

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

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

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

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

БИОМЕТРИЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ НОВИХ ЛІНІЙ *M. × GIGANTEUS* З ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ ПЛОЇДНОСТІ

Мета. Метою дослідження було вивчення біометричних та біохімічних особливостей нових ліній *M. × giganteus*, отриманих у результаті поліплоїдизації з використанням антимиотичних речовин динітроанілінового ряду. **Методи.** Оцінку нових ліній проводили за такими біометричними та біохімічними показниками; висота рослин, кількість ризом на кореневищах, кількість листків на стеблах ролин, співвідношення частки маси листя і частки маси стебел та загальної маси надземної частини рослин, вміст сухої речовини і вміст золи у надземній частині рослин; загальний вміст цукрів та моноцукрів; енергетична цінність фітомаси. **Результати.** Встановлено, що всі досліджувані лінії істотно відрізнялися між собою за всіма як біометричними, так і біохімічними показниками. Найкращими за більшістю з досліджуваних показників виявилися поліплоїдні лінії 108 та 202 (зокрема, за показниками маси надземної частини рослин, висоти рослин, кількості ризом на кореневищах рослин, кількості листків на стеблі). **Висновки.** Відібрано лінії *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плоїдності, які істотно переважають триплоїдні форми за багатьма біометричними і біохімічними показниками та потребують подальшого вивчення.

Ключові слова: динітроаніліни, поліплоїдизація, *Miscanthus × giganteus*, біопаливо.

Ґрунтово-кліматичні умови більшості регіонів України є сприятливими для вирощування багаторічних енергетичних рослин групи С4, здатних інтенсивно трансформувати енергію сонця в енергоємну біомасу. Насамперед, це природний гібрид – міскантус гігантський (*Miscanthus × giganteus*). Рослини цього роду добре відомі як кормові, декоративні, технічні,

целюлозоносні, фітомеліоративні тощо. Останнім часом увага як науковців, так і виробників зосереджена на можливості використання міскантуса як відновлювальної енергетичної сировини для виробництва різних видів біопалива [1].

Поліплоїдизація є надзвичайно ефективним методом у програмах із селекції рослин. У багатьох випадках поліплоїди мають кращу енергію росту та за розмірами переважають свої оригінальні форми [2–4]. Перші публікації щодо повної дуплікації геному рослин внаслідок поліплоїдизації і, як результат, відновлення фертильності стерильних гібридів *Nicotiana tabacum* з'явилися ще у 20-х роках ХХ століття [5]. У випадку стерильного *M. × giganteus* поліплоїдизація є незамінним методом для відновлення фертильності та подальшої селекції його нових сортів із покращеною продуктивністю. Так, за обробки колхцином п'яти генотипів міскантуса китайського чотири з отриманих поліплоїдів мали перевагу за товщиною стебла, два генотипи мали кращі показники за масою надземної частини рослин та одна поліплоїдна форма перевищувала контроль за висотою рослин [6]. Гексаплоїдні форми *M. × giganteus*, отримані з використанням оризаліну та колхцину, переважали триплоїдні за товщиною стебла та мали довші продиhi, проте істотно не відрізнялися за швидкістю росту та своїми розмірами від триплоїдних рослин [7]. Наукові літературні дані щодо відновлення фертильності, схожості насіння та вивчення мейотичних процесів у репродуктивних органах гексаплоїдних форм *M. × giganteus* після проведення поліплоїдизації обмежені лише вивченням життєздатності пилку нових ліній [6, 8, 9].

Тому метою нашого дослідження було вивчення біометричних та біохімічних особливостей нових ліній *M. × giganteus*, отриманих у результаті поліплоїдизації з використанням нових антимітотичних речовин динітроанілінового ряду [4, 10].

Матеріали і методи

Об'єкт дослідження – нові лінії рослин родини *M. × giganteus* із підвищеним рівнем плоідності (гексаплоїдні лінії – 114 хромосом), отримані із використанням сполук динітроанілінового ряду [4, 10–12], позначені далі як лінії 107, 108, 109, 114, 156, 202 та 209. Оскільки у якості вихідного матеріалу для отримання поліплоїдних форм використовували рослини *M. × giganteus* сорту «Гулівер», отриманого з колекції Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України, цей матеріал слугував контролем у подальших дослідженнях.

Оцінку нових ліній проводили за такими біометричними показниками: висота рослин, кількість ризом на кореневищах, кількість листків на стеблах рослин. Структуру рослин оцінювали за співвідношенням частки маси листя і частки маси стебел та загальної маси надземної частини рослин. Для оцінки біохімічних особливостей використовували такі показники: вміст сухої речовини та золи у надземній частині рослин; загальний вміст цукрів та моноцукрів; енергетична цінність біомаси. Енергетичну цінність сировини визначали на калориметрі ІСО 200. Енергетичну продуктивність рослин визначали на основі теплоємності та урожайності біомаси з урахуванням методик [13, 14].

Результати та обговорення

Однією з важливих ознак, які визначають накопичення біомаси, є висота рослин (рис. 1, 3). Для досліджуваних ліній міскантусу цей показник варіював у межах від 135 до 210 см. Найвищими за цим показником виявилися рослини ліній 108 та 202, середня висота яких становила 200 та 210 см відповідно. Рослини лінії 114 були всього 135 см заввишки. Висота триплоїдних рослин *M. × giganteus* (контроль) становила 180 см (рис. 1А). Висота рослин для інших досліджуваних ліній знаходилася в межах від 155 см до 165 см. Проте, за результатами інших дослідників, гексаплоїдні форми поступаються за висотою рослин триплоїдним формам. Так, наприклад, триплоїдні форми виявилися на 32 см вищими від гексаплоїдних форм *M. × giganteus* [6].

Облистяність стебла рослин безпосередньо впливає на ефективність фотосинтезу та накопичення біомаси. Середня кількість листків на стеблах досліджуваних ліній коливалася в межах від 7 до 9 шт. на стебло (рис. 1Б). Найменша кількість листків спостерігалась у рослин ліній 114 та 156 та складала в середньому 6 шт. на стебло. Зразки 107, 109, 209 та триплоїдна форма *M. × giganteus* мали в середньому по 7 листків. Найбільший рівень облистяності спостерігався у рослин ліній 202 та 108, а саме 8 та 9 листків на стебло. Виходячи з наведених вище результатів, можна зазначити, що найвищий потенціал до накопичення біомаси характерний для ліній 108 та 202, які переважають усі інші зразки та вихідний матеріал за розглянутими показниками.

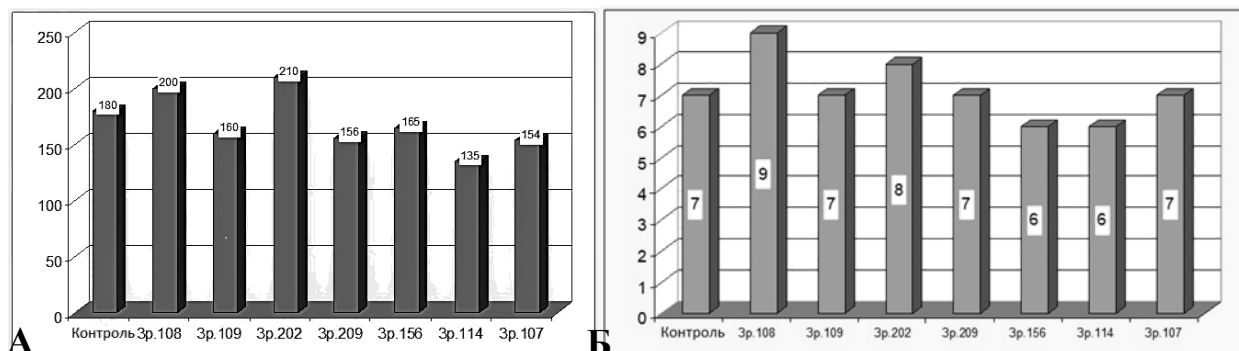


Рис. 1. Біометричні показники рослин *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плоідності: А – висота рослин різних ліній, см; Б – кількість листків на стеблах.

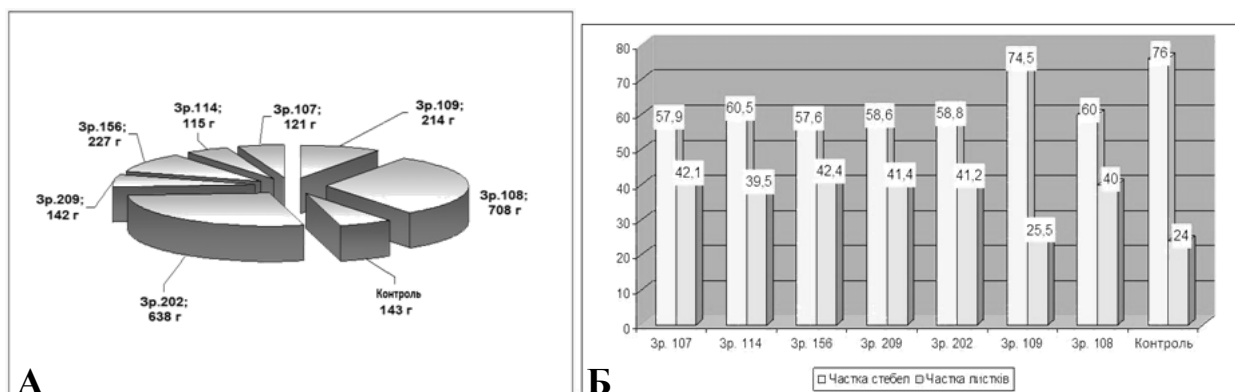


Рис. 2. Елементи продуктивності рослин *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плідності: **А** – надземна маса рослин, г; **Б** – структура надземної частини рослин, %.

Для уточнення потенціалу продуктивності досліджувані лінії було проаналізовано також за елементами формування продуктивності рослин, а саме накопиченням наземної біомаси та співвідношенням стебло/листя за вагою (рис. 2А, 2Б). Під час аналізу накопичення біомаси надземною частиною ліній рослин із підвищеним рівнем плідності встановлено, що за цим показником лінія 108 перевищувала інші зразки (рис. 2А). Її вегетативна маса складала 708 г, дещо нижчою була біомаса наземної частини рослин лінії 202–638 г. Лінія 114 мала найнижчі показники за надземною масою рослин – лише 115 г. Всі інші лінії мали вагу надземної частини в межах 120–215 г. Вихідна форма *M. × giganteus* також мала відносно низькі показники – 143 г. Отримані результати відповідають результатам попередніх досліджень, підкреслюючи істотне варіювання між лініями за такими показниками, як маса надземної частини, висота рослин, товщина стебла та інші [6, 7]. Раніше були опубліковані результати, які свідчать про те, що, незважаючи на переваги гексаплоїдних форм *M. × giganteus* за товщиною стебла, вони істотно поступаються триплоїдним формам за накопиченням надземної фітомаси рослин. Різниця між різними варіантами складала 700 г [6].

За структурою надземної частини досліджувані лінії міскантусу істотно варіювали за співвідношенням частки стебел та листків (рис. 2Б). Рослини вихідної триплоїдної форми *M. × giganteus* (контроль) мали найвищу частку стебла – 76 % і лише 24 % листя. Лінії зі зміненим рівнем плідності склалися в середньому з 60 % стебла та 40 % листя.

Ще одним важливим показником, від якого безпосередньо залежить коефіцієнт вегетативного розмноження рослин, є кількість ризом на кореневищах (рис. 3, 4). За результатами нашого дослідження, зразок 108 мав найвищі показники: середня кількість ризом на його кореневищах складала 21, у той час як триплоїдний *M. × giganteus* (контроль) мав лише 9 ризом. Найменша кількість ризом на кореневищах спостерігалась у ліній 109 та 156 – 4 та 6 відповідно (рис. 4).

Господарська цінність рослинної сировини за використання її як джерела енергії пов'язана з багатьма її біохімічними показниками, зокрема такими, як вміст сухої речовини, золи та енергетична цінність під час спалювання (за використання сировини для виготовлення твердих палив), а також вміст загального цукру та моноцукрів (за виробництва біоетанолу). Нами було проведено аналіз біомаси надземної частини рослин досліджуваних ліній із підвищеним рівнем плідності за її господарською цінністю (табл.).

Вміст сухої речовини для всіх проаналізованих ліній знаходився у межах від 37,11 до 44,16 %. За цим показником перевагою вирізнялася лінія 108, у якій вміст сухої речовини у надземній біомасі складав 44,16 %. Для інших ліній цей показник знаходився в межах від 37 до 42 %. У вихідного сорту вміст сухої речовини складав 42,59 %. За вмістом золи всі досліджувані лінії, за винятком лінії 209, поступалися вихідній формі. Вміст золи для них знаходився в межах від 5,93 до 6,35 %. Для триплоїдної форми *M. × giganteus* (контроль) вміст золи складав 6,91 %.

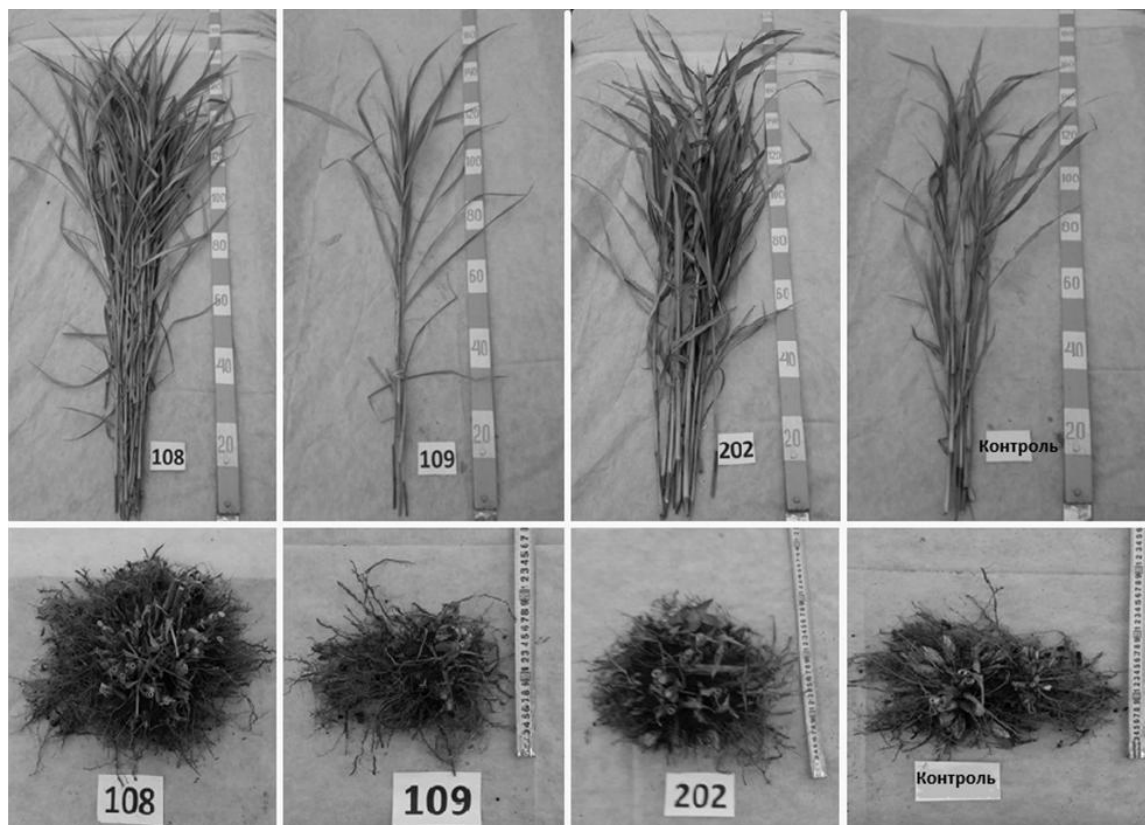


Рис. 3. Надземна частина та кореневища рослин ліній *M. x giganteus* зі змінним рівнем плідності.

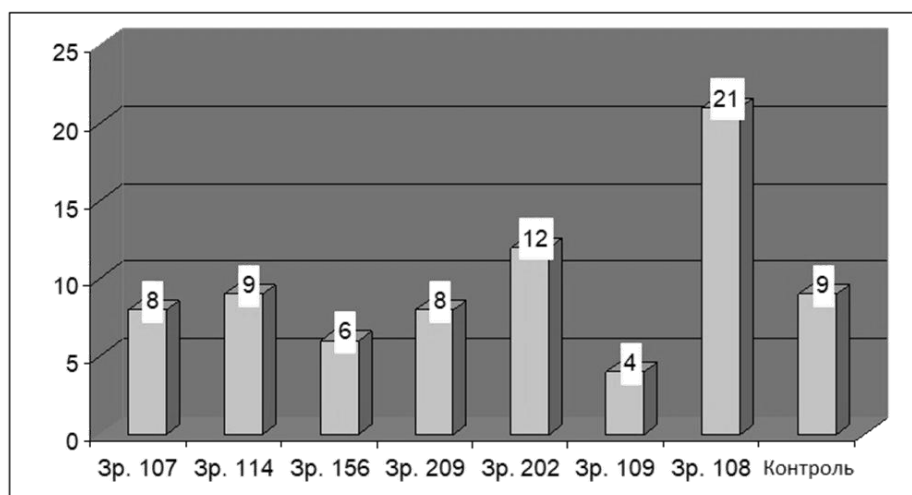


Рис. 4. Кількість ризом на кореневищах ліній *M. x giganteus* зі змінним рівнем плідності.

Під час аналізу біомаси рослин досліджуваних ліній із підвищеним рівнем плідності оцінювали також вміст загальних цукрів та моноцукрів. Встановлено, що найвищий відсоток моноцукрів має лінія 109. Для названого варіанта цей показник був на рівні 12,59 % (табл.). Ця лінія також мала рекордний показник за вмістом

загальних цукрів – 5,19 %. Лінії 114 та 108 мали найнижчі показники вмісту загальних цукрів – на рівні 3,11 та 3,21 %. Вміст цукру та моноцукрів для вихідної триплоїдної форми *M. x giganteus* (контроль) склав 11,39 та 4,52 % відповідно.

Таблиця. Біохімічні особливості ліній *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плідності

Зразок №	Вміст сухих речовин, %	Вміст золи, %	Загальний вміст цукрів, %	Вміст моноцукрів, %	Енергетична цінність фітомаси, ккал/кг
Контроль	42,59	6,91	11,39	4,52	3585
107	38,64	5,67	9,47	3,27	3633
108	44,16	6,35	6,71	3,21	3633
109	42,86	5,19	12,59	5,19	3661
114	42,40	5,70	7,28	3,11	3595
156	38,3	5,93	9,35	5,11	3635
202	42,17	6,07	7,32	3,94	3589
209	37,11	7,13	8,69	4,92	3554

За енергетичною цінністю проаналізовані зразки не мали суттєвої різниці. Цей показник для них знаходився на рівні від 3550 до 3660 ккал/кг. Загалом можна зазначити, що лінії 108 та 202, які характеризуються найвищим рівнем накопичення фітомаси, вмісту сухої речовини та не перевищують за рівнем зольності вихідну триплоїдну форму *M. × giganteus*, можуть розглядатися як перспективні джерела сировини для використання як під час виготовлення твердих палив (пелет), так і під час виробництва біоетанолу. Також значний інтерес представляє лінія міскантусу 109, яка теж переважає вихідну форму за всіма розглянутими показниками, але поступається лініям 108 та 202 за рівнем накопичення біомаси.

Крім того, слід зазначити, що серед усіх досліджених ліній лише на рослинах лінії 108 спостерігалось викидання волотей, що відкриває можливість подальшого вивчення життєздатності пилку та схожості насіння.

Висновки

Проведено дослідження біометричних та біохімічних особливостей нових ліній *M. × giganteus*, отриманих у результаті поліплоїдизації за допомогою нових антимиотичних речовин динітроанілінового ряду. Встановлено, що всі досліджувані лінії істотно відрізнялися між собою за досліджуваними морфологічними та біохімічними показниками. Найкращі результати за багатьма показниками спостерігалися у ліній 108 та 202, а саме: маса надземної частини рослин, висота рослин, кількість ризом на кореневищах рослин, кількість листків на стеблі. Крім цього, під час проведення досліджень лише на рослинах лінії 108 спостерігалось викидання волотей. У подальшому планується вивчення репродуктивної здатності відібраних ліній.

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

References

- Rakhmetov D.B., Scherbakova T.O., Rakhmetov C.D. Miscanthus in Ukraine: introduction, biology, bioenergy. Kyiv: Fitosociocenter, 2015. P. 158. [in Ukrainian] / Рахметов Д.Б., Щербаківа Т.О., Рахметов С.Д. Міскантус в Україні: інтродукція, біологія, біоенергетика. К.: Фітосоціоцентр, 2015. 158 с.
- Sattler M.C., Carvalho C.R., Clarindo W.R. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. 2016. P. 281–296. doi: 10.1007/s00425-015-2450-x.
- Yemets A.I., Blume Ya.B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. *The Open Horticulture J.* 2008. Vol. 1. P. 15–20.
- Ozheredov S.P., Yemets A.I., Brytsun V.M., Ozheredova I.P., Lozynskiy M.O., Blume Ya.B. Screening of new 2,4- and 2,6 dinitroaniline derivatives on phytotoxicity and antimitotic activity. *Cytol. Genet.* 2009. Vol. 43, № 5. P. 297–304.
- Clausen R.E., Goodspeed T.H. Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid *Glutinosa-Tabacum* hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. *Genetics*. 1925. Vol. 10. P. 278–284.
- Glowacka K., Jezowski S., Kaczmarek Z. *In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterization of induced polyploids in two *Miscanthus* species. *Industr. Crops Prod.* 2010. Vol. 32. P. 88–96.
- Yu C.Y., Kim H.S., Burn A.L., Widholm J.M., Juvik J.A. Chromosome doubling of the bioenergy crop, *Miscanthus × giganteus*. *Global Change Biol. Bioenergy*. 2009. Vol. 1. P. 404–412.
- Heaton E.A., Dohleman F.G., Miguez A.F., Juvik J.A., Lozovaya V., Widholm J., Zabolina O.A., McIsaac F., David M.B., Voight T.B., Boersma N.N., Long S.P. Miscanthus: a promising biomass crop. *Adv Bot Res.* 2010. Vol. 56. P. 75–135.

9. Touchell D.H., Ranney T.G. Chromosome doubling and fertility restoration in *Miscanthus* × *giganteus*. *ASHS Annual Conference*, Miami, Florida, 2012. P. 48.
10. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Rakhmetov D.B., Yemets A.I., Blume Ya.B. Screening of nitroanilines for their affinity to *miscanthus* β -tubulin for further *in vitro* polyploidization of *miscanthus* species. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2016. Vol. 18. P. 212–216. [in Ukrainian] / Мельничук О.В., Ожередов С.П., Рахметов Д.Б., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Скрінінг нітроанілінів на спорідненість до β -тубуліну міскантусу для їх використання у поліплоїдизації рослин цього роду. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Т. 18. С. 212–216.
11. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Sekan O.S., Bayer G.Ya., Shysha O.M., Yemets A.I. Development and application of method for *miscanthus in vitro* culture establishment. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2015. Vol. 17. P. 209–212. [in Ukrainian] / Мельничук О.В., Ожередов С.П., Секан А.С., Баєр Г.Я., Шиша О.М., Ємець А.І. Розробка та відпрацювання методики введення в культуру *in vitro* рослин міскантусу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 17. С. 209–212.
12. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Rakhmetov D.B., Rakhmetova S.O., Sekan A.S., Bayer G.Y., Shysha O.M., Yemets A. I. *In vitro* culture establishment and polyploidization of *Miscanthus giganteus*. *Scientific reports of NULES of Ukraine*. 2015. Vol. 57, № 8. [in Ukrainian] / Мельничук О.В., Ожередов С.П., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Секан А.С., Баєр Г.Я., Шиша О.М., Ємець А.І. Введення в культуру *in vitro* та поліплоїдизація *Miscanthus giganteus*. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2015. Т. 57, № 8. URL: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/8.pdf (дата звернення: 1.04.2019).
13. Dubrovin V.O., Golub G.A., Dragnev S.V. Method of a generalized assessment of technically feasible energy potential of biomass. Kyiv: "Violprint", 2013. 25 p. [in Ukrainian] / Дубровін В.О., Голуб Г.А., Драгнєв С.В. Методика узагальненої оцінки технічно досяжного енергетичного потенціалу біомаси. К.: ТОВ «Віолпринт», 2013. 25 с.
14. Morozov R.V., Fedorchuk E.M. Assessment of bioenergy potential of vegetable waste and energy crops in agriculture. *Scientific Journal of Kherson State University*. 2015. Vol. 10, № 3. P. 111–117. [in Ukrainian] / Морозов Р.В., Федорчук Є.М. Оцінка біоенергетичного потенціалу рослинних відходів та енергетичних культур у сільському господарстві. *Науковий вісник Херсонського державного університету*. 2015. Т. 10, № 3. С. 111–117.

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

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

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

BIOMETRIC AND BIOCHEMICAL PECULIARITIES OF NEW *M. × GIGANTEUS* LINES WITH INCREASED PLOIDY LEVEL

Aim. The aim of the work was to study biometric and biochemical traits of new *M. × giganteus* lines obtained from polyploidization with the use of new antimitotic compounds of dinitroanilines class. **Methods.** The study has been conducted based on biological and biochemical parameters such as: plant height, number of rhizomes, number of leaves per stalk, ratio of leaves to stems, vegetative mass, dry mass and ash content; total sugars and monosugars content; energy value of biomass. **Results.** It has been established that all studied lines significantly differed for all biological and biochemical parameters. The best results for majority of parameters has been observed in lines 108 and 202, and namely, vegetative mass of plants, plant height, number of rhizomes and number of leaves per stalk. **Conclusions.** Some lines of *M. × giganteus* with increased ploidy level appeared to be significantly superior to triploid forms in most biometric and biochemical parameters and require further study.

Keywords: dinitroanilines, polyploids, *Miscanthus* × *giganteus*, biofuel.