

Метод розмноження, стимуляції росту ризом у культурі *in vitro* та адаптації у відкритому ґрунті представників роду *Miscanthus*

С. М. Гонтаренко, С. О. Лашук*

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03110, Україна,
*e-mail: lashuk_s@ukr.net

Мета. Розробити метод розмноження, стимуляції росту ризом у культурі *in vitro* представників роду *Miscanthus* та адаптації їх у відкритому ґрунті без використання тепличних комплексів для акліматизації та дорощування. **Методи.** Біотехнологічні, математико-статистичні. **Результати.** Розроблено прописи живильних середовищ для інокуляції експлантів, розмноження пагонів, стимуляції росту ризом *in vitro*. Стерильні експланти – насіння, бруньки, видалені з ризом, частини стебла з брунькою висаджували на модифіковані середовища з мінеральною частиною за Мурасіге–Скуга (МС), що містили 0,5–1 дозу макро- та одну дозу мікроелементів, вітаміни (тіамін – 10,0 мг/л, піридоксин – 1,0, нікотинову кислоту – 1,0 та аскорбінову кислоту – 1,0 мг/л) з додаванням амінокислот (глутамінової – 250,0 мг/л, аспарагінової – 30,0, тірозину – 3,0, аргініну – 2,0, гідроксипроліну – 2,0 мг/л), регуляторів росту (ГК – 0,5–1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2, НОК – 0,1 мг/л) у різних варіаціях. Після проростання насіння, появи бруньок і утворення пагонів заввишки 1–2 см їх для розмноження пасирували на середовище іншого складу, яке відрізняється від попереднього вмістом та співвідношенням регуляторів росту, зокрема підвищеним вмістом цитокинінів [6-БАП (0,4–0,5 мг/л), кінетину (0,5 мг/л), аденіну (0,5 мг/л)] у різних варіаціях на фоні 0,2 мг/л ГК. Для стимуляції росту ризом мікроклони пересаджували на середовища з іншим складом та співвідношенням регуляторів росту [6-БАП (0,2–0,3 мг/л) + ГК (0,5–1,0 мг/л) або 6-БАП (0,2–0,3 мг/л) + ГК (0,5–1,0 мг/л) + НОК (0,1 мг/л)], тобто з підвищеним вмістом гіберелінів. Після утворення ризом завдовжки 10–15 см рослини міскантусів висаджували у відкритий ґрунт. Стимуляція утворення та росту в довжину ризом на відповідних живильних середовищах перед висаджуванням рослин *Miscanthus giganteus*, *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* в умови *in vivo* сприяла 100% адаптації та 100% виживанню рослин у зимовий період без застосування тепличних комплексів. **Висновки.** Розроблено метод розмноження міскантусів *in vitro* та адаптації у відкритому ґрунті, який включає стимуляцію росту ризом та сприяє збільшенню їхньої довжини на живильних середовищах, до складу яких введено гіберелін, що гарантовано забезпечує 100% збереження розмножених з культури *in vitro* мікророслин під час адаптації у відкритому ґрунті та акліматизації в зимовий період.

Ключові слова: рослини міскантусу, експланти, ризоми, акліматизація, живильне середовище, *in vitro*, тепличні комплекси.

Вступ

Міскантус гігантський (*Miscanthus giganteus* J.M.Greef & Deuter ex Hodkinson & Renvoize), аллотриплоїдний гібрид міскантусу цукроквіткового (*M. sacchariflorus* (Maxim) Benth) (тетраплоїд) та міскантусу китайського (*M. sinensis* Anderss) (диплоїд) [1, 2], розкрили перед ученими й практиками, які здійснюють пошук біоенергетичних культур для виробництва якісної й дешевої біосировини, величезний біоенергетичний потенціал, що дає змогу конкурувати навіть з такими традиційними видами палива, як вугілля та деревні рослини.

Оскільки *M. giganteus* є триплоїдом і не здатний утворювати насіння, а інші види міскантусу в умовах відкритого ґрунту або формують незначну кількість насінневого матеріалу, або він є практично нежиттєздатним,

міскантус розмножують вегетативним шляхом – поділом кореневищ (ризомами), укоріненням міжвузлів. Посадковий матеріал – ризоми – отримують з дво-трирічних рослин міскантусу – 50–150 ризом з однієї рослини за рік. Потенціал мікроклонального розмноження є на декілька порядків вищим. Тому мікроклональне розмноження в культурі *in vitro* вважають найрезультативнішим [3]. У країнах Європи комерційно найцінніші види рослин розмножують переважно *in vitro* [4].

Метод розмноження міскантусу в культурі *in vitro* вважають дуже продуктивним, але досить проблематичним. Однією з проблем є висока вартість, що робить вирощування рослин міскантусу в культурі *in vitro* нерентабельним. Найзатратнішою є адаптація та дорощування регенерантів у теплицях, тому цей спосіб розмноження є занадто дорогим для вирощування міскантусу в промислових масштабах. Розв'язання проблеми адаптації рослин у полі без застосування тепличних комплексів сприятиме здешевленню рослин міскантусу, тиражованих *in vitro* [5, 6].

Svitlana Gontarenko

<http://orcid.org/0000-0003-0472-720X>

Snizhana Lashuk

<http://orcid.org/0000-0002-9588-7761>

Аналіз сучасних досліджень та літературних джерел свідчить, 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 у комбінації з або без ІОК – 0,2–0,45 мг/л із субкультувацією кожні 5 тижнів для розмноження пагонів, висаджування рослин для акліматизації та дорощування в ґрунтовій суміші в умовах теплиць (температура день/ніч – 20/15 °С, освітлення – 16 годин галогеновими лампами). Для адаптації рослин використовують пластмасові накривки, які після експлантації поступово видаляють [7, 8].

Істотним недоліком цього методу є вимержання рослин міскантусу протягом зимового періоду в разі їх висаджування у відкритий ґрунт на першому році вегетації [9]. З метою запобігання пошкодженню та загибелі рослин у країнах Європи для їх адаптації та дорощування використовують тепличні комплекси, що збільшує вартість розсади та ускладнює технологію вирощування рослин [10, 11].

Мета досліджень – розробити метод розмноження, стимуляції росту ризом у культурі *in vitro* представників роду *Miscanthus* та адаптації їх у відкритому ґрунті без використання тепличних комплексів для акліматизації та дорощування, який дасть змогу зберегти рослини міскантусу на першому році вирощування в зимовий період.

Матеріали та методика досліджень

Дослідження проводили в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України протягом 2012–2014 рр. Стерилізацію та введення в культуру експлантів та насіння здійснювали з використанням загальних схем та методів, розроблених для інших культур, які адаптували для роботи з експлантами рослин міскантусу в культурі *in vitro* [12–14].

Насіння стерилізували 1–2% розчином гіпохлориду натрію протягом 15–25 хв, 3–4 рази промивали з інтервалом 15 хв стерильною дистильованою водою.

Через проблему отримання асептичної культури міскантусу з насіння, частин стебла з бруньками та бруньок, видалених з ризом, внаслідок контамінації матеріалу (особливо ризом) та пошкодження насіння й бруньок у процесі стерилізації, були розроблені режими стерилізації цих експлантів з урахуванням особливостей стерилізуючих агентів і специфіки культури.

Для отримання стерильних бруньок, видалених з ризом *M. giganteus* та *M. sacchariflorus*, їх 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. Стерильні експланти висаджували на живильні середовища.

Добір та оптимізацію складу середовищ для інокуляції бруньок, пророщування насіння, культивування, розмноження мікроклонів, стимуляції росту ризом проводили за такими чинниками, як макро-, мікроелементи, гормони, вуглеводи, амінокислоти, вітаміни та інші домішки. За основу використовували мінеральну частину середовища МС [15].

Стерильне насіння та бруньки висаджували на модифіковані середовища з мінеральною частиною за МС, що містило 0,5–1 дозу макроелементів та одну дозу мікроелементів, вітаміни (тіамін – 10,0 мг/л, піридоксин – 1,0, нікотинову кислоту – 1,0 та аскорбінову кислоту – 1,0 мг/л) з додаванням амінокислот (глютамінової – 250,0 мг/л, аспарагінової – 30,0, тірозину – 3,0, аргініну – 2,0, гідроксипроліну – 2,0 мг/л), регуляторів росту (ГК – 0,5–1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2, НОК – 0,1 мг/л) у 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 заввишки 2–3 см, їх відокремлювали та пересаджували на модифіковані живильні середовища для розмноження, які відрізнялися від попередніх вмістом регуляторів росту – підвищеним вмістом цитокинінів (6-БАП, кінетину, аденіну) на фоні 0,2 мг/л ГК.

Після розмноження пагонів їх відокремлювали та пересаджували на модифіковані живильні середовища, призначені для стимуляції утворення ризом. Ця серія середовищ відрізнялась від попередньої також за вмістом регуляторів росту – 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 завдовжки 10–15 см рослини обережно звільняли від залишків агару та висаджували у відкритий ґрунт, використовуючи для адаптації пластмасові накривки, які видаляли поступово через 6–8 діб після пересаджування рослин з колби *in vitro* в умови *in vivo*.

У досліджах визначали кількість насіння *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*, що проросло на кожному середовищі, кількість пагонів, що утворилися на кожному середовищі з одного клону,

довжину ризом однієї рослини у *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, *M. giganteus* перед висаджуванням у ґрунт, відсоток адаптованих рослин та рослин, що успішно перезимували.

Результати досліджень

Результати досліджень свідчать, що найефективнішим є режим стерилізації насіння міскантусу розчином 1–2% гіпохлориду натрію протягом 15–25 хв, завдяки якому отримано 89–100% стерильного насіння. Підвищення концентрації гіпохлориду натрію та збільшення терміну стерилізації пошкоджує проростки з насіння, зменшення – знижує ефективність стерилізації.

Щодо стерилізації бруньок, видалених з ризом *M. giganteus* та *M. sacchariflorus* внаслідок їх контамінації, позитивні результати були отримані в разі застосування токсичнішої речовини – 0,2% сулеми, реагента, що містить ртуть. Найкращі результати було отримано за такого режиму стерилізації:

- промивання в розчині мила – 30 хв;
- обробка перманганатом калію – 10–15 хв;
- застосування розчину сулеми – 0,2%;
- триразове промивання стерильною дистильованою водою.

Такий режим стерилізації забезпечує отримання 80–85% стерильного неушкодженого матеріалу.

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

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

Результати оптимізації складу живильних середовищ для пророщування насіння міскантусу за групами компонентів (макроелементи, амінокислоти, вітаміни, регулятори росту, вуглеводи) наведено в таблиці 1. Оскільки ключовими фітогормонами для проростання насіння є гібереліни [13, 16], які індукують синтез α -амілази під час проростання насіння, гіберелін був включений до складу живильних середовищ як основний гормон. Еталон – безгормональне середовище МС без амінокислот та вітамінів.

Результати досліджень свідчать, що найбільша кількість пророщених насінин була отримана на середовищах ПЗ та П4 з підвищеним вмістом ГК – вона збільшилася на 10–15% залежно від виду рослини та року репродукції насіння (рис. 1).

Було виготовлено та проаналізовано понад 40 живильних середовищ для мікро-

Таблиця 1

Склад живильних середовищ для пророщування насіння міскантусу

Компоненти середовища	Еталон	П1	П2	П3	П4
Макроелементи МС	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Мікроелементи МС	1	1	1	1	1
Вітаміни, мг/л					
Тіамін	–	10,0	10,0	10,0	10,0
Піридоксин	–	1,0	1,0	1,0	1,0
Нікотинова кислота	–	1,0	1,0	1,0	1,0
Аскорбінова кислота	–	1,0	1,0	1,0	1,0
Амінокислоти, мг/л					
Глутамінова кислота	–	250	250	250	250
Аргінін	–	30	30	30	30
Тріптофан	–	3	3	3	3
Тірозин	–	3	3	3	3
Гідроксипролін	–	2	2	2	2
Гліцин	–	2	2	2	2
Регулятори росту, мг/л					
6-БАП	–	0,2	0,2	0,2	0,2
НОК	–	–	–	–	0,1
ГК	–	–	0,5	1,0	0,5-1,0
Інші органічні домішки, г/л					
Мезоінозит	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Сахароза	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Агар	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0

клонального розмноження міскантусу, різних за складом, дозуванням та співвідношенням компонентів з метою розроблення та оптимізації складу живильних середовищ. Основними гормонами, що були введені до складу живильних середовищ, були

Таблиця 2

Склад живильного середовища для мікроклонального розмноження міскантусу

Компоненти середовища	Еталон	Р1	Р2	Р3
Макроелементи МС	1/2	1/2	1/2	1/2
Мікроелементи МС	1	1	1	1
Вітаміни, мг/л				
Тіамін	10,0	10,0	10,0	10,0
Піридоксин	1,0	1,0	1,0	1,0
Нікотинова кислота	1,0	1,0	1,0	1,0
Аскорбінова кислота	1,0	1,0	1,0	1,0
Амінокислоти, мг/л				
Глутамінова кислота	250,0	250,0	250,0	250,0
Аргінін	30,0	30,0	30,0	30,0
Тріптофан	3,0	3,0	3,0	3,0
Тірозин	3,0	3,0	3,0	3,0
Гідроксипролін	2,0	2,0	2,0	2,0
Гліцин	2,0	2,0	2,0	2,0
Регулятори росту, мг/л				
6-БАП	0,4	0,4	0,4	0,4
Кінетин	–	0,5	–	0,5
Аденін	–	–	0,5	0,5
ГК	0,2	0,2	0,2	0,2
Інші органічні домішки, г/л				
Мезоінозит	0,1	0,1	0,1	0,1
Сахароза	40,0	40,0	40,0	40,0
Агар	8,0	8,0	8,0	8,0

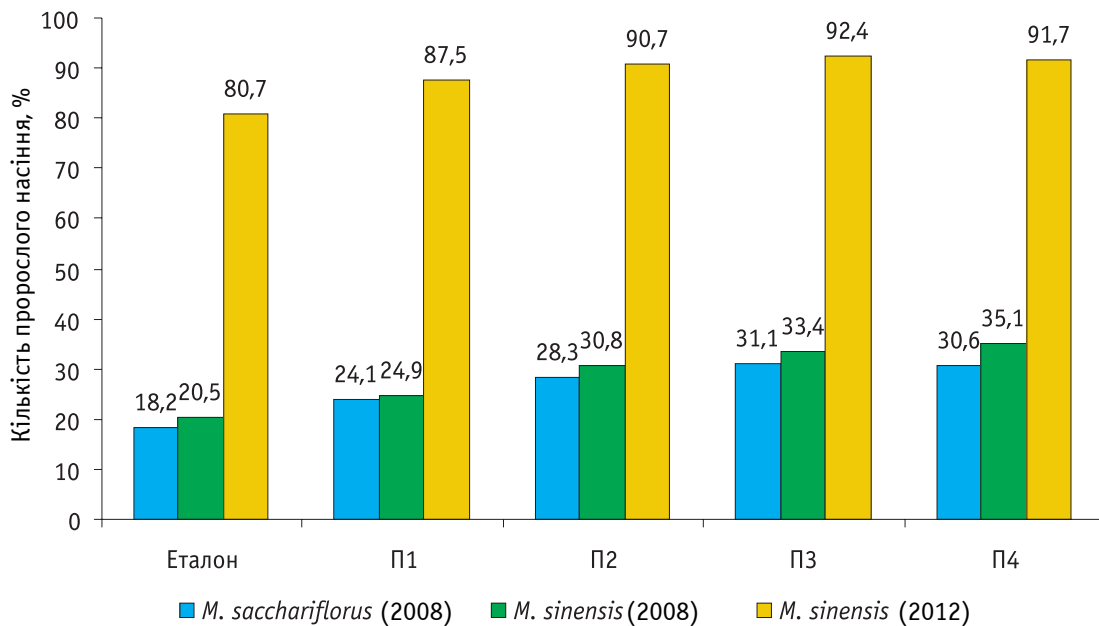


Рис. 1. Кількість пророслого насіння рослин *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* 2008 та 2012 рр. репродукції на різних живильних середовищах (у відсотках до висадженого)

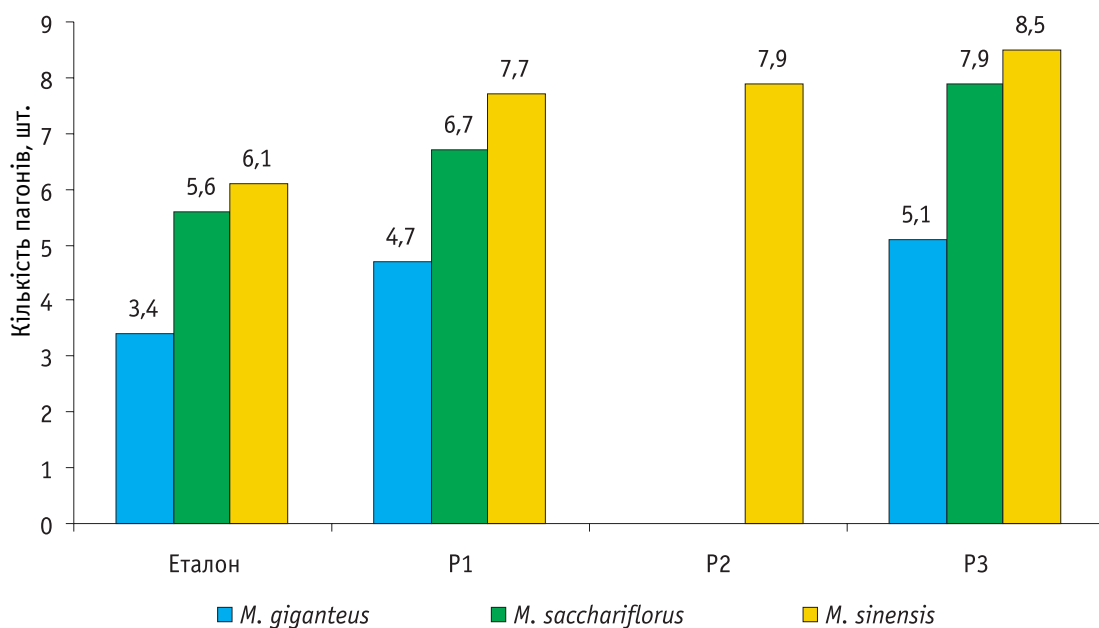


Рис. 2. Кількість пагонів, що утворилися з одного клону різних видів міскантусу, залежно від складу живильного середовища

цитокініни – 6-БАП, кінетин, аденін. Ця група регуляторів росту стимулює поділ клітин та індукують утворення адвентивних пагонів [14].

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 2.

Дані, наведені на рисунку 2, свідчать, що ефективніше клонування міскантусів забез-

печують середовища з двома або трьома видами цитокінінів, тобто ті, де, крім 6-БАП, до складу були введені інші цитокініни – кінетин та аденін. Додавання до складу середовищ цих сполук сприяло збільшенню кількості клонів, утворених з одного, на 32–50% залежно від виду міскантусу. Збільшення вмісту цитокінінів сприяло підвищенню швидкості клонування та отримання більшої кількості клонів, але мало негативний вплив на подальший розвиток рослин та акліматизацію їх у відкритому ґрунті.

Для добору та оптимізації складу живильних середовищ, призначених для стимуляції розвитку ризом *in vitro*, були проаналізовані середовища за дозуванням та співвідношенням основних компонентів живильних середовищ. Основним гормоном, що був введений до складу живильних середовищ, був гіберелін (ГК) – 0,5–1,0 мг/л, як допоміжні – 6-БАП (0,2 мг/л) та НОК (0,1 мг/л) (табл. 3).

Таблиця 3

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

Компоненти середовища	Еталон	Рр1	Рр2	Рр3
Макроелементи МС		1/2	1/2	1/2
Мікроелементи МС		1	1	1
Вітаміни, мг/л				
Тіамін	10,0	10,0	10,0	10,0
Піридоксин	1,0	1,0	1,0	1,0
Нікотинова кислота	1,0	1,0	1,0	1,0
Аскорбінова кислота	1,0	1,0	1,0	1,0
Амінокислоти, мг/л				
Глутамінова кислота	250	250	250	250
Аргінін	30	30	30	30
Тріптофан	3	3	3	3
Тірозин	3	3	3	3
Гідроксипролін	2	2	2	2
Гліцин	2	2	2	2
Регулятори росту, мг/л				
6-БАП	0,2	0,2	0,2	0,2
НОК	0,1	–	–	0,1
ГК	–	0,5	1,0	1,0
Інші органічні домішки, г/л				
Мезоінозит	0,1	0,1	0,1	0,1
Сахароза	40,0	40,0	40,0	40,0
Агар	8,0	8,0	8,0	8,0

Дані, наведені на рисунку 3, демонструють результати стимуляції утворення та пролонгації ризом на відповідних живильних середовищах. Згідно з отриманими результатами, введення до складу живильних середовищ гібереліну стимулює ріст ризом та сприяє збільшенню їхньої довжини залежно від виду міскантусу в середньому в 5–7 разів.

Рослини міскантусу з ризомами в культурі *in vitro* зображено на рисунках 4–6.

Проведені дослідження свідчать, що за розмноження міскантусу в культурі *in vitro* та адаптації в ґрунті з використанням теплиць частка адаптованих та акліматизованих рослин від висаджених становила 89%, кількість рослин, що вижили після перезимівлі – 66%. Частка адаптованих та акліматизованих рослин, розмножених *in vitro*, за висаджування їх безпосередньо у відкритий ґрунт з еталонних середовищ МС становила лише 67% загальної кількості висаджених,



Рис. 4. Проростання ризом рослин *M. sinensis* у культурі *in vitro*

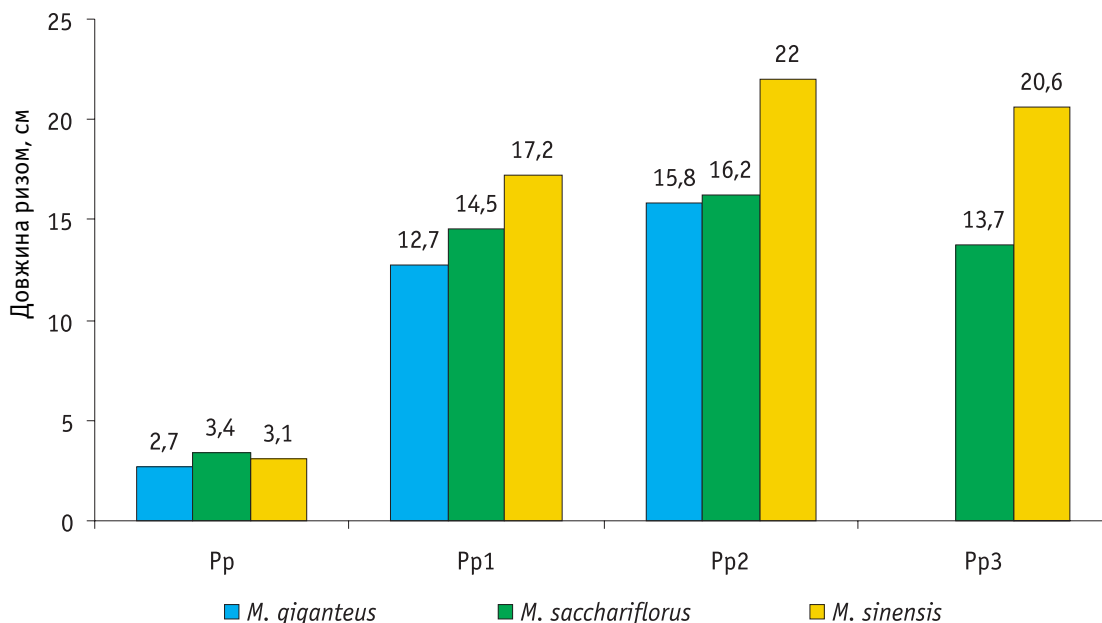


Рис. 3. Довжина ризом різних видів міскантусу з культури *in vitro* перед висаджуванням у ґрунт залежно від складу живильного середовища

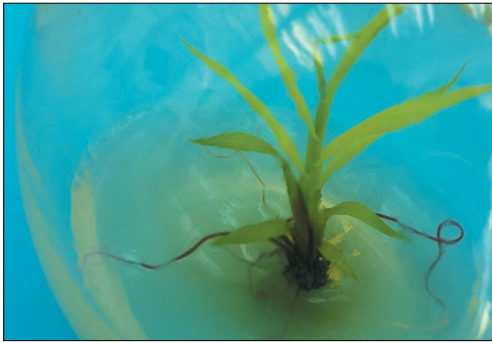


Рис. 5. Ріст ризом рослин *M. sacchariflorus* у культурі *in vitro*



Рис. 6. Ріст ризом рослин *M. giganteus* у культурі *in vitro*

кількість рослин, що вижили після перезимівлі – 41% (табл. 4). Такі результати було отримано в умовах України, тоді як в умо-

Таблиця 4

Характеристика способів розмноження міскантусу в культурі *in vitro* та адаптації в ґрунті

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 відсотках від висаджених	Кількість рослин, що вижили після перезимівлі, у відсотках від висаджених
Живильне середовище, адаптація в теплицях (еталон)	+	-	+	+	89	66
Живильне середовище (еталон), адаптація та акліматизація без використання теплиць	+	-	-	+	67	41
Модифіковане живильне середовище та акліматизація і адаптація рослин без використання теплиць	+	+	-	+	100	100

вах інших європейських країн рослини без застосування тепличних комплексів взагалі не виживають [11].

Стимуляція утворення та росту в довжину ризом на модифікованих живильних середовищах перед висаджуванням рослин *M. gi-*



Рис. 7. *M. sinensis*, адаптований до умов *in vivo* без використання тепличних комплексів



Рис. 8. Рослини *M. sinensis*, що успішно перезимували

ganteus, *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* у відкритий ґрунт сприяла 100% адаптації та 100% виживанню рослин у зимовий період без застосування тепличних комплексів як проміжної ланки для адаптації та дорожцвання рослин, отриманих з культури *in vitro* (рис. 9).



Рис. 9. Рослини *M. sinensis* другого року вегетації, висаджені в умови відкритого ґрунту з умов *in vitro*

Висновки

Розроблено метод розмноження міскантусів *in vitro* та адаптації у відкритому ґрунті, який включає стимуляцію росту ризом та сприяє збільшенню їхньої довжини на живильних середовищах, до складу яких введено гіберелін, що забезпечує гарантоване 100% збереження розмножених з культури *in vitro* рослин під час адаптації у відкритому ґрунті та акліматизації в зимовий період.

Метод має значні переваги у разі розмноження міскантусу у великих кількостях, оскільки дає змогу уникнути використання тепличних комплексів, стаціонарний характер, конструкційна складність та дороговизна яких обмежують використання їх фермерами та малими сільськогосподарськими підприємствами.

Використана література

1. Griffiths M. Index of Garden Plant. Portland, OR : Timber Press, 1994. P. 867–874.
2. Chramiec-Głębik A., Grabowska-Joachimiak A., Sliwiska E. та ін. Cytogenetic analysis of *Miscanthus × giganteus* and its parent forms. *Caryologia*. 2012. Vol. 65, Iss. 3. 234–242. doi: 10.1080/00087114.2012.740192
3. Słomka A., Kuta E., Płazek A. et al. Sterility of *Miscanthus × giganteus* results from hybrid incompatibility. *Acta Biol Cracov Ser Bot*. 2012. Vol. 54, Iss. 1. P. 113–120. doi: 10.2478/v10182-012-0011-1
4. Lewandowski I., Clifton-Brown J. C., Scurlock J. M. O., Huisman W. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*. 2000. Vol. 54, Iss. 4. P. 209–227. doi: 10.1016/S0961-9534(00)00032-5

5. 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, Iss. 4. P. 335–361. doi: 10.1016/S0961-9534(03)00030-8
6. Peng L., Gutterson N. Energy Crop and Biotechnology for Biofuel Production. *J. Integr. Plant Biol.* 2011. Vol. 53, Iss. 3. P. 253–256. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.01014.x
7. Lewandowski I. Micropropagation of *Miscanthus × giganteus*. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 39. High-Tech and Micropropagation V* / Y. P. S. Bajaj (ed.). Berlin : Springer Berlin Heidelberg, 1997. P. 239–255. doi: 10.1007/978-3-662-07774-0_16
8. Holme I. B., Petersen K. K. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus × ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 1996. Vol. 45, Iss. 1. P. 43–52. doi: 10.1007/BF00043427
9. Anderson E., Arundale R., Maughan M. et al. Growth and agronomy of *Miscanthus × giganteus* for biomass production. *Biofuels*. 2011. Vol. 2, Iss. 1. P. 71–87. doi: 10.4155/bfs.10.80
10. Schwarz K., Murphy D., Schnug E. Studies of the growth and yield of *Miscanthus × giganteus* in Germany. *Asp of Appl Biol*. 1994. Vol. 40. P. 533–540.
11. Long S. P. C4 photosynthesis at low temperature. *Plant Cell Environ*. 1983. Vol. 6, Iss. 4. P. 345–363. doi: 10.1111/1365-3040.ep11612141
12. Бутенко П. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. Москва : ФБК-ПРЕСС, 1999. 152 с.
13. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Київ : Наук. думка, 2005. 271 с.
14. Калинин Ф. Л., Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Технология микрোকлонального размножения растений. Киев : Наук. думка, 1992. 232 с.
15. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
16. Муромцев С., Чкаников Д., Кулаева О., Гамбург К. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. Москва : Агропромиздат, 1987. 383 с.

References

1. Griffiths, M. (1994). *Index of Garden Plant*. Portland, OR: Timber Press.
2. Chramiec-Głębik, A., Grabowska-Joachimiak, A., Sliwiska, E., Legutko, J., & Kula, A. (2012). Cytogenetic analysis of *Miscanthus × giganteus* and its parent forms. *Caryologia*, 65(3), 234–242. doi: 10.1080/00087114.2012.740192
3. Słomka, A., Kuta, E., Płazek, A., Dubert, F., Zur, I., Dubas, E., ... Zurek, G. (2012). Sterility of *Miscanthus × giganteus* results from hybrid incompatibility. *Acta Biol Cracov Ser Bot*, 54(1), 113–120. doi: 10.2478/v10182-012-0011-1
4. Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., Scurlock, J. M. O., Huisman, W. (2000). *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*, 54(4), 209–227. doi: 10.1016/S0961-9534(00)00032-5
5. Lewandowski, I., Scurlock, J. M. O., Lindvall, E., & Christou, M. (2003). The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy*, 25(4), 335–361. doi: 10.1016/S0961-9534(03)00030-8
6. Peng, L., & Gutterson, N. (2011). Energy Crop and Biotechnology for Biofuel Production. *J. Integr. Plant Biol.*, 53(3), 253–256. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.01014.x
7. Lewandowski, I. (1997). Micropropagation of *Miscanthus × giganteus*. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 39. High-Tech and Micropropagation V* (pp. 239–255). Berlin: Springer. doi: 10.1007/978-3-662-07774-0_16
8. Holme, I. B., & Petersen, K. K. (1996). Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus*

- ×*ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 45(1), 43–52. doi: 10.1007/BF00043427
9. Anderson, E., Arundale, R., Maughan, M., Oladeinde, A., Wycislo, A., & Voigt, T. (2011). Growth and agronomy of *Miscanthus* × *giganteus* for biomass production. *Biofuels*, 2(1), 71–87. doi: 10.4155/bfs.10.80
 10. Schwarz, K., Murphy, D., & Schnug, E. (1994). Studies of the growth and yield of *Miscanthus* × *giganteus* in Germany. *Asp of Appl Biol.*, 40, 533–540.
 11. Long, S. P. (1983). C4 photosynthesis at low temperature. *Plant Cell Environ*, 6(4), 345–363. doi: 10.1111/1365-3040.ep11612141
 12. Butenko, R. G. (1999). *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologiya na ikh osnove* [Biology of higher plant cells in vitro and biotechnology based on them]. Moscow: FBK-PRESS. [in Russian]
 13. Kushnir, H. P., & Sarnatska, V. V. (2005). *Mikroklonalne rozmnozhenia roslyn* [Microclonal plant propagation]. Kyiv: Naukova dumka. [in Ukrainian]
 14. Kalinin, F. L., Kushnir, G. P., & Sarnatskaya, V. V. (1992). *Tekhnologiya mikroklonal'nogo rozmnozheniya rasteniy* [Microclonal plant propagation technology]. Kiev: Naukova dumka. [in Russian]
 15. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
 16. Muromtsev, S., Chkanikov, D., Kulaeva, O., & Gamburg, K. (1987). *Osnovy khimicheskoy regulatsii rosta i produktivnosti rasteniy* [Fundamentals of chemical regulation of growth and productivity of plants]. Moscow: Agropromizdat. [in Russian]

УДК 631.681.16

Гонтаренко С. Н., Лашук С. А.* Метод размножения, стимуляции роста ризом в культуре *in vitro* и адаптации в открытой почве представителей рода *Miscanthus* // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2017. Т. 13, № 3. С. 230–238. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.3.2017.110703>

Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины, г. Киев, ул. Клиническая, 25, 03110, Украина,

*e-mail: lashuk_s@ukr.net

Цель. Разработать метод размножения, стимуляции роста ризом в культуре *in vitro* представителей рода *Miscanthus* и адаптации их в открытом грунте без использования тепличных комплексов для акклиматизации и доращивания. **Методы.** Биотехнологические, математико-статистические. **Результаты.** Разработаны прописи питательных сред для инокуляции эксплантов, размножения побегов, стимуляции роста ризом *in vitro*. Стерильные экспланты – семена, почки, которые удаляли с ризом, части стебля с почкой высаживали на модифицированные среды с минеральной частью по Мурасиге–Скуга (МС), в состав которых входило 0,5–1 доза макро- и одна доза микроэлементов, витамины (тиамин – 10,0 мг/л, пиридоксин – 1,0, никотиновая кислота – 1,0, аскорбиновая кислота – 1,0 мг/л), с добавлением аминокислот (глутаминовая – 250,0 мг/л, аспарагиновая – 30,0, тирозин – 3,0, аргинин – 2,0, гидроксипролин – 2,0 мг/л), регуляторов роста (ГК – 0,5–1,0 мг/л, 6-БАП – 0,2, НОК – 0,1 мг/л) в разных вариациях. После прорастания семян, появления почек и образования побегов высотой 1–2 см их для размножения пассировали на среду другого состава, которая отличалась от предыдущей соотношением регуляторов роста, в частности увеличенным количеством цитокининов [6-БАП (0,4–0,5 мг/л), кинетин (0,5 мг/л), аденина

(0,5 мг/л)] в разных вариациях на фоне 0,2 мг/л ГК. Для стимуляции роста ризом микроклоны пересаживали на среды с другим составом и соотношением регуляторов роста [6-БАП (0,2–0,3 мг/л) + ГК (0,5–1,0 мг/л) или 6-БАП (0,2–0,3 мг/л) + ГК (0,5–1,0 мг/л) + НОК (0,1 мг/л)], то есть, с повышенным составом гиббереллинов. После образования ризом длиной 10–15 см растения мискантуса высаживали в открытую почву. Стимуляция образования и роста в длину ризом на соответствующих питательных средах перед посадкой растений *Miscanthus giganteus*, *M. sacchariflorus* и *M. sinensis* в условия *in vivo* способствовала 100% адаптации и 100% выживанию растений в зимний период без использования тепличных комплексов. **Выводы.** Разработан метод размножения мискантусов *in vitro* и адаптации в открытой почве, который включает стимуляцию роста ризом и способствует увеличению их длины на питательных средах, в состав которых входит гиббереллин, что гарантированно обеспечивает 100% сохранение размноженных в культуре *in vitro* микрорастений при адаптации в открытой почве и акклиматизации в зимний период.

Ключевые слова: растения мискантуса, экспланты, ризомы, акклиматизация, питательная среда, *in vitro*, тепличные комплексы.

UDC 631.681.16

Hontarenko, S. M., & Lashuk, S. O.* (2017). Method of propagation, stimulation of rhizomes growth *in vitro* culture and adaptation in the open ground for the genus *Miscanthus* representatives. *Plant Varieties Studying and Protection*, 13(3), 230–238. <http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.13.3.2017.110703>

*Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet of NAAS of Ukraine, 25 Klinichna Str., Kyiv, 03110, Ukraine, *e-mail: lashuk_s@ukr.net*

Purpose. To develop a method of propagation, stimulation of rhizomes growth *in vitro* culture for the genus *Miscanthus* representatives and their adaptation in the open field without the use of greenhouse complexes for acclimatization and completion of growing. **Methods.** Biotechnological procedures, mathematical and statistical analyses. **Results.** Prescription of nutrient medium was developed for explants inoculation, sprouts propagation, rhizomes growth stimulation *in vitro*. Such sterile explants as seeds, buds to be re-

moved from rhizomes, parts of stems with bud were placed on modified media with mineral portion by Murashige and Skoog (MS) that contained 0,5–1 dose of macroelements and one dose of microelements, vitamins (10 mg/l of thiamin, 1,0 mg/l of pyridoxine, 1,0 mg/l of nicotinic acid and 1,0 mg/l of ascorbic acid) supplemented with amino acids (250 mg/l of glutamic acid, 3 mg/l of tyrosine, 3 mg/l of arginine, 2 mg/l of hydroxyproline), plant growth regulators [0,5–1,0 mg/l of GA (gibberelline acid), 0,2 mg/l of 6-BAP

(6-Benzylaminopurine, 0,1 mg/l of NAA (α -naphthylacetic acid)] in different variations. After seed germination, buds emerging and sprouts formation 1–2 cm in height, for propagation purpose they were passivated on the medium of other composition that differed from previous one by the content and ratio of growth regulators, especially by a high concentration of cytokinins [6-BAP (0,4–0,5 mg/l), kinetin (0,5 mg/l), adenine (0,5 mg/l)] in different variations in presence of GA (0,2 mg/l). In order to stimulate rhizomes growth, microclones were transferred on media with other composition and ratio growth regulators (6-BAP (0,2–0,3 mg/l) + GA (0,5–1,0 mg/l) or 6-BAP (0,2–0,3 mg/l) + GA (0,5–1,0 mg/l) + NAA (0,1 mg/l), in other words, with a high content of gibberellins. After the formation of rhizomes 10–15 cm in length, miscanthus plants

were planted out in the open ground. Stimulation of rhizomes initiation and elongation on appropriate nutrient media before *Miscanthus giganteus*, *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* planting *in vivo* resulted in 100% adaptation and 100% survival of plants in the winter period without the use of greenhouse complexes. **Conclusions.** The method of miscanthus propagation *in vitro* and adaptation in the open ground was developed that included stimulation of rhizomes growth and favoured the increase of their length on media supplemented with gibberelline that guaranteed 100% preservation of microplants to be propagated from *in vitro* culture during adaptation in the open ground and acclimatization in winter.

Keywords: *miscanthus plants, explants, rhizomes, acclimatization, nutrient medium, in vitro, greenhouse complexes.*

Надійшла / Received 14.06.2017

Погоджено до друку / Accepted 07.08.2017