – рослини роду *Miscanthus* видів *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack, *Miscanthus sinensis* Andersson, *Miscanthus giganteus* J.M.Greef, Deuter ex Hodk., Renvoize.

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

Методи дослідження: біотехнологічні, фізіологічні, біохімічні, цитологічні, польові, математико–статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів.

Уперше:

- розроблено метод отримання селекційного матеріалу (калюсних ліній) *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* з насіння із низькою схожістю та життєздатністю способом ініціації калюсогенезу та регенерації мікророслин з калюсу;

- розроблено метод розмноження та 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 проведено оцінювання створених калюсних ліній *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* з погляду генетичної однорідності каріотипу за рівнем плоїдності;
- розроблено метод синхронізації цвітіння рослин *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* в умовах відкритого ґрунту з використанням фізіологічного методу стимуляції цвітіння *M. sacchariflorus* та агротехнічного способу гальмування цвітіння *M. sinensis*.
- Удосконалено схеми та режими стерилізації насіння *M. sacchariflorus*, *M. sinensis* та 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.

Практичне значення результатів досліджень. З метою подальшої селекційної роботи отримано, відібрано й залучено для створення нових триплоїдних гібридів міскантусу (на зразок *M. giganteus*) п'ять ліній

M. sacchariflorus (4n) та *M. sinensis* з ознаками високої швидкості процесів росту, розвитку й продуктивності. Створено колекцію та банк гермплазми міскантусу видів *M. sacchariflorus*, *M. sinensis*, *M. giganteus*, розроблено методики проведення експертизи сортів міскантусу гігантського (*Miscanthus x giganteus* J.M. Greef&Deuterex Hodkinson Renvoize), міскантусу цукроквіткового (*Miscanthus sacchariflorus* Maxim) та міскантусу китайського (*Miscanthus sinensis* Anderss) на відмінність, однорідність і стабільність.

Розроблено деклараційні патенти на корисну модель «Спосіб розмноження рослин міскантусу з насіння з низькою схожістю та життєздатністю» та «Спосіб розмноження в культурі *in vitro* та адаптації міскантусу у відкритому ґрунті», які рекомендуємо застосовувати у селекційному процесі створення та розмноження нових вихідних селекційних матеріалів представників роду *Miscanthus* із залученням біотехнології *in vitro* та при комерційному масштабованому вирощуванні міскантусу як сировини для біоенергетики для здешевлення його агротехнології.

Для створення гетерозисних гібридів доцільно використовувати результати досліджень патенту на винахід «Спосіб синхронізації цвітіння компонентів гібридизації міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського в польових умовах».

Особистий внесок здобувача. Дисертаційну роботу виконано автором самостійно. Зроблено глибокий аналіз вітчизняних та зарубіжних літературних джерел за темою дисертації, розроблено програму досліджень і схеми дослідів згідно з чинними методиками, проведено лабораторні, польові досліді, узагальнено отримані експериментальні дані та здійснено їх статистичну обробку, сформульовано висновки та розроблено рекомендації для селекційної практики. Автором у співавторстві розроблено патенти, методичні рекомендації.

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

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати досліджень викладено та обговорено на щорічних звітах методичної комісії Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН (2013–2016 рр.), а також апробовано у виступах на конференціях:

- V Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених «Новітні технології вирощування сільськогосподарських культур» (м. Київ, 29–30 вересня 2016 р.);

- VII Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, 19 квітня 2019 р.);

- VII Міжнародна науково-практична конференція «Results of modern scientific research and development» (Мадрид, Іспанія, 21 вересня 2021 р.);

- VIII Міжнародна науково-практична конференція «Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects» (Берлін, Німеччина, 23–25 січня 2022 р.).

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, три патенти України на корисну модель, чотири тези доповідей на наукових конференціях, три методичні рекомендації.

Структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на **168** сторінках комп'ютерного тексту. Вона складається зі вступу, шести розділів, висновків, списку використаних літературних джерел, що налічує **191** посилання, з яких **138** – латиницею, **6** додатків та містить **21** таблицю і **73** рисунки.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Походження рослин роду *Miscanthus*

Природними місцями походження роду *Miscanthus* є терени Японії, Південних Курил, Маньчжурії, Кореї, Тайланду, Полінезії, Східної частини Китаю та В'єтнаму (рис. 1.1) [1–5].

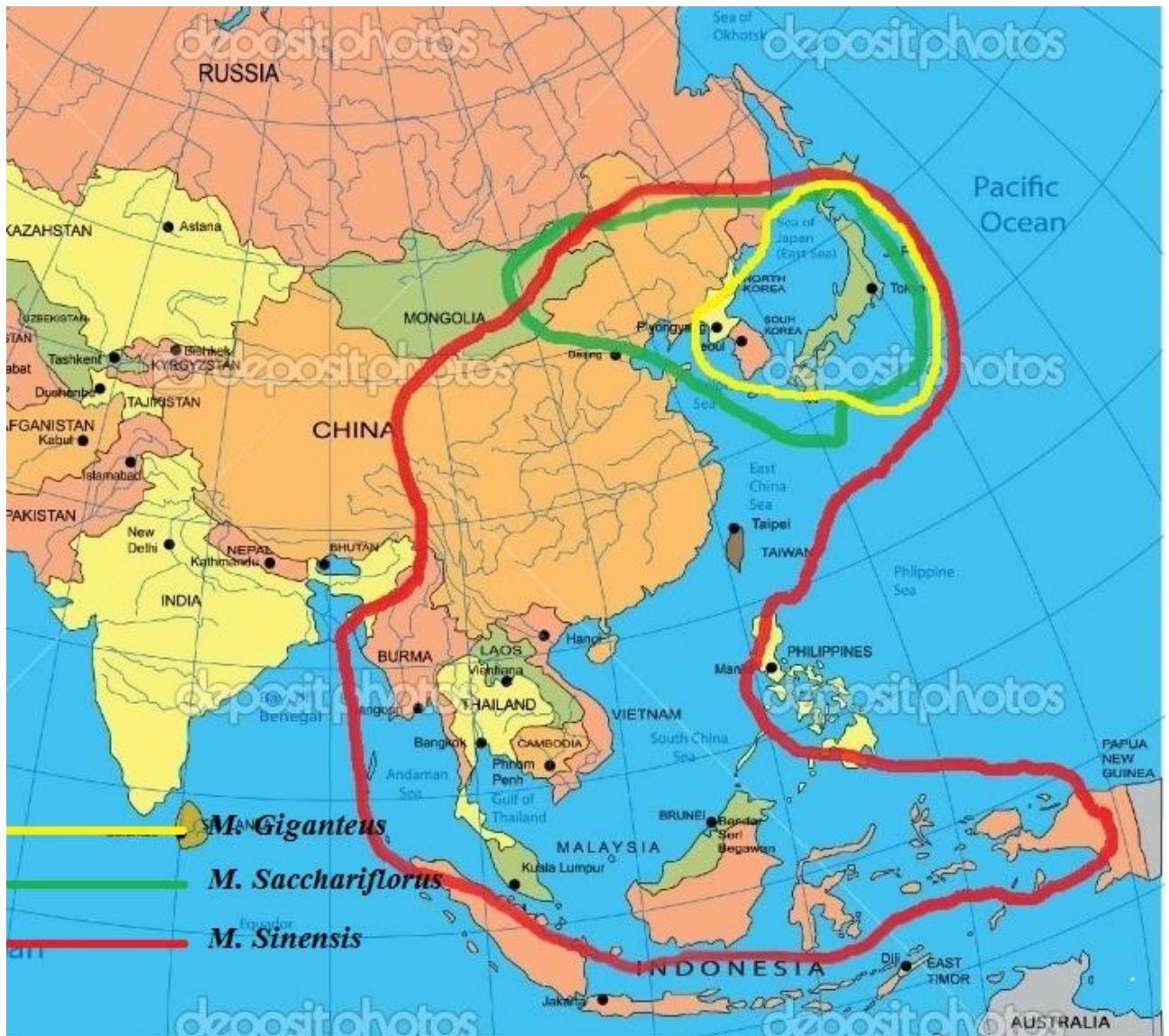


Рис. 1.1. Ареал походження рослин роду *Miscanthus*

Цей рід об'єднує понад двадцять різних морфологічних видів [6].

Серед них найбільш поширеними є:

- *M. floridulus* (Labill.) Warb.
- *M. intermedius* (Honda) Honda
- *M. longiberbis* Nakai

- *M. lutarioparius*
- *M. oligostachyus* Stapf.
- *M. paniculatus* (B. S. Sun) Renvoize & S. L. Chen
- *M. sacchariflorus* (Maxim.) Hack.
- *M. sinensis* Anderss.
- *M. tinctorius* (Steud.) Hack.
- *M. transmorrisonensis* Hayata
- the hybrid *M. giganteus* Greef & Deuter ex Hodkinson and Renvoize [7–9].

Особливо швидким ростом і високою якістю сировини характеризується *M. sinensis*. У природі ці рослини виростають до 4 метрів заввишки, діаметр стебла досягає подекуди 6 см, а вегетація може тривати приблизно 30 років [10].

Рослини міскантусу китайського поширені на відкритих трав'янистих схилах, лісових галявинах нижнього гірського поясу на півдні Приморського краю Росії, в Кореї та Японії. Міскантус китайський зростає в районах з субарктичним, прохолодно-помірним і помірно-теплим кліматом, переважно на аеробних ґрунтах [11]. З усіх видів міскантусу, адаптованих до помірного клімату, міскантус китайський має найширший природний ареал розповсюдження, що свідчить про значну генетичну різноманітність та спроможність адаптуватися до навколишнього середовища [12–14].

Міскантус китайський зазвичай диплоїдний із розміром моноплоїдного генома 2,5–2,8 пг [12, 15, 13, 16–18].

Іншим важливим для культивування видом є міскантус цукрокрітковий (*M. sacchariflorus*). Це багаторічник висотою 0,8–2,0 м, з довгими повзучими кореневищами, який швидко колонізує ґрунтовий простір, утворюючи суцільні плантації [19]. Розповсюджений переважно в прибережній зоні. Рослини міскантусу цукрокріткового зростають на вологих лугах, піщаних берегах річок, лісових галявинах, відкритих кам'янистих схилах Кореї, Китаю, Японії, від Амурської області до півдня Приморського краю Росії. Трапляються як диплоїди, так і тетраплоїди з розміром моноплоїдного генома 2,1–2,3 пг

[15–18, 20]. Особливою рисою міскантусу цукрокрівкового є його зимостійкість, яка є найвищою серед представників родини *Miscanthus*. Відомо, що популяції з Північного Китаю та Сходу Росії витримують мінімальну температуру повітря $-40,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ [21, 22]. Завдяки довгим кореневищам та здатності зав'язувати насіння, цей вид культивується обмежено [23].

Природні ареали міскантусу цукрокрівкового та міскантусу китайського перекриваються на широті 29° – 43° (позначено жовтим кольором на рис. 1.1). Міскантус цукрокрівковий поширюється далі на північ, приблизно до 50° на сході Росії (позначено зеленим кольором на рис. 1.1), а міскантус китайський – далі на південь, приблизно до 18° широти на острові Хайнані, Китай (позначено червоним кольором на рис. 1.1) [13, 24].

Молекулярними та цитогенетичними дослідженнями підтверджено автополіплоїдне походження тетраплоїдного міскантусу цукрокрівкового від диплоїдного [14, 25]. Зокрема, як вважають деякі науковці [20, 26], подібність генотипів з одонуклеотидним поліморфізмом, який виникає як результат крапкових мутацій у диплоїдних і тетраплоїдних рослин міскантусу цукрокрівкового, також вказує на те, що тетраплоїди виникли внаслідок автополіплоїдизації диплоїдів. Відомо також про інтрогресію диплоїдного міскантусу китайського в тетраплоїдну форму міскантусу цукрокрівкового. Певний градієнт інтрогресії ДНК диплоїдного міскантусу китайського, за даними структурного аналізу, мали більшість тетраплоїдів міскантусу цукрокрівкового по всій території Японії. Серед фенотипових міскантусів цукрокрівкових частка ДНК міскантусу китайського становила 7 % (від 1 до 39 %), найбільша інтрогресія була визначена на півдні Японії. А на півночі Японії було виявлено орієнтовно 1 % рідкісних диплоїдних рослин міскантусів китайських з 6–27 % ДНК, що походила з міскантусу цукрокрівкового. На переважній більшості території розповсюдження міскантусу цукрокрівкового поширені як диплоїдні, так і тетраплоїдні форми [15, 17, 18, 21, 27]. Диплоїдна форма міскантусу цукрокрівкового поширена на сході Росії, на території Китаю та Кореї [16, 17, 21, 27], але відсутня в Японії [20]. Тетраплоїдна форма

міскантусу цукрокрівкового здебільшого розповсюджена в Японії та Кореї, трапляється на сході Росії та в Китаї [15, 28, 17, 18, 21, 29].

Відомо, що на диплоїдному рівні *M. sacchariflorus* має на $\approx 0,5$ пг ($\approx 23\%$) менше ДНК у порівнянні з *M. sinensis*, тобто має місце 1,2-кратна різниця вмісту ядерної ДНК між *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* за однакової кількості хромосом ($2n=2x=38$). Спостерігали 17–26% варіації у кількості ДНК між цими двома видами [15, 29, 30, 16, 17, 25]. Як вважають вчені [31], вміст більшої кількості ДНК спричиняє не тільки збільшення ядра і розміру клітин, а й подовження мінімального часу для поділу клітин, що впливає на тривалість всіх стадій клітинного циклу. На думку Кліфтон-Браун та Левандовські [32], менший розмір клітин призводить до зменшення розмірів сім'ядоль і гіпокотилів, і тому маса насіння, що продукує *M. Sacchariflorus*, менша, ніж у *M. sinensis*. Отже, менший розмір генома, як-от у *M. sacchariflorus*, має свій фенотиповий прояв. До того ж вміст ДНК відіграє адаптивну роль і корелює з географічним та екологічним розподілом популяції [33].

Одним з підвидів міскантусу цукрокрівкового (за даними таксономічного оцінювання та молекулярних досліджень) є *M. sacchariflorus ssp. Lutarioriparius* [34, 35, 25, 20], розповсюджений в Китаї уздовж південного краю ареалу видів, біля річки Янцзи. Особливістю цієї рослини є дуже високі (три–сім метрів) стебла діаметром 10–20 мм. Цей підвид адаптований до восьмої–дев'ятої зони морозостійкості (USDA) з середньорічною мінімальною температурою від 1,2 до 12,2 °С. *M. sacchariflorus ssp. Lutarioriparius* здавна використовують в Китаї у промислових масштабах для виробництва паперу [34, 16].

Міскантуси китайський та цукрокрівковий вперше виявлено в Японії, де їхні ареали перекриваються (рис.1.1), що призвело до природної міжвидової гібридизації [36].

До початку п'ятого століття міскантус вирощували тільки в Китаї та застосовували як протиерозійну рослину. Вважають, що до Європи він потрапив в XVI столітті, де його вирощували тільки як декоративну рослину, оскільки він утворює великі купини [37].

У 1935 році данський вчений Ансель Ольсен завіз до Європи японський клон, який став вихідним для селекції рослин, що використовуються натеper [38–43]. З огляду на великий врожай Карл Фостер дав цій рослині назву *Miscanthus sinensis* «Giganteus». В наукових цілях цією рослиною почали займатись у 1983 році на Станції селекції рослин в Данії. З того часу проводять дослідницькі роботи в багатьох країнах Європи: Німеччині, Великобританії, Італії, Франції, Іспанії, Польщі [44].

Лінде-Лаурсен в 1993 році довів, що *Miscanthus sinensis* «Giganteus» є триплоїдом. У більшості верхівкових клітин коренів кількість хромосом – $2n=3x=57$ або 58. Для роду *Miscanthus* основна кількість хромосом становить $x=19$. Клон, привезений Ольсеном, виник найімовірніше через схрещування *M. sinensis* – диплоїда ($2n=2x=38$) і аллеотетраплоїда *M. sacchariflorus* ($2n=4x=76$), тому не може розмножуватись генеративно (має стерильний пилок) [45]. За результатами подальших досліджень його назву було змінено на *Miscanthus giganteus* (*M. giganteus*) [46, 47]. Батьківські види *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* вважають одними з найбільш поширених і дивергентних у межах культури *M. giganteus* [12, 13, 32, 48]. Видоутворення міскантусу – складний і динамічний процес. На відміну від обмеженої інтрогресії між диплоїдними *M. sacchariflorus* і *M. sinensis* в північному Китаї, відбір для адаптації до помірного морського клімату, ймовірно, сприяв інтрогресантам крос-плоїдності на півдні Японії.

1.2. Ботанічна характеристика роду *Miscanthus*

Miscanthus належить до відділу покритонасінних (Angiospermal), класу однодольні (Monocotyledoneae), ряду Glumifloreae, родини злакові (Gramineae), роду *Miscanthus* (Anderse) [49].

Коренева система. Міскантус є багаторічною трав'янистою рослиною з добре розгалуженою кореневою системою (рис. 1.2). Маса коренів перед появою сходів становить приблизно 15–25 т сухої маси з гектара. Корені досягають

2,5 метрів вглиб землі. Така коренева система сприяє дуже ефективному використанню елементів живлення і води [50, 51].

Кореневище міскантусу – це тонкі або товсті пагони (ризоми) завдовжки до 20 см і в діаметрі 1–2 см. Розгалуження кореневища – симподіальне. На кожному підземному пагоні розташована верхівкова брунька, яка з’являється над поверхнею ґрунту і стає надземним пагоном. Форма кореневища – безрозеткова з ортотропними вкороченими пагонами, на вузлах яких розміщені редуковані листки. В їхніх пазухах розміщені бруньки, з яких утворюються надземні пагони та корені [52–54].



Рис. 1.2. Коренева система міскантусу гігантського [55]

Стебло є дуже міцним, з волосками або без них, з добре вираженими вузлами. Забарвлення однорідне. Завдяки значному вмісту в стеблі лігніну і целюлози рослини відзначаються великою стійкістю проти механічних ушкоджень (рис. 1.3). В європейських умовах рослини міскантусу досягають 200–350 см заввишки. В перший рік вегетації рослини виростають до 200 см, на другий рік – до 350 см, а в наступні роки – до 400 см і більше [56, 7, 57].



Рис. 1.3. Стебло міскантусу гігантського [58]

Листові пластинки довгі, сплюснуті і ланцетоподібні (у небагатьох видів овальні), без поперечних жилок, довжина – 60–100 см, ширина – 0,8–3,2 см. Ростуть поодинокі з вузлів, майже по всій довжині стебла. Забарвлені вони однорідно, яскраво- або темно-зеленого кольору. На рослині листя утримується дуже довго, іноді навіть протягом зими [55, 59].

Міскантус належить до групи геліофітів – рослин з С–4 шляхом фотосинтезу, що забезпечує повну утилізацію вуглецю. Особливістю рослин із С–4 шляхом фотосинтезу є наявність фотосинтезуючих клітин двох типів: клітин обкладки судин флоєми та клітин мезофілу. Загальна ефективність трансформації сонячної енергії в біомасу у С–4 рослин значно вища, ніж у С–3 рослин – 4,0 та 3,6 % відповідно [60]. С–4 рослини мають змогу рости навіть за високої температури та інтенсивного освітлення при закритих продихах, тобто мають своєрідну адаптацію до жорстких погодно-кліматичних умов. Ефективність фотосинтезу в таких рослин дуже висока, а органічна речовина в значній мірі надходить не тільки на новоутворення пагонів, а й підземної частини – коренів, ризом. Міскантус вважають одним з рекордсменів серед найбільш ефективно синтезуючих організмів [1].

Суцвіттям є волоть, або колосоподібна волоть, слабо розвинута, яка також довго залишається на рослині (рис. 1.4). Суцвіття біле або рожево-сріблясте, до 25 см завдовжки. Колоски одноквіткові, до 0,7 см завдовжки, в пухких китицях з укороченою головною віссю. В основі колоскових лусок – довгі шовковисті волоски, нижня колоскова луска з колінчасто-вигнутою віссю до 1,5 см завдовжки [19].



Рис. 1.4. Суцвіття міскантусу гігантського [61]

Велика кількість рослин не цвіте або не утворює насіння. Якщо через холодний клімат Східної Європи рослини не входять у стан спокою, то цвітуть у вересні–листопаді [62, 11, 63].

У країнах південно-східної Азії деякі види міскантусу, зокрема, міскантус китайський та міскантус цукроквітковий, розмножуються насінням.

Насіння *M. sinensis* дуже маленьке – 1,9–2,7 мм довжиною, 0,7–1,0 мм шириною, маса насіння – від 0,5 до 1,4 мг. Кількість життєздатного насіння на одну волоть дуже варіюється. Найбільша кількість насінин у міскантусу китайського становить 123–150 шт. Кількість насіння – 962–1051 шт. з однієї рослини. З огляду на невеликий запас поживних речовин у насінні міскантусу посів у ґрунт має бути неглибоким. Насіння світлочутливе – світло регулює припинення фази спокою. Як свідчать Кліфтон-Браун та ін. [64], для більшої

частини ЄС низькі весняні температури обмежують дати посіву насіння міскантусу безпосередньо в ґрунт – насіння проростає тільки наприкінці травня і пізніше. Надалі, з кінця травня сухість ґрунту та конкуренція з боку бур'янів гальмують проростання та пригнічують ріст міскантусу. Крім того, коли сходи з'являються пізно, вони погано ростуть і до осені не здатні утворити достатню кількість кореневища для успішної перезимівлі. Поєднання всіх цих факторів робить прямий посів складним методом сучасної агрономії [33, 65, 66]. У польових дослідках із прямим посівом насіння міскантусу при використанні високих норм висіву (50–300 насіння на м²) схожість була приблизно 10 % від висіяного насіння [33].

З огляду на те, що насіння міскантусу маленьких розмірів, швидко втрачає свою життєздатність, було проведено дослідження із застосування регуляторів росту для підвищення проростання насіння *M. sinensis*. Так, у відомій роботі Єйсо [67] з вивчення ефекту гіберелової кислоти (ГК) на проростання насіння *Miscanthus sinensis* визначено, що ГК у концентрації від 0,1 до 100 мг/л збільшує кількість насіння, що проросло, порівнюючи з необробленим контролем, з 25 до 47 %. У дослідках Крістіана Джона обробка насіння *M. sinensis* ГК в дозуванні 500 мг/л сприяла підвищенню схожості насіння на 5–6 % за пророщування його при температурі 5°C [68].

1.3. Використання міскантусу в біоенергетиці

Швидка вичерпність запасів видобувних енергоносіїв спонукала суспільство по-новому оцінити енергетичний потенціал агрокультур, змінити ставлення до біомаси та фітоенергетики загалом [69–73]. Новітні технології перероблення біомаси дають змогу перетворювати енергію, акумульовану рослинами за період вегетації, на джерело енергії, яке надалі може використовуватися людиною [74–81].

На сьогодні в Європі активно розвивається виробництво і використання енергетичних біопаливних культур, до яких належать як дерев'янисті (тополя, верба), так і трав'янисті рослини, найбільш популярними серед яких є кукурудза,

соняшник, ріпак, соя, пшениця, топінамбур, буряк цукровий, буряк кормовий, сорго цукрове тощо [82, 83, 84, 85, 86]. В Україні ці культури майже не вирощують на енергетичні цілі, проте, враховуючи їхній потенціал до наростання вегетативної маси, а також кількість зареєстрованих сортів перспективних біоенергетичних культур в Україні (рис. 1.5), ситуація може змінитися найближчим часом [87, 88].

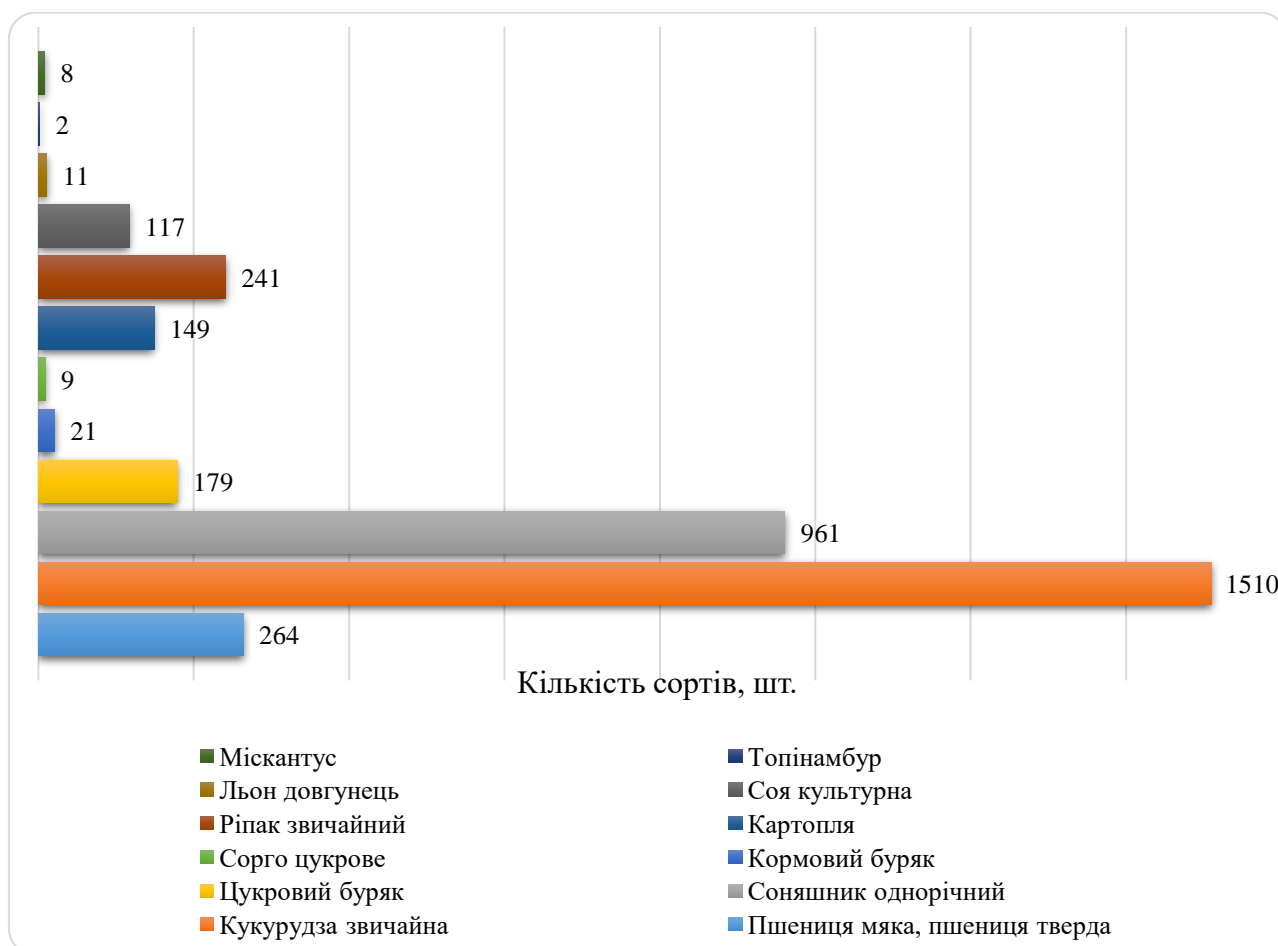


Рис. 1.5. Кількість зареєстрованих в Україні сортів перспективних біоенергетичних культур у 2012–2017 роках

Оцінюючи кількість сортів перспективних біоенергетичних культур та кількість сортів міскантусу, внесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні, бачимо, що Україна має досить великий біоенергетичний потенціал вирощування сільськогосподарських культур на біомасу. Кількість сортів тільки 11 перспективних біоенергетичних культур досягає понад 3,5 тис. (3564 сорти). Кількість же сортів міскантусу, порівняно з провідними в цій галузі культурами – кукурудзою та соняшником (кількість

zareєстрованих сортів яких дорівнює відповідно 1510 та 961) незрівнянно мала. Стрімке щорічне збільшення кількості поданих заявок на сорти міскантусу, а відповідно, і кількості zareєстрованих сортів свідчить про інтенсивність ведення селекційного процесу. З огляду на неабиякий інтерес до цієї культури з боку аграріїв перспективи міскантусу як енергетичної культури досить великі. В майбутньому це дасть змогу значно скоротити залежність країни від непоновлюваних джерел енергії [87, 89].

1.4. Створення вихідного селекційного матеріалу та розмноження рослин із використанням біотехнологічних методів

На сьогодні розроблено низку різних способів біотехнології мікроклонального розмноження. В їх основі лежать чотири принципових підходи:

- активація розвитку рослинних меристем (апекс пагона, пазушні і сплячі бруньки пагона);
- утворення адвентивних бруньок із тканин експланта;
- індукція соматичного ембріогенезу;
- диференціація адвентивних бруньок в первинній і первинній калюсній тканині [90].

На думку деяких вчених, основним методом мікроклонального розмноження рослин є активація пазушних меристем [91]. Цей метод вже став промисловим при виробництві посадкового матеріалу деяких культур. Він є найбільш надійним для плодових і ягідних рослин. Цей метод базується на знятті апікального домінування, чого можна досягти двома способами:

- отриманням пагонів нормальних пропорцій із послідуочим їх поділом на «однобрунькові мікроживці», які використовують як вторинні експланти для повторення циклу розмноження. Теоретична можливість такого способу розмноження становить приблизно 10 000–1 000 000 пагонів на рік [92];

- введенням в живильне середовище речовин з цитокініновою активністю, що спричинює формування пагонів з відносно вкороченими міжвузлями, а

пазушні бруньки дають початок новим пагонам. Експланти на таких середовищах набувають вигляду пучків маленьких пагонів, кожний із яких можна рекультивувати. Теоретично можливість цього методу може становити до 15 000 000 000 бруньок або пагонів на рік від одного експланту [93]. Вважають, що цей метод має мінімальний ступінь ризику стосовно отримання неоднорідного потомства, а частота появи мутантних рослин не перевищує частоти появи таких при звичайному розмноженні. Метод відносно універсальний і має гарну відтворюваність у межах виду і навіть роду рослин [94].

Другий метод – це індукція утворення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експланта. Він базується на здатності ізольованих частин рослин за сприятливих умов живильного середовища відновлювати недостаючі органи і регенерувати цілі рослини (виключення становить кореневий органогенез) [95]. Майже всі органи і тканини рослин можуть утворювати адвентивні бруньки. Цей процес, як правило, відбувається на живильних середовищах, які містять лише цитокинін або в сполученні з ауксином у співвідношенні 10:1 або 100:1. З ауксинів у такому разі найчастіше використовують індолілоцтову кислоту (ІОК) або α -нафтилоцтову кислоту (α -НОК) [96].

Однак при розмноженні таким способом не виключена можливість отримання неоднорідного потомства. Річ у тому, що в тканинах експлантів можуть бути клітини з порушеною плоідністю [97]. Передусім це стосується тканин, які складаються з клітин, що швидко відмирають, наприклад, клітини кореневого чохла. І хоча ймовірність регенерації рослин із таких клітин відносно низька, нею не можна нехтувати, оскільки *in vitro* ці клітини можуть отримати перевагу у розвитку [98].

У певних випадках ефективним способом розмноження рослин *in vitro* може бути соматичний ембріогенез – це формування зародкоподібних структур (ембріодів) із соматичних клітин в умовах *in vitro*, які при перенесенні на відповідне живильне середовище здатні розвиватися у цілу рослину.

Соматичний ембріогенез наочно демонструє тотипотентність рослинних клітин [99].

Основна відмінність утворення зародків *in vitro* від *in vivo* полягає в тому, що соматичні зародки розвиваються асексуально поза зародковим мішком і за своїм зовнішнім виглядом нагадують біполярні структури, у яких одночасно спостерігається розвиток апікальних меристем стебла і кореня [96]. Ембріоїди утворюються з поодиноких клітин, розташованих переважно на поверхні калюсу. Вони відрізняються щільнішою цитоплазмою, відносно великим ядром зі збільшеним ядрцем, містять дрібні вакуолі. Це метаболічно активні клітини, багаті на білки та РНК [100].

Формування ембріоїдів у культурі тканин проходить у два етапи. На першому етапі клітини експланта дедиференціюються через додавання в живильне середовище ауксинів, як правило 2,4-дихлорфенокси оцтової кислоти (2,4 Д), і перетворюються на ембріональні. На наступному етапі з цих клітин розвиваються ембріоїди. Відбувається це при зменшенні концентрації ауксину або взагалі повному його виключенні зі складу живильного середовища [101]. Ембріогенез легше відбувається у молодих культурах. У міру подовження строку культивування ембріогенна активність клітин посилюється [98].

Четвертий метод мікроклонального розмноження – диференціація адвентивних бруньок в первинній і первинній калюсній тканині. Цей метод мало використовують для отримання посадкового матеріалу *in vitro*. Це пов'язано з тим, що при тривалому культивуванні калюсу спостерігаються зміни плоідності клітин, структурні перебудови хромосом, накопичення генних мутацій і зменшення або втрата морфогенного потенціалу [70, 93]. Тому цей метод мікроклонального розмноження доцільно використовувати лише для тих рослин, яким притаманна генетична стабільність калюсної тканини, а варіабельність між рослинами-регенерантами не перевищує рівня природної мінливості. До таких рослин можна віднести томати, спаржу, деякі деревні породи. Через калюсну культуру були також розмножені цукровий буряк, кукурудза, рис, пшениця, соняшник, льон, картопля, огірок [99].

1.5. Історичні аспекти використання методів біотехнології в селекції міскантусу, стан розвитку селекції міскантусу у світі

Перші результати досліджень з використання методів біотехнології в селекції міскантусу було опубліковано в 1990 році вченим Гавелем. Він з'ясував, що незрілі суцвіття *M. sinensis* були кращими експлантами для калюсогенезу, ніж молоді листки, вузлові сегменти, меристематичні тканини чи жіночі статеві клітини, а морфогенні калюси утворювались більш успішно на середовищі з вмістом 2,4 Д, ніж на середовищі зі вмістом піклораму. Автором також було зазначено, що регенерація рослин відбувалась через органогенез [102]. Холм І. Б. та Петерсон К. К. в 1996 році порівняли два види живильних середовищ Гамборга (N6) та Мурасіге і Скуга (МС) на їх здатність утворювати швидкоростучі та регенераційні клітинні суспензії міскантусу гігантського з калюсів, вирощених із незрілих суцвіть [103], а Моллер та Нельсон опублікували перші результати мікроклонального розмноження *in vitro*. Вони описали метод вирощення пагонів з вузлових сегментів (експланти розміром 5–10 мм) на середовищі МС з додаванням гелюріту та з регуляторами росту 6-БАП і α -НОК. В 1997 році німкеню Левандовскі І. було опубліковано першу детальну інформацію щодо культури *in vitro*, яка ґрунтувалася на утворенні калюсних тканин міскантусу гігантського. Автором були підібрані найбільш оптимальні середовища для калюсогенезу та регенерації рослин міскантусу з калюсу [104]. Кліфтон-Браун Дж. К. та Левандовскі І. в 1997–2000 роках дослідили вплив критично низьких температур на рослини *M. giganteus* та *M. sinensis*, було з'ясовано, що *M. giganteus* більш стійкий до низьких температур, ніж *M. sinensis* [105]. У 2000 році ці ж вчені зробили спробу синхронізації цвітіння рослин виду *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* в лабораторних умовах, були підібрані батьківські пари за часом цвітіння для наступного їх перезапилення [106]. У 2002 році Кліфтон-Брауном способом застосування модифікованих живильних середовищ було підвищено посухостійкість рослин *M. sinensis* [107], а в 2003 році Петерсон, Хагверг, Крістьянсен та Форкман провели подвоєння хромосом у різних генотипів міскантусу китайського [108]. У 2010 році Гловаська за допомогою

колхіцину здійснила поліплоїдизацію двох видів міскантусу та охарактеризувала отримані поліпоїди [28]. У 2014 році селекціонери Ціхорц, Горська, Літвінець провели генетичні дослідження трьох видів міскантусу (гігантський, китайський та цукроквітковий) із застосуванням молекулярних маркерних систем, таких як прості повтори послідовностей (ISSRs), випадкова ампліфікована поліморфна ДНК (RAPD) та оцінка рівня плоїдності на основі протокової цитометрії [109]. Через рік такими вченими, як Перера, Барнес, Балдвін та Рейчерт було отримано мутанти міскантусу гігантського через вплив на калюсні тканини незрілих суцвіть етилметансульфату [110].

Згодом, у 2016 році японські вчені Гуо, Фенг, Хонг, Чен, Зенг та ін. дослідили толерантність до важких металів, зокрема кадмію, рослин *M. giganteus* та *M. sacchariflorus* способом вивчення генів стійкості вказаних видів міскантусу до цього металу та шляхи накопичення його в різних органах рослин [111].

Згідно з літературними даними, в останні десять років найбільш інтенсивно селекцію нових гібридів міскантусу проводять у 3 країнах – Швеції, Данії та Німеччині [112]. У 1993 році відомий данський селекціонер Лінде Лаурсен довів, що *M. giganteus* є триплоїдом ($2n=3x=57$ або 58), а основна кількість хромосом для роду *Miscanthus* становить $x=19$. Ґрунтуючись на характері цвітіння та анатомії листків, було визначено, що це натуральний гібрид *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* [45]. Використовуючи генотипи *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* в селекційних центрах вищезгаданих країн, було створено 15 гібридів міскантусу, які випробовували в різних кліматичних зонах Європи. Визначено, що *M. sinensis* більш зимостійкий, ніж *M. giganteus* та *M. Sacchariflorus*, та більше підходить для північної Європи [113]. Найбільш продуктивними виявилися триплоїди – гібриди *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* – *M. giganteus* [114–116].

Останніми роками в різних країнах світу все інтенсивніше й масштабніше розробляють селекційні програми зі створення нових і вдосконалення існуючих форм міскантусу [117]. В Ірландії, наприклад, досліджують можливості створення нових поліпшених сортів *M. sinensis* і *M. giganteus*, вдосконалюють

методи отримання насіння міскантусу, вивчають його потенціал для Північної Ірландії [118]. В США розроблено програму розмноження та селекції представників роду *Miscanthus* спільно з німецькою компанією Tinplant Biotechnik, яка інвестувала кошти на 15 років на розвиток селекції та вдосконалення процесів розмноження нових сортів міскантусу. У 2006 році в рамках селекційної програми Tinplant було створено два нових гібридних сорти міскантусу 'Amuri' і 'Nagara'. Ці сорти є результатом схрещування гібридних *M. sacchariflorus* і *M. sinensis*, вони виявляють більший ступінь зимостійкості, ніж *M. giganteus* [119].

Селекціонери з Данії працюють над вдосконаленням методів створення нового селекційного матеріалу, розмноження рослин з насіння і скорочення витрат на вирощування міскантусу [120].

У Великобританії селекціонери займаються збором, вивченням та зберіганням зародкової плазми різних видів роду *Miscanthus*, створенням колекції різних фенотипів з низкою надзвичайно важливих для селекційної роботи ознак: товсте, прямостояче стебло, пізнє цвітіння *M. sacchariflorus* та щільне, високе стебло із різними строками цвітіння *M. sinensis*, що дадуть нові гібридні форми при схрещуванні [121].

У результаті досліджень накопичено значний генофонд рослин міскантусу в Європі, а саме: кілька видів, сотні генотипів в межах виду, а також відповідне потомство від схрещування [122, 123]. Дослідження з селекції міскантусу в різних країнах світу тривають.

1.6. Стан та напрями селекції міскантусу в Україні

Селекція міскантусу в Україні розвивається у двох основних напрямках. Перший – використання міскантусу як декоративної рослини. У такому разі селекцію спрямовано на отримання сортів різної висоти, габітусу, з різноманітною формою та кольором волоті, забарвленням листків [55, 124–126]. Другий напрям – це вирощування міскантусу як джерела целюлози, біопалива, тепло- й електроенергії. Він передбачає залучення нових видів та форм і

створення сортів з високим вмістом целюлози, лігніну, геміцелюлози, високою врожайністю сухої біомаси, підвищеною посухостійкістю та зимостійкістю [127, 128]. Важливою умовою селекції є виведення стерильних триплоїдних сортів передусім з метою виключення їх інвазійності, а також для збільшення приросту біомаси, поліпшення мінерального складу біомаси, отримання більшої кількості життєздатного насіння та збереження його протягом тривалого часу [129, 130].

До 2012 року селекційний процес з генотипами міскантусу в Україні майже не проводили. З 2012 року в Україні почали подавати заявки з метою реєстрації майнових прав на сорти міскантусу (рис. 1.6).

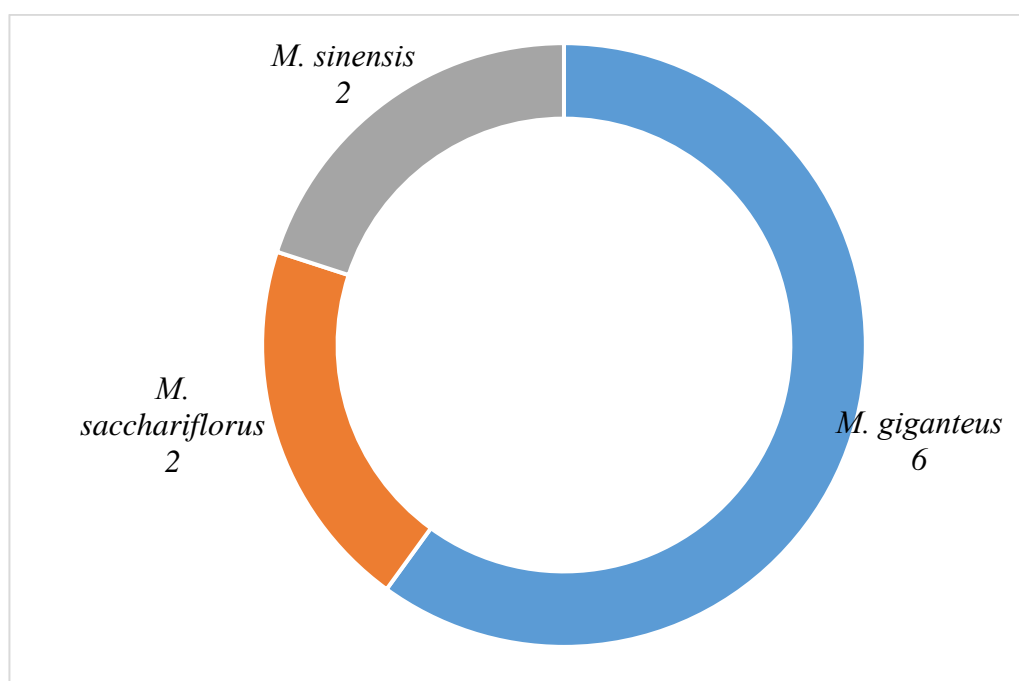


Рис. 1.6. Кількість поданих заявок з метою реєстрації майнових прав на сорти міскантусу в Україні за 2012–2017 роки

Найбільш інтенсивно заявки на сорти міскантусу в Україні подавали в 2012 році. Провідними установами з селекції міскантусу в нашій державі є Інститут біоенергетичних культур та цукрових буряків НААН, Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НААН та Товариство з обмеженою відповідальністю «АМАКО Україна» [131].

На сьогодні в Державному реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні, є 8 сортів міскантусу, володільцями прав на які є вітчизняні заявники [131].

1.7. Способи розмноження міскантусу

Рослини міскантусу утворюють незначну кількість насіння, або воно є майже нежиттєздатним. Тому його розмножують вегетативним способом. Відомі 3 способи вегетативного розмноження [55]:

- саджанцями, отриманими з культур *in vitro*;
- поділом кореневищ;
- укоріненням міжвузлів.

Розмноження саджанцями з культури *in vitro*. Мікроклональне розмноження міскантусу може бути здійснено за допомогою соматичних ембріодних формоутворень або кушіння пагонів, утворених з апікальних меристем чи пахвових вузлів. Натепер наявні в продажу рослини є результатом цих двох методів розмноження міскантусу *in vitro* [94].

Вихідним матеріалом для отримання цього типу саджанців є недозрілі суцвіття, бруньки, що розташовані на ризомах та пагонах, з яких беруть експланти і розміщують на відповідному поживному середовищі. Найчастіше це є поживне середовище МС або Джонса. Регенерація рослин проходить через соматичний ембріогенез [132].

Встановлено, що ріст калюсу і регенерація рослин краще проходять на рідкому живильному середовищі. Протягом п'яти місяців з одного суцвіття можна отримати 1830 рослин. Цей спосіб дає змогу не тільки одержати оздоровлений матеріал для комерційного використання, а й розмножувати селекційні зразки впродовж року на невеликій лабораторній площі та підвищити коефіцієнт розмноження [133].

Окрім суцвіть, експланти отримують з листя, верхівкових меристем стебел і коріння. Однак регенерація рослин з таких експлантів менш результативна, ніж з недозрілих суцвіть [134].

Незважаючи на те, що цей метод є дуже продуктивним, він має дві вади. Одна з них – це висока вартість, яка робить вирощування рослин міскантусу не рентабельним. Вартість закладки 1 га плантації у 2019 році в Україні становила 3000 USD, за умови, що на 1 м² висаджують одну рослину [135]. На сьогодні в

Україні 1 рослина коштує 90 грн, в перерахунку на 1 га це становить 90000 грн (орієнтовно 3500 USD) [136]. Висока вартість саджанців, отриманих в культурі *in vitro*, спричинена необхідністю адаптації мікророслин *ex vitro* в умовах теплиць. Адаптація в умовах закритого ґрунту може тривати три місяці. Другим недоліком цього методу розмноження є низький відсоток рослин, що виживають у першу зиму. Часто на плантаціях при використанні рослин, розмножених *in vitro*, останні випадають в такій кількості, що подальше вирощування їх стає неможливим [36].

Розмноження саджанцями, отриманими через поділ кореневищ. У 1990 році на дослідній станції в Данії виявили, що при знищенні плантацій міскантусу із застосуванням спеціалізованих машин відбулася зворотна дія – рослини почали дуже швидко відростати. Це дало ідею нового методу закладання плантацій – поділом кореневищ [137].

Розмноження поділом кореневищ можна виконувати кількома способами. Найчастіше як маточники використовують трирічні плантації міскантусу, які ще не розрослись дуже сильно [73].

Одним зі способів отримання саджанців є подрібнення надземних і підземних решток після збору за допомогою ротаційної машини, викопування фрагментів рослин копачкою для квіткових цибулин або машиною для збору картоплі. Можна також виорювати цілі купини, а потім ділити їх на фрагменти довжиною приблизно 10 см. За такої довжини кореневищ найкращі результати отримано при посадці їх масою 0,1–0,2 кг/м² [138].

Дуже важливим у цій методиці є недопущення пересушування зібраного матеріалу – максимальне скорочення часу зберігання саджанців. Основною перевагою саджанців, отриманих цим способом, є їхня вища витривалість за низьких температур під час першої зими, а також швидкий розвиток на початку росту [139].

Розмноження саджанцями з укорінених міжвузлів. У 1997 році на кафедрі фізіології рослин Аграрного університету було проведено дослід, в якому укорінювали міжвузля рослин. Найкращі саджанці було отримано з

найстарших міжвузлів. Саджанці не вдалося отримати з вузлів 7-го порядку (рахуючи від низу рослини) і молодших. Отримані в такий спосіб рослини не перезимували з причини дуже короткого часу, потрібного на пристосування до стану спокою [140].

1.8. Створення вихідного селекційного матеріалу методом непрямого морфогенезу в рослин роду *Miscanthus*

Міскантус – рослина короткого дня. В кліматичних умовах Східної Європи рослини міскантусу цвітуть у вересні–листопаді. Суцвіття – волоть, або колосоподібна волоть, слабо розвинута. Велика кількість представників роду *Miscanthus* не утворює насіння, що створює перешкоди для генеративного розмноження культури та проведення селекційних робіт [70, 141]. Ті генотипи, що цвітуть рано – наприкінці літа, використовуються як газонні декоративні трави і мають невеликий врожайний потенціал. Насіння, що утворюється, має низьку схожість (6–60 %), життєздатність його зберігається орієнтовно 6 місяців [142]. Маса тисячі насінин міскантусу китайського варіюється від 505 до 655 мг, міскантусу цукроквіткового – від 444 до 467 мг. Таке насіння має невелику кількість резервних поживних речовин для проростання та зберігання [70]. Розмноження міскантусу способом висіву кондиційного насіння в ґрунт не забезпечує високого коефіцієнта розмноження, тому що з однієї пророслої насінини можна отримати лише одну рослину [143]. До того ж рослини міскантусу, отримані таким способом, дуже вразливі і майже всі гинуть впродовж зимового періоду [106]. Тому існує проблема насінневого розмноження рослин цього роду.

Отже, актуальним питанням сьогодення є розроблення нових біотехнологічних методів розмноження міскантусу та створення нових вихідних форм для збільшення генетичного різноманіття існуючих видів з погляду використання їх як сировини для біоенергетики.

У сучасних дослідженнях для отримання калюсних культур використовують різні експланти рослин – бруньки, пагони, квітки та дозріле насіння міскантусу [99].

Аналіз літературних джерел та узагальнення вимог до складу живильних середовищ, призначених для індукції калюсогенезу з різних частин рослин [28, 45, 90], показали, що найбільшу кількість калюсів отримували, використовуючи середовища Гамборга-B5 або Чу, модифіковані за вмістом регуляторів росту, а саме – з додаванням 2 мг/л 2,4 Д. Як регенераційне середовище використовували модифіковане середовище MS: сахарози – 20 г/л + гелеріту – 3 г/л + 6- БАП – 5 мг/л, α -НОК – 0,24 мг/л або 2,4-Д – 1 мг/л. Дані щодо середовищ для отримання калюсних ліній і регенерації з них повноцінних рослин із насіння з низькою схожістю та життєздатністю відсутні.

Цінність методу культури тканин полягає в тому, що, з одного боку, об'єктом досліджень є клітина як природна модель-одиниця біологічної активності, що наближує умови експерименту до нативних. З іншого боку, з певним ступенем автономності одиниця біологічної активності (клітина, орган) вилучається з під впливу корелятивних зв'язків і залежностей материнського організму. Створюються умови *in vitro*, які підпадають під управління та регуляцію [144]. Це дає змогу кількісно виразити результати експерименту і встановити загальні, фундаментальні біологічні закономірності.

Рослинна клітина характеризується унікальними особливостями (тотипотентність, здатність гаплоїдних клітин до відновлення цілого організму, перехід до морфогенезу тощо), тому вона може бути прекрасним об'єктом у вирішенні багатьох проблем загальнобіологічного значення. Рослинна клітина є об'єктом для з'ясування первинних процесів росту, диференціації, взаємодії між ядром і цитоплазмою, стану генетичної інформації, її зміни та часової реалізації [45].

Майже всі методичні прийоми культури тканин ґрунтуються на таких основних принципах:

- ізолювання експланту (клітина, шматочок тканини, орган) від материнського організму;
- поміщення експланту в контрольовані, ретельно підібрані умови;
- дотримання умов стерильності матеріалу, що вирощується [90, 96].

Отже, згідно з даними наукової літератури, на сьогодні створення нового селекційного матеріалу міскантусу з використанням біотехнологічних методів забезпечується декількома способами – прямий органогенез та індукція ембіогенного калюсу, який не втрачає своєї регенераційної здатності протягом року; використовують також метод подвоєння хромосом у різних генотипів міскантусів китайського та гігантського. Адаптують та підрощують регенеранти в теплицях, що робить цей спосіб розмноження занадто дорогим для вирощування міскантусу в промислових масштабах. Вирішення проблеми адаптації рослин в полі без застосування тепличних комплексів сприятиме здешевленню рослин міскантусу, тиражованих *in vitro*.

1.9. Синхронізація цвітіння рослин міскантусу китайського та міскантусу цукроквіткового в симпатричних популяціях

Новітньою стратегією отримання нових генотипів міскантусу на зразок гігантеусу є пошуки нових триплоїдних гібридів або насіння в симпатричних популяціях міскантусу китайського та міскантусу цукроквіткового [45]. Групою японських та американських вчених вже знайдено триплоїдне насіння, але подібність його до міскантусу гігантського з різних аспектів біології та продуктивності ще не доведено [36].

Міскантуси цукроквітковий та китайський – багаторічні злаки, C_4 -рослини зі швидким ростом [145–49]. Міскантус цукроквітковий – тетраплоїд, який може гібридизуватися з диплоїдом міскантусом китайським та продукувати специфічні стерильні триплоїдні гібриди, такі як міскантус гігантський [65, 23, 150]. Через стерильність міскантус гігантський розмножується ризомами. Використання лімітованої герма плазми міскантусу гігантського пов'язане з ризиком епіфітотій. Отримання нових гібридів

струмується відсутністю синхронності цвітіння компонентів гібридизації міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського [36].

Англійськими вченими було запропоновано спосіб регуляції цвітіння міскантусу цукроквіткового, який включає застосування дії довжини світлового дня і клімату в умовах теплиці [151].

Також розроблено спосіб синхронізації цвітіння міскантусу цукроквіткового та цукрової тростини, який включає дії, спрямовані на прискорення цвітіння цукрової тростини та затримку цвітіння міскантусу цукроквіткового способом культивування останнього в умовах теплиці при постійному сприятливому фотоперіоді протягом емпірично визначеної кількості часу від 12,5 до 16 годин. Для стимулювання цвітіння цукрової тростини рослини пропонують саджати з живців за 5–6 місяців до настання 12,5-годинного дня, важливого для індукції цвітіння [152].

Проте відомі методи не забезпечують синхронізацію цвітіння міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського при створенні їхніх симпатричних популяцій в умовах відкритого ґрунту, оскільки призначені для регуляції цвітіння міскантусів в умовах закритого ґрунту (теплиці).

Як підсумок, нами було проаналізовано актуальність проблеми розроблення нових біотехнологічних методів розмноження міскантусу та створення нових вихідних форм для збільшення генетичного різноманіття існуючих видів з погляду використання їх як сировини для біоенергетики. Також встановлено, що створення нового селекційного матеріалу міскантусу з використанням біотехнологічних методів можна забезпечити декількома способами – прямим органогенезом та індукцією ембіогенного калюсу, а оцінку рівня плідності можна проводити на основі протокової цитометрії.

Натомість невирішеними проблемами на сьогодні є:

➤ отримання калюсних ліній та регенерації рослин із насіння з низькою схожістю та життєздатністю, розроблення оптимальних живильних середовищ для калюсогенезу та регенерації рослин міскантусу з калюсу та оцінка створених калюсних ліній міскантусу з погляду генетичної однорідності каріотипу.

Прискорення процесу мікроклонального розмноження міскантусу в умовах *in vitro*;

➤ висока вартість саджанців, отриманих в культурі *in vitro*, спричинена необхідністю адаптації мікророслин *ex vitro* в умовах теплиць та низьким відсотком рослин, що виживають в першу зиму, робить вирощування рослин міскантусу не рентабельним. У цьому контексті – проблема вирощування міскантусу з мікроклонів *in vitro* без застосування тепличних комплексів, способом прямого висаджування у відкритий ґрунт;

➤ використання лімітованої герма плазми міскантусу гігантського, що пов'язане з ризиком епіфітотій. Проблема отримання нових триплоїдних гібридів, що обумовлена відсутністю синхронності цвітіння компонентів гібридизації міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського в умовах відкритого ґрунту.

РОЗДІЛ 2

ВИХІДНИЙ МАТЕРІАЛ, УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Вихідний матеріал

Дослідження проводили в лабораторії біотехнології та на дослідному полі Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН упродовж 2012–2017 рр.

У дослідах використовували насіння 2008 та 2012 років репродукції *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* ($2n$) (диплоїдні форми), ризоми *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* ($4n$) (тетраплоїдні форми) та *M. giganteus* – алотриплоїдного гібрида, які було введено до культури *in vitro*. Мікророслини міскантусу отримували методом непрямого морфогенезу та подальшого мікроклонального розмноження відповідно до методики [153]. Клони міскантусу з культури *in vitro* висаджували з колб у ґрунт без попереднього підрощування та адаптації в умовах теплиці, згідно з патентом [154].

2.2. Умови проведення досліджень

Ґрунт дослідного поля – темно-сірий опідзолений, слабокислий (рН – 5,4) з низьким вмістом азоту – 80 мг/кг ґрунту, середнім вмістом фосфору – 850 мг/кг ґрунту, і низьким вмістом калію – 600 мг/кг ґрунту. В орному шарі ґрунту вміст гумусу (за Тюрінім) становить 2,23 %, ступінь насичення основами – 71 %; сума ввібраних основ невисока (14–17 мг-екв./100 г ґрунту). Додаткове внесення органічних та мінеральних добрив не проводили.

Кліматичні умови Північного Лісостепу України є сприятливими для вирощування багатьох сільськогосподарських культур, зокрема й енергетичних. Клімат території розміщення дослідних ділянок – помірно континентальний з м'якою зимою і теплим літом. Середня температура січня – $-3,2$ °С, липня – $+21,3$ °С. За рік на території м. Києва випадає 500–600 мм опадів (за даними метеостанцій).

Характеристику температурного режиму та кількість опадів у роки проведення польових досліджень міскантусу в м. Києві наведено на рис. 2.1, 2.2, 2.3 та в таблицях 2.1–2.2 (Додаток А, Б).

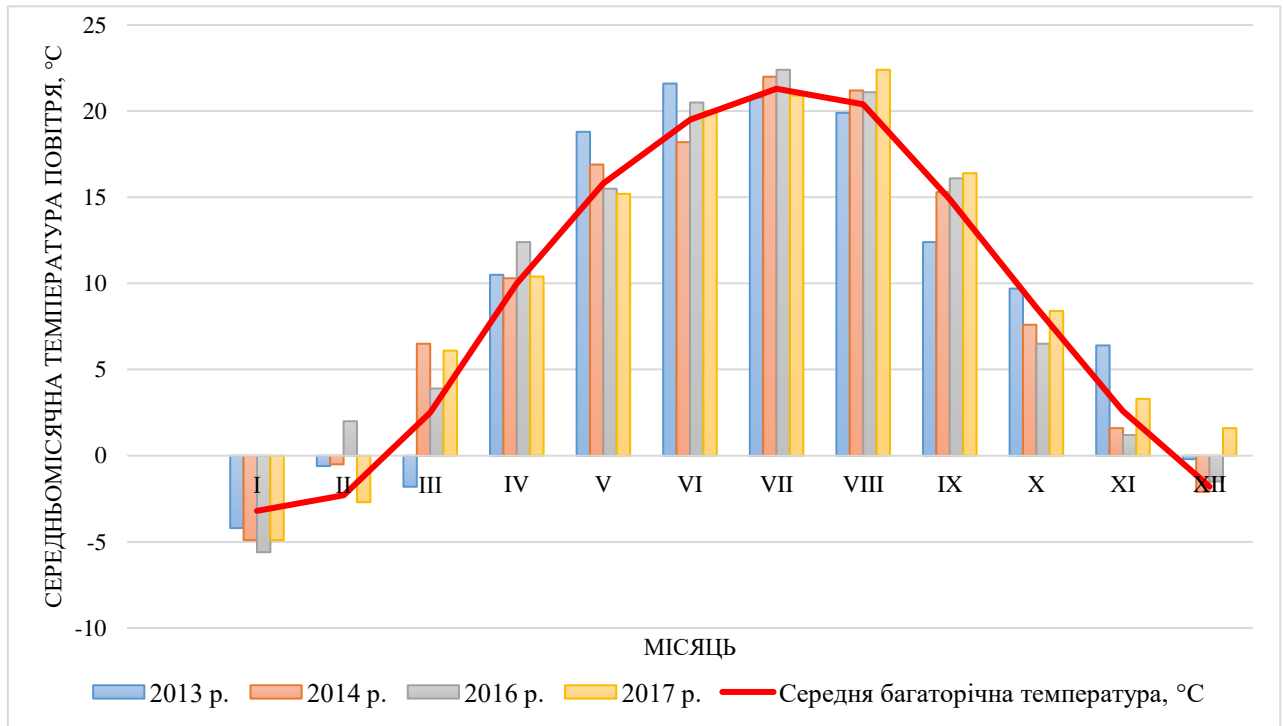


Рис. 2.1. Температурний режим за роки проведення польових досліджень міскантусу (за даними Метеостанції Київ, 2013–2017 рр.)

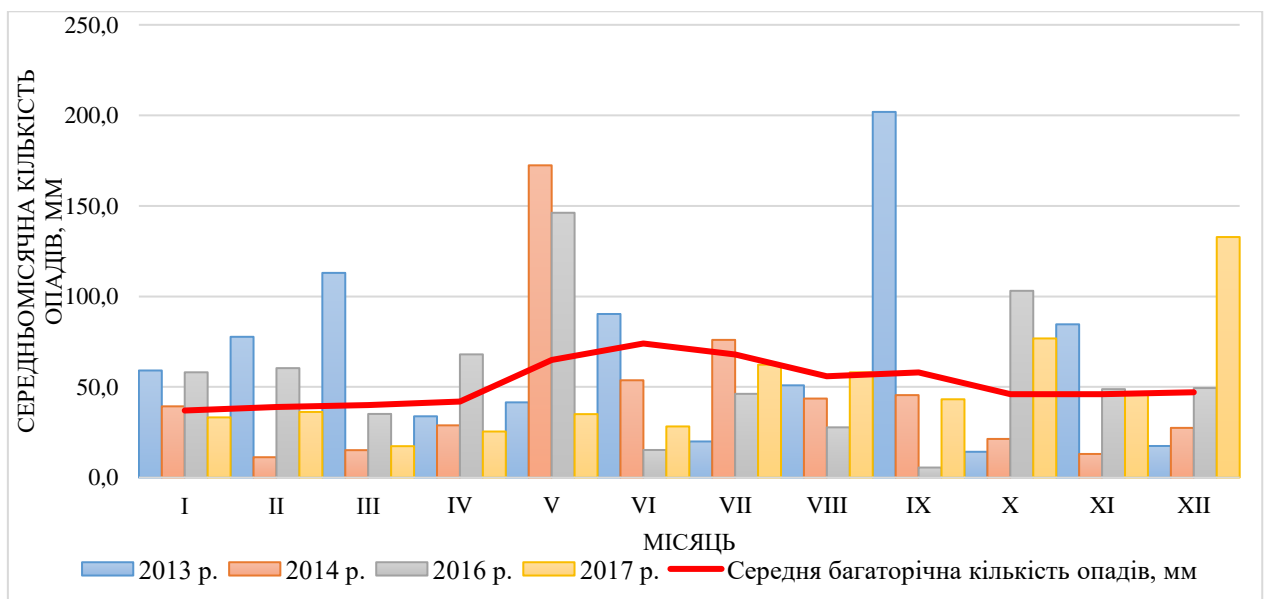


Рис. 2.2. Кількість опадів за роки проведення польових досліджень міскантусу (за даними Метеостанції Київ, 2013–2017 рр.)

У другій декаді червня 2013 року рослини міскантусу було висаджено з колб у відкритий ґрунт. У цей період температура повітря була вищою за норму на 2–3 °С. Достатня кількість опадів і помірно тепле літо дали змогу рослинам добре адаптуватись до умов відкритого ґрунту. Загалом, 2013 рік був сприятливим для адаптації та вкорінення рослин досліджуваних видів міскантусу, оскільки відхилення температурного режиму за рік становило лише +0.4 °С, а кількість опадів перевищувала багаторічну норму на 186,6 мм (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Середньорічне відхилення температури повітря та кількості опадів від середніх багаторічних показників за 2013–2017 роки

Незважаючи на морозну зиму 2014 року (подекуди температура знижувалася до $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$), рослини *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* (4n) та *M. sacchariflorus* (2n), а також рослини *M. giganteus* першого року вегетації перезимували добре. Завдяки теплій весні (температура повітря була вища за норму на 0,3–4 °С) та рівномірному розподілу вологи протягом вегетаційного періоду відростання міскантусу почалось в середині квітня, а з червня рослини інтенсивно набирали вегетативну масу. Загалом, 2014 рік виявився дещо

посушливим, проте завдяки регулярному зрошенню рослин вдалося зберегти всіх представників досліджуваних видів міскантусу.

Сприятливим для вирощування міскантусу виявився 2016 рік. Зима була помірно холодною (в січні температура повітря на 2,4 °С поступалася нормі, температурні показники лютого були на 4 °С вищими за середні багаторічні). Тепла і волога весна та не надто спекотне літо дали змогу отримати велику вегетативну масу рослин і у вересні – на початку жовтня – появу волоті й цвітіння різних видів міскантусу. Це був найбільш сприятливий рік для росту та розвитку рослин міскантусу.

За температурним режимом 2017 рік був найтеплішим з усіх років, протягом яких проводили польові дослідження. Річне відхилення температури повітря від норми становило +0,8 °С. Але температура повітря в лютому була значно нижчою за середню багаторічну, тому майже всі рослини *M. sacchariflorus* (2n) не витримали зимових заморозків та загинули. Відчутною була нестача вологи навесні та влітку, а за рік опадів випало майже на 57 мм менше за норму. Завдяки теплій та вологій осені рослини *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* (4n) та *M. giganteus* вчасно почали вегетацію й вихід у трубку, цвітіння.

2.3. Методика проведення досліджень

У роботі застосовували загальноприйняті біотехнологічні методи [91-94, 155, 156], цитологічні методи, методи проведення фенологічних досліджень дерев'янистих і трав'янистих рослин [157], визначення вмісту сухої речовини, визначення кількості хлорофілу та каротиноїдів у листках вищих рослин, за Починком [158]. Статистичне опрацювання результатів досліджень здійснювали за методиками Єременко В. С та ін. [159], Єріної А. М. [160].

2.3.1. Розроблення методики проведення експертизи сортів міскантусу гігантського (*Miscanthus X giganteus* J.M.Greef & Deuter ex *Hodkinson Renvoize*), міскантусу цукроквіткового (*Miscanthus sacchariflorus* Maxim), міскантусу китайського (*Miscanthus sinensis* Anderss) на відмінність, однорідність і стабільність

Проводили визначення основних морфологічних ознак та ступенів прояву цих ознак для трьох видів міскантусу: *M. giganteus*, *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*.

- Габітус рослини, кущистість, висота, схильність до утворення волотей у перший рік вегетації, час викидання волоті.
- Стебло: кількість вузлів, наявність бруньок і воскового нальоту, товщина, забарвлення, опушення.
- Листкова пластинка: положення відносно стебла, довжина, ширина, забарвлення.
- Волоть: форма, щільність, довжина, ширина, наявність остюків, кількість колосків, забарвлення колоскових лусок, пиляків.
- Ризоми: кількість, довжина, товщина.

2.3.2. Фізіолого-біохімічні дослідження

Визначали вміст сухої речовини в колекційних зразках рослин *M. sinensis*, *M. giganteus* та *M. sacchariflorus* третього та четвертого років вегетації.

Проводили визначення вмісту хлорофілу *a*, *b* та каротиноїдів у листках *M. sacchariflorus* (*4n*), *M. Sinensis* і *M. giganteus*.

2.3.3. Біотехнологічні дослідження

Розроблення методу отримання рослин *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack та *Miscanthus sinensis* Andersson у культурі *in vitro* способом непрямого морфогенезу

У дослідях з отримання рослин із калюсної тканини використовували насіння 2012 року репродукції *M. sinensis* німецької фірми «Jelitto» та насіння

2008 року репродукції *M. sacchariflorus*. Лабораторна схожість насіння *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* ($2n$) становила 6–8 %, проростки були з низькою життєздатністю. В умовах поля схожість насіння *M. sinensis* та *M. Sacchariflorus* дорівнювала нулю. Схожість *in vitro* становила 6–10 %, кількість життєздатних проростків – 0,5–1 %.

У дослідженнях проаналізовано та розроблено прописи трьох типів середовищ: 1) середовища для ініціації та утворення калюсів з насіння низької схожості та життєздатності; 2) середовища для стимуляції морфогенезу та регенерації мікроклонів; 3) середовища для розмноження мікроклонів і стимуляції утворення та росту ризом.

Для введення в культуру міскантусу насіння стерилізували розчином 1–2 % гіпохлорида натрію протягом 15–25 хв. Стерильне насіння висаджували на серію середовищ першого типу – модифіковане середовище МС, що містило 1/2 дози макроелементів та повну дозу мікроелементів, вітаміни: тіамін (B_1) – 0,1–1,0 мг/л, піридоксин (B_6) – 0,1–1,0 мг/л, нікотинову кислоту (PP) – 0,5–1,0 мг/л та аскорбінову кислоту (C) – 1,0 мг/л, з додаванням амінокислот: глютамінової – 200–500 мг/л, аспарагінової – 30–50 мг/л, тірозину – 1–10 мг/л, аргініну – 2–10 мг/л, гідроксипроліну – 2–4 мг/л, регуляторів росту: 6-БАП – 0,3–0,8 мг/л та АБК – 0,1–0,4 мг/л, 2,4 Д – 1,0–2,5 мг/л або 2,4 Д – 1,0–2,5 + ІОК – 0,5–1,0 мг/л або 2,4 Д – 1,0–2,5 мг/л + НОК – 0,5–1,0 мг/л, сахарози – 40 г/л. Як еталон використовували середовища Гамборга–В5 або Чу, модифіковані за вмістом регуляторів росту. Культивували насіння після висаджування на живильне середовище за температури 22–30 °С та відносної вологості повітря 50–80 %. Після проліферації калюсу його переносили на другу серію середовищ, яка відрізнялася від першої вмістом вітамінів та регуляторів росту: B_1 – 0,1–0,5 мг/л, B_6 – 0,1–0,5 мг/л, PP – 0,5 мг/л, C – 1,0 мг/л, глютамінова амінокислота – 250–300 мг/л, 6-БАП – 1,0–3,0 мг/л, НОК – 0,3–1,0 мг/л, сахароза – 40 г/л, і витримували до появи первинних корінців, бруньок та пагонів. Після того, як пагони стали заввишки 2–3 см, їх відокремлювали від калюсної маси і пересаджували на третю серію середовищ для розмноження або депонування

(модифіковане агаризоване середовище МС, що містило 1/2 дози макроелементів та мікроелементи у повній дозі, до складу якого додатково вводили В₁ – 10,0 мг/л, В₆, РР, С по 1,0 мг/л, глютамінову амінокислоту – 250–300 мг/л, 6-БАП – 0,3–0,5 мг/л, НОК – 0,3–1,0 мг/л та ГК – 0,2 мг/л).

У дослідах підраховували кількість отриманих калюсів у % від насіння, що проросло, визначали частоту регенерації (%), підраховували кількість мікророслин (шт.), отриманих через 4 тижні культивування калюсу на регенераційному середовищі.

Розроблення методу стимуляції росту ризом у культурі *in vitro* та адаптації у відкритому ґрунті представників роду *Miscantus*

Для введення в культуру *in vitro* використовували насіння *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*, яке стерилізували 1–2 % розчином гіпохлориду натрію протягом 15–25 хв, промивали три–чотири рази з інтервалом у 15 хв стерильною дистильованою водою; також застосовували бруньки, видалені з ризом *M. giganteus* та *M. sacchariflorus*. Для отримання стерильних бруньок їх упродовж 30 хв промивали в мильному розчині, потім витримували 10–15 хв у розчині перманганату калію та 30–45 хв – у 0,2 % розчині сулеми, тричі промивали стерильною дистильованою водою. Стерильне насіння та бруньки висаджували на модифіковані середовища з мінеральною частиною за МС, що містило – 1 дозу макроелементів та повну дозу мікроелементів, вітаміни: В₁ – 10,0 мг/л, В₆ – 1,0 мг/л, РР – 1,0 мг/л та С – 1,0 мг/л, з додаванням амінокислот: глютамінової – 250,0 мг/л, аспарагінової – 30,0 мг/л, тірозину – 3,0 мг/л, аргініну – 2,0 мг/л, гідроксипроліну – 2,0 мг/л, регуляторів росту: ГК – 0,5 – 1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2 мг/л, НОК – 0,1 мг/л в різних варіаціях. Пророщували насіння та ініціювали ріст бруньок на модифікованих живильних середовищах за температури 22–25 °С та відносної вологості повітря 50–80 %.

Після того, як насіння та бруньки проросли, а пагони досягли висоти 2–3 см, їх відокремлювали та пересаджували на модифіковані живильні середовища для розмноження, які відрізнялися від попередніх середовищ

вмістом регуляторів росту, зокрема підвищеним вмістом цитокінінів – 6-БАП, кінетину, а також аденіну, на фоні ГК – 0,2 мг/л.

Після розмноження пагонів їх відокремлювали та пересаджували на модифіковані живильні середовища, призначені для стимуляції утворення ризом. Ця серія середовищ відрізнялася від попередньої також за вмістом регуляторів росту, а саме: підвищеним вмістом ГК – 0,5–1,0 мг/л на фоні 6-БАП – 0,2 мг/л та НОК – 0,1 мг/л у різних варіаціях. Після утворення ризом довжиною 10–15 см мікророслини обережно звільняли від залишків агару та висаджували у відкритий ґрунт, використовуючи для адаптації пластмасові колби, які видаляли поступово через 6–8 діб після пересаджування рослин з умов *in vitro* в умови *ex vitro*.

У досліджах визначали кількість насіння, що проросло на кожному окремому середовищі *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*, кількість пагонів, які утворилися на кожному окремому середовищі з одного клону, довжину ризом однієї рослини перед висадкою в ґрунт у *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus*, відсоток адаптованих та виживших рослин після зимового періоду.

2.3.4. Дослідження з біоморфології, феноритмики та продуктивності вихідного селекційного матеріалу представників роду *Miscanthus*

Для біоморфометричної характеристики ритмів росту та розвитку (феноритмики) і продуктивності вихідного селекційного матеріалу представників роду *Miscanthus* використовували рослини *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* ($2n$) та *M. sacchariflorus* ($4n$), *M. giganteus*, отримані в умовах *in vitro* та розмножені за допомогою ризом в період вегетації.

У дослідженнях проводили:

- фенологічні спостереження – фази росту та розвитку (дата, \pm доба): відростання, кущіння, вихід у трубку, поява волоті, цвітіння, плодоношення;
- визначення морфометричних показників способом вимірювання та обрахунків: висота рослини (см); стебла: кількість стебел у кущі (шт.), довжина стебла (см), діаметр (мм), кількість міжвузлів (шт.); листки: кількість на стеблі

(шт.), довжина (см), ширина (см), площа (см²); суцвіття (волоть): довжина (см), ширина (см);

- визначення продуктивності способом зважування за стандартної вологоємності надземної маси рослини (г), маси стебла (г), маси листків (г), маси суцвіття (волоть) (г).

2.3.5. Молекулярно-генетичні дослідження

Визначення плоідності рослин міскантусу способом протокової цитофлуориметрії

Дослідження з визначення плоідності за вмістом ДНК у рослин *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus* проводили, використовуючи цитофлуориметр COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytometer COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer SYSTEM II™ Software з лазерним джерелом випромінювання – аргонний іонний лазер із довжиною хвилі 488 нм, з чотирма каналами детекції. Листя міскантусу подрібнювали за допомогою леза в 1 мл охолодженого буфера Otto I з модифікаціями (0,1 М лимонної кислоти, 0,5 % Triton X-100) у стерильних пластмасових чашках Петрі діаметром 60 мм та інкубували протягом 10 хв за кімнатної температури. Зразки фільтрували крізь нейлонову мембрану з розміром пор 20–40 мкм. Розчин бромистого етидію додавали до кінцевої концентрації 20 мкг/мл, встановлювали середню (medium) швидкість потоку зразка, яку підтримували в постійному режимі впродовж всього експерименту, зразок (мінімальний розмір зразка 500 мкл) переносили в пластмасову пробірку розміром 12 x 75 мм, встановлювали її в карусельний завантажувач та вмикали прилад. Отримували цитограми, які відображали розподіл ядер клітин зразка відповідно до інтенсивності флуоресценції, сигнали записували в логарифмічному представленні даних флуоресценції (логарифмічна шкала), застосовували два канали детекції – FL2 log та FL4 log. Цитограми оцінювали, порівнюючи їх із цитограмами зразків, плоідність яких була відома заздалегідь. Статистичну обробку даних цитофлуориметрії проводили на підставі отриманих

вимірювань (3000–5000 клітинних ядер на зразок), застосовуючи програмне забезпечення XL SYSTEM II™.

2.3.6. Цитологічні дослідження

У дослідженнях використовували генеративні органи – маточки, незапліднені насінніві зачатки, пиляки та пилок *M. sinensis*, *M. giganteus* та *M. sacchariflorus*, які відбирали у фазі цвітіння на четвертий–п'ятий рік вирощування у відкритому ґрунті.

Дослідження проводили з використанням світлової мікроскопії, застосовували тимчасові препарати, незабарвлені або забарвлені 2 % розчином карміну у 45 % оцтовій кислоті чи розчином метиленового синього [144]. Для всіх видів міскантусу проводили вимірювання та підраховували кількість пилку різного діаметру. Повторення десятиразове.

2.3.7. Дослідження з розроблення методу синхронізації цвітіння міскантусу цукроквіткового та міскантусу китайського

Для отримання гібридного триплоїдного насіння створювали симпатричні популяції міскантусів цукроквіткового та китайського в умовах відкритого ґрунту та розробляли метод синхронізації їх цвітіння.

Згідно зі спостереженнями, в умовах Північного Лісостепу України міскантус цукроквітковий починає цвісти у третій декаді липня, тоді як міскантус китайський зацвітає у третій декаді серпня. Тому для синхронізації цвітіння цих видів необхідно було дещо затримати цвітіння міскантусу цукроквіткового та стимулювати початок цвітіння міскантусу китайського. Для затримання цвітіння міскантусу цукроквіткового ризоми викопували з ґрунту у полі восени (наприкінці вересня – початку жовтня) та відразу висаджували біля дво-трирічних та більшого віку рослин міскантусу китайського. А для стимуляції початку цвітіння міскантусу китайського в рік синхронізації один-два рази обробляли 0,0001–0,0005 % водним розчином 6-БАП в останню декаду липня.

РОЗДІЛ 3

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

3.1. Отримання асептичної культури міскантусу *in vitro*

Отримання стерильного матеріалу для досліджень в умовах *in vitro* є першим етапом культивування рослинного матеріалу і досить складним завданням через те, що поверхня експлантів інфікована різноманітною мікрофлорою – епіфітними бактеріями, грибами та їхніми спорами, а нейтралізація цієї мікрофлори не повинна пошкодити тканини експлантів [156].

З огляду на контамінацію експлантів, особливо бруньок із підземних органів міскантусу – ризом, та можливе ушкодження рослинних тканин у процесі стерилізації, було вдосконалено режими та схеми стерилізації рослинного матеріалу міскантусу з урахуванням особливостей стерилізуючих агентів і специфіки експлантів (насіння з низькою схожістю та життєздатністю, насіння з високою схожістю та життєздатністю (рис. 3.1–3.2); бруньок, які видаляли з ризом).



Рис. 3.1. Насінина *M. sinensis*



Рис. 3.2. Насінина *M. sacchariflorus*

Схеми стерилізації експлантів пагонів вдосконалювали з урахуванням загальних схем та методів, які застосовують для знезараження експлантів міскантусу в європейських країнах, Японії, Китаї, що адаптували для роботи з рослинним матеріалом міскантусу – насінням та бруньками з ризом [104, 105]. Для стерилізації насіння міскантусу як основний засіб використовували 2 % розчин гіпохлориту натрію, для підвищення ефективності стерилізації застосовували 70 % спиртовий розчин та 3 % пероксид водню в різних варіаціях. Розчин сулеми для знезараження насіння не використовували через цитотоксичний вплив на його схожість та життєздатність, який було встановлено в попередніх дослідженнях.

Результати стерилізації насіння міскантусу наведено в таблиці 3.1. Відповідно до даних таблиці, використання 2 % гіпохлориту натрію було ефективним для знезараження насіння міскантусу. Кількість знезараженого насіння у % від висадженого на живильне середовище становила 86,5–100,0 % залежно від схеми та режиму стерилізації, що, крім гіпохлориту натрію, включала такі додаткові хімічні агенти, як 3 % пероксид водню та 70 % спиртовий розчин. Найкращі результати було отримано при використанні схеми стерилізації з трьома знезаражуючими реагентами – 70 % спиртового розчину впродовж 1–3 хв, розчину 2 % гіпохлориту натрію протягом 25 хв та розчину

пероксиду водню в концентрації 3 % з експозицією 10 хв, яка забезпечила 96,9–100 % знезараженого насіння. 100 % ефективності було отримано при стерилізації насіння врожаю 2012 року *M. sinensis*, тоді як знезараження насіння врожаю 2008 року і *M. Sinensis*, і *M. sacchariflorus* (2n) було дещо нижчим. Другим важливим показником для введення в культуру насіння є кількість схожого насіння у % від висадженого. Згідно з нашими даними, лабораторна схожість насіння міскантусу врожаю 2008 року при її визначенні в 2012 році була низькою – 6,3–13,6 % у *M. sinensis* та 10,0–15,7 % у *M. sacchariflorus* (2n), а життєздатність паростків із цього насіння в умовах *in vitro* була ще нижчою. Лабораторна схожість насіння *M. sinensis* врожаю 2012 року була на рівні 95 %. При запропонованих нами схемах знезараження насіння зниження його схожості було незначним. Кількість схожого насіння у % від висадженого для насіння врожаю 2008 року становила 9,3–10,2 % (*M. sinensis*) та 12,1–15,3 % (*M. sacchariflorus* (2n)), тоді як схожість насіння міскантусу врожаю 2012 року була досить високою – 89,1–92,2 % залежно від режиму стерилізації.

Таблиця 3.1

Ефективність стерилізації насіння міскантусу для введення в культуру
in vitro

Види та форми міскантусу	Тип експланту	Схема та режим стерилізації	Ефективність стерилізації	
			Кількість знезараженого насіння, у % від висадженого	Кількість насіння, що проросло на живильному середовищі у % від висадженого
<i>M. sinensis</i>	Насіння 2008 року	2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв	88,2 ± 1,2	9,3 ± 0,1
		70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв	92,1 ± 1,3	10,0 ± 0,1

продовження таблиці 3.1

		70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв	98,3 ± 1,4	10,2 ± 0,1
<i>M. sinensis</i>	Насіння 2012 року	2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв	92,1 ± 1,3	92,2 ± 1,3
		70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв	95,4 ± 1,3	89,1 ± 1,2
		70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв	100,0	90,4 ± 1,3
<i>M. sacchariflorus</i> (2n)	Насіння 2008 року	2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв	86,5 ± 1,2	13,3 ± 0,2
		70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв	92,4 ± 1,3	11,7 ± 0,2
		70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв	96,9 ± 1,4	11,1 ± 0,2

Отже, встановлено, що кращими схемою та режимом стерилізації як свіжого насіння міскантусу *M. sinensis* (врожай 2012 року), так і насіння, що зберігалось 4 роки, *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* (2n) (врожай 2008 року), було застосування 70 % спиртового розчину впродовж 1–3 хв, далі обробка 2 % розчином гіпохлориту натрію впродовж 25 хв та насамкінець обробка 3 % розчином пероксиду водню з експозицією 10 хв, яка забезпечила 96,9–100 % знезараженого насіння зі збереженням високих показників кількості схожого насіння.

З огляду на те, що *M. giganteus* – триплоїдний безплідний гібрид, його зазвичай розмножують ризомами (рис. 3.3–3.6) або із застосуванням мікроклонального розмноження *in vitro*.



Рис. 3.3. Ризома *M. giganteus*



Рис. 3.4. Ризома *M. giganteus* з корінням



Рис. 3.5. Ризома *M. sacchariflorus* (4n)



Рис. 3.6. Ризома *M. sacchariflorus* (4n) з корінням

Як експланти використовували бруньки з ризом *M. giganteus* (рис. 3.7), що відокремлювали та стерилізували. За браком насіння, аналогічно отримували експланти *M. sacchariflorus* (4n), які теж мають ризоми. В наших дослідженнях для експлантації *in vitro* використовували центральні бруньки з ризом *M. sacchariflorus* (4n) (рис. 3.8–3.9).



Рис. 3.7. Верхівкова брунька з ризоми *M. giganteus* *in vitro*



Рис. 3.8. Верхівкові бруньки з ризом *M. sacchariflorus* ($4n$) *in vitro*

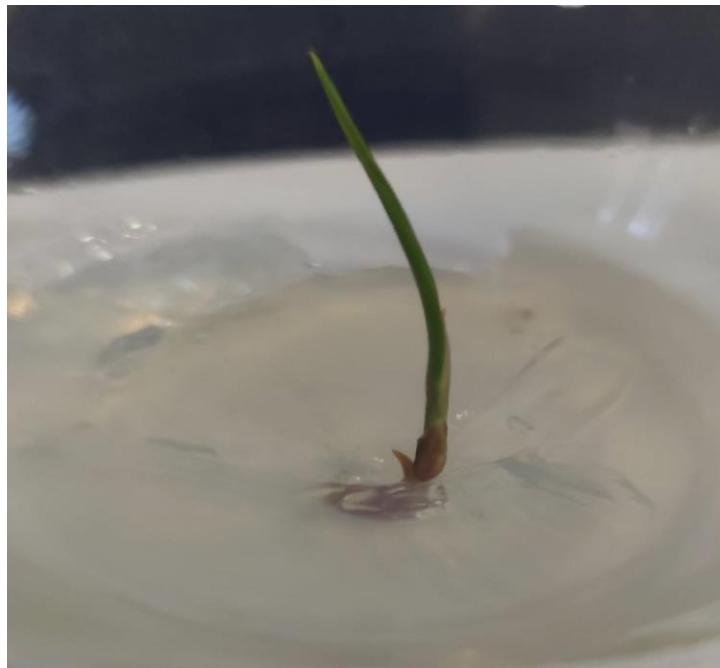


Рис. 3.9. Паросток із верхівкової бруньки з ризоми
M. sacchariflorus ($4n$) *in vitro*

Через значну контамінацію бруньок, які безпосередньо контактували з землею, їх ретельно промивали та витримували в мильному розчині 30 хв, а потім ще 10 хв у 0,05 % розчині перманганату калію; схеми стерилізації включали такий сильний антисептик, як сулема (0,2 %) з експозицією від 15 до 45 хв. Результати досліджень показали, що зі збільшенням проміжку часу для стерилізації бруньок сулемою кількість незаражених бруньок зростала з 84,1 до

98,1 % у *M. sacchariflorus* (4n) та з 91,5 до 99,2 % у *M. giganteus*, але кількість життєздатних бруньок знижувалася з 89,0 до 69,5 % у *M. sacchariflorus* (4n) та з 92,7 до 76,0 % у *M. giganteus*. Використання таких схеми та режиму стерилізації, які було успішно застосовано для знезаражування насіння міскантусу (70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв), було малоефективним – 14,6 % у *M. sacchariflorus* (4n) та 15,5 % у *M. giganteus*, кількість життєздатних бруньок була на рівні 11,7 та 12,6 % відповідно (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Ефективність стерилізації бруньок із ризом міскантусу для введення в культуру *in vitro*

Види та форми міскантусу	Тип експланту	Схема та режим стерилізації	Ефективність стерилізації	
			Кількість знезаражених бруньок, %	Кількість життєздатних бруньок, %
<i>M. sacchariflorus</i> (4n)	Бруньки з ризом	Мильний розчин – 30 хв + 0,05 % перманганат калію – 10 хв + 0,2 % сулема – 15 хв	84,1 ± 1,2	78,3 ± 1,1
		Мильний розчин – 30 хв + 0,05 % перманганат калію – 10 хв + 0,2 % сулема – 30 хв	96,4 ± 1,3	89,0 ± 1,2
		Мильний розчин – 30 хв + 0,05 % перманганат калію – 10 хв + 0,2 % сулема – 45 хв	98,1 ± 1,4	69,5 ± 1,0
		70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв	14,6 ± 0,2	11,7 ± 0,2
<i>M. giganteus</i>	Бруньки з ризом	Мильний розчин – 30 хв + 0,05 % перманганат калію – 10 хв + 0,2 % сулема – 15 хв	91,5 ± 1,3	89,2 ± 1,2
<i>M. giganteus</i>	Бруньки з ризом	Мильний розчин – 30 хв + 0,05 % перманганат калію – 10 хв + 0,2 % сулема – 30 хв	97,6 ± 1,4	92,4 ± 1,3
		Мильний розчин – 30 хв + 0,05 % перманганат калію – 10 хв + 0,2 % сулема – 45 хв	99,2 ± 1,4	76,0 ± 1,0
		70 % спирт – 1–3 хв + 2 % гіпохлорит натрію – 25 хв + 3 % пероксид водню – 10 хв	15,5 ± 0,2	12,6 ± 0,2

Отже, кращі результати зі знезараження бруньок *M. sacchariflorus* (4n) та *M. giganteus* становили 96,4–97,6 %, найбільшу кількість неушкоджених життєздатних бруньок на рівні 89,0–92,7 % було отримано із застосуванням схеми стерилізації, що включала витримування бруньок у мильному розчині впродовж 30 хв, потім протягом 10 хв в 0,05 % розчині перманганату калію та впродовж 30 хв у 0,2 % розчині сулеми.

3.2. Пророщення насіння міскантусу в умовах *in vitro*

Прямий ембріогенез, тобто формування соматичних зародків на експлантах без утворення калюсної тканини, спостерігають при культивуванні різних частин рослини, особливо з тканин зиготичного зародка, молодих проростків [156].

На першому етапі розроблення методу прямого ембріогенезу з проростків насіння міскантусу було проведено тестування живильних середовищ для пророщування насіння та отримання більшої кількості життєздатних проростків в умовах *in vitro*.

Відомо, що ключовими фітогормонами, які контролюють схожість насіння, є гібереліни та цитокініни. При проростанні насіння, на етапі надходження в нього води, гібереліни у спосіб дифузії із зародка надходять в ендосперм, індукують експресію генів, що кодують катаболічні ферменти, зокрема, гідролази (α -амілазу, протеази, рібонуклеази), сприяють їх вивільненню з алейронових зерен в ендосперм, що призводить до швидкого перетворення запасних речовин насіння в розчинні доступні поживні сполуки, які використовують як джерела енергії і матеріалів, необхідних для процесів росту та розвитку проростка [163–171]. Вже через шість–вісім годин після обробки насіння гібереловою кислотою спостерігають секрецію ферментів, синтезованих *de novo* [164]. Роль цитокінінів при проростанні насіння полягає в активації ферментів та поділі клітин [172–173], ауксини зі свого боку активують розтягнення клітин та стимулюють процеси коренеутворення, зокрема, за

безпосередньої участі ауксинів відбувається розпушення клітинних стінок та їх розтягнення, яке спостерігають після збільшення об'єму вакуолі [174].

Через це ГК та 6-БАП було включено до складу живильних середовищ як основні гормони, для елонгації первинного корінця проростків до деяких живильних середовищ було додано ауксин α -НОК. Еталоном слугувало безгормональне середовище МС, в якому були відсутні амінокислоти та вітаміни (табл.3.3).

Таблиця 3.3

Склад живильних середовищ для пророщування насіння

M. sinensis та *M. sacchariflorus*

№	Компоненти середовища	Еталон	П1	П2	П3	П4
1	Макроелементи МС	1/2	1/2	½	1/2	1/2
2.	Мікроелементи МС	1	1	1	1	1
Вітаміни, мг/л						
3.	Тіамін (В ₁)	-	10,0	10,0	10,0	10,0
4.	Піридоксин (В ₆)	-	1,0	1,0	1,0	1,0
5.	Нікотинова кислота (РР)	-	1,0	1,0	1,0	1,0
6.	Аскорбінова кислота (С)	-	1,0	1,0	1,0	1,0
Амінокислоти, мг/л						
7.	Глутамінова	-	250	250	250	250
9	Аргінін	-	30	30	30	30
10.	Триптофан	-	3	3	3	3
12.	Тірозин	-	3	3	3	3
11.	Гідроксипролін	-	2	2	2	2
13.	Глицин	-	2	2	2	2
Регулятори росту, мг/л						
14.	6-БАП	-	0,2	0,2	0,2	0,2
15.	α -НОК	-	-	-	-	0,1
16.	ГК	-	-	0,5	1,0	0,5-1,0
Інші органічні домішки, г/л						
17.	Мезоінозит	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
18.	Сахароза	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
19.	Агар	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0

Результати досліджень показали, що додавання до базового середовища МС (еталон) комплексу вітамінів (В₁ – 10 мг/л, В₆, РР, С по 1 мг/л, амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аргініну – 30 мг/л, триптофану – 3 мг/л, тіроzinу – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л та регулятора росту 6-БАП – 0,2 мг/л) сприяє

підвищенню схожості насіння *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* як 2008, так і 2012 років репродукції (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

Схожість насіння *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* в культурі *in vitro* залежно від типу живильного середовища для пророщування насіння

Види міскантусу	Кількість висадженого насіння на кожному типі середовища, шт.	Кількість пророслого насіння на різних типах живильних середовищ, %.				
		Еталон	П1	П2	П3	П4
<i>M. sinensis</i> (насіння 2008 року)	20	16,0 ± 0,6	21,0 ± 0,8	25,0 ± 0,9	27 ± 1,0	27,0 ± 1,0
<i>M. sinensis</i> (насіння 2012 року)	20	76,0 ± 2,9	82,0 ± 3,1	85,0 ± 3,2	88,0 ± 3,2	88,0 ± 3,3
<i>M. sacchariflorus</i> (2n) (насіння 2008 року)	20	11,0 ± 0,4	16,0 ± 0,7	22,0 ± 0,9	24,0 ± 0,9	24,0 ± 0,9

Так, кількість схожого насіння *M. sinensis* репродукції 2008 року підвищилася на 5 %, *M. sacchariflorus* – на 6 %, а *M. sinensis* 2012 року репродукції – на 6,8 %. Додавання до складу живильного середовища ГК з дозуванням 0,5 та 1,0 мг/л (середовища П2 та П3) сприяло подальшому збільшенню кількості схожого насіння ще на 4–7 % у *M. sinensis*, на 6–8 % у *M. sacchariflorus* 2008 року репродукції та на 3–5 % у *M. sinensis* 2012 року репродукції, порівняно з попереднім середовищем П1. Додавання до складу живильного середовища ще α -НОК (середовище П4) не сприяло подальшому збільшенню кількості схожого насіння в умовах *in vitro*. Кращий результат з кількості схожого насіння було отримано із застосуванням модифікованого середовища МС з додаванням комплексу вітамінів: В₁ – 10 мг/л, В₆, РР, С по 1 мг/л; амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аргініну – 30 мг/л, триптофану – 3 мг/л, тірозину – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л; фітогормонів: 6-БАП – 0,2 мг/л та ГК – 1,0 мг/л, яке забезпечило підвищення схожості насіння,

порівняно з еталоном–середовищем без гормонів, амінокислот та вітамінів, на 11,0 % (*M. sinensis* репродукції 2008 р.), 13,0 % (*M. sacchariflorus* репродукції 2008 р.) та на 12 % (*M. sinensis* репродукції 2012 р.). Отже, найбільшу кількість схожого насіння було отримано на середовищі з підвищеним вмістом ГК (рис. 3.10–3.11).



Рис. 3.10. Насіння *M. sinensis*
в умовах *in vitro* (2012 року)



Рис. 3.11. Насіння *M. sinensis*
в умовах *in vitro* (2008 року)

Саме такий склад живильного середовища ми пропонуємо для пророщування насіння міскантусу в умовах *in vitro*.

РОЗДІЛ 4

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

4.1. Отримання калюсних ліній та клонування *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* в умовах *in vitro*

Метод мікроклонального розмноження рослин в умовах *in vitro*, який було започатковано в Україні у 80-х роках минулого століття, дає змогу вирішувати важливі проблеми біотехнології рослин, зокрема й біоенергетичних, – отримати посадковий матеріал видів і сортів, які не можуть розмножуватися насінням (*M. giganteus*), збільшити коефіцієнт розмноження інших видів міскантусу (*M. sinensis* та *M. sacchariflorus*).

З огляду на те, що *M. sinensis* рослина короткого дня, період цвітіння та зав'язування насіння в Європейських країнах припадає на осінні місяці, кількість отриманого насіння незначна, життєздатність його низька, що не забезпечує високий коефіцієнт розмноження міскантусу. Тобто насіннєве розмноження міскантусу проблематичне, що створює перешкоди для проведення схрещувань у селекційній практиці та отримання нових вихідних форм для збільшення генетичного різноманіття наявних видів і швидкого розмноження міскантусу для використання в біоенергетиці [161].

Одним із відомих біотехнологічних методів розмноження рослин в умовах *in vitro* є ініціація калюсогенезу та морфогенез калюсів. Перші калюсні лінії в умовах *in vitro* було отримано з використанням як експлантів незрілих суцвіть *M. Sinensis* Н. Дж. Гавель та ін. у 1987 році [162]. На сьогодні для отримання калюсних культур, крім незрілих суцвіть, як експланти використовують різні частки міскантусу: бруньки, пагони, квітки та достигле насіння [161 С.13–14].

Загальновідомо, що одним із основних факторів, які зумовлюють успішну реалізацію морфогенетичних стратегій в умовах *in vitro*, є склад живильного середовища. Тому на першому етапі наших досліджень було проведено аналіз літературних джерел та узагальнення вимог щодо складу живильних середовищ,

призначених для індукції калюсогенезу з різних частин рослин, морфогенезу калюсів та регенерації мікророслин [161 С.15–17]. Встановлено, що найбільш придатними для ініціації калюсогенезу були модифіковані середовища Гамборга – В5 з додаванням 2 мг/л 2,4 Д. Як регенераційне середовище було запропоновано модифіковане середовище МС з регуляторами росту 6-БАП (5 мг/л), α -НОК (0,24 мг/л) або 2,4 Д (1 мг/л) з невисоким вмістом сахарози (20 г/л) та застосуванням гелеріту (3 г/л).

Дані щодо середовищ для отримання калюсних ліній і регенерації з них повноцінних рослин із насіння з низькою схожістю та життєздатністю були відсутні. Саме тому добору компонентів живильних середовищ ми приділили першорядну увагу.

Унаслідок оптимізації та модифікації складу живильного середовища МС було розроблено прописи живильних середовищ для індукції калюсогенезу (перша серія) з насіння міскантусу з низькою схожістю та життєздатністю, морфогенезу калюсів (друга серія) та розмноження мікроклонів міскантусу в умовах *in vitro* (третья серія). В таблицях 4.1 та 4.2 наведено склад цих середовищ порівняно з іншими відомим середовищем Гамборга – В5, які модифіковано за вмістом регуляторів росту та інших компонентів.

Таблиця 4.1

Склад живильних середовищ для калюсогенезу (перша серія)

№	Компоненти середовища	Гамборга – В5, модифіковане за вмістом регуляторів росту	Мурасиге-Скуга (МС)	Мурасиге-Скуга модифіковане (МС модифіковане)
1.	NH_4NO_3	-	1650,0	825,0
2.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134,0	-	-
3.	KNO_3	2500,0	1900,0	950,0
4.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	440,0	220,0
5.	CaCl_2 б/в	113,24	-	-
6.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	370,0	185,0
7.	MgSO_4 б/в	122,09	-	-
8.	KH_2PO_4	-	170,0	85,0
9.	NaH_2PO_4 б/в	130,5	-	-

продовження таблиці 4.1.

10.	H ₃ BO ₃	3,0	6,2	6,2
11.	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10,0	22,3	22,3
12.	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0025	0,0025
13.	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0025	0,0025
14.	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,0	8,6	8,6
15.	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
16.	KI	0,75	0,83	0,83
17.	Fe SO ₄ ·7H ₂ O	27,85	27,8	27,8
18.	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,25	37,4	37,4
19.	Тіамін (B ₁)	10,0	0,1	1,0
20.	Піридоксин (B ₆)	1,0	0,5	1,0
21.	Нікотинова кислота (PP)	1,0	0,5	1,0
22.	Аскорбінова кислота (C)	-	-	1,0
23.	Біотин	-	-	-
24.	Гліцин	-	2,0	2,0
25.	Глутамінова	-	-	300,0
26.	Аспаргінова	-	-	50,0
27.	Тірозин	-	-	5,0
28.	Аргінін	-	-	3,0
29.	Пролін	-	-	2,0
30.	6-БАП	-	-	0,6
31.	Кінетин	0,1	0,2	-
32.	ІОК	-	2,0	-
33.	НОК	-	-	2,0-2,5
34.	2,4 Д	2,0	-	-
35.	АБК	-	-	0,3
36.	мезоінозит	-	0,1	0,1
37.	мезоінозитол	0,1	-	-
38.	сахароза	30,0	30,0	40,0
39.	мальтоза	-	-	-
40.	агар	-	8,0	8,0
41.	гельріт	3,0	-	-

Таблиця 4.2

Склад морфогенних живильних середовищ (друга серія) та розмноження мікроклонів міскантусу в умовах *in vitro* (третя серія)

Компоненти середовища	Морфогенні середовища		Середовища для розмноження мікроклонів
	МС модифіковане (еталон)	МС модифіковане	
Макроелементи МС	1/2	1	1
Мікроелементи МС	1	1	1
Вітаміни, мг/л			
Тіамін (В ₁)	10,0	10,0	10,0
Піридоксин (В ₆)	1,0	1,0	1,0
Нікотинова кислота (РР)	1,0	1,0	1,0
Аскорбінова кислота (С)	1,0	1,0	1,0
Амінокислоти, мг/л			
Гліцин	2,0	2,0	2,0
Глутамінова кислота	200,0-300,0	200,0-300,0	200,0-300,0
Регулятори росту, мг/л			
6-БАП	5,00	2,0	0,5
НОК	0,2–0,4	0,3	0,5
або 2,4-Д	1,0	-	-
ГК	-	-	0,2
Інші органічні домішки, г/л			
мезоінозит	0,1	0,1	0,1
сахароза	20,0	40,0	40,0
агар	8,0	8,0	8,0
гельріт	3,0	-	-

Результати досліджень свідчать, що найкраще проліферація калусів відбувалась при застосуванні модифікованого агаризованого середовища МС з додаванням вітамінів (В₁, В₆, РР, С), комплексу амінокислот (глутамінової, аспарагінової, тирозину, аргініну, проліну) та регуляторів росту (6-БАП, α -НОК або 2,4 Д, АБК) у кількостях, що наведені в таблиці 4.2, при використанні більшої кількості сахарози (40 г/л), порівняно з еталонними середовищами (30 г/л), без мальтози та гельріту.

Згідно зі спостереженнями, проліферація калюсів відбувалася через 13–15 діб після введення насіння в культуру *in vitro* (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Калюс рослин *M. sacchariflorus*

Отримані калюси (щільні та середньої щільності) мали неоднорідне забарвлення – від жовто-зеленого до зеленого із антоціановими краплями. Через 30–60 діб калюси було пересаджено на нове морфогенне живильне середовище (табл. 4.3), яке 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 α -НОК – 0,3 мг/л. Внаслідок модифікації живильного середовища вихід калюсів становив 100 % від кількості висадженого пророслого насіння *in vitro*.

За нашими спостереженнями, морфогенез калюсної тканини починався з утворення первинних корінців (рис. 4.2), через 5–7 діб на поверхні морфогенного калюсу утворювалися первинні бруньки та листки (рис. 4.3) і формувалися первинні мікроклони (рис. 4.4).



Рис. 4.2. Морфогенез калюсу – утворення первинних корінців



Рис. 4.3. Калюсна тканина – ріст і розвиток первинних листків

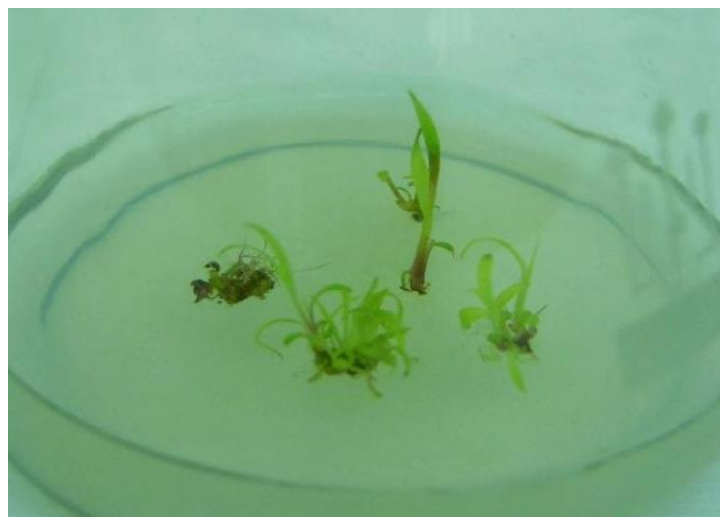


Рис. 4.4. Мікророслини міскантусу *in vitro*

Новоутворені мікроклони міскантусу розміром 0,5–0,7 см пересаджували на середовища для розмноження мікророслин в умовах *in vitro* (третьої серії) з меншою кількістю 6-БАП – 0,5 мг/л та додаванням ГК 0,2–1,0 мг/л, де згодом сформувались повноцінні рослини (рис. 4.5).



Рис. 4.5. Рослини міскантусу, сформовані внаслідок морфогенезу калюсів

Підрахунки свідчать, що завдяки стимуляції калюсогенезу в насіння з низькою схожістю та життєздатністю й морфогенезу калюсів найвищий коефіцієнт розмноження (62 шт. з однієї насінини) було отримано для міскантусу цукроквіткового, тоді як для міскантусу китайського цей показник був удвічі нижчим – 33 шт. внаслідок нижчого показника регенерації (20 %), коефіцієнт розмноження мікророслин становив 1,3–3,1 (таблиця 4.3).

Таблиця 4.3

Вплив складу живильного середовища на калюсогенез, частоту регенерації та кількість отриманих мікророслин міскантусу китайського та цукроквіткового

Вид	Склад живильних середовищ для отримання калюсів та регенерації рослин	Кількість отриманих калюсів у % від насіння, що проросло	Частота регенерації, %	Кількість мікророслин, отриманих через 4 тижні культивування калюсу на регенераційному середовищі з 1 насінини, шт.	Загальна кількість мікророслин, отриманих через 4 тижні культивування калюсу на регенераційному середовищі, шт.
<i>M. sinensis</i>	Гамборга модифіковане – еталон	$13,3 \pm 0,1$ $-31,2 \pm 0,2$	$20 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$ – $3,1 \pm 0,7$	$9,0 \pm 0,5$
<i>M. sinensis</i>	МС модифіковане	100,0	$50,0 \pm 0,7$	$33,0 \pm 1,0$	$198,0 \pm 6,0$
<i>M. sacchariflorus</i> (2n)	МС модифіковане	100,0	100,0	$62,0 \pm 2,0$	$372,0 \pm 12,0$

Отже, завдяки модифікації середовищ для ініціації калюсогенезу та морфогенезу калюсів коефіцієнт розмноження рослин міскантусу цукроквіткового можна підвищити в середньому в 40 разів, міскантусу китайського – в 20 разів.

Для розроблення та оптимізації складу живильних середовищ для мікроклонального розмноження міскантусу виготовлено та проаналізовано більш як 40 різних за складом, дозуванням, співвідношенням компонентів живильних середовищ. Основними регуляторами росту, введеними до складу живильних середовищ, були цитокиніни – 6-БАП, кінетин, а також аденін, які досить часто використовують в біотехнології рослин. Ця група регуляторів росту стимулює поділ клітин та індукує утворення адвентивних пагонів *in vitro*, ініціює морфогенез, сприяє диференціюванню калюсних тканин та збереженню їхньої ембріогенної активності протягом тривалого часу [175, 176].

Відомо, що аденін (аденін сульфат), який має назву вітамін В₄, зазвичай вносять до середовища разом з такими цитокинінами, як 6-БАП, кінетин для підсилення їхньої дії [156], а природні цитокиніни є N6-заміщені похідні аденіна [177, 178].

Результати оптимізації та уніфікації складу живильних середовищ для розмноження міскантусу в умовах *in vitro* за компонентами (макроелементи, амінокислоти, вітаміни, регулятори росту, вуглеводи) наведено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

Склад живильного середовища для мікроклонального розмноження
міскантусу

№	Компоненти середовища	P	P1	P2	P3
1	Макроелементи МС	1	1	1	1
2.	Мікроелементи МС	1	1	1	1
Вітаміни, мг/л					
3.	Тіамін (В ₁)	10,0	10,0	10,0	10,0
4.	Піридоксин (В ₆)	1,0	1,0	1,0	1,0
5.	Нікотинова кислота (РР)	1,0	1,0	1,0	1,0
6.	Аскорбінова кислота (С)	1,0	1,0	1,0	1,0
Амінокислоти, мг/л					
7.	Глутамінова	250,0	250,0	250,0	250,0
8	Аргінін	30,0	30,0	30,0	30,0
9.	Тріптофан	3,0	3,0	3,0	3,0
10.	Тірозин	3,0	3,0	3,0	3,0
11.	Гідроксипролін	2,0	2,0	2,0	2,0
12.	Глицин	2,0	2,0	2,0	2,0
Регулятори росту, мг/л					
13.	6-БАП	0,4	0,4	0,4	0,4
14.	Аденін	-	0,5	-	0,5
15.	Кінетин	-	-	0,5	0,5
16.	ГК	0,2	0,2	0,2	0,2
Інші органічні домішки, г/л					
17.	Мезоінозит	0,1	0,1	0,1	0,1
18.	Сахароза	40,0	40,0	40,0	40,0
19.	Агар	8,0	8,0	8,0	8,0

Результати досліджень показали, що найбільшу кількість клонів міскантусів було отримано на середовищах з декількома регуляторами росту з цитокініноювою активністю, тобто тих середовищах, до складу яких, крім 6-БАП, було введено кінетин та речовину з цитокініноювою активністю – аденін. Так, якщо на середовищі Р (БАП – 0,4 мг/л) кількість утворених клонів становила у *M. giganteus* 3 шт., *M. sacchariflorus* – 6 шт., *M. sinensis* – 6, шт., то додавання до складу живильного середовища аденіну – 0,5 мг/л сприяло підвищенню отриманих клонів на 20–30 %, залежно від виду міскантусу, а додавання до складу живильного середовища кінетину – 0,5 мг/л збільшило ці показники на 32–50 % (табл. 4.5).

Таблиця 4.5.

Результати клонування рослин міскантуса залежно від типу живильного середовища для розмноження

Види міскантусу	Кількість рослин, отриманих з одного паростка чи бруньки з ризом на живильних середовищах для розмноження кожні 3 тижні, шт.			
	Р	Р1	Р2	Р3
<i>M. sinensis</i> (паросток з насіння)	6,1 ± 0,5	6,6 ± 0,5	6,7 ± 0,5	7,0 ± 0,6
<i>M. sacchariflorus</i> (4n) (брунька з ризоми)	5,6 ± 0,5	7,0 ± 0,6	7,6 ± 0,7	8,0 ± 0,7
<i>M. giganteus</i> (брунька з ризоми)	3,4 ± 0,3	4,0 ± 0,4	4,8 ± 0,5	6,0 ± 0,5

Загалом, під час мікроклонального розмноження отримали 261 рослин *M. sinensis* (паросток з насіння), 326 рослин *M. sacchariflorus* (4n) (брунька з ризоми) та 211 рослини *M. giganteus* (брунька з ризоми).

Додавання до складу середовищ цих сполук сприяло збільшенню кількості утворених клонів у 1,5–2 раза залежно від виду міскантусу. Збільшення вмісту цитокінінів, зокрема 6-БАП, до 1,0 мг/л сприяло підвищенню швидкості

клонування та отриманню більшої кількості клонів, але мало негативний вплив на подальший розвиток рослин та акліматизацію їх у відкритому ґрунті.

Отже, краще клонування міскантусів в умовах *in vitro* забезпечувало модифіковане середовище РЗ з двома видами цитокінінів – 6-БАП – 0,4 мг/л та кінетином – 0,5 мг/л, аденіном – 0,5 мг/л, ГК – 0,2 мг/л з додаванням амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аргініну – 30 мг/л, триптофану – 3 мг/л, тірозину – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л та комплексу вітамінів: В₁ – 10 мг/л, В₆, РР, С по 1 мг/л. Такий склад живильного середовища забезпечує отримання максимальної кількості клонів з однієї рослини що три тижні – більш як 6 клонів *M. giganteus*, 7 клонів *M. sinensis* та 8 клонів *M. sacchariflorus*. Це середовище ми рекомендуємо для мікроклонального розмноження міскантусу в умовах *in vitro*.

4.2 Мультиплікація та порівняльна характеристика методів мікроклонального розмноження міскантусу в умовах *in vitro*

За результатами наших досліджень було розроблено метод отримання калюсних ліній *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* в умовах *in vitro* способом ініціації калюсогенезу та регенерації мікророслин з калюсу; метод розмноження міскантусу в умовах *in vitro* способом експлантації насіння або бруньок із ризом на живильне середовище. Результати мультиплікації, отримані за розробленими нами методами (таблиця 4.5–4.7), ми порівнювали з результатами мультиплікації при регенерації міскантусу китайського із калюсу за методом, розробленим корейськими вченими [179], та результатами мультиплікації міскантусу, запатентованими американськими вченими [180] (таблиця 4.5).

Мультиплікація міскантусу з одного паростка
(Patent United States № 20120042569)

№	Місяць	Кількість розмнужених клонів, шт.
1	Січень	1
2	Лютий	12
3	Березень	144
4	Квітень	1 728
5	Травень	20 736
6	Червень	248 832
7	Липень	2 985 984
8	Серпень	35 831 808
9	Вересень	429 981 696
10	Жовтень	5 159 780 352
11	Листопад	61 917 364 224
12	Грудень	743 008 370 688

Згідно з літературними джерелами, швидкість мутації при розмноженні *M. giganteus* ризомами відносно низька. Кількість ризом, яку було отримано на перший рік вирощування становила 7–10 шт., а на другий рік – 25–30 шт. на одну рослину після висаджування материнських ризом [71]. Тоді як швидкість мультиплікації міскантусу в умовах *in vitro* значно вища. За підрахунками американських вчених, теоретична швидкість мультиплікації становила більш як 743 млрд мікроклонів *M. giganteus* за один рік при коефіцієнті розмноження 12 на місяць.

Таблиця 4.6

Теоретичні розрахунки з масштабованої мультиплікації різних видів міскантусу з проростка з насіння та з калюсу

Проміжок часу	Кількість клонів <i>M. sacchariflorus</i> (2n) (проросток з насіння)	Кількість клонів <i>M. sacchariflorus</i> (2n) (калюс)	Кількість клонів <i>M. sinensis</i> (калюс)
2 тижні	1x8		
6 тижнів	8		
9 тижнів	64	65x11	33x10
12 тижнів	512	715	330
15 тижнів	4 096	7 865	3 300
18 тижнів	32 768	95 515	33 000
21 тиждень	262 144	1 050 665	330 000
24 тижні	2 097 152	11 557 315	3 300 000
27 тижнів	16 777 216	127 130 465	33 000 000
30 тижнів	130 217 728	1 398 435 115	330 000 000
33 тижні	1 041 741 824	15 382 786 265	3 300 000 000
36 тижнів	8 333 934 592	169 210 648 915	33 000 000 000
39 тижнів	66 671 676 736	1 861 317 138 065	330 000 000 000
42 тижні	533 372 413 888	20 474 488 518 715	3 300 000 000 000
45 тижнів	4 488 979 321 104	225 319 373 705 865	33 000 000 000 000
48 тижнів	39 101 834 568 832	2 477 413 110 764 515	330 000 000 000 000
51 тиждень	312 814 676 550 856	27 351 544 218 419 665	3 300 000 000 000 000
54 тижні	2 502 517 411 406 848	300 866 486 402 616 315	33 000 000 000 000 000

Згідно з даними, отриманими в наших дослідженнях, з мультиплікації *M. giganteus* при коефіцієнті розмноження 8, у середньому за три тижні культивування в умовах *in vitro*, майже за рік теоретично можна отримати 2 502

млрд мікроклонів *M. giganteus*. Порівнюючи з теоретичною швидкістю мультиплікації, підрахованою американськими вченими для *M. giganteus*, це в 3,7 рази більше.

Таблиця 4.7

Теоретичні розрахунки з масштабованої мультиплікації різних видів міскантусу з бруньок із ризом та з проростка насіння

Проміжок часу	Кількість клонів, шт. <i>M. giganteus</i> (брунька з ризом)	Кількість клонів, шт. <i>M. sacchariflorus</i> (4n) (брунька з ризом)	Кількість клонів, шт. <i>M. sinensis</i> (проросток з насіння)
2 тижня	1x8	1x6	1x7
6 тижнів	8	6	7
9 тижнів	64	36	49
12 тижнів	512	216	343
15 тижнів	4 096	1 296	2 401
18 тижнів	32 768	7 776	16 849
21 тиждень	262 144	46 656	117 943
24 тижня	2 097 152	279 936	825 601
27 тижнів	16 777 216	1 679 616	5 779 207
30 тижнів	130 217 728	10 077 696	40 454 449
33 тижні	1 041 741 824	60 466 176	283 181 143
36 тижнів	8 333 934 592	362 797 056	1 982 268 001
39 тижнів	66 671 676 736	2 176 782 336	13 875 876 007
42 тижня	533 372 413 888	13 060 694 016	97 131 132 049
45 тижнів	4 488 979 321 104	78 364 164 096	679 917 924 343
48 тижнів	39.101.834.568.832	470 184 984 576	4 759 425 470 401
51 тиждень	312 814 676 550 856	2 821 109 907 456	33 315 978 292 807
54 тижня	2 502 517 411 406 848	16 926 659 444 736	233 211 848 049 649

При підрахунку мультиплікації *M. sacchariflorus* за рік при коефіцієнті розмноження 6 можна отримати 16 926 млрд мікроклонів та 233 212 млрд мікроклонів *M. sinensis* при коефіцієнті розмноження 7. А при розмноженні *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* із застосуванням калюсогенезу розрахункові цифри значно більші – 300 866 486 млрд мікроклонів *M. sacchariflorus* та 33 000 000 000 млрд мікроклонів *M. sinensis*.

При порівнянні теоретичної швидкості мультиплікації при розмноженні *M. sacchariflorus* ($2n$) з проростка насіння та з калюсу за кількістю клонів, отриманих за рік, встановлено, що швидкість мультиплікації з калюсу була у 120, а для *M. sinensis* – у 142 рази більша.

4.3. Адаптація регенерантів міскантусу у відкритому ґрунті

Метод розмноження міскантусу в культурі *in vitro* вважають дуже продуктивним, але досить проблематичним. Одна з проблем – це висока вартість, що робить вирощування рослин міскантусу в культурі *in vitro* нерентабельним. Найбільш затратною є адаптація та підрощування регенерантів в теплицях, що робить цей спосіб розмноження занадто дорогим для вирощування міскантусу в промислових масштабах. Вирішення проблеми адаптації рослин у полі, без застосування тепличних комплексів сприятиме здешевленню рослин міскантусу, тиражованих *in vitro* [181, 132].

Аналіз сучасних досліджень та літературних джерел показав, що процес розмноження міскантусу в культурі *in vitro* зазвичай включає інокуляцію експлантів (апикальні меристеми) для індукції утворення пагонів на живильне середовище Мурасіге–Скуга (МС), яке містить 1,0–5,0 мг/л 6-БАП в комбінації або без ІОК – 0,2–0,45 мг/л із субкультивуацією що чотири–п'ять тижнів для розмноження пагонів, висаджування рослин для акліматизації та підрощування у ґрунтові суміші в умовах теплиць, температура день/ніч – 20/15 °С, освітлення – 16 годин галогеновими лампами. Для адаптації рослин використовують пластмасові колби, які видаляють поступово після експлантації [103, 104].

Суттєвим недоліком цього методу є вимерзання рослин міскантусу протягом зимового періоду в разі висаджування їх у відкритий ґрунт на першому році вегетації [182]. Для запобігання ушкодженню та загибелі рослин у країнах Європи для їх адаптації та підрощування використовують тепличні комплекси, що збільшує вартість розсади та ускладнює технологію вирощування рослин [183, 184]. Тому розроблення методу розмноження культури *in vitro* представників роду *Mischanthus* й адаптації їх у відкритому ґрунті без використання тепличних комплексів для їх акліматизації та підрощування, який дасть змогу зберегти рослини міскантусу на першому році вирощування у зимовий період, є актуальним.

Основою успішного культивування та розмноження рослин міскантусу *in vitro* є правильний добір живильних середовищ. У дослідженнях було проаналізовано та розроблено прописи трьох типів середовищ:

- живильне середовище для інокуляції експлантів;
- живильне середовище для розмноження пагонів;
- живильне середовища для стимуляції росту ризом *in vitro*.

Відомо, що вегетативне розмноження різних видів міскантусу здійснюють способом поділу підземних стебел (кореневищ) – ризом. Ці стебла утворюють міжвузля та бруньки, подібні до наземних стебел. Вони також виконують функцію підземного запасуючого органа для зимівлі рослини та є джерелом поживних речовин для початкового росту її надземної частини. Щовесні з бруньок ризом відростають нові пагони, які використовують запаси, що зберігалися в ризомах для ініціації ростових процесів [182]. З огляду на такі важливі для акліматизації та виживання в зимовий період властивості ризом наші зусилля було спрямовано на ініціацію процесів росту та розвитку цих органів в умовах *in vitro*.

Для добору та оптимізації складу живильних середовищ, призначених для стимуляції розвитку ризом *in vitro*, було проаналізовано середовища за дозуванням та співвідношенням їхніх основних компонентів. Основним

гормоном, внесеним до складу живильних середовищ, був гіберелін (ГК) – 0,5–1,0 мг/л, та як допоміжні – 6-БАП – 0,2 мг/л та НОК – 0,1 мг/л (таблиця 4.8).

Таблиця 4.8

Склад живильного середовища для стимуляції розвитку ризом *in vitro*
міскантусу

№	Компоненти середовища	Еталон (Рр)	Рр1	Рр2	Рр3
1	Макроелементи МС	1/2	1/2	1/2	1/2
2.	Мікроелементи МС	1	1	1	1
Вітаміни, мг/л					
3.	Тіамін (В ₁)	10,0	10,0	10,0	10,0
4.	Піридоксин (В ₆)	1,0	1,0	1,0	1,0
5.	Нікотинова кислота (РР)	1,0	1,0	1,0	1,0
6.	Аскорбінова кислота (С)	1,0	1,0	1,0	1,0
Амінокислоти, мг/л					
7.	Глутамінова	250	250	250	250
8	Аргінін	30	30	30	30
9.	Тріптофан	3	3	3	3
10.	Тірозин	3	3	3	3
11.	Гідроксипролін	2	2	2	2
12.	Гліцин	2	2	2	2
Регулятори росту, мг/л					
13.	6-БАП	0,2	0,2	0,2	0,2
14.	НОК	0,1	-	-	0,1
15.	ГК	-	0,5	1,0	1,0
Інші органічні домішки, г/л					
16.	Мезоінозит	0,1	0,1	0,1	0,1
17.	Сахароза	40,0	40,0	40,0	40,0
18.	Агар	8,0	8,0	8,0	8,0

Результати досліджень свідчать, що введення до складу живильних середовищ гібереліну стимулює ріст ризом та сприяє збільшенню їхньої довжини залежно від виду міскантусу в середньому в 5–7 разів.

Дані, що наведено на рисунку 4.6, демонструють результати стимуляції утворення та пролонгації ризом на відповідних живильних середовищах.

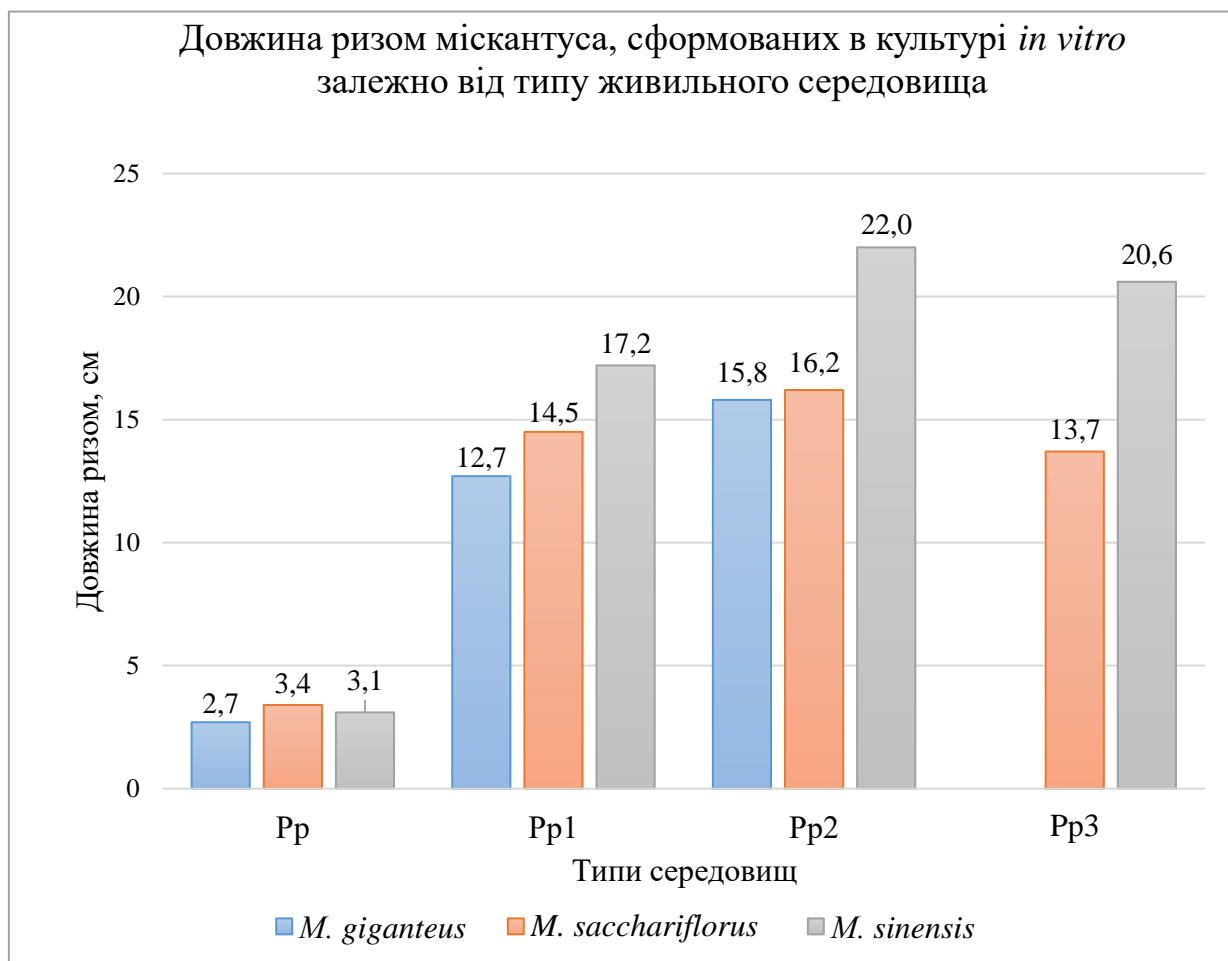


Рис. 4.6. Довжина ризом різних видів міскантусу залежно від складу живильного середовища, см

Найкращі результати отримано за використання середовища Pp2 із регуляторами росту ГК – 1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2 мг/л без α -НОК. Введення до складу живильних середовищ гібереліну стимулювало ріст ризом та сприяло збільшенню їхньої довжини в середньому в 5–7 разів, порівняно з контролем (Pp).

Рослини *M. sinensis* з утвореними ризомами *in vitro* зображено на рис. 4.7–4.11.

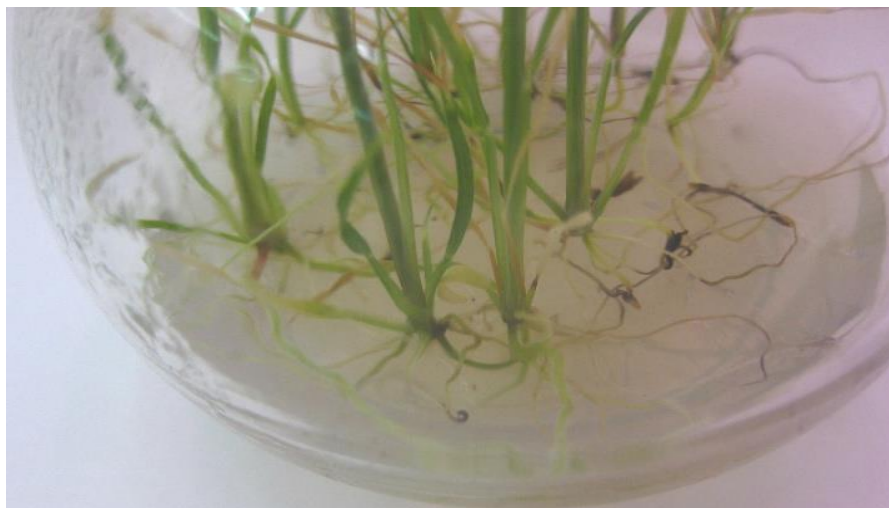


Рис. 4.7. Рослини *M. sinensis* з утвореними ризомами *in vitro*



Рис. 4.8. Проростання ризом у рослин *M. sinensis in vitro*



Рис. 4.9. Рослина *M. sacchariflorus* з ризомами *in vitro*



Рис. 4.10. Ризоми рослини *M. sacchariflorus in vitro*



Рис. 4.11. Рослина *M. giganteus* з ризомами *in vitro*

Дослідження показали, що при розмноженні міскантусу в культурі *in vitro* та адаптації у ґрунті з використанням теплиць кількість адаптованих та акліматизованих рослин у % від висаджених становила 89 %, а кількість рослин, що вижили після перезимівлі у % від висаджених, – 66 %. Адаптація та акліматизація мікророслин при висаджуванні їх безпосередньо у відкритий ґрунт з еталонних середовищ МС забезпечила тільки 67 % адаптованих та акліматизованих рослин у % від висаджених, а кількість рослин, що вижили

після перезимівлі становила 41 % (табл. 4.9). Такі результати було отримано в умовах України, тоді як в умовах інших європейських країн рослини без застосування тепличних комплексів взагалі не виживають [183].

Таблиця 4.9

Характеристика способів розмноження міскантусу в культурі *in vitro* та адаптації в ґрунті (2013 рік)

Способи розмноження міскантусу в культурі <i>in vitro</i> та адаптації у ґрунті	Розмноження <i>in vitro</i>	Стимуляція росту ризом <i>in vitro</i>	Адаптація в умовах теплиць	Адаптація та акліматизація в умовах відкритого ґрунту	Кількість адаптованих та акліматизованих рослин у % від висаджених	Кількість рослин, що вижили після перезимівлі у % від висаджених
Живильне середовище, адаптація в теплицях (еталон)	+	-	+	+	89 ± 2,7	66 ± 2,0
Живильне середовище (еталон), адаптація та акліматизація без використання теплиць	+	-	-	+	67 ± 2,0	41 ± 1,2
Модифіковане живильне середовище та акліматизація й адаптація рослин без використання теплиць	+	+	-	+	100	100

У II декаді червня 2013 року в умови відкритого ґрунту висадили по 50 рослин кожного виду міскантуса, які розміщали під пластмасовими колбами для підтримання їхнього оптимального мікроклімату (рис. 4.12). Сприятливі кліматичні умови та стимуляція утворення і пролонгації ризом на модифікованих середовищах перед висаджуванням рослин *M. giganteus*, *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* у відкритий ґрунт сприяла їх 100 % адаптації та повному виживанню

в зимовий період без застосування тепличних комплексів як проміжної ланки для адаптації та підрощення мікророслин.



Рис. 4.12. Адаптація рослин міскантусу до умов *ex vitro*
(II декада червня 2013 року)

Дані, отримані в результаті досліджень зі стимуляції утворення та росту ризом міскантусу в культурі *in vitro*, було використано для оформлення патенту на корисну модель [160].

Отже, нами було розроблено метод розмноження міскантусів *in vitro* та адаптації їх у відкритому ґрунті, який передбачає стимуляцію росту ризом із застосуванням прописів живильних середовищ, до складу яких як основний гормон було введено гіберелін (ГК) в дозуванні 0,5–1,0 мг/л, та як допоміжні – 6-БАП – 0,2 мг/л та НОК – 0,1 мг/л. Це сприяло збільшенню довжини ризом на живильних середовищах, що забезпечило гарантоване 100 % збереження розмножених з культури *in vitro* мікророслин при адаптації та акліматизації у зимовий період. Метод надає значні переваги при розмноженні міскантусу у великих кількостях, тому що дає змогу уникнути використання тепличних комплексів, стаціонарний характер, конструкційна складність та дороговизна яких обмежують використання їх окремими фермерами та малими сільськогосподарськими підприємствами.

РОЗДІЛ 5

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

5.1. Фенологія та морфометричні показники різних видів міскантусу

Спостереження за ростом і розвитком рослин *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* ($4n$), *M. sacchariflorus* ($2n$), *M. giganteus* першого року вегетації, які було висаджено з колб безпосередньо в ґрунт в другій декаді червня, показали, що всі види міскантусу успішно перезимували, рослини витримали морози навіть $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

На рисунках 5.1–5.4 представлено рослини різних видів міскантусу першого року вегетації, отримані в умовах *in vitro*.



Рис. 5.1. Рослина *M. giganteus* першого року вегетації, отримана в умовах *in vitro* (липень 2014 року)



Рис. 5.2. Рослини *M. sinensis* першого року вегетації, отримані в умовах *in vitro* (липень 2014 року)



Рис. 5.3. Рослина
M. sacchariflorus ($2n$) першого року
вегетації, отримана в умовах
in vitro (липень 2014 року)



Рис. 5.4. Рослини *M. sacchariflorus*
($4n$) першого року вегетації,
отримані в умовах *in vitro*
(липень 2014 року)

Для проведення подальших досліджень, було відібрано по 10 кращих рослин (зразків) кожного виду міскантуса. На основі узагальнених даних фенологічних спостережень рослин *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* ($4n$), *M. sacchariflorus* ($2n$), *M. giganteus* (*in vitro*) та рослин *M. giganteus*, розмножених ризомами (*ex vitro*) (таблиця 5.1), визначено, що рослини *M. giganteus*, розмножені *ex vitro*, характеризувалися пізнім відростанням, в середньому на 7 днів пізніше, порівнюючи з рослинами інших дослідних зразків міскантусу, а саме: *M. sacchariflorus* ($2n$) та *M. sacchariflorus* ($4n$). Фаза кущіння в рослин *M. giganteus* (*ex vitro*) наставала через 50–55 днів після відростання. В такі ж строки наставала фаза кущіння у рослин *M. giganteus*, розмножених у культурі *in vitro*. Тоді як рослини *M. sacchariflorus* ($2n$) та *M. sacchariflorus* ($4n$) починали кущитись значно раніше – вже за 45–48 днів після відростання. У рослин *M. sacchariflorus* ($2n$) фаза виходу в трубку, а відповідно і появи волоті, цвітіння

та плодоношення не наставала. Проте у рослин *M. sacchariflorus* (4n) вихід в трубку починався на місяць раніше (в останній декаді липня) ніж в *M. sinensis* (*in vitro*) та майже на два місяці раніше ніж у рослин *M. giganteus* з *in vitro* та з *ex vitro*. В еталонних зразках у *M. giganteus* (*ex vitro*) та рослинах *M. giganteus* (*in vitro*) волоть з'являлася в середині вересня, проте плодоношення не наставало, оскільки це триплоїдні рослини, які не можуть мати насіння. Поява волоті та цвітіння в рослин *M. sacchariflorus* (4n) (*in vitro*) (остання декада липня, перша декада серпня відповідно) відбувалися на місяць раніше, порівнюючи з рослинами *M. sinensis* (*in vitro*) (остання декада серпня, перша декада вересня відповідно), через що існує проблема із перезапиленням цих видів та отриманням гібридного насіння. У *M. sinensis in vitro* за пізніх строків цвітіння насіння не встигало повністю достигати.

Таблиця 5.1

Фази росту та розвитку представників роду *Miscanthus*, розмножених (отриманих) в умовах *in vitro* та *ex vitro* (ризомами) (2016 рік)

Фази росту та розвитку, дата, ±доба	Вид міскантусу				
	<i>M. sacchariflorus</i> (2n) (отримані <i>in vitro</i>)	<i>M. sacchariflorus</i> (4n) (отримані <i>in vitro</i>)	<i>M. sinensis</i> (отримані <i>in vitro</i>)	<i>M. giganteus</i> (отримані <i>in vitro</i>)	<i>M. giganteus</i> (<i>ex vitro</i>)
Відростання	10.04±4	8.04 ±3	12.04 ±5	15.04±5	15.04±5
Кущіння	28.05±3	22.05±3	04.06±4	06.06±5	04.06±5
Вихід у трубку	-	6.07±5	10.08±5	26.08±7	25.08±5
Поява волоті	-	22.07±4	26.08±6	16.09±7	14.09±6
Цвітіння	-	31.07±5	08.09±6	10.10±7	7.10±7
Плодоношення	-	5.09±6	10.10±7	Не настає	Не настає

Детальну морфометричну характеристику представників роду *Miscanthus*, розмножених (отриманих) в умовах *in vitro* та *ex vitro* (ризомами), надано в таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Морфометрична характеристика представників роду *Miscanthus*, розмножених (отриманих) в умовах *in vitro* та *ex vitro* (ризомами) (2016 рік)

Параметри органів рослин		Вид міскантусу				
		<i>M.sacchariflorus</i> (2n) (отримані <i>in vitro</i>)	<i>M.sacchariflorus</i> (4n) (отримані <i>in vitro</i>)	<i>M.sinensis</i> (отримані <i>in vitro</i>)	<i>M.giganteus</i> (отримані <i>in vitro</i>)	<i>M.giganteus</i> (<i>ex vitro</i>)
Висота рослини, см		43,2±3,0	215,7±6,3	224±5,8	289, 3±9,1	380, 3±11,1
Стебла	Кількість стебел у кущі, шт.	5±0,4	54,4±5,7	62,6±4,6	16,3±2,1	36,4±3,2
	Висота, см	39,3±3,1	202±9,3	215,3±7,1	267,5±10,8	357,4±14,5
	Діаметр, мм	6,4±0,4	5,0±0,2	12,5± 1,4	14,0± 1,6	14,6± 1,4
	Кількість міжвузлів, шт.	7,0±0,3	12,1 ±0,6	14,2± 0,9	16,1± 1,1	17,0± 1,2
Листки	Кількість на стеблі, шт.	7,0±0,4	11,8±0,2	12,4±0,3	15,7± 1,4	16,5± 1,3
	Довжина, см	27,9±3,0	38,2±4,1	45,7± 1,7	56,1± 2,1	65,7± 4,0
	Ширина, см	1,3±0,3	1,5±0,2	2,3±0,2	2,6±0,3	2,6±0,2
	Площа, см ²	21,8±2,2	34,4±2,9	63,0±1,1	87,5±1,9	102,5±2,6
Суцвіття (волоть)	Довжина, см	-	26,1±0,4	32,4±1,2	36,7±1,4	38,1±1,5
	Ширина, см	-	14,2±0,6	13,4±0,4	18,9±1,5	19,6±1,3

Результати досліджень морфометричних особливостей різних видів і морфотипів міскантусів визначають їхні можливості широкомасштабної інтродукції та є підґрунтям для їх оцінки щодо різних напрямів практичного використання в біоенергетиці.

Такі показники, як висота рослини, діаметр пагонів, кількість стебел у кущі, кількість міжвузлів, кількість і довжина листків, їхня площа, а також довжина, ширина волоті досліджуваних видів міскантусів, розмножених в умовах *in vitro* та *ex vitro*, мають вагоме значення та є важливими критеріями для визначення цінності міскантусів у селекційній практиці.

Згідно з результатами досліджень, найбільшими морфометричними показниками органів, що характеризують габітус досліджуваних рослин, відзначилися рослини *M. giganteus (ex vitro)*, дещо нижчими були морфометричні показники *M. giganteus (in vitro)*. Рослини *M. giganteus (ex vitro)* значно домінували за цими показниками над *M. sacchariflorus (4n)* та *M. sinensis (in vitro)*. Так, висота *M. giganteus (ex vitro)*, що становила 380,3 см, була на 35,7 % вищою ніж у *M. giganteus (in vitro)* та на 76,3 % і 69,8 % вищою за *M. sacchariflorus (4n)* та *M. sinensis (in vitro)* відповідно. Найнижчий показник висоти – 43,2 см – мали рослини *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)*, чим різко відрізнялися від інших досліджуваних видів міскантусів, зокрема, тетраплоїдної форми – *M. sacchariflorus (4n)*.

Найбільшою кількістю міжвузлів характеризувалися рослини *M. giganteus (ex vitro)* – 17,0 шт., близькою до цього показника була кількість міжвузлів у *M. giganteus (in vitro)* – 16,1 шт., найменшою – *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)* – 7,0 шт. За кількістю міжвузлів *M. sacchariflorus (4n)* та *M. sinensis (in vitro)*, які мали 12,1 та 14,2 шт. міжвузлів відповідно, поступалися *M. giganteus (in vitro)* та *M. giganteus (ex vitro)*.

Значні відмінності мали рослини досліджуваних видів за таким важливим показником, як діаметр стебла. Найменший діаметр стебла (5,0 мм) мали рослини *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)*, що в 2,5 раза менше за показник *M. sinensis (in vitro)* та в 2,8 і 2,9 раза менше ніж показники *M. giganteus (in vitro)* та *M. giganteus (ex vitro)* відповідно.

Суттєвими відмінностями за таким важливим для біоенергетики показником, як кількість стебел у кущі (кущистість), характеризувалися всі види міскантусів, що вивчалися. Найбільшою кількістю стебел в кущі – 62,6 шт. –

характеризувалися рослини *M. sinensis* (*in vitro*), дещо менше стебел – 54,4 шт. – було зафіксовано у *M. sacchariflorus* ($4n$) (*in vitro*). У *M. giganteus* (*ex vitro*) кількість стебел (36,4 шт.) була майже в 2 рази більшою ніж у *M. giganteus* (*in vitro*) (16,3 шт.), але на 72 % меншою від кількості стебел у *M. sinensis* (*in vitro*). Найменшу кількість стебел у кущі (5 шт.) мали рослини *M. sacchariflorus* ($2n$) (*in vitro*).

Вивчення морфологічних особливостей листкового апарату досліджуваних видів рослин міскантусу продемонструвало, що за показником кількості листків на стеблі (приблизно 16 шт.) різниці між *M. giganteus* (*ex vitro*) та *M. giganteus* (*in vitro*) практично не було, також майже на одному рівні була кількість листків на стеблі у *M. sacchariflorus* ($4n$) (*in vitro*) та *M. sinensis* (*in vitro*) – 11,8 та 12,4 шт. відповідно. Найменшу кількість листків – 7 шт. – визначено у *M. sacchariflorus* ($2n$) (*in vitro*). За довжиною, шириною листків, площею листової поверхні також домінували рослини *M. giganteus* (*ex vitro*) та *M. giganteus* (*in vitro*). Найбільшу довжину листків (65,7 см) визначено у *M. giganteus* (*ex vitro*), найменшу – 27,0 см – у *M. sacchariflorus* ($2n$) (*in vitro*). Довжина листків у *M. sacchariflorus* ($4n$) (*in vitro*) та *M. sinensis* (*in vitro*) була на 72,0 та 43,8 % відповідно меншою ніж у *M. giganteus* (*ex vitro*). Найменшу ширину листків (1,3 см) зафіксовано у *M. sacchariflorus* ($2n$) (*in vitro*), практично на такому ж рівні (1,5 см) була ширина листків у *M. sacchariflorus* ($4n$) (*in vitro*). Ширина листків рослин *M. giganteus* (*in vitro*) та *M. giganteus* (*ex vitro*) була однаковою – 2,6 см, дещо меншою (2,3 см) була ширина листків у *M. sinensis* (*in vitro*). Слід зазначити, що деякі переваги у довжині листків (17,1 % у *M. giganteus* (*ex vitro*) порівняно з *M. giganteus* (*in vitro*)) позначилися на різниці у їхній площі. Так, якщо площа листків у *M. giganteus* (*ex vitro*) дорівнювала 102,5 см², то у *M. giganteus* (*in vitro*) – 87,5 см². Площа листків *M. sinensis* (*in vitro*) була в 1,6 рази, *M. sacchariflorus* ($4n$) (*in vitro*) в 3 рази, а *M. sacchariflorus* ($2n$) (*in vitro*) в 4,7 рази меншою від площі листків *M. giganteus* (*ex vitro*).

Визначення морфометричних показників волоті продемонструвало, що найбільші розміри – 38,1 см довжини та 19,6 см ширини – мала волоть

M. giganteus (ex vitro). Волоть *M. giganteus (in vitro)* дещо поступалася за розмірами *M. giganteus (ex vitro)* – 36,7 см довжини та 18,9 см ширини. Волоть *M. sinensis (in vitro)* за довжиною була меншою на 17,6 %, а за шириною – на 46,4 % ніж у *M. giganteus (ex vitro)*. Найменшими розмірами характеризувалася волоть *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)*. Її довжина була на 46 %, а ширина на 38,0 % меншою ніж у волоті *M. giganteus (ex vitro)*.

За результатами морфологічних досліджень визначено, що найкращі результати за такими показниками, як висота рослини, діаметр пагонів, кількість міжвузлів, кількість та довжина листків, їхня площа, а також довжина й ширина волоті продемонстрував *M. giganteus (ex vitro)*. Рослини *M. giganteus*, що були розмножені *in vitro*, дещо поступалися рослинам *M. giganteus*, розмноженим ризомами. Найбільш суттєвою була різниця за висотою рослин – 31,5 %, за кількістю стебел у кущі – 123 %, довжиною листків – 17,1 %, площею листків – 17,1 %. За такими показниками, як діаметр стебла, кількість листків на стеблі, довжина та ширина волоті, різниця між *M. giganteus (ex vitro)* та *M. giganteus (in vitro)* була незначна – 3,7–5,0 %. Варто зазначити, що *M. sinensis (in vitro)*, який поступався *M. giganteus (in vitro)* та *M. giganteus (ex vitro)* за таким важливим показником, як висота рослин, мав найбільшу кількість стебел у кущі – 62,6 шт., що в 1,7 раза більше ніж у *M. giganteus (ex vitro)* та в 3,8 раза більше ніж у *M. giganteus (in vitro)*.

Отже, відповідно до проведеного аналізу морфометричних показників *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)*, *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)*, *M. sinensis (in vitro)*, *M. giganteus (in vitro)* та *M. giganteus (ex vitro)*, перспективними для використання в біоенергетиці є *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. *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)*, який не цвіте в умовах України, варто використовувати як декоративну культуру.

Визначення маси надземних органів різних видів міскантусу показало, що найбільша надземна маса – 2950,6 г – була у *M. giganteus (ex vitro)*. У

M. giganteus (in vitro) надземна маса на 1431,8 г або в 2,1 раза поступалася *M. giganteus (ex vitro)*. Надземна маса *M. sinensis (in vitro)* становила 1335,6 г, що на 1615 г або в 2,2 раза менше ніж у *M. giganteus (in vitro)*, однак лише на 183,2 г або на 21 % менше ніж у *M. giganteus (in vitro)*. Надземна маса *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)* становила 412,4 г, що в 3,2 раза менше ніж у *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) була надземна маса у *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)* (таблиця 5.3).

Таблиця 5.3

Продуктивність представників роду *Miscanthus*, розмнужених в умовах *in vitro* та *ex vitro* (ризомами) (2016 рік)

Показники	Вид міскантусу				
	<i>M. sacchariflorus (2n) (отримані in vitro)</i>	<i>M. sacchariflorus (4n) (отримані in vitro)</i>	<i>M. sinensis (отримані in vitro)</i>	<i>M. giganteus (отримані in vitro)</i>	<i>M. giganteus (ex vitro)</i>
Надземна маса рослини, г	50,1±5,4	412,7±5,4	1335,6±7,4	1518,8±14,6	2950,6±17,4
Маса стебла, г	26,0±0,2	255,6±3,1	896,8±6,4	982,8±12,9	2030,5±16,9
Маса листків, г	24,1±0,3	133,1±3,2	456,0±5,1	491,6±6,0	870,0±14,7
Маса суцвіття (волоть), г	-	24,6±0,9	32,8±1,2	45,4±2,2	50,1±2,5

Щодо маси стебел, то найбільші її показники (2030,5 г) мали також рослини *M. giganteus (ex vitro)*. Маса стебел у *M. giganteus (in vitro)* була в 2,1 раза менше ніж у *M. giganteus (ex vitro)*, а у *M. sinensis (in vitro)* – у 2,3 раза менше ніж у *M. giganteus (ex vitro)* та лише на 10 % менше ніж у *M. giganteus (in vitro)*. Маса стебел у *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)*, яка становила 255,6 г, в 7,9 раза поступалася масі стебел *M. giganteus (ex vitro)*, у 3,8 раза – *M. giganteus (in vitro)*

та в 3,5 раза – *M. sinensis (in vitro)*. Найменшою (лише 26 г) була маса стебел у рослин *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)*, яка в 10 разів поступалася масі *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)*.

Маса листків, як і маса стебел, була найбільшою у *M. giganteus (ex vitro)*. Вона становила 870 г, що на 133 % менше від маси стебел цієї рослини. Маса листків у *M. giganteus (in vitro)* становила 491,6 г, що на 96,7 % менше за масу стебел та на 77 % менше від маси листків у *M. giganteus (ex vitro)*. Маса листків *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)* була меншою ніж у *M. sinensis (in vitro)*, *M. giganteus (in vitro)*, *M. giganteus (ex vitro)* в 3,4; 3,7; 6,5 раза відповідно. Найменшою серед досліджуваних видів міскантусу була маса листків у *M. sacchariflorus (2n) (in vitro)*, яка дорівнювала 24,1 г та була майже на рівні з масою стебел цієї рослини. Щодо маси волоті, то найбільші значення, як і маси стебел і листків, були в *M. giganteus (ex vitro)* – 50,1 г. Маса волоті *M. giganteus (in vitro)* була на 9,4 %, *M. sinensis (in vitro)* на 34,5 %, *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)* на 50,9 % меншою за масу волоті *M. giganteus (ex vitro)*.

Щодо частки кожного надземного органу рослин у загальній продуктивності досліджуваних видів міскантусу, найбільший внесок припадає на масу стебел. Так, маса стебел у *M. giganteus (ex vitro)* становила 68,8 % від загальної надземної маси, *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 % від загальної надземної маси, *M. giganteus (in 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 припадала 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 %.

Отже, за всіма морфологічними показниками та надземною масою переважали рослини *M. giganteus (ex vitro)*. Рослини *M. giganteus (in vitro)* на третій рік вирощування поступалися *M. giganteus (ex vitro)* за основними морфологічними показниками: висотою – на 23,9 %, кількістю стебел – на

123,3 %, довжиною листків – на 17,1 %, кількістю листків – на 5,1 %, площею листків – на 14,6 % та продуктивністю надземної маси – на 106,6 %. Рослини *M. sinensis (in vitro)* поступалися *M. giganteus (ex vitro)* за висотою – на 41,2 %, довжиною листків – на 43,8 %, кількістю листків на рослині – на 33,1 %, площею листків – на 62,6 % та продуктивністю надземної маси – на 126,4 %. Але *M. sinensis (in vitro)* перевищував *M. giganteus (ex vitro)* за кількістю стебел в кущі на 72 %, а *M. giganteus (in vitro)* – в 3,4 раза, тому виходить на продуктивність, яка тільки на 9,1 % нижча ніж у *M. giganteus (in vitro)*, завдяки чому може конкурувати з продуктивністю останнього. З огляду на такі цінні біологічні властивості *M. sinensis (in vitro)*, його можна так само, як і *M. giganteus (in vitro)*, рекомендувати до використання в біоенергетиці.

Результати оцінювання стану рослин після перезимівлі в перші три роки вегетації за сприятливих зимових умов та наявності снігового покриву показали 100 % збереження рослин всіх досліджуваних видів міскантусу. Водночас за критичних умов довкілля (морози більш як 15 °C без снігового покриву) на четвертий рік вегетації майже всі рослини *M. sacchariflorus (2n)* вимерзли, а у *M. sacchariflorus (4n)*, *M. sinensis (in vitro)*, *M. giganteus (in vitro)* та *M. giganteus (ex vitro)* практично 100 % рослин збереглися. Варто зазначити, що у *M. sacchariflorus (2n)* у сприятливі роки стеблуння та цвітіння не спостерігали, та навіть ті декілька рослин, що лишились після жорстких умов перезимівлі, в наступні роки не утворили жодного стебла та квітконосного пагона. На рис. 5.5–5.7 зображено рослини *M. sacchariflorus (4n)*, *M. sinensis (in vitro)*, *M. giganteus (in vitro)* у фазі цвітіння.



Рис. 5.5. Рослини *M. giganteus* четвертого року вегетації, отримані в умовах *in vitro* (I декада жовтня 2017 року)



Рис. 5.6. Рослини *M. sinensis* четвертого року вегетації, отримані в умовах *in vitro* (I декада вересня 2017 року)



Рис. 5.7. Рослини *M. sacchariflorus* ($4n$) четвертого року вегетації, отримані в умовах *in vitro* (I декада серпня 2017 року)

5.2. Морфометричні та цитологічні дослідження генеративних органів міскантусу

За результатами морфометричних досліджень, довжина волоті *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* перебувала в межах 18,4–20 см, а у *M. giganteus* – 20–23 см. Ширина волоті у *M. sinensis* становила 8–9 см, *M. sacchariflorus* ($4n$) – 9–11 см, *M. giganteus* – 14–16 см (рис. 5.8).



Рис. 5.8. 1) Волоть *M. sacchariflorus* ($4n$) (*in vitro*); 2) волоть *M. sinensis* (*in vitro*);
3) волоть *M. giganteus* (*in vitro*); 4) волоть *M. giganteus* (*ex vitro*)

Квітка міскантусу містить як тичинки, так і маточку (рис. 5.9).

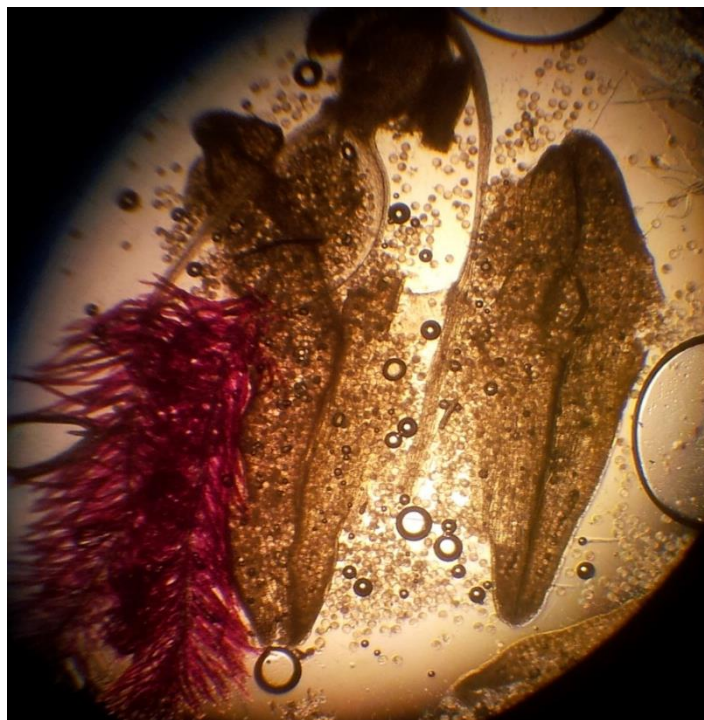


Рис. 5.9. Пиляки та маточка *M. sacchariflorus* ($4n$)
(загальний вигляд)

Тичинки мають довгі тичинкові нитки та продовгуваті пиляки (рис. 5.10–5.12). Пиляки *M. sinensis* та *M. giganteus* мають світло-жовте, жовте чи жовто-рожеве забарвлення. Забарвлення тканини пиляків міскантусу цукроквіткового переважно жовто-рожеве. Тканини пиляків складаються з видовжених клітин (рис. 5.13), довжина яких у *M. sacchariflorus* ($4n$) становить приблизно 70–100 мкм.

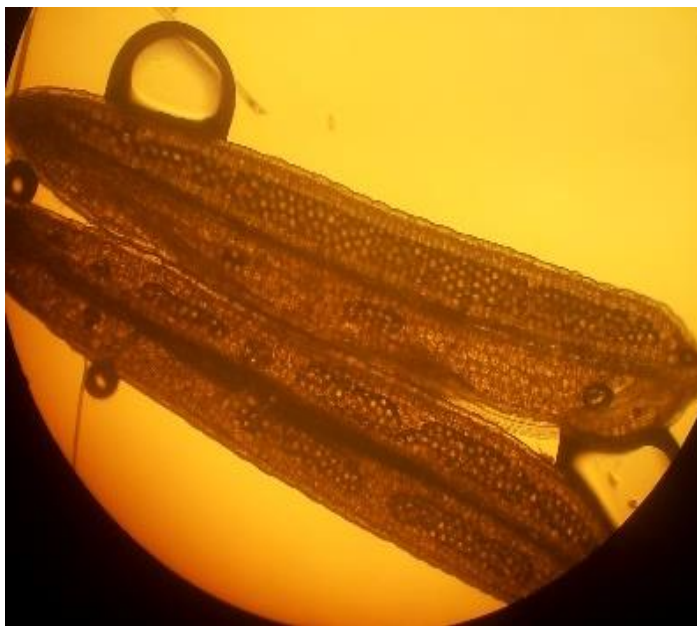


Рис. 5.10. Пиляки *M. sacchariflorus* ($4n$)

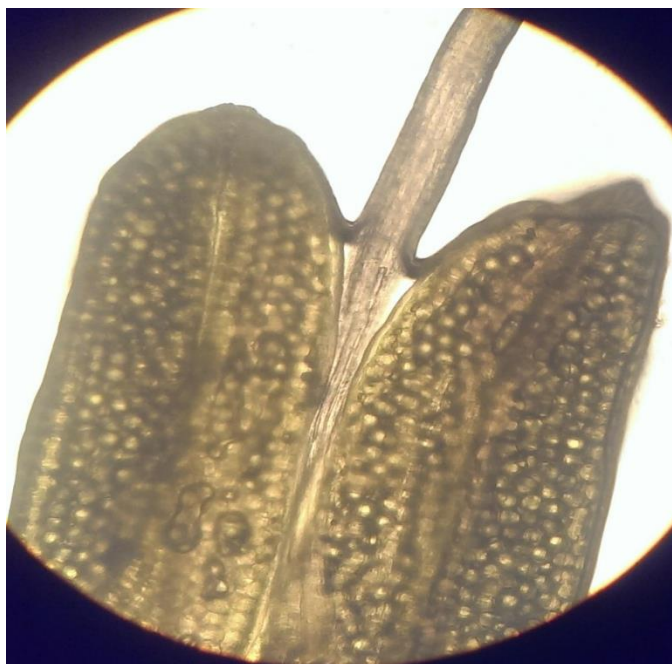


Рис. 5.11. Тканини пиляка *M. sacchariflorus* ($4n$)

з пилком та пиляковою ниткою



Рис. 5.12. Тканини пиляка *M. sacchariflorus* (4n)
міскантусу з пилком (середня частина)

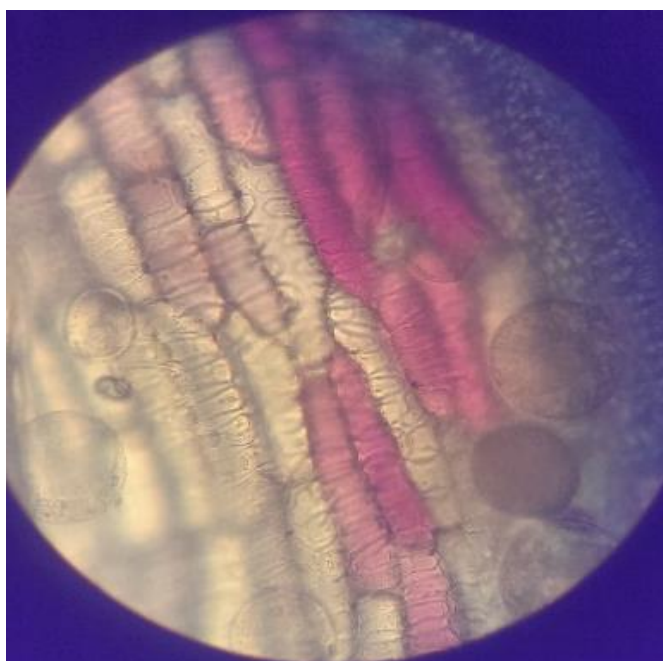


Рис. 5.13. Тканини пиляка *M. sacchariflorus* (4n)

Маточка у міскантусів складається із зав'язі з двох стовпчиків, які несуть довгі розгалужені перисті приймочки. Довжина приймочок – 2,0–2,8 мм. У *M. sinensis* та *M. giganteus* забарвлення варіюється від білого до рожевого кольору, тоді як у *M. sacchariflorus* (4n) приймочки мають яскраво-рожеве забарвлення (рис. 5.14–5.17).

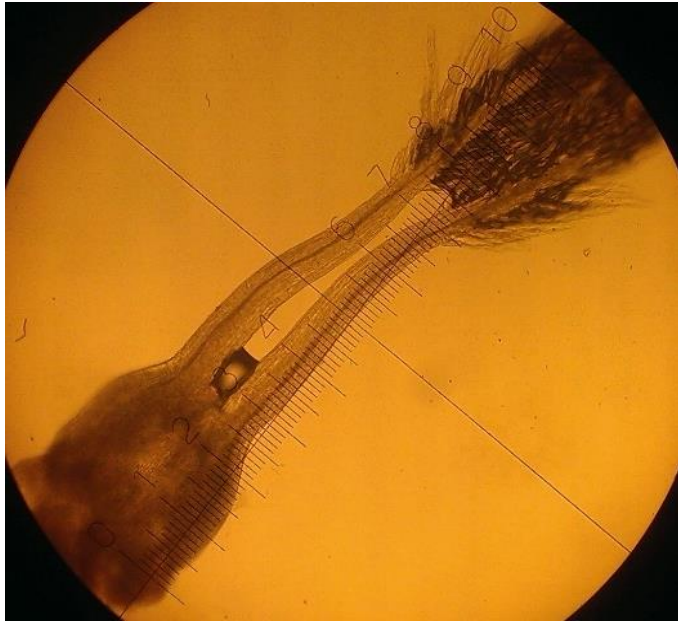


Рис. 5.14. Маточка *M. sacchariflorus*
(загальний вигляд)



Рис. 5.15. Недозріла приймочка маточки *M. giganteus*

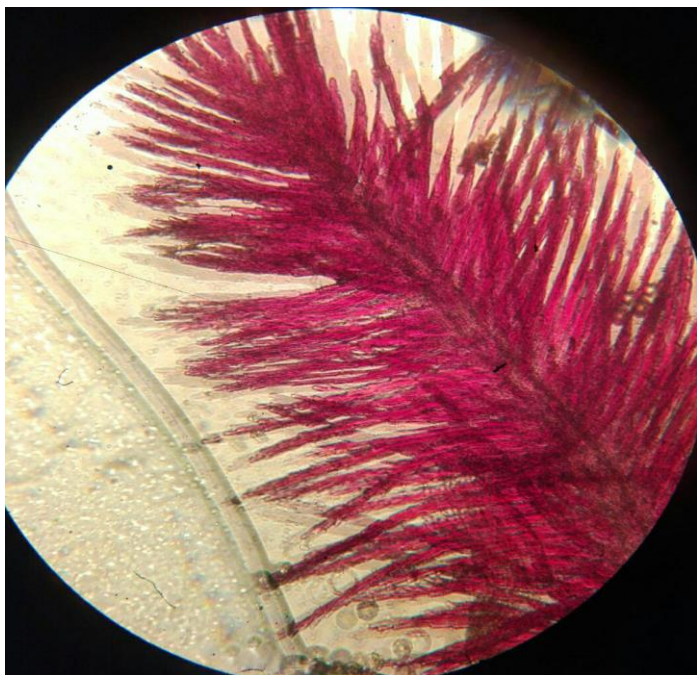


Рис. 5.16. Приймочка маточки *M. sacchariflorus* ($4n$)

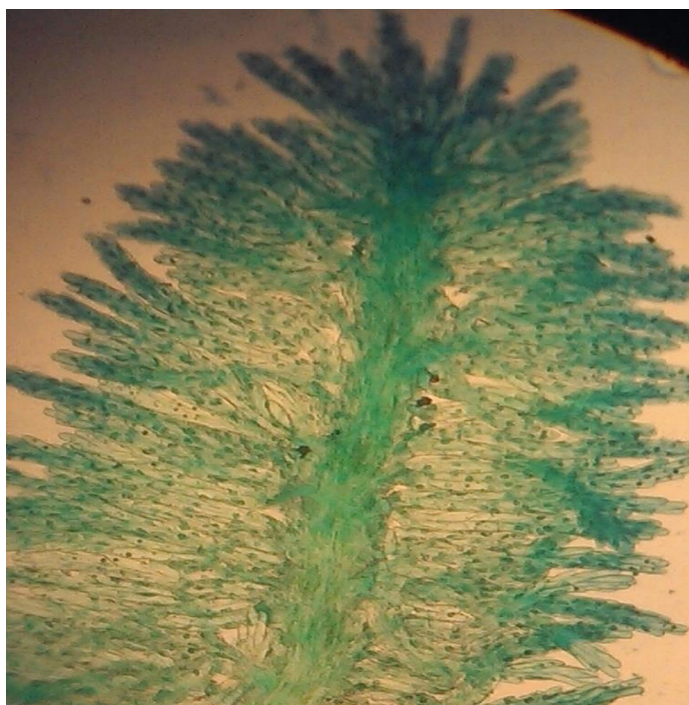


Рис. 5.17. Приймочка маточки *M. giganteus*
(загальний вигляд)

Форма пір'ячок помірно розгалужена. Кількість маленьких відгалужень – 10–15 шт. Розташування – почергове (рис. 5.18–5.20).

Довжина пір'ячок маточки різниться залежно від їх розташування. На кінцівці – довжина становить 160–200 мкм, в середині та в основі – 270–300 мкм, ширина – 20–30 мкм.

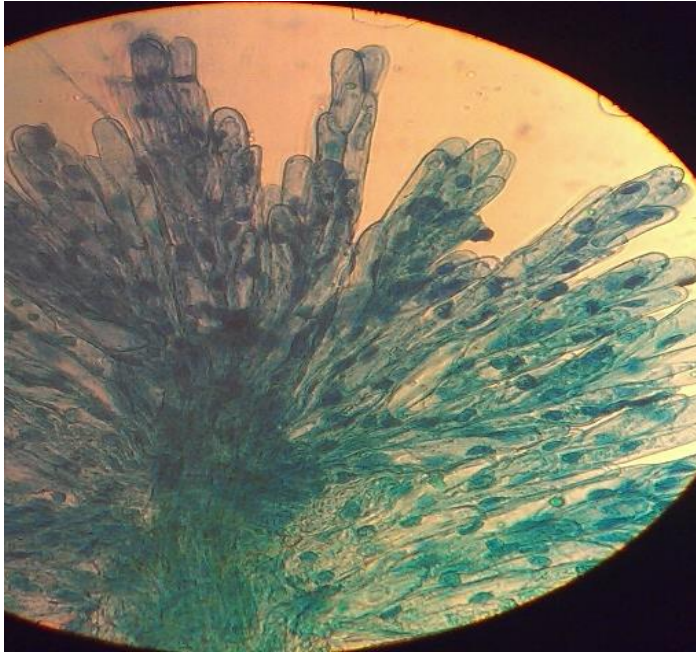


Рис. 5.18. Верхівка приймочки маточки *M. giganteus*



Рис. 5.19. Пір'ячко приймочки маточки *M. sacchariflorus* ($4n$)



Рис. 5.20. Запилення *M. sinensis*

За даними цитологічного аналізу встановлено, що пилок різних видів міскантусу різняться за якісними та кількісними ознаками (розмірами, гомо- чи гетерогенністю).

Так, пилок *M. sacchariflorus* ($4n$) та *M. sinensis* характеризується округлими формами, вирівняністю та майже однорідністю розмірів – 43–48 мкм у діаметрі (рис. 5.21, 5.22), тоді як пилок *M. giganteus* більш гетерогенний, варіюється за розміром, діаметр – 23–45 мкм, але кількість дрібних мікроспор невелика – 5–10 % від їх загальної кількості (рис. 5.23).

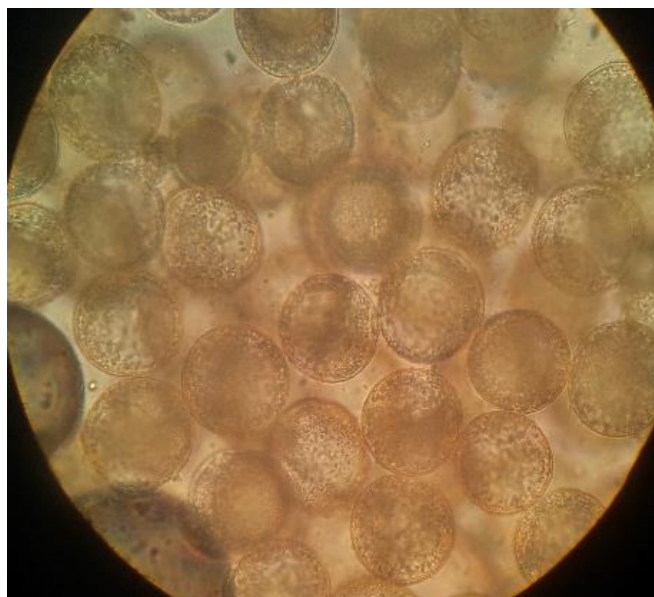


Рис. 5.21. Пилок *M. sinensis*



Рис. 5.22. Пилок *M. sacchariflorus* ($4n$)



Рис. 5.23. Пилок *M. giganteus*

Широкий діапазон розмірів пилку *M. giganteus*, згідно з джерелами літератури, пов'язаний з тим, що пилок має різний рівень плоідності [185] (рис. 5.24).

Пилкове зерно має одну округлу орнаментовану пору з внутрішнім діаметром 2,7–4,0 мкм.

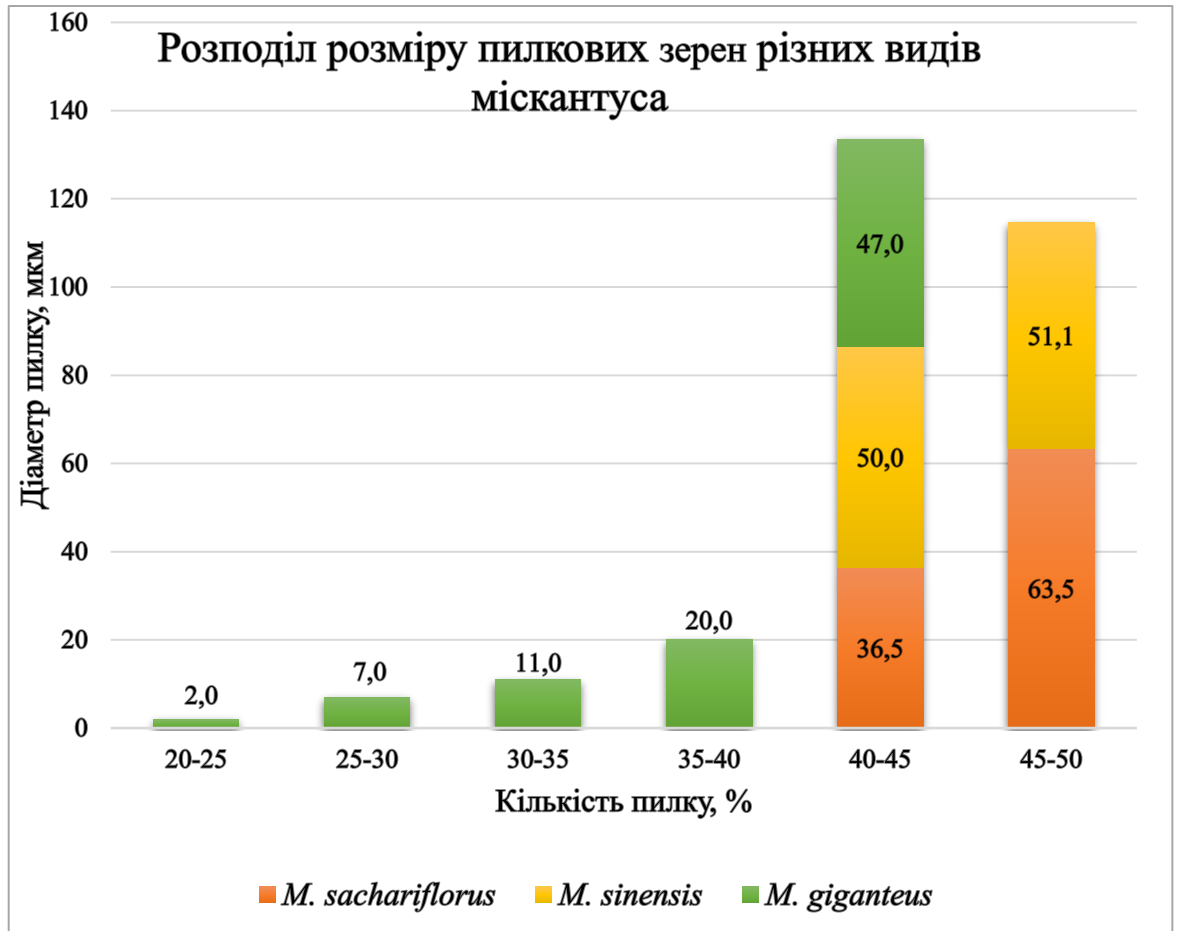


Рис. 5.24. Розміри пилку *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus*, мкм

Морфо–біометричні особливості генеративних органів міскантусу – пилку та приймочки, є важливими біологічними ознаками виду, сорту, селекційного матеріалу. Від якості пилку, його кількості залежить результативність запилення квітки та утворення якісного насіння.

Отримані дані дають змогу оцінити морфометричні параметри генеративних органів трьох видів міскантусу *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus* – розміри та розгалуженість приймочки маточки, розміри та гетерогенність пилку, які слід враховувати в селекції міскантусу.

Дослідження генеративних органів становить значний інтерес не тільки з загальнобіологічних фундаментальних позицій, а й у прикладному аспекті – у практичній селекції такої надважливої енергетичної та технічної культури як міскантус.

5.3. Визначення вмісту сухої речовини, хлорофілу та каротиноїдів у рослинах міскантусу

Уміст сухої речовини в рослині є важливим показником її фотосинтетичної активності. Асиміляція сухої речовини є основним процесом, який триває від появи сходів до відмирання рослин, це відбиток життєдіяльності рослинного організму на кожному етапі його росту і розвитку в конкретних умовах навколишнього середовища, що забезпечує якісні та кількісні показники врожаю. Різниця в показниках накопиченої сухої речовини різних видів і сортів рослин зумовлена низкою чинників, до яких належать передусім морфометричні показники – габітус рослин, площа листкової поверхні, а також ефективність фотосинтезу та раціональне використання вологи. Суха речовина – це рослинна маса, що залишається після висушування або визначення води. Результати обрахунків сухої речовини в різних частинах *M. sacchariflorus* (4n), *M. sinensis*, *M. giganteus* представлено на рис. 5.25.

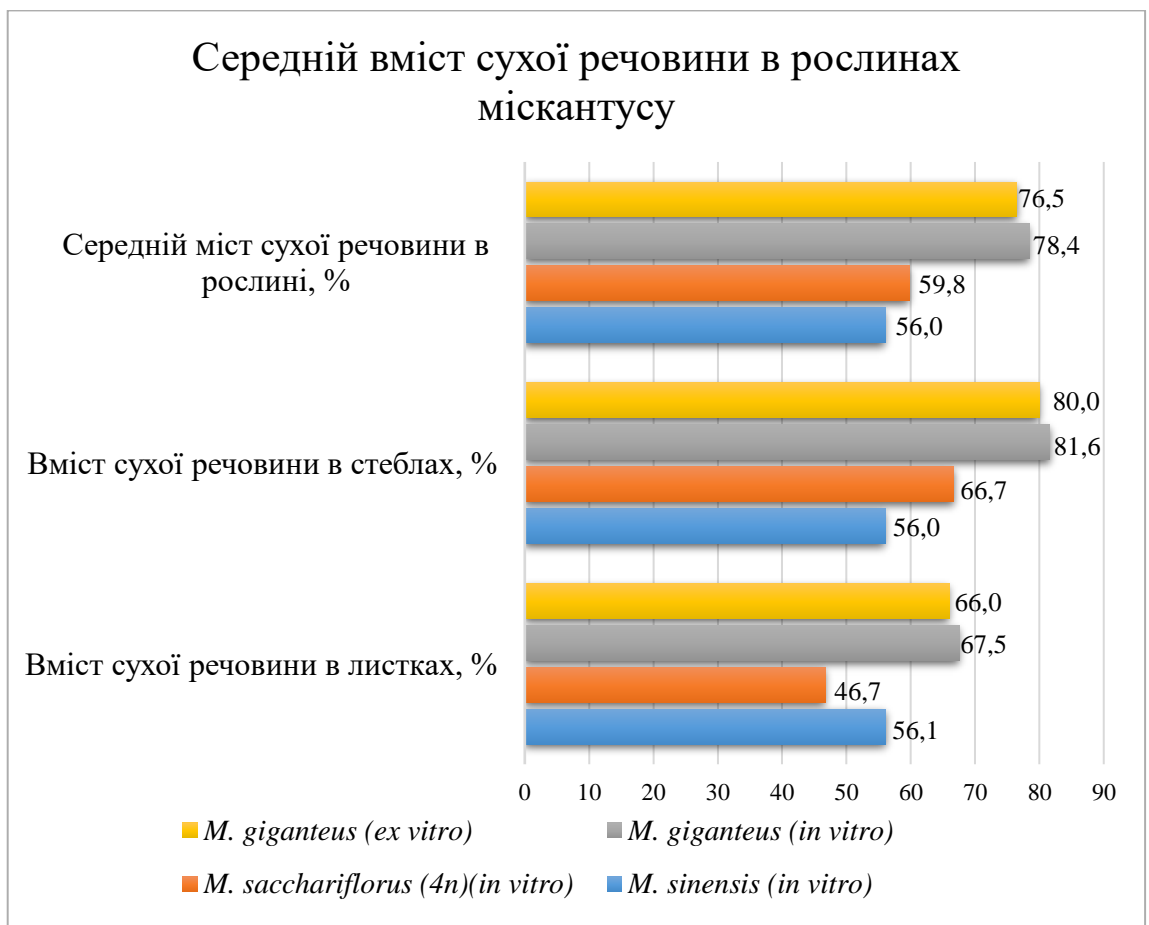


Рис. 5.25. Уміст сухої речовини в рослинах міскантусу

Результати визначення вмісту сухої речовини в надземній масі та окремо у стеблах і листках досліджуваних видів міскантусу показали, що найбільший відсоток сухої речовини містився у надземній масі рослин *M. giganteus (in vitro)*, який становив 78,4 %, майже на тому ж рівні був і відсоток сухої речовини у *M. giganteus (ex vitro)* – 76,5 %, тоді як у надземній масі *M. sinensis (in vitro)* – 56,0 %, а у *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)* – 59,8 % сухої речовини, що менше на 17,7–22,4 %.

Встановлено, що у стеблах міскантусів містилося більше сухої речовини порівняно з листками. Так, якщо у стеблах *M. giganteus (in vitro)* та *M. giganteus (ex vitro)* містилося 80,0–81,6 % сухої речовини, найвищий відсоток порівняно з *M. sinensis (in vitro)* (56,0 %) та *M. sacchariflorus (4n) in vitro* (66,7 %), то в листках *M. giganteus (in vitro)* та *M. giganteus (ex vitro)* містилося 66,0–67,5 % сухої речовини, що менше на 14,0–14,1 %. Така ж тенденція характерна і для *M. sacchariflorus (4n) (in vitro)*, в листках якого містилося 46,7 % сухої речовини (найменший відсоток сухої речовини в листках порівняно з іншими видами), що на 20 % менше ніж у стеблах. У листках *M. sinensis (in vitro)* виявлено майже стільки ж сухої речовини, як і в стеблах.

Значна маса листків, яка становить залежно від виду міскантусу від 30 до 50 % надземної маси рослини, та швидке наростання зеленої маси дають підставу рекомендувати до використання рослини міскантусу не лише як енергетичну, а й як кормову культуру.

Ще одним важливим показником, що характеризує фізіологічні процеси в рослині, є вміст хлорофілу та каротиноїдів в асимілюючих органах. Так, у багатьох дослідках показано, що існує пряма кореляція між кількістю пігменту в листках, інтенсивністю фотосинтезу, ростом і розвитком рослин та їхньою продуктивністю. Вміст хлорофілу в хлоропластах також залежить від виду рослин, етапу онтогенезу, екологічних умов тощо. Водночас значний вплив на біосинтез хлорофілу мають такі фактори, як освітлення, температура, мінеральне живлення, обробка рослин фізіологічно активними речовинами, вік листків. Уміст хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів можна визначити в загальному екстракті

пігментів без попереднього їх розділення. Визначення точної концентрації хлорофілів *a* та *b* у розчині без їх розділення складне, оскільки спектри обох хлорофілів перекривають один одного, й неможливо знайти дві довжини хвилі, в яких поглинання повністю зумовлювалося б лише одним пігментом. Однак існуючі відміни в спектрах поглинання хлорофілів *a* та *b* дають змогу вибрати точки, де поглинання одного пігменту суттєво перевищує поглинання іншого.

Результати визначення вмісту хлорофілу *a*, хлорофілу *b* та каротиноїдів на основі 96 % спиртового розчину та ацетону представлено в таблиці 5.4.

Таблиця 5.4

Вміст хлорофілу *a*, хлорофілу *b* та каротиноїдів у листках рослин міскантусів з використанням різних екстрагуючих речовин

Екстрагуюча речовина – 96 % спирт						
Види міскантусу	<i>Aa+b</i> , мг/г сирії речовини	<i>Aa</i> , мг/г сирії речовини	<i>Ab</i> , мг/г сирії речовини	<i>Aa/Ab</i>		
<i>M. sacchariflorus</i>	1,78 ± 0,10	1,13 ± 0,07	0,65 ± 0,04	1,77 ± 0,09		
<i>M. sinensis</i>	1,84 ± 0,12	1,11 ± 0,07	0,73 ± 0,05	1,53 ± 0,10		
<i>M. giganteus</i>	1,40 ± 0,09	0,95 ± 0,06	0,44 ± 0,03	2,13 ± 0,14		
Екстрагуюча речовина – ацетон						
Вид	<i>Aa</i> , мг/г сирії речовини	<i>Ab</i> , мг/г сирії речовини	<i>A a+b</i> , мг/г сирії речовини	<i>A кар</i> , мг/г сирії речовини	<i>Aa/Ab</i> , мг/г сирії речовини	<i>A a+ b/A кар</i> .
<i>M. giganteus</i>	2,23 ± 0,15	0,98 ± 0,06	3,21 ± 0,22	1,44 ± 0,09	2,25 ± 0,15	2,23 ± 0,15

Згідно з отриманими даними, найвищий уміст суми хлорофілів *a* та *b* визначено в листках *M. sinensis* – 1,84 мг/г сирії речовини. Дещо менше – 1,78 мг/г – в листках *M. sacchariflorus*. Найменший уміст суми хлорофілів *a* та *b* – 1,40 мг/г – встановлено в листках *M. giganteus*. Це на 21,3–22,2 % менше ніж

у *M. sinensis* та *M. sacchariflorus*. Таке явище, вочевидь, пов'язане з наявністю на листках *M. giganteus* повздовжної безхлорофільної білої смуги, більш значної та чіткіше вираженої, ніж у інших видів міскантусу.

Визначення окремо вмісту хлорофілу *a* та *b* в листках міскантусів показало, що значних відмінностей у вмісті хлорофілу *a* не було. Так, якщо у листках *M. sacchariflorus* кількість хлорофілу *a* становила 1,13 мг/г, у *M. sinensis* – 1,11 мг/г, то у *M. giganteus* – 0,95 мг/г сирової речовини, що на 15,9–14,4 % менше ніж у *M. sacchariflorus* та *M. giganteus* відповідно. А от показники вмісту хлорофілу *b* у *M. giganteus* суттєво відрізнялися від тих, що визначено в листках *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*. Різниця становила 32,5 %, порівнюючи зі вмістом хлорофілу *b* в листках *M. sacchariflorus*, та 39,7 %, порівнюючи з *M. sinensis*. Найбільший показник співвідношення хлорофілу *a/b* було визначено у *M. giganteus* – 2,13, тоді як у *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* показник співвідношення хлорофілу *a/b* був значно менше – 1,77 та 1,53 відповідно. Вважають, що хлорофіл *a* – синьо-зелений, а хлорофіл *b* – жовто-зелений. Високий показник співвідношення хлорофілу *a/b* вказує на те, що фотосистема I, яка активна в довгохвильовій частині спектру, функціонує більш ефективно ніж фотосистема II, що активується світлом з довжиною менше ніж 680 нм.

У дослідах з використанням як екстрагенту ацетону, де вилучався процес розтирання рослинного матеріалу в ступці, та подальшою фільтрацією розчину, що призводило до втрат пігментів, екстракцію проводили способом витримання в холодильнику подрібненого листя міскантусу у щільно закритих пробкою колбах із розчинником до повного знебарвлення рослинного матеріалу. Такий спосіб екстракції дав змогу отримати значно більшу, майже удвічі, кількість хлорофілів і визначити вміст каротиноїдів у листках *M. giganteus*, якій дорівнював 1,44 мг/г сирової речовини. Тому менш енергозатратним і більш достовірним методом виділення хлорофілу та каротиноїдів виявився метод з використанням ацетону.

На сучасному етапі розвитку біоенергетики та впровадження в агровиробництво таких нових культур, як міскантус, ретельне вивчення його

структури, фізіолого-біохімічних властивостей дало змогу визначити ще й такий напрям застосування міскантусу, як виробництво хлорофілу для потреб медицини. Як відомо, хлорофіл має багато корисних для організму людини властивостей. Це потужний антиоксидант, який зв'язує і виводить токсини, сприяє швидшому загоєнню ран, покращує травлення. Отримують хлорофіл із різних рослин, зокрема, з люцерни.

За нашими підрахунками з листків однієї рослини *M. sacchariflorus* ($4n$) (*in vitro*) можна отримати 287,7 мг хлорофілу $a+b$, з рослини *M. sinensis* (*in vitro*) – 839,0 мг та з *M. giganteus* (*ex vitro*) – 1218,0 мг, а з гектара – 4,9; 16,8 та 24,4 кг відповідно хлорофілу $a+b$ при застосуванні як екстрагенту етилового спирту. З листків однієї рослини *M. giganteus* (*ex vitro*) при екстракції ацетоном можна отримати 2792,7 мг хлорофілу $a+b$, а з гектара – 45,9 кг (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Розрахунковий вміст фотосинтетичних пігментів у листках представників роду *Miscanthus*, розмножених в умовах *in vitro* та *ex vitro* (ризомами)

Показники	Вид міскантусу		
	<i>M. sacchariflorus</i> ($4n$) <i>in vitro</i>	<i>M. sinensis in vitro</i>	<i>M. giganteus ex vitro</i>
Маса листків однієї рослини, г	133,1±3,2	456,0±5,1	870,0±14,7
Кількість рослин на одному га, тис. шт.	20	20	20
Маса листків з одного га, кг	2662	9120	17400
Екстракція спиртом			
Кількість хлорофілу $a+b$ в листках однієї рослини, мг	287,7	839,0	1218,0
Кількість хлорофілу $a+b$ в листках, кг/га	4,8	16,8	24,4
Екстракція ацетоном			
Кількість хлорофілу $a+b$ в листках однієї рослини, мг	-	-	2792,7
Кількість хлорофілу $a+b$ в листках, кг/га	-	-	45,9

Отже, згідно з проведеними розрахунками, найбільший вміст суми хлорофілів *a* та *b* у листках досліджуваних видів міскантусу виявлено у *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* – 1,78–1,84 мг/г сирової речовини, що на 21,3–22,2 % більше ніж у *M. giganteus*. За вмістом хлорофілу *a* значних відмінностей у досліджуваних видів міскантусу зафіксовано не було, тоді як показники вмісту хлорофілу *b* у *M. giganteus* суттєво відрізнялися від визначених у листках *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*. Різниця становила 32,5 % порівняно зі вмістом хлорофілу *b* в листках *M. sacchariflorus* та 39,7 % порівняно з *M. sinensis*. Найбільший показник співвідношення хлорофілу *a/b* було визначено у *M. giganteus* – 2,13, що вказує на високу активність фотосистеми I, яка активна в довгохвильовій частині спектру, водночас фотосистема II активується світлом з довжиною менше ніж 680 нм, тоді як у *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* цей показник був значно менше – 1,77.

Також вдосконалено метод виділення хлорофілу та каротиноїдів з використанням ацетону, який є менш енергозатратним та більш ефективним. Впровадження методу дало змогу отримати значно більшу (майже в 2 рази) кількість хлорофілів та визначити вміст каротиноїдів у листках *M. giganteus*. Проведено розрахунки зі вмісту хлорофілу *a+b* у листках рослин міскантусу із застосуванням різних екстрагуючих речовин на гектар площі і визначено, що з листків рослин *M. sacchariflorus* (*4n*) (*in vitro*) можна отримати 4,8 кг/га хлорофілу, *M. sinensis* (*in vitro*) – 16,8 кг/га, *M. giganteus* (*ex vitro*) – 24,4 кг/га при застосуванні як екстрагенту етилового спирту. При екстракції ацетоном з листків рослини *M. giganteus* (*ex vitro*) можна отримати 45,9 кг/га хлорофілу *a+b*. Отже, можна рекомендувати вирощування рослин міскантусу також і для застосування їх у виробництві хлорофілу для потреб медицини, враховуючи ретельне вивчення їхньої структури та фізіолого-біохімічних властивостей.

РОЗДІЛ 6

ВИЗНАЧЕННЯ ОДНОРІДНОСТІ КАРІОТИПУ НОВОСТВОРЕНИХ ЛІНІЙ ТА РЕГУЛЯЦІЯ ЦВІТІННЯ МІСКАНТУСУ

6.1. Протокова цитофлуориметрія калюсних ліній *M. sacchariflorus*, *M. sinensis* та розмноженого *in vitro* *M. giganteus*

Відомо, що при культивуванні рослин *in vitro*, особливо при регенерації рослин із калюсів, присутнє явище соматоклонильної мінливості, тобто отримання нових різноманітних форм рослин. Соматоклони за певними ознаками відрізняються від вихідного селекційного матеріалу або існують як генетично стабільні форми [186, 187]. Тобто соматоклонам притаманна генетична варіабельність чи стабільність. Найбільш раціональний спосіб підвищення продуктивності рослин – це селекція морфологічно різноманітних форм і сортів у межах певного генетично стабільного екотипу рослин, без змін їхнього каріотипу (плоїдності).

Для визначення плоїдності рослин застосовують декілька методів, до яких належить метод визначення плоїдності за цитоморфологічною характеристикою – пар замикаючих клітин продихів – визначення кількості хлоропластів. Це непрямий метод, який застосовують для визначення плоїдності у цукрових буряків (*Beta vulgaris* L.). Встановлено, що у тетраплоїдів та триплоїдів у замикаючих клітинах продихів міститься більша кількість хлоропластів (відповідно 22–28 та 17–22 шт.) ніж у диплоїдів (12–16 шт.) та гаплоїдів (9–11 шт.) [188, 189].

Точним, але складним є метод визначення плоїдності способом підрахунку хромосом у метафазних пластинках меристематичної зони коренів із застосуванням мікроскопу (прямий метод) [144].

Відомо про спосіб визначення ядерної ДНК у регенерантів рису (*Oryza sativa* L.), отриманих в культурі пиляків *in vitro* способом протокової цитометрії [190].

Протокова цитометрія (цитофлуориметрія) – це метод аналізу елементів дисперсійної фази за сигналами світлорозсіювання та флуоресценції, який дає

змогу різносторонньо аналізувати різні популяції клітин, а також кожну клітину окремо. Протокова цитометрія дозволяє визначити генотип рослин вже на стадії декількох тисяч клітин або паростка. Цей метод, який було розроблено ще в середині ХХ сторіччя, сьогодні є невід'ємною частиною світових селекційних програм.

До переваг методу протокової цитометрії належать швидкість аналізу, аналіз великої кількості клітин (декілька тисяч клітин у зразку), кількісне вимірювання інтенсивності флуоресценції, отримання даних для кожної окремої клітини, якісна візуалізація даних тощо.

Метод протокової цитометрії було застосовано для оцінювання створених калюсних ліній *M. sacchariflorus* (2n), *M. sacchariflorus* (4n), *M. sinensis* та *M. giganteus*, розмноженого *in vitro* з погляду генетичної однорідності каріотипу.

У дослідженнях використовували рослини калюсних ліній *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* (2n), *M. sacchariflorus* (4n), рослини *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* (4n) та *M. giganteus* (3n), отримані безпосередньо з насіння. Для більш швидкого отримання чітких вірогідних результатів визначення плоідності рослин способом протокової цитофлуориметрії використовували цитофлуориметр нового покоління з ширшими можливостями COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytometer COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer SYSTEM II™ Software з лазерним джерелом випромінювання – аргоний іонний лазер із довжиною хвилі 488 нм із чотирма каналами детекції, який широко використовують у медицині [191]. Канали FL1–FL3 реєструють флуоресценцію при збудженні 488 нм лазером: о 530/30 нм, о 585/42 нм, о > 650 нм; 20 FL-детектор (ФЕУ), FL4, реєструє флуоресценцію при збудженні о 681/16 нм з поліпшеною цифровою компенсацією флуоресценції, що дає змогу спростити і автоматизувати проведення цитометричних досліджень. За допомогою цих цитометрів можна виконувати аналіз до 4 флуорохромів одночасно, при використанні одного лазера з повітряним охолодженням. У протоковій цитометрії Beckman Coulter використовують запатентовану цифрову обробку сигналу (DSP), що дає змогу збільшити діапазон лінійності, уникнути

зрушень при посиленні сигналу і виконати колірну компенсацію. Чутливість каналів світорозсіювання дозволяє реєструвати частинки розміром від 0,2 до 40 мкм та встановлювати області аналізу для будь-якої виділеної популяції, завдяки чому ми отримували цитограми, які відображали розподіл ядер клітин зразка відповідно до інтенсивності флуоресценції, сигнали записували в логарифмічному представленні даних флюоресценції (логарифмічна шкала), застосовували два канали детекції – FL2 log та FL4 log. Канали FL1–FL3 реєструють флуоресценцію при збудженні 488 нм лазером: о 530/30 нм, о 585/42 нм, о > 650 нм; 20 FL-детектор (ФЭУ), FL4, реєструє флуоресценцію при збудженні 635 нм лазером: о 661/16 нм, цитограми оцінювали, порівнюючи їх із контрольними зразками, плоїдність яких була відома заздалегідь. Статистичну обробку даних цитофлуориметрії проводили на підставі отриманих вимірювань (3000–5000 клітинних ядер на зразок), застосовуючи програмне забезпечення XL SYSTEM II™.

Із використанням методу цитофлуориметрії проведено ідентифікацію рівня генома залежно від кількісного вмісту ядерної ДНК у інтерфазних ядрах клітин, отриманих з листків різних видів міскантусу, розмножених як в умовах *in vitro*, так і *ex vitro*, якій відповідає певному рівню плоїдності, тобто кількості хромосом.

Відомо, що *M. sinensis* – диплоїд, ядра клітин містять 38 хромосом ($2n=38$), *M. giganteus* – триплоїд ($3n=57$), а *M. sacchariflorus* трапляється як з диплоїдним ($2n=38$), так і тетраплоїдним рівнем генома ($4n=76$) [45]. Як еталон використовували диплоїдні, триплоїдні та тетраплоїдні форми міскантусів, плоїдність яких було попередньо визначено на цитофлуориметрі «Партек».

При детекції ізольованих ядер рослин, отриманих із листків калюсних ліній рослин регенерантів з *in vitro*, було отримано поодинокі одновершинні параболічні цитограми. Сигнали записували в логарифмічному представленні даних флюоресценції (логарифмічна шкала). Застосовували два канали детекції – FL2 log та FL4 log, які характеризувалися різними, але дуже близькими зонами детекції флуоресценції при збудженні 488 нм лазером.

Порівняння позиції піків на цитограмах, отриманих при аналізуванні вмісту ДНК в інтерфазних ядрах *M. sinensis* (еталон) (рис. 6.1, 6.2), та рослин *M. sinensis*, отриманих з калюсних ліній А, Б, С *in vitro*, плоїдність яких була нам не відома, показало їх ідентичність, тобто цитограми мали по одному піку та були розташовані в одній зоні як при застосуванні логарифмічної шкали FL2 log, так і FL4 log (рис. 6.3–6.8).

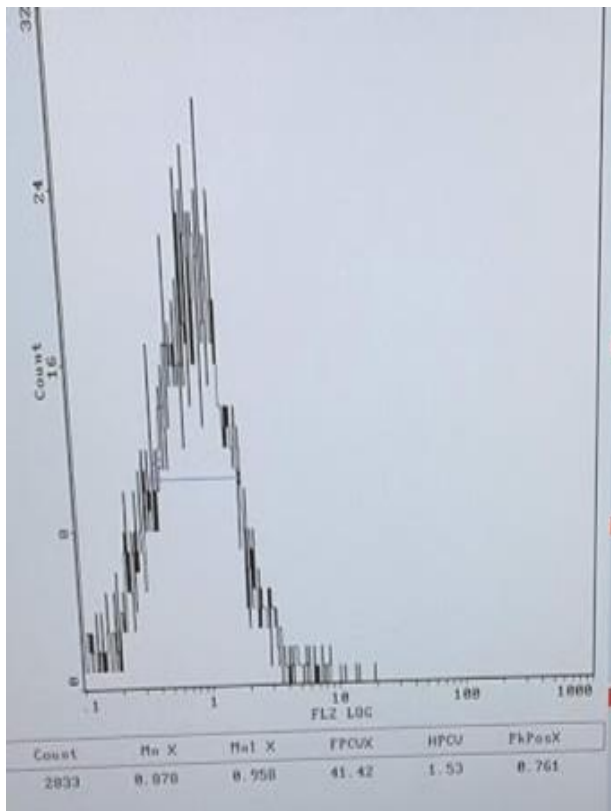


Рис. 6.1. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етидієм ізольованих ядер *M. sinensis* (еталон), логарифмічна шкала FL2 log .

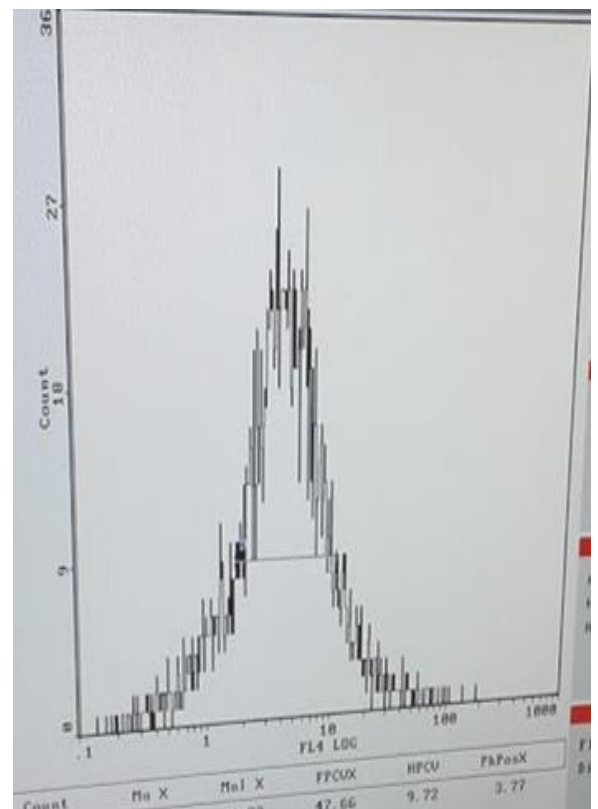


Рис. 6.2. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етидієм ізольованих ядер *M. sinensis* (еталон), логарифмічна шкала FL4 log

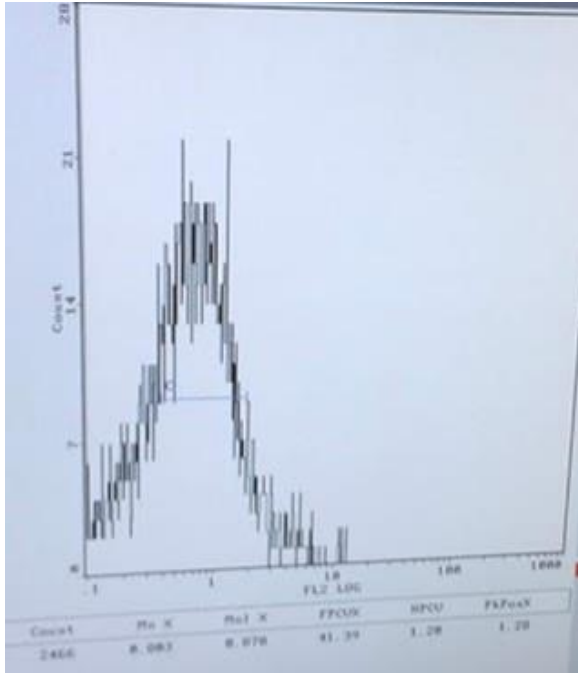


Рис. 6.3. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етидієм ізольованих ядер рослини *M. sinensis*, отриманих з калюсної лінії (А) *in vitro*, логарифмічна шкала FL2 log

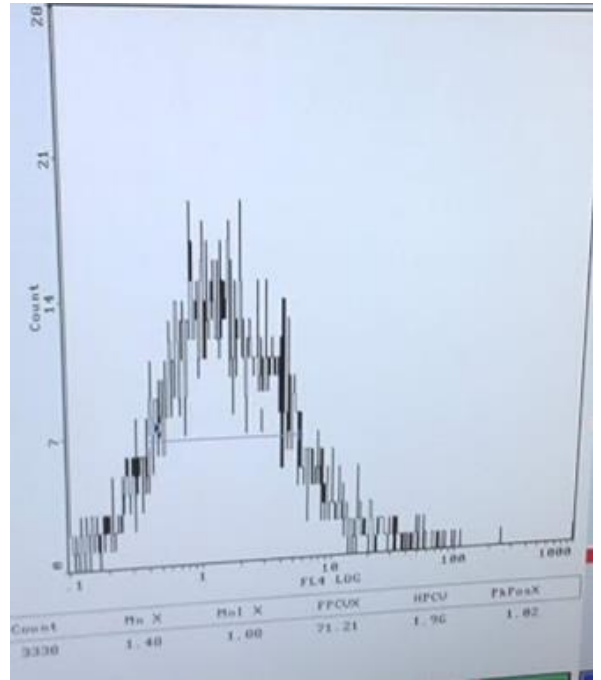


Рис. 6.4. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етидієм ізольованих ядер рослини *M. sinensis*, отриманих з калюсної лінії (А) *in vitro*, логарифмічна шкала FL4 log

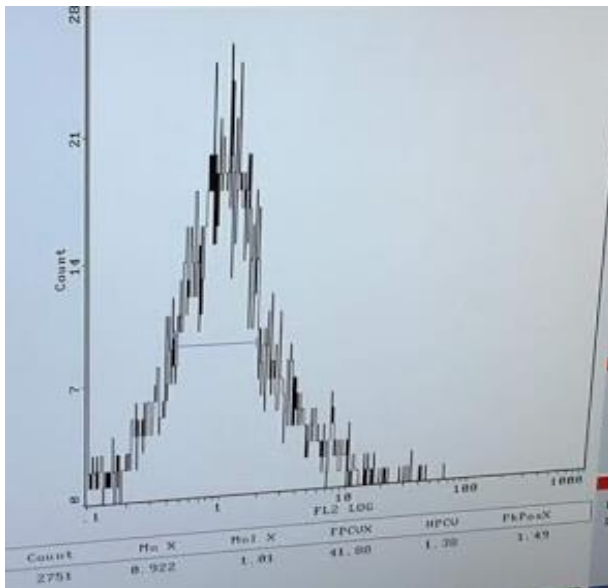


Рис. 6.5. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етидієм ізольованих ядер рослини *M. sinensis*, отриманих з калюсної лінії (Б) *in vitro*, логарифмічна шкала FL2 log

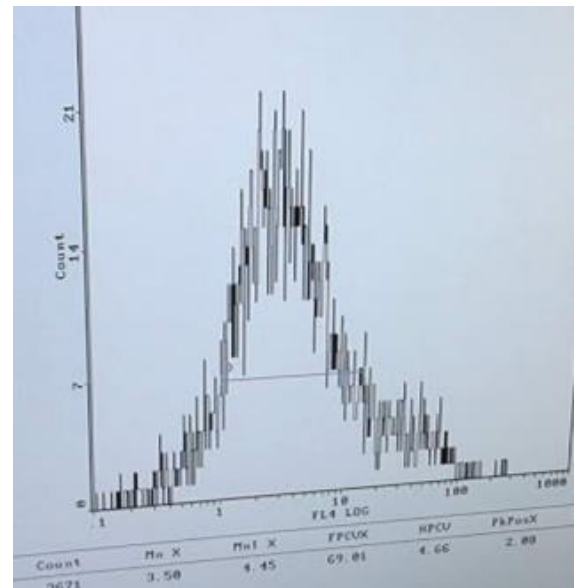


Рис. 6.6. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етидієм ізольованих ядер рослини *M. sinensis*, отриманих з калюсної лінії (Б) *in vitro*, логарифмічна шкала FL4 log

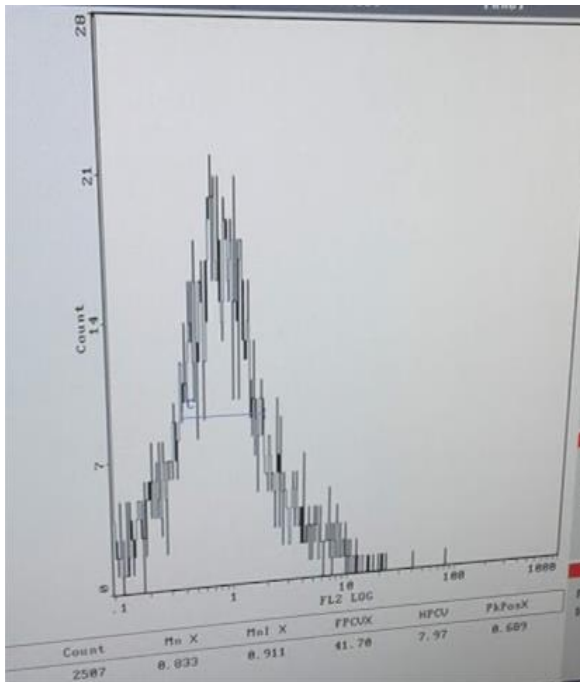


Рис. 6.7. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етидієм ізольованих ядер рослини *M. sinensis*, отриманих з калюсної лінії (С) *in vitro*, логарифмічна шкала FL2 log

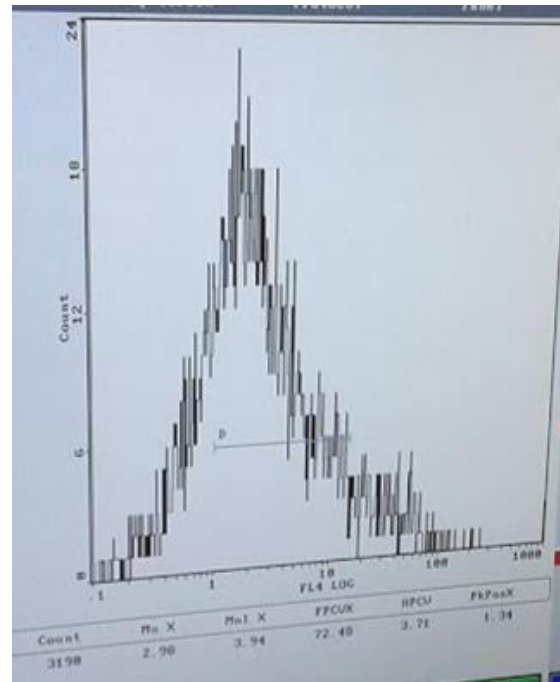


Рис. 6.8. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етидієм ізольованих ядер рослини *M. sinensis*, отриманих з калюсної лінії (С) *in vitro*, логарифмічна шкала FL4 log

Цитограми інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер диплоїдних рослин *M. sacchariflorus* ($2n$), логарифмічна шкала FL2 log та логарифмічна шкала FL4 log (рис. 6.9, 6.10) були досить схожими на цитограми ізольованих ядер диплоїдних рослин *M. sinensis* (еталон) та рослин *M. sinensis*, отриманих з калюсних ліній А, Б, С *in vitro*. Цитограми інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер тетраплоїдних рослин *M. sacchariflorus* ($4n$), логарифмічна шкала FL2 log та логарифмічна шкала FL4 log (рис. 6.11, 6.12) суттєво відрізнялися за формою параболічної кривої з більш видовженою її правою стороною та наявністю невеликих піків на ній.

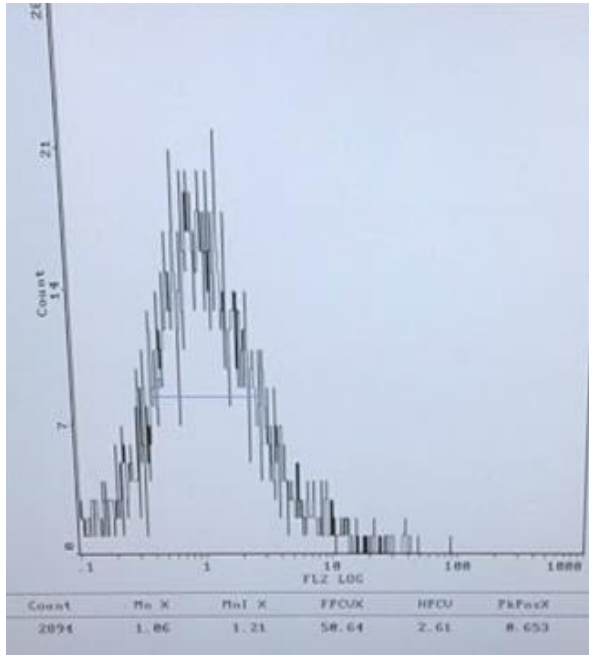


Рис 6.9. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етідієм ізольованих ядер рослин *M. sacchariflorus* ($2n$), логарифмічна шкала FL2 log

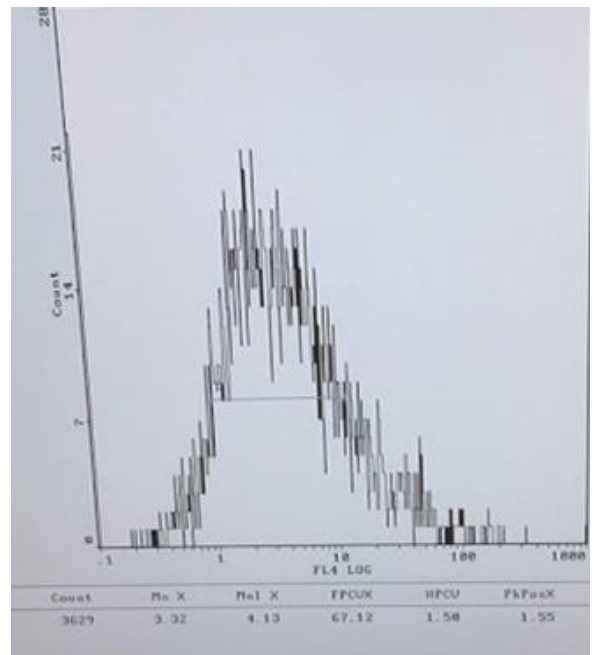


Рис 6.10. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етідієм ізольованих ядер рослин *M. sacchariflorus* ($2n$), логарифмічна шкала FL4 log

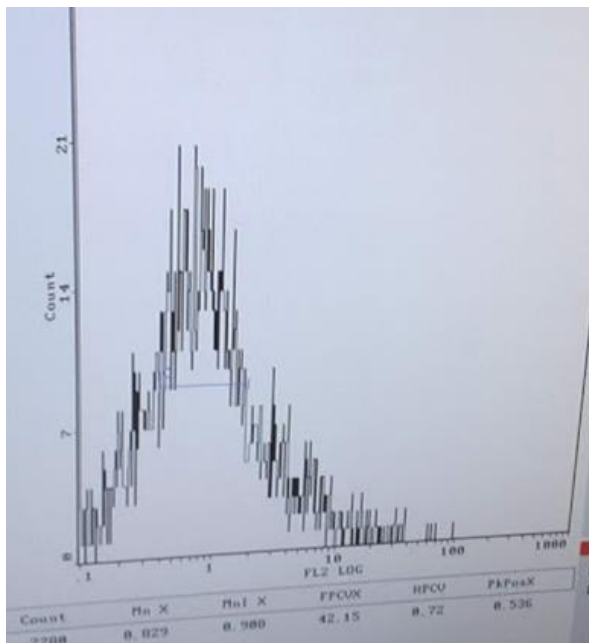


Рис. 6.11. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етідієм ізольованих ядер рослин *M. sacchariflorus* ($4n$), логарифмічна шкала FL2 log

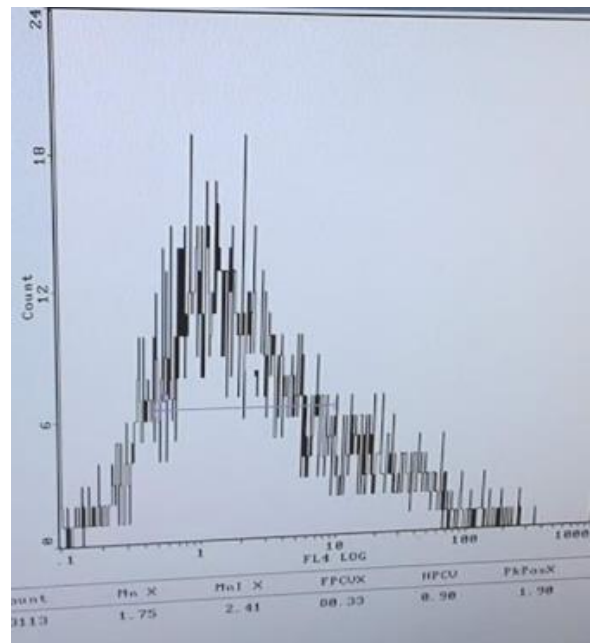


Рис. 6.12. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етідієм ізольованих ядер рослин *M. sacchariflorus* ($4n$), логарифмічна шкала FL4 log

Схожі візуальні відмінності форми параболічної кривої мали цитограми ізольованих ядер рослин *M. giganteus* ($3n$) як логарифмічної шкали FL2 log, так і логарифмічної шкали FL4 log, але з деякими відмінностями у формі правої сторони з невеликими піками на параболічній кривій (рис. 6.13–6.14).

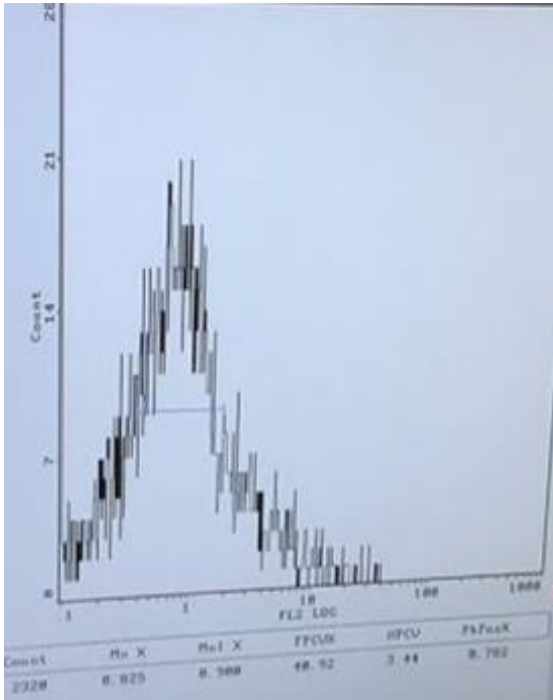


Рис. 6.13. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етідієм ізольованих ядер рослин *M. giganteus* ($3n$) (еталон), логарифмічна шкала FL2 log .

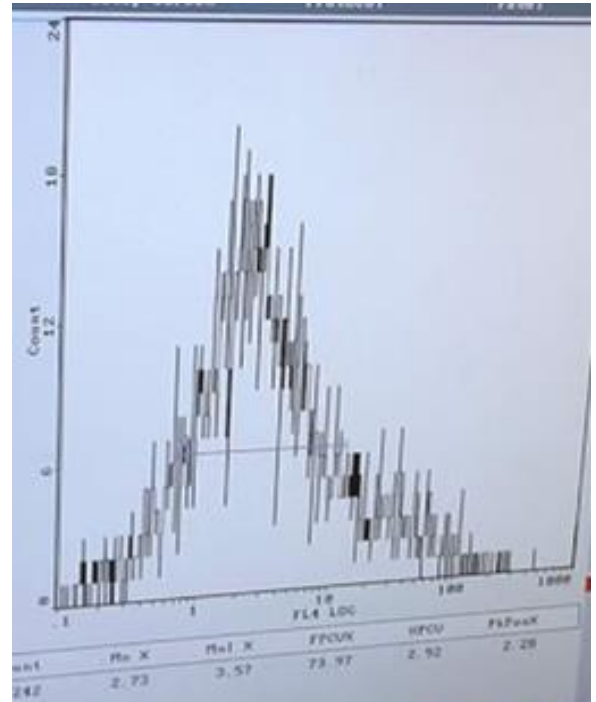


Рис. 6.14. Цитограма інтенсивності флуоресценції забарвлених бромистим етідієм ізольованих ядер рослин *M. giganteus* ($3n$) (еталон), логарифмічна шкала FL4 log .

Отже, проведена дискримінація цитогам вмісту ДНК в інтерфазних ядрах рослин *M. sinensis*, отриманих з калюсних ліній А, Б, С *in vitro*, плоїдність яких була нам не відома, та цитогам інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер рослин *M. sinensis* (еталон), тетраплоїдних рослин *M. sacchariflorus* ($4n$) та *M. giganteus* ($3n$) показала їх абсолютну ідентичність з цитограмами флуоресценції ізольованих ядер рослин міскантусу китайського (еталону) та суттєві відмінності від цитогам інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер тетраплоїдних рослин *M. sacchariflorus* і триплоїдного *M. giganteus* за формою параболічної кривої з більш видовженою її правою стороною та наявністю піків на ній. Визначено, що отримані нами калюсні лінії *M. sinensis* мають диплоїдний

стан генома з кількістю хромосом ($2n=38$), як і рослини *M. sinensis*, розмножені безпосередньо з насіння. Встановлено візуальну ідентичність цитограм інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер диплоїдних рослин *M. sacchariflorus* ($2n$) з цитограмами ізольованих ядер диплоїдних рослин *M. sinensis* (еталон) та рослин *M. sinensis*, отриманих з калюсних ліній А, Б, С *in vitro*, та суттєву відмінність їх від цитограми інтенсивності флуоресценції ізольованих ядер тетраплоїдних рослин *M. sacchariflorus* ($4n$) за формою параболічної кривої.

6.2. Регуляція цвітіння міскантусів *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*

Міскантус – рослина короткого дня. У кліматичних умовах Східної Європи рослини міскантусу цвітуть у вересні – листопаді. Представники деяких видів не утворюють насіння, що створює перешкоди для генеративного розмноження культури та проведення селекційних робіт. *M. sacchariflorus* – тетраплоїд, який може гібридизуватися з диплоїдом *M. sinensis* та продукувати специфічні стерильні триплоїдні гібриди, подібні до *M. giganteus*. З огляду на свою стерильність *M. giganteus* розмножується ризомами. Використання лімітованої герма плазми *M. giganteus* пов'язане з ризиком епіфітотій. Отримання нових гібридів стримується відсутністю синхронності цвітіння компонентів гібридизації міскантусу цукрокріткового та міскантусу китайського. В умовах Києва *M. sacchariflorus* починає цвісти у третій декаді липня, тоді як *M. sinensis* – у третій декаді серпня.

Саме тому нами була поставлена задача розробити спосіб синхронізації цвітіння *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* при створенні симпатричних популяцій цих видів міскантусу в умовах відкритого ґрунту для отримання гібридного насіння.

Для розробки методу синхронізації цвітіння рослин *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* було залучено по 5 рослин кожного виду. Вегетуючі рослини *M. sinensis* один або два рази обробляли 0,0001–0,0005 % водним розчином 6–

БАП в останню декаду липня, що стимулює їх цвітіння, яке починається на 1–1,5 тижні раніше, ніж у рослин-еталонів (рис.6.15).



Рис.6.15. Рослини *M. sinensis* після обробки регулятором росту (злів) та без його застосування (справа)

Ризоми *M. sacchariflorus* викопували восени (наприкінці вересня – початку жовтня), а не навесні і одразу ж висаджували біля рослин *M. sinensis*, з якими на наступний рік проводили дослідження по синхронізації цвітіння. Цей метод затримує початок цвітіння *M. sacchariflorus* на 2–3 тижні на наступний рік, порівняно з рослинами–еталонами (табл.6.1). Застосування таких способів регулювання цвітіння *M. sinensis* і *M. sacchariflorus* забезпечує синхронне цвітіння цих батьківських компонентів гібридизації у першій–другій декаді серпня на наступний рік

Таблиця 6.1

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, \pm доба:		
	Вихід у трубку	Поява волоті	Цвітіння
<i>M. sinensis</i>	17.08 \pm 6	23.08 \pm 5	31.08 \pm 4
<i>M. sacchariflorus</i>	06.07 \pm 5	22.7 \pm 4	30.07 \pm 5
Вид міскантусу	Фази генеративного розвитку батьківських компонентів гібридизації за використання методу синхронізації цвітіння, \pm доба:		
	Вихід у трубку	Поява волоті	Цвітіння
<i>M. sinensis</i>	7.08 \pm 5	11.08 \pm 5	19.08 \pm 5
<i>M. sacchariflorus</i>	26.07 \pm 4	08.08 \pm 4	17.08 \pm 3

Результати проведених досліджень дають змогу встановити, що у рослин *M. sinensis*, залучених до процесу синхронізації цвітіння, фаза виходу в трубку, поява волоті та цвітіння починалась на 10–12 днів раніше, порівняно з рослинами–еталонами. Натомість, рослини *M. sacchariflorus*, висаджені восени, значно пізніше вступили у фазу виходу в трубку, появу волоті та цвітіння, аніж рослини–еталони цього ж виду. Загалом, затримка у цвітінні рослин міскантусу цукроквіткового склала 14–20 днів, що дало змогу синхронізувати цвітіння цих двох видів міскантусу у другій декаді серпня.

Впровадження цього способу значно прискорить 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 здійснюється зазвичай в європейських країнах та США.

Для досліджень з метою ресинтезу клону подібного до природного триплоїдного гібрида – *M. giganteus*, що розмножується лише вегетативно, було створено симпатричні популяції *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* з регульованим

цвітінням компонентів, які в майбутньому дадуть змогу отримати гібридне насіння та створити новий високопродуктивний селекційний матеріал міскантусу для потреб біоенергетики (рис. 6.16)



Рис. 6.16. Симпатрична популяція *M. sinensis* (ліворуч) та *M. sacchariflorus* (праворуч)

Отже, у результаті проведених досліджень нами було розроблено спосіб синхронізації цвітіння *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*, застосування якого значно прискорить селекційний процес створення нових триплоїдних гібридів міскантусу та сприятиме значній економії ресурсів унаслідок проведення селекції в умовах поля, а не в умовах теплиці, як це здійснюється зазвичай в європейських країнах та США.

Дані, отримані в результаті досліджень з регуляція цвітіння міскантусів китайського та цукроквіткового, було використано для оформлення патенту на винахід.

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 (B_1 – 10 мг/л, B_6 , 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: B_1 – 10 мг/л, B_6 , РР, С по 1 мг/л. Такий склад живильного середовища дає змогу отримувати максимальну кількість клонів що 3 тижні: понад вісім клонів *M. giganteus*, дев'ять – *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 настають 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 починаються 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 куші 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 пилок *M. sacchariflorus (4n)* та *M. sinensis* характеризувався округлими формами та майже однорідністю розмірів – 43–48 мкм у діаметрі, натомість пилок *M. giganteus* був більш гетерогенний, варіювався за розміром (діаметр 23–45 мкм), кількість дрібних мікроспор становила 5–10 % від загальної. Широкий

діапазон розмірів пилку *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 із застосуванням різних екстрагуючих речовин на гектар площі визначено, що у разі застосування 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, показала 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 параболічної

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*. Встановлено, що стимуляція цвітіння *M. sinensis* в рік синхронізації і висаджування 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 прискореного 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 ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Haberl H., Erb K., Krausmann F et al. Quantifying and mapping the human appropriation of net primary production in earth's terrestrial ecosystems. *PNAS*. 2007. Vol. 104, No. 31. P. 12942–12947. doi: 10.1073/pnas.0704243104
2. Honda M. *Monographia Poacearum Japonicarum*. Tokyo, 1930. 484 p.
3. Keng Y. L. The gross morphology of Andropogoneae. *Sinensis*. 1939. Vol. 10. P. 273–343.
4. Adati S., Shiotani I. The cytotaxonomy of the genus *Miscanthus* and its phylogenic status. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Mie University*. 1962. Vol. 25. P. 1–24.
5. Deuter M., Abraham J. Wissenstand in der *Miscanthus*-Zuchtung. *Miscanthus – Anbau und Vermehrung*. Bonn, 2000. P. 8–14.
6. *Miscanthus*. *The Plant List*. URL: [http://www.the plant list.org](http://www.theplantlist.org) (last accessed: 16.05.2019)
7. Griffiths M. *Index of Garden Plants*. Portland, Oregon : Timber Press, 1994. 12–p.
8. Kindersley D. *Encyclopedia of Garden Plants*. London, New York, Stuttgart, Moscow, 1996. 1080 p.
9. Leyneova U. *Travy a kapradiny*. Praga, 2010. 160 p.
10. Hodkinson T. R., Renvoize S. A., Chase M. W. Systematics of *Miscanthus*. *Aspects Appl Biol*. 1997. Vol. 49. P. 189–197.
11. Ruan Stewart J., Toma Y., Fernandez F. G. et al. The ecology and agronomy of *Miscanthus sinensis*, a species important to bioenergy crop development, in its native range in Japan: a review. *GCB Bioenergy*. 2009. Vol. 1. P. 126–153. doi: 10.1111/j.1757-1707.2009.01010.x.
12. Clifton Brown J. C., Chiang Y. C., Hodkinson T. R. *Miscanthus*: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production. *Genetic improvement of bioenergy crops*. 2008. P. 295–2308. doi: 10.1007/978-0-387-70805

13. Sacks E. J., Juvik J. A., Lin Q. et al. The gene pool of *Miscanthus* species and its improvement. *Genomics of the saccharinae*. 2013. Vol. 11. P. 73–101. doi: 10.1007/978-1-4419-5947-8
14. Dwiyantri M. S., Stewart J. R., Yamada T. Germplasm resources of *Miscanthus* and their application in breeding. *Bioenergy feedstocks: Breeding and genetics*. 2013. Vol. 11. P. 49–66. doi: 10.1002/9781118609477.ch4
15. Rayburn A., Crawford J., Rayburn C., Juvik J. Genome size of three *Miscanthus* species. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2009. Vol. 2. P. 184–188. doi: 10.1007/s11105-008-0070-3
16. Li X., Hu D., Luo M. et al. Nuclear DNA content variation of three *Miscanthus* species in China. *Genes & Genomics*. 2013. Vol. 1. P. 13–20. doi: 10.1007/s13258-013-0063-y
17. Moon Y. H., Cha Y. L., Choi Y. H. et al. Diversity in ploidy levels and nuclear DNA amounts in Korean *Miscanthus* species. *Euphytica*. 2013. Vol. 3. P. 317–326. doi: 10.1007/s10681-013-0910-6
18. Gifford J. M., Chae W. B., Swaminathan K. et al. Mapping the genome of *Miscanthus sinensis* for QTL associated with biomass productivity. *GCB Bioenergy*. 2015. Vol. 4. P. 797–810. doi: 10.1111/gcbb.12201
19. Рахметов Д. Б., Каленська С. М., Федорчук М. І. та ін. Методичні рекомендації з оптимізації технології вирощування міскантусу в різних ґрунтово-кліматичних зонах України. Херсон : ВЦ «Колос», 2017. 23 с.
20. Clark L. V., Jin X., Petersen K. K. et al. Population structure of *Miscanthus sacchariflorus* reveals two major polyploidization events, tetraploid mediated unidirectional introgression from diploid *M. sinensis*, and diversity centred around the Yellow Sea. *Annals of Botany*. 2018. Vol. 4. P. 731–748. doi: 10.1093/aob/mcy161
21. Clark L. V., Brummer J. E., Głowacka K. et al. A footprint of past climate change on the diversity and population structure of *Miscanthus sinensis*. *Annals of Botany*. 2014. Vol. 1. P. 97–107. doi: 10.1093/aob/mcu084

22. Clark L. V., Stewart J. R., Nishiwaki A. et al. Genetic structure of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus sacchariflorus* in Japan indicates a gradient of bidirectional but asymmetric introgression. *Journal of Experimental Botany*. 2015. Vol. 14. P. 4213–4225. doi: 10.1093/jxb/eru511
23. Trindade L. M., Dolstra O., Loo E. N. van, Visser R. G. F. Plant breeding and its role in a biobased economy. *The biobased economy*. 2010. Vol. 1. P. 67–83.
24. Dong H., Green S. V., Nishiwaki A. et al. Winter hardiness of *Miscanthus* (I): Overwintering ability and yield of new *Miscanthus x giganteus* genotypes in Illinois and Arkansas. *GCB Bioenergy*. 2018. P. 691–705. doi: 10.1111/gcbb.12588
25. Głowacka K., Clark L. V., Adhikari S. et al. Genetic variation in *Miscanthus x giganteus* and the importance of estimating genetic distance thresholds for differentiating clones. *GCB Bioenergy*. 2015. Vol. 2. P. 386–404. doi: 10.1111/gcbb.12166
26. Clark L. V., Dwiyantri M. S., Anzoua K. G. et al. Genome-wide association and genomic prediction for biomass yield in a genetically diverse *Miscanthus sinensis* germplasm panel phenotyped at five locations in Asia and North America. *GCB Bioenergy*. 2015. Vol. 8. P. 988–1007. doi: 10.1111/gcbb.12620
27. Clark L. V., Dzyubenko E., Dzyubenko N. et al. Ecological characteristics and in situ genetic associations for yield-component traits of wild *Miscanthus* from eastern Russia. *Annals of Botany*. 2016. Vol. 118, No. 5. P. 941–955. doi: 10.1093/aob/mcw137
28. Głowacka K., Jeżowski S., Kaczmarek Z. In vitro induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterization of induced polyploids in two *Miscanthus* species. *Industrial Crops and Products*. 2010. Vol. 32, No. 2. P. 88–96. doi: 10.1016/j.indcrop.2010.03.009
29. Uwatoko N., Tamura K., Yamashita H., Gau M. Naturally occurring triploid hybrids between *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* in Southern Japan, show

phenotypic variation in agronomic and morphological traits. *Euphytica*. 2016. Vol. 212, No. 3. P. 355–370. doi: 10.1007/s10681-016-1760-9

30. Nishiwaki A., Sugawara K. The temperature-germination rate response of *Miscanthus x sinensis* seeds. *Grassland Science*. 1997. Vol. 43. P. 62–63.

31. Ma X. F., Jensen E., Alexandrov N. et al. High resolution genetic mapping by genome sequencing reveals genome duplication and tetraploid genetic structure of the diploid *Miscanthus sinensis*. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, No. 3. doi: 10.1371/journal.pone.0033821

32. Clifton-Brown J. C., Lewandowski I. Screening *Miscanthus* genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. *European Journal of Agronomy*. 2002. Vol. 16, No. 2. P. 97–110. doi: 10.1016/S1161-0301(01)00120-4

33. Kalinina O., Nunn C., Sanderson R. et al. Extending *Miscanthus* Cultivation with Novel Germplasm at Six Contrasting Sites. *Front. Plant Sci*. 2017. Vol. 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00563

34. Yan J., Chen W., Luo F. et al. Variability and adaptability of *Miscanthus* species evaluated for energy crop domestication. *GCB Bioenergy*. 2012. Vol. 4, No. 1. P. 49–60. doi: 10.1111/j.1757-1707.2011.01108.x

35. Brosse N., Dufour A, Meng X. et al. *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels, Bioprod., Bioref.* 2012. Vol. 6, No. 5. P. 580–598.

36. Nishiwaki A., Mizuguti A., Kuwabara S. et al. Discovery of natural *Miscanthus* (Poaceae) triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan. *Am. J. Bot.* 2011. Vol. 98, No. 1. P. 154–159. doi: 10.3732/ajb.1000258

37. Лось Л. В., Іванцов В. В., Новіцький Р. Ц. Перспективи енергетичного використання соломи для сільського господарства України. *Вісник ДАЕУ*. 2008. Т 1, № 22. С. 199–204.

38. Zhao H., Wang B., He J., Junpin Y. Genetic Diversity and Population Structure of *Miscanthus sinensis* Germplasm in China. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, No. 10. P. 3–11. doi: 10.1371/journal.pone.0075672
39. Dahl J., Obernberger J. Evaluation of the combustion characteristics of four perennial energy crops *Arundo donax*, *Cynara cardunculus*, *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum*. *Industry and climate protection: 2nd World Conference on biomass for energy* (Rome, Italy, May 10–14, 2004). URL: https://www.researchgate.net/publication/228722637_Evaluation_of_the_combustion_characteristics_of_four_perennial_energy_crops_Arundo_donax_Cynara_cardunculus_Miscanthus_x_giganteus_and_Panicum_virgatum
40. Dondini M., Hastings A., Saiz G. et al. The potential of *Miscanthus* to sequester carbon in soils: comparing field measurements in Carlow, Ireland to model predictions. *Global Change Biology Bioenergy*. 2010. Vol. 1, No. 6. P. 413–425. doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01033.x
41. Christian D. G., Riche A. B., Yates N. E. Growth, yield and mineral content of *Miscanthus giganteus* grown as a biofuel for 14 successive harvests. *Industrial crops and products*. 2008. Vol. 28, No. 3. P. 320–327. doi: 10.1016/j.indcrop.2008.02.009
42. Clifton-Brown J, Schwarz K. U., Hastings A. History of the development of *Miscanthus* as a bioenergy crop: from small beginnings to potential realisation. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*. 2015. Vol. 115, No. 1. P. 45–57. doi: 10.3318/bioe.2015.05
43. Hodkinson T. R., Renvoize S. Nomenclature of *Miscanthus x giganteus* (Poaceae). *Kew Bulletin*. 2001. Vol. 56, No. 3. P. 759–760.
44. Heaton A. E., Dohleman F. G., Miguez A. F. et al. *Miscanthus*: A Promising Biomass Crop. *Advances in Botanical Research*. 2011. Vol. 56. P. 75–137. doi: 10.1016/B978-0-12-381518-7.00003-0
45. Chramiec-Głabik A., Grabowska-Joachimiak A., Sliwiska E. et al. Cytogenetic analysis of *Miscanthus x giganteus* and its parent forms. *Caryologia*. 2012. Vol. 65, No. 3. P. 234–242. doi: 10.1080/00087114.2012.740192

46. Гелетуха Г. Г., Желєзна Т. А., Кучерук П. П., Олійник Є. М. Сучасний стан та перспективи розвитку біоенергетики в Україні. *Біоенергетична асоціація України*. URL: <http://www.uabio.org/img/files/docs/position-paper-uabio-9-ua.pdf> (дата звернення 26.09.2019).
47. Лось Л. В, Зінченко В. О., Жайвороновський В. Р. Вирощування і газифікація біопалив – ефективний шлях вирішення енергетичних і екологічних проблем на прикладі міскантусу гігантеусу. *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету*. 2011. Т 2, № 29. С. 46–58.
48. Kaiser C. M., Clark L. V., Juvik J. A. et al. Characterizing a *Miscanthus* germplasm collection for yield, yield components, and genotype x environment interactions. *Crop Science*. 2015. Vol. 55, No. 5. P. 1978–1994. doi: 10.2135/cropsci2014.12.0808
49. Huisman W. Logistics of harvest of *Miscanthus sinensis Giganteus*. *Agris Search*. 1994. Vol. 1. P. 361–379.
50. Clifton-Brown J., Lewandowski I., Andersson B. et al. Performance of 15 *Miscanthus* genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal*. 2001. Vol. 93, No. 5. P. 1013–1019. doi: 10.2134/agronj2001.9351013x
51. Figala J., Vranova V., Rejsek K., Formanek P. Giant miscanthus (*Miscanthus x Giganteus* Greef et Deu.) – A promising plant for soil remediation: A Mini Review. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2015. Vol. 63, No. 6. P. 2241–2246. doi: 10.11118/201563062241
52. Курило В. Л., Ганженко О. М., Гументик М. Я. та ін. Методичні рекомендації з технології вирощування і перероблення міскантусу гігантського. *ІБКіЦБ*. Київ, 2015. С. 9, 41, 47–49.
53. Григора І. М., Якубенко Б. Є., Алейніков І. М. та ін. Ботаніка. Практикум : навч. посіб. Київ, 2006. 340 с.
54. Kaack K., Schwarz Kai-Uwe, Brander P. E. Variation in morphology, anatomy and chemistry of stems of *Miscanthus* genotypes differing in mechanical properties. *Industrial Crops and Products*. 2003. Vol. 17, Iss. 2. P. 131–142. doi:10.1016/S0926-6690(02)00093-6

55. Роїк М. В., Сінченко В. М., Іващенко О. О. та ін. Міскантус в Україні. Київ, 2019. 256 с.
56. Григора І. М., Шабарова С. І., Алейніков І. М. Ботаніка. Київ, 2000. 196 с.
57. Hafliger E., Scholz H. Grass Weeds 1. Panicoid grass weeds. Berlin, 1980. 142 p.
58. Недільська У. І., Коруняк О. П. Морфоструктурні і фізіологічні особливості *Miscanthus giganteus*. Abstracts of the 9th International scientific and practical conference «Scientific achievements of modern society» (Liverpool, United Kingdom, April 28–30, 2020). URL: <https://sci-conf.com.ua/ix-mezhdunarodnaya-nauchno-prakticheskaya-konferentsiya-scientific-achievements-of-modern-society-28-30-aprelya-2020-goda-liverpul-velikobritaniya-arhiv/>
59. Доронин В. А., Дрига В. В., Кравченко Ю. А., Доронин В. В. Особливості росту та розвитку міскантусу залежно від якості садивного матеріалу. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2017. № 2. С. 22–25.
60. Сиваш О. О. Акумуляція сонячної енергії: фотосинтез чи штучні системи. *Біотехнологія*. 2012. Т. 5, № 6. С. 27–38.
61. Топ 3 біоенергетичні рослини: користь та показники. *Агробізнес сьогодні*. Київ, 2021. URL: <http://agro-business.com.ua/agrobusiness/item/20962-top3-bioenerhetychni-roslyny-koryst-ta-pokaznyky.html> (дата звернення: 17.11.2021)
62. Lee K. Y., Zhang L., Geung-Joo Lee G. Botanical and germinating characteristics of *Miscanthus* species native to Korea. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2012. Vol. 53. P. 490–496. doi: 10.1007/s13580-012-0137-9
63. Deuter M., Abraham J. Genetic resources of *Miscanthus* and their use in breeding. *Proceedings of the 10th European conference and technology exhibition, «Biomass for energy and industry»* (Wurzburg, Germany, June 8–11, 1998). Wurzburg, 1998. P. 775–777.

64. Clifton-Brown J., Robson P., Sanderson R. et al. Thermal requirements for seed germination in *Miscanthus* compared with Switchgrass (*Panicum virgatum*), Reed Thermal requirements for seed germination canary grass (*Phalaris arundinaceae*), Maize (*Zea mays*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *GCB Bioenergy*. 2011. Vol. 3. P. 375–386. doi: 10.1111/j.1757-1707.2011.01094.x
65. Jensen E., Robson P., Norris J. et al. Flowering induction in the bioenergy grass *Miscanthus x sacchariflorus* is a quantitative short-day response, whilst delayed flowering under long days in creases biomass accumulation. *Journal of Experimental Botany*. 2012. Vol. 64. P. 541–552. doi: 10.1093/jxb/ers346
66. Щербаківа Т. О., Рахметов Д. Б. Морфологічні особливості монокарпичних пагонів видів роду *Miscanthus Anderss.* у зв'язку з інтродукцією в Лісостепу та Поліссі України. *Інтродукція рослин*. 2014. Т. 62, № 2. С. 3–9.
67. Aso T. Studies on the germination of seeds of *Miscanthus sinensis ANDERSS.* *Science reports of the Yokohama National University*. 1976. P. 27–37.
68. Christian E. J. Seed development and germination of *Miscanthus sinensis*: diss...submitted to the graduate faculty in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy. Ames, Iowa, 2012. 75 p.
69. Лутковська С. М., Зеленчук Н. В. Розвиток біоенергетики в Україні – енергетична та економічна безпека в умовах сталого розвитку. *Ефективна економіка*. 2012. № 12. doi: 10.32702/2307-2105-2021.12.2
70. Правдюк Н. Л., Томчук О. В. Формування ринку біоенергетики в Україні та його інформаційно-аналітичне забезпечення. *Аграрний ринок*. 2018. № 5. UPL: <http://repository.vsau.org/getfile.php/19033.pdf>
71. Pyter R., Heaton E., Dohleman F. et al. Agronomic experiences with *Miscanthus x giganteus* in Illinois, USA. *Biofuels: methods and protocols*. 2009. Vol. 581. P. 41–52. doi: 10.1007/978-1-60761-214-8_3
72. Heaton E. A., Clifton-Brown J., Voigt T. B. et al. *Miscanthus* for renewable energy generation: European Union experience and projections for Illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. 2004. Vol. 9, No. 4. P. 433–451. doi: 10.1023/B:MITI.0000038848.94134.be

73. Heaton E. A., Dohleman F. G., Long S. P. Meeting US biofuel goals with less land: The potential of Miscanthus. *Global Change Biology*. 2008. Vol. 14, No. 9. P. 2000–2014. doi: 10.1111/j.1365-2486.2008.01662.x
74. Гументик М. Я., Квак В. М., Замойський О. І. Урожайність біомаси міскантусу. *Біоенергетика*. 2013. № 2. С. 32–35.
75. Зінченко В. О. Міскантус – джерело енергетичної біомаси. *Новини Агротехніки*. 2008. Т. 63, № 3. С. 40–41.
76. Рахметов Д. Б. Генетичні ресурси фітоенергетичних інтродуцентів в Україні. *Інтродукція рослин*. 2007. № 2. С. 3–9.
77. Рахметов Д. Б. Теоретичні та прикладні аспекти інтродукції рослин в Україні. Київ, 2011. 398 с.
78. Acikel H. The use of miscanthus (*Giganteus*) as a plant fiber in concrete production. *Scientific Research and Essays*. 2011. Vol. 6, No. 13. P. 2660–2667. doi: 10.5897/SRE10.1139
79. Arnoult S., Brancourt-Hulmel M. A review on Miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: Genotypic and environmental variability and implications for breeding. *Bio Energy Research*. 2015. Vol. 8, No. 2. P. 502–526. doi: 10.1007/s12155-014-9524-7
80. Dong H., Liu S., Clark L. V. et al. Genetic mapping of biomass yield in three interconnected Miscanthus populations. *GCB Bioenergy*. 2017. Vol. 10, No. 3. P. 165–185. doi: 10.1111/gcbb.12472 1144
81. Arundale R. A., Dohleman F. G., Heaton E. A. et al. Yields of *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum* decline with stand age in the Midwestern USA. *GCB Bioenergy*. 2014. Vol. 6, No. 1. P. 1–13. doi: 10.1111/gcbb.12077
82. Желєзна Т. А., Баштовий А. І. Аналіз основних тенденцій розвитку біоенергетики в Європейському Союзі. *Промислова теплотехніка*. 2018. № 3. С. 70–75. doi: 10.31472/ihe.3.2018.09
83. Гелетуґа Г., Крамар В., Епiк О. та iн. Комплексний аналіз українського ринку пелет з біомаси. Київ, 2016. 344 с.

84. Енергетичний баланс України за 2017 рік. URL: http://ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2012/energ/en_bal/arh_2012.htm (дата звернення: 27.12.2018)
85. Johnson M., Tucker N., Barnes S., Kirwan K. Improvement of the impact performance of a starch based biopolymer via the incorporation of *Miscanthus giganteus* fibres. *Industrial Crops and Products*. 2005. Vol. 22, No. 3. P. 175–186. doi: 10.1016/j.indcrop.2004.08.004
86. Hastings A, Clifton-Brown J, Wattenbach M. Et al. Future energy potential of *Miscanthus* in Europe. *GCB Bioenergy*. 2009. Vol. 1, No. 2. P. 180–196. doi: 10.1111/j.1757-1707.2009.01012x
87. Трипольська Г. С., Киристюк С. В. Розвиток біоенергетики України в контексті орієнтирів ЄС. *Ринок: прогноз і кон'юнктура*. 2018. № 3. С. 138–159. doi: 10.15407/eip2018.03.138
88. Державний реєстр сортів рослин придатних до поширення в Україні на 2017 рік (реєстр є чинним на 06.03.2017)/ Мін-во аграр. політики та прод-ва України. Київ, 2017. URL: <https://minagro.gov.ua/file-storage/reyestr-sortiv-roslin> (дата звернення: 18.07.2017)
89. Beale C., Morison J., Long S. Water use efficiency of C4 perennial grasses in a temperate climate. *Agricultural and Forest Meteorology*. 1999. Vol. 1. P. 103–115. doi: 10.1016/S0168-1923(99)00042-8
90. Reinert J., Yeoma M. M. Plant cell and tissue culture. Berlin : Springer-Verlag, 1982. 83 p.
91. Білько Д. І. Методи культури клітин і тканин у біології, біотехнології та медицині. Київ : НаУКМА, 2017. 88 с.
92. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. Киев : Наукова думка, 1992. 232 с.
93. Подгаєцький А., Мацкевич В., Філіпова Л. та ін. Оптимізація технології культивування павловнії (*Paulownia Siebold & Zucc.*) *in vitro*. *Journal of Native and Alien Plant Studies*. 2022. № 18. С. 191–208. doi: 10.37555/2707-3114.18.2022.270617

94. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Київ : Вища освіта, 2003. 520 с.
95. Мацай Н. Ю. Основи біотехнології. Луганськ : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011. 153 с.
96. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Левенко Б. О. Основи біотехнології. Київ : ЗАТ «Ей-Бі-Сі», 2000. 248 с.
97. Manchanda P., Kaur A., Gosal S. S. Somaclonal Variation for Sugarcane Improvement. *Biotechnologies of Crop Improvement*. 2018. Vol. 1. P. 299–326.
98. Efroni I., Mello A., Nawy T. et. al. Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell*. 2016. Vol. 165, Iss. 7. P. 1721–1733. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.046
99. Płażek A., Dubert F. Improvement of medium for *Miscanthus giganteus* callus induction and plant regeneration. *Acta Biol Cracov Ser Bot*. 2010. Vol. 52, No. 1. P. 105–110. doi: 10.2478/v10182-010-0013-9
100. Hussey G. Vegetative propagation of plants by tissue culture. *Plant Cell Culture Technology*. 1989. P. 29–66.
101. Słomka A., Kuta E., Płażek A. et al. Sterility of *Miscanthus giganteus* Results from Hybrid Incompatibility. *Acta Biol Cracov Ser Bot*. 2012. Vol. 54, No. 1. P. 113–120. doi: 10.2478/v10182-012-0011-1
102. Gawel N. J., Robaker C. D., Corley W. L. Propagation of *Miscanthus sinensis* through tissue culture. *Hortscience*. 1987. Vol. 22. P. 1137.
103. Holme I. B., Petersen K. K. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 1996. Vol. 45, No. 1. P. 43–52. doi: 10.1007/BF00043427
104. Lewandowski I. Micropropagation of *Miscanthus x giganteus*. High-Tech and Micropropagation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 1997. Vol. 39. P. 239–255. doi: 10.1007/978-3-662-07774-0_16
105. Lewandowski I., Clifton-Brown J. C., Deuter M. Potential of *Miscanthus* genotypes in Europe: over-wintering and yields. *Alternative crops for sustainable agriculture* (Turku, Finland, June 13–15, 1999). P. 46–52.

106. Lewandowski I., Clifton-Brown J. C., Scurlock J. M., Huisman W. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass Bioenerg.* 2000. Vol. 19, No. 4. P. 209–227. doi: 10.1016/S0961-9534(00)00032-5
107. Clifton-Brown J. C., Lewandowski I., Bangerth F., Jones M. B. Comparative responses to water stress in stay-green, rapid- and slow senescing genotypes of the biomass crop, *Miscanthus*. *New Phytologist*. 2002. Vol. 154, No. 2. P. 335–345. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00381.x
108. Petersen K. K., Hagberg P., Kristiansen K., Forkmann G. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. *Plant breeding*. 2002. Vol. 121, No. 5. P. 445–450. doi: 10.1046/j.1439-0523.2002.738314.x
109. Cichorz S., Goska M., Litwiniec A. *Miscanthus*: Genetic Diversity and Genotype Identification Using ISSR and RAPD Markers. *Molecular Biotechnology*. 2014. Vol. 56. P. 911–924. doi: 10.1007/s12033-014-9770-0
110. Perera D, Barnes D. J., Baldwin B., Reichert N. Mutagenesis of in vitro cultures of *Miscanthus x giganteus* cultivar Freedom and detecting polymorphisms of regenerated plants using ISSR markers. *Industrial Crops and Products*. 2015. Vol. 65. P. 110–116. doi:10.1016/j.indcrop.2014.12.005
111. Guo H., Feng X., Hong Ch. et al. Malate secretion from the root system is an important reason for higher resistance of *Miscanthus sacchariflorus* to cadmium. *Physiologia Plantarum*. 2017. Vol. 159, No. 3. P. 340–353. doi: 10.1111/ppl.12526
112. Clifton-Brown J., Lewandowski I. Overwintering problems of newly established *Miscanthus* plantations can be overcome by identifying genotypes with improved rhizome cold tolerance. *New Phytologist*. 2000. Vol. 148, No. 2. P. 287–294.
113. Kowal N. Shifting cultivation, fire and pine forest in the Central, Luzon, Philippines. *Ecological Monographs*. 1966. Vol. 36, No. 4. P. 389–419. doi: 10.2307/1942374
114. Paterson A. H. Genomics of the Saccharinae. New York: Springer Science, 2013. 566 p.

115. Перебора С. В. Державне стимулювання створення біоенергетичних плантацій: аналіз досвіду країн Європейського Союзу. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2009. № 19. С. 73–77.
116. Anderson E. K., Lee D., Allen D. J., Voigt T. B. Agronomic factors in the establishment of tetraploid seeded *Miscanthus x giganteus*. *GCB Bioenergy*. 2015. Vol. 7. P. 1075–1083. doi: 10.1111/gcbb.12192
117. O'Loughlin J., Mc Donnell K., Finnan J. Establishing *miscanthus x giganteus* crops in Ireland through nodal propagation by harvesting stems in autumn and sowing them immediately into a field. *Biomass and Bioenergy*. 2017. Vol. 107. P. 345–352. doi: 10.1016/j.biombioe.2017.08.010
118. Timplant Biotechnik und Pflanzenvermehrung GmbH. URL: <http://timplant-gmbh.de> (Last accessed: 13.09.2016)
119. Jorgensen U., M. Jens J., Kjeldsen B., Schwarz K. Establishment, Development and Yield Quality of Fifteen *Miscanthus* Genotypes over Three Years in Denmark. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 2003. Vol. 53, No. 4. P. 190–199.
120. Vermerris W. Genetic Improvement of Bioenergy Crops. University of Florida, Gainesville, USA, 2008. 450 p.
121. Lafferty J., Lelley T. Cytogenetic studies of different *Miscanthus* species with potential for agricultural use. *Plant Breeding*. 1994. Vol. 113, No. 3. P. 246–249.
122. Atienza S., Satovic Z., Petersen K., Dolstra O. Preliminary genetic linkage map of *Miscanthus sinensis* with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002. Vol. 105, No. 6/7. P. 946–952.
123. Swaminathan K., Alabady M., Varala K. et. al. Genomic and small RNA sequencing of *Miscanthus giganteus* shows the utility of sorghum as a reference genome sequence for Andropogoneae grasses. *Genome Biology*. 2010. Vol. 11, No. 2. doi: 10.1186/gb-2010-11-2-r12
124. Hitchcock A. S. *Miscanthus*. Cyclopedia of Horticulture. Macmillan, New York, 1901. 598 p.
125. Greenlee J. The encyclopedia of ornamental grasses. Emmaus RA : Rodale Press, 1992. 182 p.

126. Darke R. The color encyclopedia of ornamental grasses. Portland, Oregon : Timber Press, 1999. 325 p.
127. Meyer M. H. Ornamental grasses for cold climates. University of Minnesota Extension Service, 1998. 56 p.
128. Davidson C. G., White D. B., Pellett H. Evaluation of ornamental grasses for the northern Great Plains. *Hort.* 1998. Vol. 16. P. 218–229.
129. Гелетуха Г. Г., Желєзна Т. А., Крамар В. Г., Кучерук П. П. Перспективи розвитку біоенергетики, як інструменту заміщення газу в Україні. *Промышленная теплотехника.* 2015. Т. 37, № 6. С. 56–65. Doi: 10.31472/ihe.6.2015.07
130. Scally L., Hodkinson T., Jones M. B. Origins and taxonomy of *Miscanthus*. *Miscanthus for energy and fibre.* 2001. P. 1–9.
131. Інформаційно-довідкова система «Реєстр сортів» сортів рослин. URL: <http://service.ukragroexpert.com.ua/> (дата звернення: 28.05.2018)
132. Peng L., Gutterson N. Energy Crop and Biotechnology for Biofuel Production. *Journal of Integrative Plant Biology.* 2011. Vol. 53. P. 253–256.
133. Toth S., Pepo P. Nutrient uptake of *Miscanthus in vitro* cultures. *Journal of Natural Fibers.* 2006. Vol. 3, No. 1. P. 17–21. doi: 10.1300/J395v03n01_02
134. Hanke D. Plant cell and tissue culture. *Trends in Cell Biology.* 1991. Vol. 1. P. 36–43.
135. Ганженко О. Біоенергетичні культури варто вирощувати на деградованих ґрунтах. *SuperAgronom.com.* URL: <https://superagronom.com/articles/311-oleksandr-ganjenko-bioenergetichni-kulturi-varto-viroschuvati-na-degradovanih-gruntah> (дата звернення: 04.11.2019).
136. Саджанці міскантусу в контейнерах. *Яскрава клумба* URL: <https://yaskravaklumba.com.ua/ua/shop/category/rasteniia-v-gorshkah/mnogoletniki-v-konteynere/miskantusy-v-konteineraх> (дата звернення: 04.11.2019)
137. Lewandowski I., Kicherer A. Combustion quality of biomass: practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*.

European Journal of Agronomy. 1997. Vol. 6. P. 163–177. doi: 10.1016/s1161-0301(96)02044-8

138. Mangold A., Lewandowski I., Xue S., Kiesel A. ‘Collar propagation’ as an alternative propagation method for rhizomatous miscanthus. *GCB-Bioenergy*. 2017. doi: 10.1111/gcbb.12480

139. Олійник Є., Жовмір М., Дрозд К., Єловікова Т. Енергетичні плантації. Чи можна зменшити залежність України від імпортованих енергоносіїв? *Біоенергоресурси*. 2007. № 3. С. 6–9.

140. Блюм Я. Б., Гелетуха Г. Г., Григорюк И. А. Новітні технології біоенергоконверсії. Київ : Аграр Медіа Груп, 2010. 326 с.

141. Xue S, Kalinina O, Lewandowski I. Present and future options for Miscanthus propagation and establishment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2015. Vol. 49. P. 1233–1246. doi: 10.1016/j.rser.2015.04.168

142. Beale C. V., Long S. P. Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates? *Plant Cell Environ*. 1995. Vol. 18, No. 6. P. 641–650. doi: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00565.x

143. Ганженко О. М., Квак В. М. Вплив глибини садіння ризом міскантусу на їх проростання. *Біоенергетика*. 2013. № 1. С. 36.

144. Держинський М. Е., Вороніна О. К., Скрипник Н. В. та ін. Загальна цитологія. Практикум. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2011. 126 с.

145. Clifton-Brown J., Schwarz K. U., Hastings A. History of the development of miscanthus as a bioenergy crop: from small beginnings to potential realisation. *Biol. Environ. Proc. R. Ir. Acad.* 2015. Vol. 115B, No. 1. P. 45–57. doi: 10.3318/bioe.2015.05

146. Clifton-Brown J., Hastings A., Mos M. et al. Progress in upscaling Miscanthus biomass production for the European bio-economy with seed-based hybrids. *GCB Bioenergy*. 2016. Vol. 9. P. 6–17. doi: 10.1111/gcbb.12357

147. Davey C. J., Jones L. E., Laurence E. J. et al. Radiation capture and conversion efficiencies of *Miscanthus sacchariflorus*, *M. sinensis* and their naturally

occurring hybrid *M. giganteus*. *GCB Bioenergy*. 2017. Vol. 9. P. 385–399. doi: 10.1111/gcbb.12331

148. Jezowski S. Yield traits of six clones of *Miscanthus* in the first 3 years following planting in Poland. *Industrial Crops and Products*. 2008. Vol. 27, No. 1. P. 65–68. doi: 10.1016/j.indcrop.2007.07.013

149. Nie G., Huang L., Zhang X. et al. Marker-trait association for biomass yield of potential biofuel feedstock *Miscanthus sinensis* from southwest China. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 802. doi: 10.3389/fpls.2016.00802

150. Matumura M., Hasegawa T., Saijoh Y. Ecological aspects of *Miscanthus sinensis* var. *condensatus*, *M. sacchariflorus* and their 3x, 4x hybrids, 3 Above ground standing crop and response cutting. *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture, Gifu University*. 1987. Vol. 52. P. 315–324.

151. Jensen E., Farrar K., Thomas-Jones S. et al. Characterization of flowering time diversity in *Miscanthus* species. *GCB Bioenergy*. 2011. Vol. 3. P. 387–400. doi: 10.1111/j.1757-1707.2011.01097.x

152. Dong H., Clark L. V., Jin X. et al. Managing flowering time in *Miscanthus* and sugarcane to facilitate intra- and intergeneric crosses. *PLoS One*. 2021. Vol. 16, No. 1. doi: 10.1371/journal.pone.0240390

153. Спосіб розмноження рослин міскантусу з насіння з низькою схожістю та життєздатністю: пат. 97957 Україна. № у 2014 12015; заявл. 06.11.2014; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 7.

154. Спосіб розмноження в культурі *in vitro* та адаптації міскантусу у відкритому ґрунті: пат. 111300 Україна. № у 2016 03754; заявл. 08.04.2016; опубл. 10.11.2016, Бюл. № 21.

155. Калинин Ф. Л., Сарнацкая Ф. Л., Полищук В. Є. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.

156. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження. Київ: Наук. думка, 2005. 271с.

157. Лапин П. И. Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР. Москва: Глав. ботанического сада АН СССР, 1972. 270 с.

158. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1976. 334 с.
159. Єременко В. С., Куц Ю. В., Мокійчук В. М., Самойліченко О. В. Статистичний аналіз даних вимірювань. Київ: НАУ, 2013. 320 с.
160. Єріна А. М. Статистичне моделювання та прогнозування. Київ: КНЕУ, 2001. 170 с.
161. 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
162. 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.
163. Peng J., Harberd N. P. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Current Opinion in Plant Biology.* 2002. Vol. 5, No. 5. P. 376–381. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00279-0
164. Kosakivska I. V., Voytenko L. V., Vasyuk V. A. et al. Phytohormonal regulation of seed germination. *Fiziol. rast. genet.* 2019. Vol. 51, No. 3. P. 187–206. doi: 10.15407/frg2019.03.187
165. Kai Shu, Xiao-dong Liu, Qi Xie, Zu-hua He. Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant.* 2016. Vol. 9, Iss. 1. P. 34–45. doi: 10.1016/j.molp.2015.08.010
166. Zhao G., Jiang X. Roles of gibberellin and auxin in promoting seed germination and seedling vigor in *Pinus massoniana*. *Forest Science.* Vol. 60, No. 2. 2014. P. 367–373. doi: 10.5849/forsci.12-143
167. Chen S. Y., Kuo S. R. Chien C. Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. *Tree Physiol.* 2008. Vol. 28, No. 9. P. 1431–1439. doi: 10.1093/treephys/28.9.1431

168. Ranjan R., Lewak S. Interaction of Jasmonic Acid with Some Plant-Growth Regulators in the Control of Apple (*Malus domestica*) Embryo Germination. *Plant Growth Regulation*. 1994. Vol. 14, No. 2. P. 159–166.
169. Yamaduchi S., Kamiya Yu. Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals. *Plant Cell Physiol*. 2000. Vol. 43, No. 3. P. 251-257. doi: 10.1093/pcp/41.3.251
170. Gubler F., Kalla R., Roberts J. K., Jacobsen J. V. Gibberellin-Regulated Expression of a Myb Gene in Barley Aleurone Cells: Evidence of Myb Transactivation -Amylase Gene Promoter. *The Plant Cell*. 1995. Vol. 7, No. 11. P. 1879–1891. doi: 10.1105/tpc.7.11.1879
171. Pulok M., Rahman M. M., Haque Nazmul Md. et al. Effect of Growth Regulators on Germination and Vigor of Lentil Seeds. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*. 2015. Vol. 3, No. 1. P. 8–14. doi: 10.18801/JBAR.030115.26
172. Hutton M. J., Van Staden J., Davey E. Cytokinins in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. I. Changes in endogenous levels within the cotyledons. *Annals of Botany*. 1982. Vol. 49, No. 5. P. 685–692. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a086296
173. Kaneko M., Itoh H., Ueguchi-Tanaka M. et al. The rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiol*. 2002. Vol. 128, No. 4. P. 1264–1270. doi: 10.1104/pp.010785
174. Paque S, Weijers D. Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC Biology*. 2016. Vol. 67. URL: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-016-0291-0>
175. Веденичова Н. П., Косаківська І. В. Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. Київ: Наш формат, 2017. 200 с.
176. Barpete S. Preconditioning effect of cytokinins on in vitro multiplication of embryonic node of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) cultivar Gurbuz. *Turkish Journal of Biology*. 2014. Vol. 38, No. 4. P. 485–492. doi: 10.3906/biy-1312-94
177. Strnad M., Peters W., Beck E., Kamínek M. Immunodetection and Identification of N^6 -(*o*-Hydroxybenzylamino) Purine as a Naturally Occurring

Cytokinin in *Populus* × *canadensis* Moench cv *Robusta* Leaves. *Plant Physiology*. 1992. Vol. 99, Iss. 1. P. 74–80. doi: 10.1104/pp.99.1.74

178. Haberer G., Kieber J. J., Notes A. Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone. *Plant Physiology*. 2002. Vol. 128, Iss. 2. P. 354–362. doi: 10.1104/pp.010773

179. Seong E. S., Yoo J. H., Kil H. Y. et.al. Establishment of a Regeneration System by Callus Induction from Explants of *Miscanthus sinensis*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2010 Vol. 53. P. 661–667.

180. Methods and media formulations for large-scale and efficient micropropagation of bio-energy grasses: pat. A01H4/005 USA. № 20120042569; appl. 15.07.2011; public. 23.02.2012. No. 61/415,068

181. Lewandowski I., Scurlock J. M. O., Lindvall E., Christou M. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy*. 2003. Vol. 25, No. 4. P. 335–361. doi: 10.1016/S0961-9534(03)00030-8

182. Anderson E., Arundal R., Maughan M. et al. Growth and agronomy of *Miscanthus* × *giganteus* for biomass production. *Biofuels*. 2011. Vol. 2, No. 1. P. 71–87. doi: 10.4155/bfs.10.80

183. Schwarz K., Murphy D., Schnug E. Studies of the growth and yield of *Miscanthus* × *giganteus* in Germany. *Aspects of Applied Biology*. 1994. Vol. 40. P. 533–540.

184. Long S. P. C4 photosynthesis at low temperature. *Plant Cell Environ*. 1983. Vol. 6, No. 4. P. 345–363. doi: 10.1111/1365-3040.ep11612141

185. Krzewska M., Gołębiowska-Pikania G., Dubas E. Identification of proteins related to microspore embryogenesis responsiveness in anther cultures of winter triticale (×*Triticosecale* Wittm.). *Euphytica*. 2017. Vol. 2013, No. 8. P. 192. doi: 10.1007/s10681-017-1978-1

186. Hussain M., Khan G. S., Shaheen M. S., Ahmad M. Somaclonal variation in regenerated plants of ten wheat genotypes. *Agricultural Research Journal*. 2001. Vol. 39, No. 1. P. 1–7.

187. Бублик О. М., Андрєєв І. О., Спірідонова К. В., Кунах В. А. Сомаклональна мінливість *Ungernia victoris*: необхідність комплексного генетичного аналізу. *Біополімери і клітина*. 2008. Т. 24, № 6. С. 487–493. doi: 10.7124/bs.0007C1
188. Редько В. І., Недяк Т. М., Драгунова О. К., Дубін О. В. Калюсогенез і соматональна мінливість у цукрових буряків. Збірник наукових праць Інституту цукрових буряків УААН. 2000. Т. 2, № 1. С. 138–143. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/znpicb_2000_2\(1\)_23](http://nbuv.gov.ua/UJRN/znpicb_2000_2(1)_23)
189. Zhuzhzhhalova T. P., Kolesnikova E. O., Vasilchenko E. N., Cherkasova N. N. Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii*. 2020. Vol. 24, Iss. 1. P. 40–47. doi: 10.18699/VJ20.593
190. Pyushko M. V., Skaptsov M. V., Romashova M. V. Nuclear DNA content in rice (*Oryza sativa* L.) regenerants derived from anther culture *in vitro*. *Agricultural Biology*. 2018. Vol. 53, Iss. 3, P. 531–538. doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.531eng
191. Тихоненко Т. М. Механізми реалізації дії вітаміну В3 та його похідних за експериментального цукрового діабету : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.04. Київ, 2020. 20 с.

ДОДАТКИ

Додаток А

Температурний режим за роки проведення польових досліджень міскантусу
(за даними метеостанції Київ, 2013–2017 рр.)

Місяць	Середньомісячна температура повітря, °С				Середня багаторічна температура, °С	Відхилення від середньої багаторічної температури, °С			
	2013 р.	2014 р.	2016 р.	2017 р.		2013 р.	2014 р.	2016 р.	2017 р.
I	-4.2	-4.9	-5.6	-4.9	-3.2	-1	-1.7	-2.4	-1.7
II	-0.6	-0.5	+2	-2.7	-2.3	+1.7	+1.8	+4.3	-0.4
III	-1.8	+6.5	+3.9	+6.1	+2.5	-4.3	+4	+1.4	+3.6
IV	+10.5	+10.3	+12.4	+10.4	+10	+0.5	+0.3	+2.4	+0.4
V	+18.8	+16.9	+15.5	+15.2	+15.8	+3	+1.1	-0.3	-0.6
VI	+21.6	+18.2	+20.5	+20	+19.5	+2.1	-1.3	+1	+0.5
VII	+20.8	+22	+22.4	+20.9	+21.3	-0.5	+0.7	+1.1	-0.4
VIII	+19.9	+21.2	+21.1	+22.4	+20.4	-0.5	+0.8	+0.7	+2
IX	+12.4	+15.3	+16.1	+16.4	+14.9	-2.5	+0.4	+1.2	+1.5
X	+9.7	+7.6	+6.5	+8.4	+8.6	+1.1	-1	-2.1	-0.2
XI	+6.4	+1.6	+1.2	+3.3	+2.6	+3.8	-1	-1.4	+0.7
XII	-0.2	-2.1	-1.5	+1.6	-1.8	+1.6	-0.3	+0.3	+3.4
За рік	+9.4	+9.3	+9.5	+9.8	+9	+0.4	+0.3	+0.5	+0.8

Додаток Б

Кількість опадів за роки проведення польових досліджень міскантусу
(за даними метеостанції Київ, 2013–2017 рр.)

Місяць	Середньомісячна кількість опадів, мм				Середня багаторічна кількість опадів, мм	Відхилення від середньої багаторічної кількості опадів, мм			
	2013 р.	2014 р.	2016 р.	2017 р.		2013 р.	2014 р.	2016 р.	2017 р.
I	59.1	39.3	58.1	33.2	37	+22.1	+2.3	+21.1	-3.8
II	77.7	11.2	60.4	36.2	39	+38.7	-27.8	+21.4	-2.8
III	113	15.1	35.1	17.3	40	+73	-24.9	-0.9	-22.7
IV	33.8	28.8	68	25.4	42	-8.2	-13.2	+26	-16.6
V	41.5	172.4	146.2	35	65	-23.5	+107.4	+81.2	-30
VI	90.3	53.7	15.2	28.2	74	+16.3	-20.3	-58.8	-45.8
VII	19.9	76	46.2	62.3	68	-48.1	+8	-21.8	-5.7
VIII	50.9	43.6	27.7	58.1	56	-5.1	-12.4	-28.3	+2.1
IX	201.9	45.5	5.5	43.2	58	+143.9	-12.5	-52.5	-14.8
X	14.2	21.3	103.1	76.8	46	-31.8	-24.7	+57.1	+30.8
XI	84.6	13	48.8	46.3	46	+38.6	-33	+2.8	+0.3
XII	17.4	27.4	49.4	132.8	47	-29.6	-19.6	+2.4	+85.8
За рік	804.3	547.3	663.7	561.6	618	+186.3	-70.7	+45.7	-56.4



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97957** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A01B 79/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 12015	(72) Винахідник(и): Гонтаренко Світлана Миколаївна (UA), Лашук Сніжана Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.11.2014	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ НААН, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03141 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2015, Бюл.№ 7	

(54) СПОСІБ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН МІСКАНТУСУ З НАСІННЯ З НИЗЬКОЮ СХОЖІСТЮ ТА ЖИТТЕЗДАТНІСТЮ

(57) Реферат:

Спосіб розмноження рослин міскантусу з насіння з низькою схожістю та життєздатністю включає використання як експлантів насіння міскантусу, застосування гіпохлориду натрію для його стерилізації насіння, висаджування насіння на тверде живильне середовище з макро-мікроелементами та додаванням регуляторів росту 2,4-Д, НОК у певних дозах, отримання калусів міскантусу в культурі *in vitro*, культивування калусів на регенераційному модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга з 6-БАП, НОК або 2,4Д, сахарозою, та регенерацію мікророслин, причому як експланти використовують насіння з низькою схожістю та життєздатністю, для запобігання ушкодження слабких проростків міскантусу для його стерилізації застосовують гіпохлорид натрію в знижених концентраціях 1-2 % замість 6 %, калуси отримують використовуючи модифіковане середовище Мурасіге-Скуга (1/2 дози макроелементів, мікроелементи у повній дозі) з додаванням амінокислот: глютамінової - 250-500 мг/л, аспарагінової - 30-50 мг/л, тирозину - 1-10 мг/л, аргініну - 2-10 мг/л, гідроксипроліну - 2-4 мг/л, вітамінів: тіаміну, піридоксину, нікотинової та аскорбінової кислот по 1 мг/л, регуляторів росту: 6-БАП - 0,5-0,8 мг/л, АБК - 0,1-0,4 мг/л, 2,4-Д - 1-2,5 мг/л, або 2,4-Д - 1-2,5 мг/л та НОК - 0,1 - 1 мг/л, або 2,4-Д - 1-2,5 мг/л та ІОК - 0,5-1 мг/л, сахарози - 40 г/л, агару - 8 г/л, середовище не містить мальтозу та гелірит, для регенерації мікророслин з калусу використовують модифіковане агаризоване середовище Мурасіге-Скуга, що містить 1/2 дози макроелементів та мікроелементи у повній дозі, до складу якого додатково вводять: тіамін - 0,1-0,5 мг/л, піридоксин - 0,1-0,5 мг/л, нікотинову кислоту - 0,5 мг/л, аскорбінову кислоту - 1 мг/л, глютамінову амінокислоту - 250-300 мг/л, 6-БАП - 1,0-3,0, НУК 0,3-1,0 мг/л, сахарозу - 40 г/л, агар - 8 г/л, на якому через 4 тижні отримують 60-70 мікророслин.

UA 97957 U



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111300** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A01H 4/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2016 03754	(72) Винахідник(и):	Гонтаренко Світлана Миколаївна (UA), Лашук Сніжана Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	08.04.2016	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ НААН, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03141 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.11.2016		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.11.2016, Бюл.№ 21		

(54) СПОСІБ РОЗМНОЖЕННЯ В КУЛЬТУРІ IN VITRO ТА АДАПТАЦІЇ МІСКАНТУСУ У ВІДКРИТОМУ ҐРУНТІ

(57) Реферат:

Спосіб розмноження в культурі in vitro та адаптації міскантусу у відкритому ґрунті включає розмноження пагонів міскантусу в культурі in vitro, висаджування рослин для акліматизації та адаптації в ґрунт, використання пластикових накривок, які видаляють поступово через 1 тиждень після експлантації. Пагони міскантусу розмножують в культурі in vitro на живильному середовищі - модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга, що містить $\frac{1}{2}$ дози макроелементів та повну дозу мікроелементів, вітаміни - піридоксин - 1-10 г/л, тіамін - 1 мг/л, нікотинову кислоту - 1 г/л, аскорбінову кислоту - 1 мг/л, + амінокислоти: глютамінову - 250-300 мг/л, аспарагінову - 30-50 мг/л, тірозин - 2-5 мг/л, аргінін - 2-3 мг/л, гідроксипролін - 1-3 + регулятори росту: БАП - 0,4-0,5 мг/л + ГК - 0,2-0,3 мг/л або БАП - 0,4-0,5 мг/л + аденін - 0,5 мг/л + ГК - 0,2-0,3 мг/л або БАП - 0,4-0,5 мг/л + аденін - 0,5 мг/л + кінетин - 0,5 мг/л + ГК - 0,2-0,3 мг/л з додаванням сахарози - 40 г/л та агару - 8 г/л. Культивують за температури 22-25° С та відносній вологості повітря 50-80 %, фотоперіоді - 16 годин освітлення 2-5 клк, для стимуляції росту ризом in vitro пагони пересаджують на середовище іншого складу, яке відрізняється від попереднього вмістом та співвідношенням регуляторів росту - БАП 0,2-мг/л + ГК - 0,5-1,0 мг/л або БАП - 0,2-мг/л + ГК - 0,5-1,0 мг/л + НОК - 0,1 мг/л.

UA 111300 U



(11) **127650**

(19) **UA** (51) МПК
A01H 1/04 (2006.01)

(21) Номер заявки:	а 2021 03120	(72) Винахідники: Гонтаренко Світлана Миколаївна, UA, Лашук Сніжана Олександрівна, UA, Герасименко Ганна Миколаївна, UA
(22) Дата подання заявки:	07.06.2021	(73) Володілець: ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вуп. Клінічна, 25, м. Київ, 03110, UA
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	16.11.2023	
(41) Дата публікації відомостей про заяву та номер Бюлетеня:	11.01.2023, Бюл. № 2	
(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня:	15.11.2023, Бюл. № 46	

(54) Назва винаходу:

СПОСІБ СИНХРОНІЗАЦІЇ ЦВІТІННЯ КОМПОНЕНТІВ ГІБРИДИЗАЦІЇ МІСКАНТУСУ ЦУКРОКВІТКОВОГО ТА МІСКАНТУСУ КИТАЙСЬКОГО В ПОЛЬОВИХ УМОВАХ

(57) Формула винаходу:

Спосіб синхронізації цвітіння компонентів гібридації міскантусу цукровіткового та міскантусу китайського в польових умовах, що включає затримку цвітіння міскантусу цукровіткового та прискорення цвітіння другого компонента гібридації - міскантусу китайського, які відрізняється тим, що для затримки цвітіння міскантусу цукровіткового разом цього компонента гібридації висаджують восени; наприкінці вересня - початку жовтня, що затримує цвітіння міскантусу цукровіткового на 2-3 тижні на наступний рік, та проводить одно-дворазову обробку вегетуючих рослин міскантусу китайського (другого компонента гібридації) в останню декаду липня 0,0001-0,0005 % β-бензіламінопурином (β-БАП), що стимулює цвітіння міскантусу китайського, яке починається на 1-1,5 тижня раніше, таким чином досягається синхронізація цвітіння міскантусу цукровіткового та міскантусу китайського, які починають цвісти синхронно у першій-другій декадах серпня.

Сторінка 3 із 4

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Статті у міжнародних фахових виданнях:**

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 фахових виданнях 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*. *Plant Var. 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 %).

Тези наукових доповідей:

6. **Лашук С. О.** Худолій Л. В. Характеристика генеративних органів вихідного селекційного матеріалу представників роду *Miscanthus*. *Results of modern 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 цукровіткового. *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. *Матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Новітні технології вирощування сільськогосподарських культур»*, (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 %).

Авторські свідоцтва і патенти:

10. Гонтаренко С. М., Лашук С. О. Патент на корисну модель № 97957 Україна, МПК: А01В 79/00. Спосіб розмноження рослин міскантусу з насіння з низькою схожістю та життєздатністю. Заявник та патентовласник Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН № у 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: А01Н 4/00. Спосіб розмноження в культурі *in vitro* та адаптації міскантусу у відкритому ґрунті. Заявник та патентовласник Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН № у 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 цукровіткового 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 & Deuter ex 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 цукроквіткового (*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 %).