

**Національна академія аграрних наук України**  
**Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків**

**ОЦІНКА ТА ОТРИМАННЯ НОВИХ ФОРМ**  
**МІСКАНТУСУ ТОЛЕРАНТНИХ ДО АБІОТИЧНИХ**  
**СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ В УМОВАХ IN VITRO**  
*методичні рекомендації*

УДК: 633.282:581.143.6:58.01/07

Методичні рекомендації розробили наукові співробітники Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН:

**Роїк Микола Володимирович**, доктор сільськогосподарських наук, академік;

**Бех Наталія Степанівна**, завідувач сектору культури клітин і тканин *in vitro*;

**Коцар Марія Олександрівна**, молодший науковий співробітник.

**Рецензенти:**

Балан В.М., доктор с.-г. наук, професор

Гонтаренко С.М., кандидат с.-г. наук

Методичні рекомендації «Оцінка та отримання нових форм міскантусу толерантних до абіотичних стресових факторів в умовах *in vitro*» призначені для спеціалістів у галузі селекції і біотехнології рослин, фахівців науково-дослідних установ, викладачів, аспірантів та студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації сільськогосподарського профілю.

**Рекомендовано до друку**

**Вченою радою Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків  
від 14.12.2015 року (протокол № 22)**

© Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН, 2015

© Роїк М.В., Бех Н.С., Коцар М.О., 2015

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ.....	5
2. ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА .....	6
2.1 Приготування маточних розчинів .....	6
2.2 Приготування живильного середовища (на 1 л розчину) .....	6
2.3 Приготування селективних середовищ.....	7
3. ОЦІНКА ТОЛЕРАНТНОСТІ МІСКАНТУСУ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ В УМОВАХ <i>IN VITRO</i> .....	8
3.1 Оцінка толерантності міскантусу на проростках у культурі <i>in vitro</i> .....	8
3.2 Оцінка толерантності пагонів міскантусу на селективних середовищах .....	9
3.3 Ризогенез міскантусу на селективних середовищах .....	11
4. ШКАЛА ОЦІНКИ ТОЛЕРАНТНОСТІ МІСКАНТУСУ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ <i>IN VITRO</i> .....	13
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	14

## ВСТУП

Міскантус – багаторічна рослина родини Злакових, яку використовують як біоенергетичну культуру, у целюлозно-паперовій промисловості та у ландшафтному дизайні. Для виробництва біопалива використовують міскантус гігантеус (*Miscanthus giganteus*,  $3n=57$ ), який є алотриплоїдним гібридом міскантусу китайського (*Miscanthus sinensis*,  $2n=38$ ) та міскантусу цукроцвітного (*Miscanthus sacchariflorus*,  $2n=76$ ). За рахунок високої врожайності сухої біомаси (до 25 т/га), високої теплотворної здатності (5 кВт/год/кг або 18 МДж/кг), низької природної вологості стебел на час збирання (до 15%) міскантус є найефективнішою порівняно з іншими сільськогосподарськими культурами рослиною для виробництва біопалива [1, 2]. Міскантус бажано вирощувати на маргінальних землях, які знаходяться у різних кліматичних зонах України. Таким чином, рослини піддаються декільком стрес-факторам, наприклад, посуха та засолення ґрунту [3].

Практичне значення має оцінка та створення шляхом селекції рослин, стійких до абіотичних факторів. Для прискорення селекційного процесу застосовують біотехнологічні підходи, зокрема, клітинну та тканинну селекцію *in vitro*. Багатьма авторами на різних видах рослин показано, що культивування ізольованих тканин *in vitro* підвищує рівень генетичної мінливості, створюючи матеріал для добору [4]. Ефективність використання культивованих тканин в селекції значно зростає, якщо добір бажаних варіантів проводити також в культурі *in vitro*. В даний час розроблені селективні системи для отримання форм, толерантних до різних біотичних і абіотичних стресорів [5]. Існують отримані методом клітинної селекції солестійкі і посухостійкі рослини цукрових буряків, тютюну, пшениці та ін. [6-9].

Розроблені біотехнологічні методи дозволять отримання нових форм міскантусу толерантних до декількох стресорів: посуха та засолення живильного середовища.

## 1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ

Для введення в культуру *in vitro* насіння і бруньок з ризом міскантусу та культивування культури пагонів необхідні лабораторні приміщення, які укомплектовані спеціальним обладнанням:

1. кімната для миття посуду з холодною та гарячою водою, дистиллятором, стелажем для сушіння посуду;

2. лабораторна кімната для приготування середовищ, забезпечена технічними і аналітичними терезами, рН-метром, ди- та бідистилляторами, холодильником для зберігання маточних розчинів і реактивів, електроплиткою, водяною банею, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду, мікроскопом;

3. приміщення для стерилізації живильного середовища, інструментів, посуду, з горизонтальними чи вертикальними автоклавами, сушильною шафою з режимом роботи – 150-160 °С;

4. стерильне приміщення (бокс, операційна кімната) для ізоляції і пересадки культур. Для стерильних робіт використовують ламінар-бокси;

5. культуральна кімната з кондиційованим повітрям, температурою повітря 24±2 °С, відносною вологістю повітря 70 %, освітленням 3-4 тис. лк., 16-годинним фотоперіодом, стелажми для розміщення колб і штативів з пробірками.

**Інструменти та матеріали:** пінцети хірургічні або анатомічні довжиною 20 см, скальпелі, спиртівка, проавтоклавований папір.

**Посуд:** для приготування живильного середовища – колби об'ємом 500 і 1000 мл, циліндри мірні об'ємом 10, 50, 100 мл, піпетки об'ємом 1, 2, 5, 10 мл; для культивування насіння та бруньок – пробірки висотою 10 см; для культивування культури пагонів та ризогенезу – колби Ерленмейера з термостійкого скла об'ємом 250-300 мл.

## **2. ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА**

### **2.1 Приготування маточних розчинів**

Для приготування маточних розчинів використовують реактиви високої хімічної чистоти. Для зручності в роботі макроелементи готують у вигляді маточних розчинів у концентраціях, що в 10 разів перевищують необхідні, для приготування середовищ. Їх зберігають в холодильнику не більше двох місяців за температури  $4 \pm 1$  °С.

Розчини мікроелементів і вітамінів готують у концентраціях, що в 100 разів перевищують необхідні і зберігають в замороженому стані.

При приготуванні хелатного заліза окремо розчиняють 37,3 мг  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (трилон Б) і 27,8 мг  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Потім ці розчини зливають в одну колбу і доводять їх об'єм до 1000 мл.

Маточні розчини гормональних речовин і вітамінів готують відповідно їх властивостям:

1. 100 мг  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти ( $\alpha$ -НОК), або 100 мг індолілоцтової кислоти (ІОК) розчиняють в 0,5-2 мл етанолу, підігривають і доводять об'єм бідистильованою водою до 100 мл (концентрація 1 мг/мл);
2. 100 мг 6-бензиламінопурина (6-БАП) розчиняють у 1-2 мл 0,5 н  $\text{HCl}$ , підігривають на водяній бані і доводять об'єм бідистильованою водою до 100 мл;
3. вітаміни – тіамін ( $\text{B}_1$ ), піридоксин ( $\text{B}_6$ ), нікотинову кислоту (PP), аскорбінову кислоту (C) розчиняють у бідистильованій воді в концентрації 1 мг/мл.

### **2.2 Приготування живильного середовища (на 1 л розчину)**

1. 6,5-7,0 г агару (залежно від марки) заливають бідистильованою водою ( $\frac{1}{2}$  об'єму середовища);

2. агар розтоплюють на водяній бані або автоклавують за умов 1,25 атм упродовж 30 хв;
3. 20-40 г сахарози розчиняють у 100-150 мл дистильованої води за температури 50-60 °С;
4. ємність для приготування середовища на 1/3 від запланованого об'єму наповнюють бідистильованою водою, додають необхідну кількість макро- та мікроелементів, Fe-хелату із маточних розчинів та наважку мезоінозиту, розчин сахарози. Вітаміни і гормони додаються за допомогою піпеток із маточних розчинів;
5. рН живильного середовища доводять до 5,6-5,8 за допомогою 1 н розчинів HCl або NaOH, підігривають, додають розтоплений агар;
6. живильне середовище розливають по 10 мл у пробірки для культивування насіння та бруньок та по 40 мл у 250-300 мл колби для культивування пагонів і ризогенезу, закривають фольгою і стерилізують у автоклаві за умов 1,5 атм упродовж 60 хв.

### **2.3 Приготування селективних середовищ**

1. для визначення толерантності до хлоридного засолення: готують середовища з NaCl 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %: до основного розчину живильного середовища додають 10 г/л, або 15 г/л, або 20 г/л хімічно-чистої солі NaCl, відповідно;
2. для визначення толерантності до сульфатного засолення: готують середовища з Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %: до основного розчину живильного середовища додається 20 г/л, або 25 г/л, або 30 г/л хімічно-чистої солі Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, відповідно;
3. для визначення толерантності до посухи: готують середовища з манітом 0,02 М, 0,04 М, 0,06 М: до основного розчину живильного середовища додається 3,6 г/л, або 7,2 г/л, або 10,8 г/л хімічно-чистого маніту, відповідно.

### 3. ОЦІНКА ТОЛЕРАНТНОСТІ МІСКАНТУСУ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ В УМОВАХ *IN VITRO*

#### 3.1 Оцінка толерантності міскантусу на проростках у культурі *in vitro*

Для отримання асептичних проростків насіння міскантусу, його стерилізують мильним розчином протягом 10 хв, 2-3-кратно промивають дистильованою водою. Стерилізацію проводять у розчині «Білізна», масовою часткою 35 % з експозицією 40-60 хв та подальшим 3-кратним промиванням стерильною дистильованою водою (рис. 3.1).

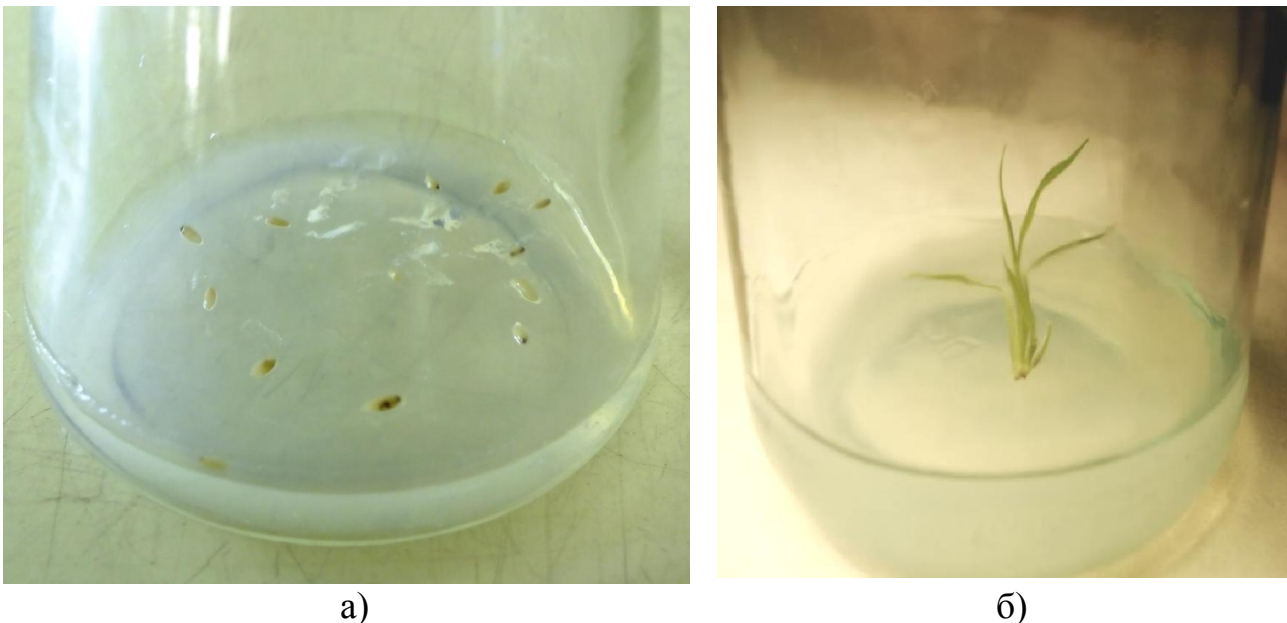


Рис. 3.1 Введення в культуру *in vitro* насіння міскантусу: а) насіння міскантусу, б) рослина-регенерант з насіння міскантусу

Попередня підготовка ризом міскантусу включає очищення їх від залишків ґрунту у мильному розчині за допомогою жорсткої щітки. Для отримання асептичної культури за допомогою скальпеля відділяють верхівкові бруньки з ризом міскантусу. Відібраний матеріал занурюють у мильний розчин на 20-40 хв, потім 2-3-кратно промивають дистильованою водою. Стерилізацію проводять у розчині сулеми, масовою часткою 0,2 % (експозиція 50-70 хв) і промивають 3-кратно стерильною дистильованою водою (рис. 3.2).



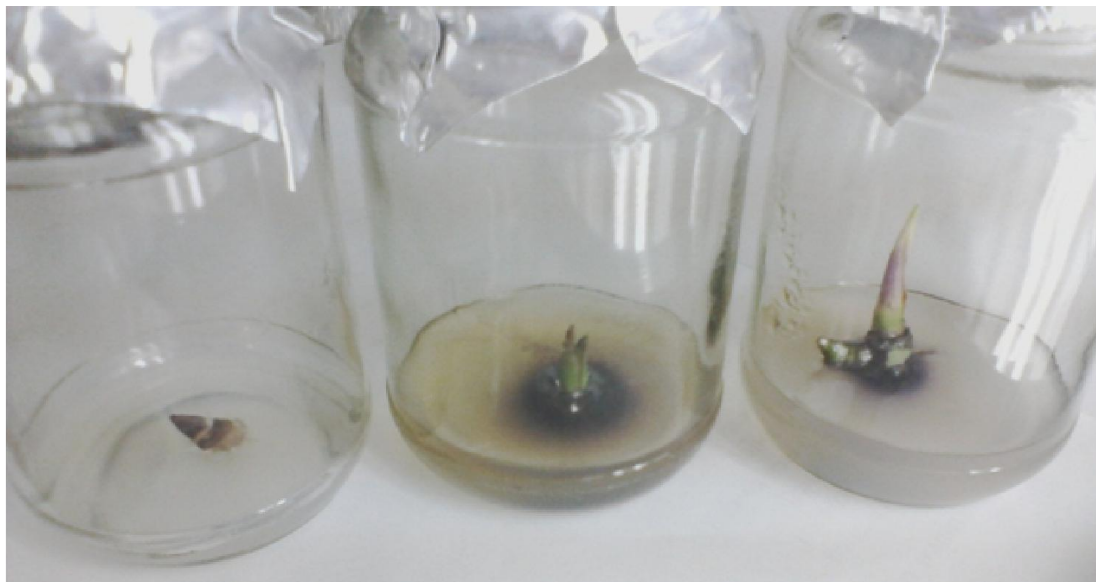


Рис. 3.2 Розвиток пагонів міскантусу в культурі *in vitro* з ризом

Звільнені від інфекції насіння, бруньки висаджують в пробірки на агаризоване живильне середовище МС без фітогормонів (контроль) та на селективне середовище МС з NaCl 1,5 % (або Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 %, або манітом 0,04 М). На кожний варіант висаджують по 25 експлантів, повторність – чотирикратна. Насіння та бруньки міскантусу пророщують за температури 24±2 °С, освітленні інтенсивністю 3-4 тис. лк і 16-годинному фотоперіоді.

Оцінка толерантності проводиться за кількістю пророслого насіння та росту бруньок міскантусу на 10-14 день культивування порівняно з контролем.

### **3.2 Оцінка толерантності пагонів міскантусу на селективних середовищах**

В подальшому утворені пагони переносять на модифіковане живильне середовище МС з додаванням кінетину – 1,0 мг/л, БАП – 0,5 мг/л і сахарози – 30 г/л (контроль) для клонування. Після отримання достатньої кількості пагонів, кожен генотип висаджують на селективні живильні середовища (рис. 3.3) та на контрольне середовище у 4-5 колб по 5 штук/колбу.



Рис. 3.3 Вплив маніту на міскантус

При проведенні обліків визначають забарвлення пагонів, життєздатність, підраховують кількість пагонів в зоні кущіння та вимірюють їх висоту кожні 14 днів після початку брунькування (рис. 3.4).



Рис. 3.4 Культивування пагонів міскантусу на сольовому стресі за різних концентрацій солі

### 3.3 Ризогенез міскантусу на селективних середовищах

Для визначення спроможності генотипів утворювати корені на селективному середовищі клоновані пагони переносять на модифіковане живильне середовище МС з додаванням ІОК – 0,5 мг/л, НОК – 0,5 мг/л і сахарози – 30 г/л та обраний селективний реагент різних концентрацій (рис. 3.5).

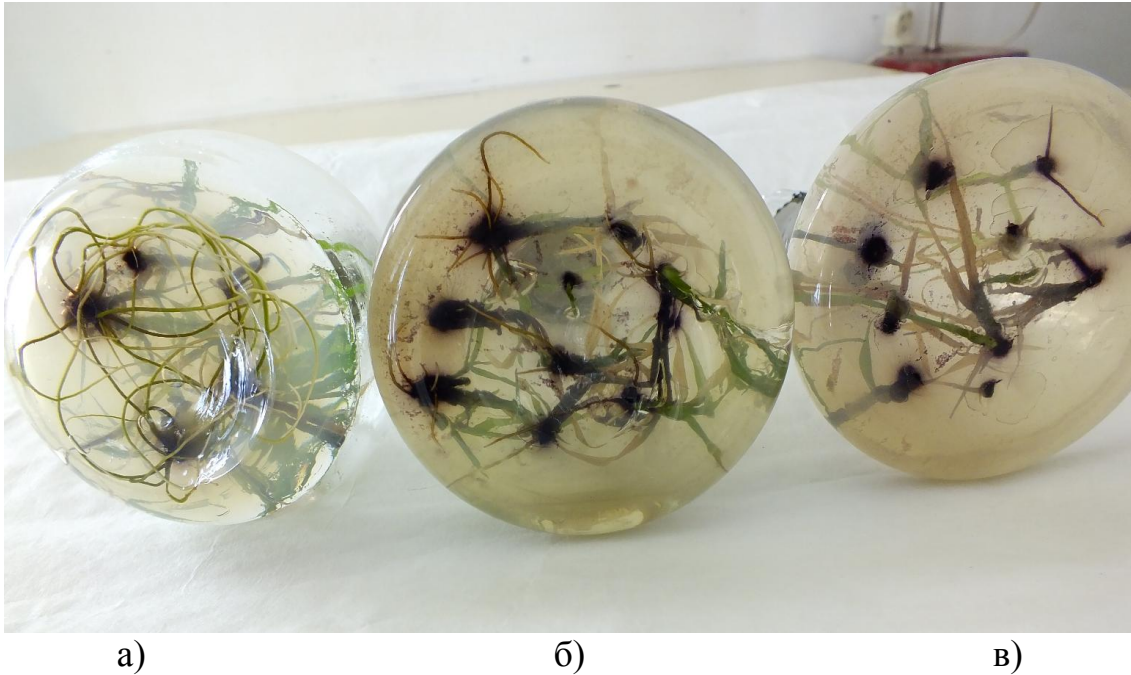


Рис. 3.5 Ризогенез міскантусу в культурі *in vitro* на сольовому стресі.  
Примітка: а – контроль, б – 1,0 % NaCl, в – 2,0 % NaCl

Для оцінки ризогенезу визначають параметри: довжина, кількість, маса коренів, відсоток укорінених пагонів та вміст сухої речовини укорінених *in vitro* рослин (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 Укорінення міскантусу на селективних середовищах

№ з/п	Селекційний номер	Варіант середовища	Укорінення рослин, %	Маса коренів, г/пагін	Середня довжина коренів, см	Кількість коренів, шт./пагін	Вміст сухої речовини укорінених <i>in vitro</i> рослин, %

Після завершення досліджень експериментальні клони переносять з культури *in vitro* в умови вегетаційного або польового дослідження, контролюючи умови вирощування рослин.

#### 4. ШКАЛА ОЦІНКИ ТОЛЕРАНТНОСТІ МІСКАНТУСУ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ *IN VITRO*

Для оцінки толерантності ліній міскантусу до абіотичних стресових факторів в умовах *in vitro* порівнюють показники росту пагонів на контрольному середовищі та на селективних середовищах. На основі оцінки фізіологічного стану пагонів виділяють 5 ступеней толерантності (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 Шкала оцінки толерантності міскантусу до абіотичних стресових факторів *in vitro*

Бал	Інтенсивність пригнічення росту та розвитку пагонів, %	Ступінь толерантності
9	81-100 % пагонів зеленого кольору і пагоноутворення більше або на рівні контролю	Висока толерантність
7	61-80 % пагонів зеленого кольору і пагоноутворення на рівні контролю	Толерантність
5	41-60 % пагонів зеленого кольору і пагоноутворення нижче контролю на 40-50 %	Помірна толерантність
3	21-40 % пагонів зеленого кольору і пагоноутворення відсутнє	Слабка толерантність
1	0-20 % пагонів зеленого кольору і пагоноутворення відсутнє	Відсутня толерантність

Толерантними вважаються ті лінії, які мають 7 і 9 балів та параметри наростання на селективних середовищах близькі до показників контрольного середовища. Інші лінії, які мають 1, 3 та 5 балів, не вважаються толерантними і не використовуються в подальших дослідженнях.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гументик М.Я. Перспективи вирощування багаторічних злакових культур для виробництва біопалива // Цукрові буряки. – 2010. – №4. – С. 21-22.
2. Ганженко О.М. Вплив варіювання глибини садіння ризомів міскантусу на їх проростання / О.М. Ганженко, М.Я. Гументик, В.М. Квак, П.Ю. Зиков // Біоенергетика. – 2013. – №1. – С. 36-38.
3. Роїк М.В. Біоенергетика в Україні: стан та перспективи розвитку / М.В. Роїк, В.Л. Курило, М.Я. Гументик, О.М. Ганженко // Біоенергетика. – 2013. – №1. – С. 5-10.
4. Karp A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement // Euphytica. – 1995. – V. 85. – P. 295-302.
5. Отбор *in vitro* селекционного материала пшеницы на устойчивость к биотическим факторам среды: Методические рекомендации / В.С. Гирко, С.И. Волощук, Т.П. Руденко и др. – Мироновка, 1996. – 44 с.
6. Van der Bulk R.W. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding – a review. – Euphytica. – 1991. – V. 56, – P. 269-285.
7. Zaiz I. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure / I. Zaiz, A. Chlyah, K. Safounji, M. Tuttahsen, H. Chlyah // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 2003. – V. 73. – P. 237-244.
8. Редько В.В. Особенности реакции сахарной свеклы на солевой стресс / В.В. Редько, В.И. Редько // В кн.: Генетические исследования сахарной свеклы. – К.: ВНИС, 1991. – С. 68-74.
9. Tarczynski M.C. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol / M.C. Tarczynski, R.G. Jensen, H.J. Bohnert // Science. – 1993. – V. 259. – P. 508-510.

*Наукове видання*

**Оцінка та отримання нових форм міскантусу  
толерантних до абіотичних стресових факторів в  
умовах *in vitro***

**Методичні рекомендації**

*Відповідальний за випуск – М.О. Коцар  
Комп'ютерний набір – М.О. Коцар*

Підписано до друку 14.12.2015 р. Формат 60x84/16.  
Папір Data Copy. Гарнітура Таймс. Друк циф. дуплікаттор.  
Ум. Друк. Арк. 1,69. Обл.-вид. арк. 1,04.  
Тираж 100. Зам. 17/03.  
Видавництво – «ІБКіЦБ НААНУ».  
Друк - ІБКіЦБ НААНУ.