

Національна академія аграрних наук України
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків

СТВОРЕННЯ ПОЛІПЛОЇДНИХ ФОРМ
МІСКАНТУСУ І ПРОСА ПРУТОПОДІБНОГО В
КУЛЬТУРИ IN VITRO
методичні рекомендації

Київ – 2015

УДК: 633: 57.044:581.143.6

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 «Створення поліплоїдних форм міскантусу і проса прутноподібного в культурі *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.....	6
2. ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА	7
2.1 Приготування маточних розчинів	7
2.2 Приготування живильного середовища (на 1 л розчину)	7
3. ПОЛІПЛОЇДИЗУВАННЯ МІСКАНТУСУ І ПРОСА ПРУТОПОДІБНОГО У КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	9
3.1 Отримання стерильної культури	9
3.2 Поліплоїдизування у культурі <i>in vitro</i>	12
3.3 Добір поліплоїдних форм	13
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	16

ВСТУП

У зв'язку з екологічними проблемами на планеті та зменшенням традиційних джерел енергії зріс інтерес до біоенергетики. В світовій практиці вона розвивається дуже швидко. У структурі відновлювальних джерел енергії у світі більше 50 % займає енергія, отримана з біомаси рослинного походження, яка становить 15 % всієї сукупної енергії. Обсяги виробництва твердого біопалива в Україні теж щорічно зростають [1]. Так, за 2013 рік було вироблено близько 1,5 млн. т. різних видів твердого біопалива. Сировиною для виробництва твердого біопалива здебільшого є відходи деревообробної промисловості, солома зернових та зернобобових культур, соняшникова лузга. Надходження такої сировини не є стабільним і носить сезонний характер. Тому важливим є розробка заходів пов'язаних із забезпеченням сировиною виробників твердого біопалива за рахунок вирощування нових видів багаторічних рослин, що дасть можливість стабільно отримувати біосировину [2]. Сировина біоенергетичних культур є також додатковим джерелом відновлюваної енергії і використовується в сучасних біотехнологіях переробки целюлози для отримання цукромістких субстратів і глюкози [3-5].

Ґрунтово-кліматичні умови більшості регіонів України є сприятливими для вирощування багаторічних енергетичних рослин групи С4, здатних інтенсивно трансформувати енергію сонця в енергомістку біомасу. Ці рослини не вимогливі до родючості ґрунту, не потребують значного використання добрив, запобігають ерозії ґрунту, сприяють збереженню та покращенню агроєкосистем, забезпечують низьку собівартість біомаси. Енергетичні рослини можна культивувати на малопродуктивних землях, яких в Україні налічується понад 8 млн. га [6].

Значні перспективи для культивування в Україні мають такі біоенергетичні культури, як міскантус і просо прутоподібне, вирощування і переробка яких дозволить аграрному сектору перетворитись із споживача

енергії на її виробника і створить умови для скорочення споживання природного газу [7, 8].

Враховуючи важливість цієї проблеми, необхідно розвивати селекцію енергетичних культур. У світовій селекційній практиці для прискорення її результативності використовують біотехнологічні методи, які дозволяють не тільки розмножувати та зберігати матеріали, створені традиційними методами, а й отримувати нові форми на основі передових досягнень біотехнології. До таких методів відноситься клональне мікророзмноження і поліплоїдизування клонів у культурі *in vitro*, що дає можливість розмножувати і змінювати рівень плоїдності вихідних генотипів. Отримані вихідні матеріали будуть використані селекціонерами при створенні нових сортів та гібридів енергетичних культур. Розроблені методи дозволять значно скоротити селекційний процес.

Розроблені методичні рекомендації дозволяють створювати поліплоїдні форми міскантусу і проса прутopodobного в культурі *in vitro*, розмножувати їх в необхідній кількості для проведення схрещувань та оцінки на продуктивність отриманих гібридів.

1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ

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

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

2. лабораторна кімната для приготування середовищ, забезпечена технічними і аналітичними терезами, рН-метром, ди- та бідистильаторами, 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, відотною вологістю повітря 70 %, освітленням 3-4 тис. лк., 16-годинним фотоперіодом, стелажми для розміщення колб і штативів з пробірками.

Інструменти і 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 ± 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 Na_2EDTA (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 α -нафтилоцтової кислоти (α -НОК), або 100 мг індолілоцтової кислоти (ІОК) розчиняють в 0,5-2 мл етанолу, підігрівають і доводять до об'єму 100 мл бідистильованою водою (концентрація 1 мг/мл);
2. 100 мг 6-бензиламінопурина (6-БАП) розчиняють у 1-2 мл 0,5 н HCl , підігрівають на водяній бані і доводять до об'єму 100 мл бідистильованою водою;
3. вітаміни – тіамін (B_1), піридоксин (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 мезо-інозиту, розчин сахарози. Вітаміни і гормони додають за допомогою піпеток із маточних розчинів;
5. рН живильного середовища доводять до 5,6-5,8 за допомогою 1 н розчинів HCl або NaOH, підігрівають, 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, поліплоїдизування і ризогенезу, закривають фольгою і стерилізують у автоклаві за умов 1,5 атм упродовж 60 хв.

3. ПОЛІПЛОЇДИЗУВАННЯ МІСКАНТУСУ І ПРОСА ПРУТОПОДІБНОГО У КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

3.1 Отримання стерильної культури

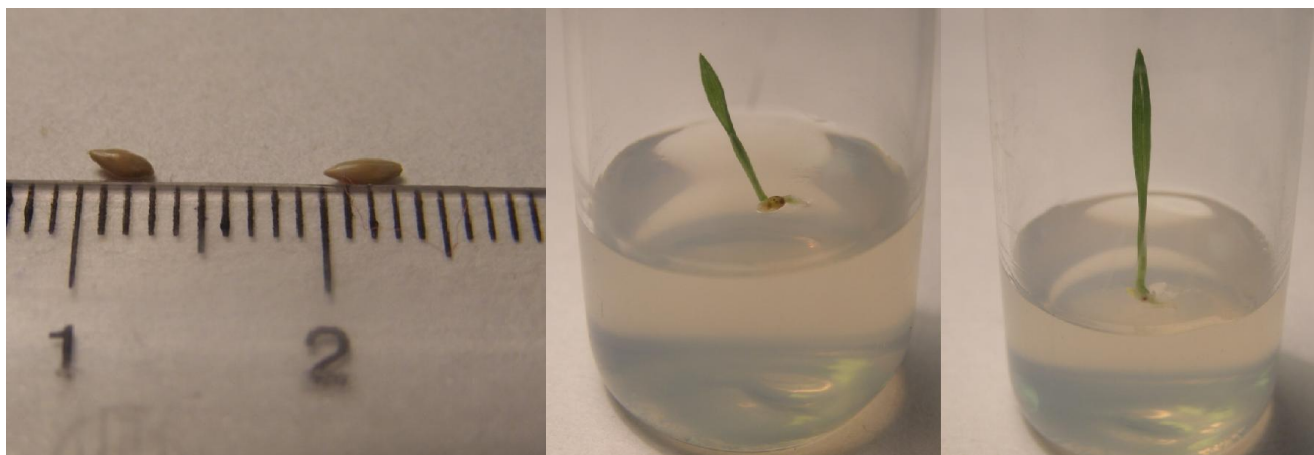
Для отримання звільненої від інфекції культури насіння міскантусу, його обробляють розчинами сулеми 0,1 % упродовж 30 хв або відбілювача «Білизна», масовою часткою 30 %, за експозиції 30-40 хв. Для підвищення ефекту стерилізації застосовують попередню обробку насіння слабким розчином KMnO_4 – 2-3 хв та ультрафіолетовим опроміненням 30 хв. Після стерилізації насіння промивають 4 рази з інтервалом 15-20 хв стерильною дистильованою водою (рис. 3.1). Вільне від інфекції насіння висаджують на агаризоване живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) без гормонів.



Рис. 3.1 Проростання насіння міскантусу в культурі *in vitro*

Для отримання звільненої від інфекції культури насіння проса прутіподібного, його обробляють у мильному розчині 30 хв, потім – розчином KMnO_4 0,005 % – 10 хв та ультрафіолетовим опроміненням упродовж 30 хв. Стерилізацію проводять розчином сулеми, масовою часткою 0,1 % з експозицією 40-50 хв або розчином відбілювача «Білизна» 30 % – 40-50 хв. Після стерилізації насіння проса прутіподібного, його промивають 4 рази

автоклаваною дистильованою водою упродовж 1 години. Вільне від інфекції насіння висаджують на агаризоване живильне середовище МС без гормонів (рис. 3.2).



а)

б)

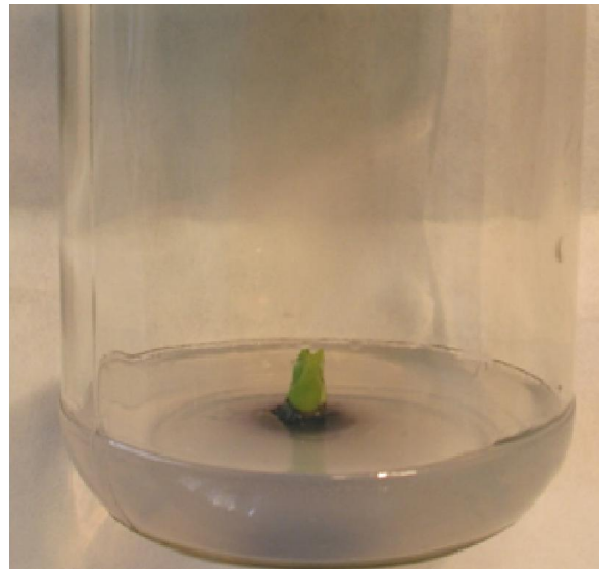
в)

Рис. 3.2 Введення в культуру *in vitro* насіння проса прутopodobного: а) насіння, б) проростання насіння *in vitro*, в) пагін.

Для отримання звільненої від інфекції культури бруньок видалених з ризом міскантусу, їх попередньо промивають у мильному розчині 30 хв, потім – розчином KMnO_4 0,005 % – 10 хв. Стерилізацію проводять розчином сулеми, масовою часткою 0,2 % з експозицією 60-70 хв. Зразки промивають 4 рази автоклаваною дистильованою водою упродовж 1 години. Вільні від інфекції бруньки висаджують на агаризоване живильне середовище МС без гормонів (рис. 3.3).



а)



б)

Рис. 3.3 Проростання бруньок міскантусу (а і б)

Культивування селекційних зразків проводять в термальному приміщенні за температури 24 ± 2 °С, освітленні інтенсивністю 3-4 тис. лк. і 16-годинному фотоперіоді. Після появи проростка міскантусу або проса прутopodobного в умовах стерильного приміщення їх виймають з колб, скальпелем відсікають насінину з коренем, пагін висаджують на модифіковане живильне середовище МС з додаванням мезо-інозиту – 100 мг/л, 6-бензиламінопурина (6-БАП) – 0,5 мг/л, кінетину – 1 мг/л та сахарози – 30 г/л для клонування (МС№1). Після проростання стерильних сплячих бруньок, їх звільняють від поверхневих захисних лусок та переносять на модифіковане живильне середовище для клонування (МС№1).

Через 3 тижні культивування асептичні бруньки переносять на свіже живильне середовище для розмноження, відділяючи новоутворені пагони. Після утворення від 30 до 50 пагонів кожного селекційного номера проводять їх поліплоїдизування на селективному середовищі з колхіцином різних концентрацій та експозицій в умовах культури *in vitro* (рис. 3.4).

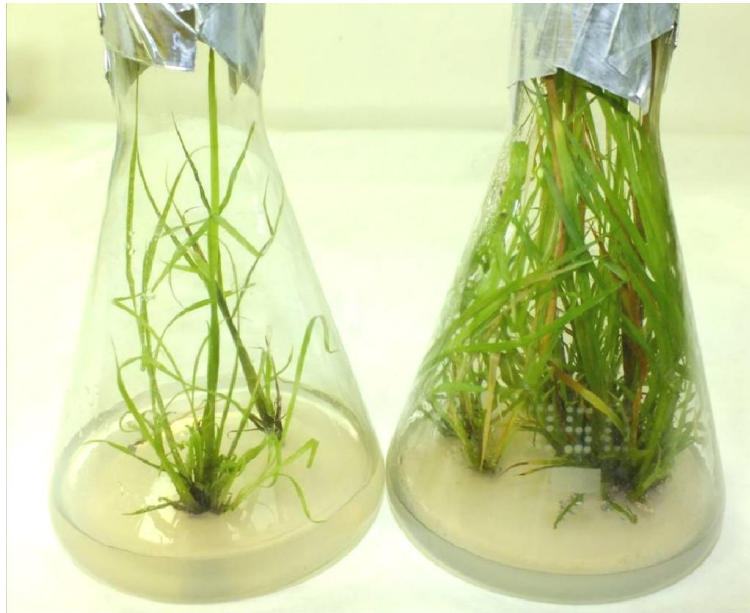
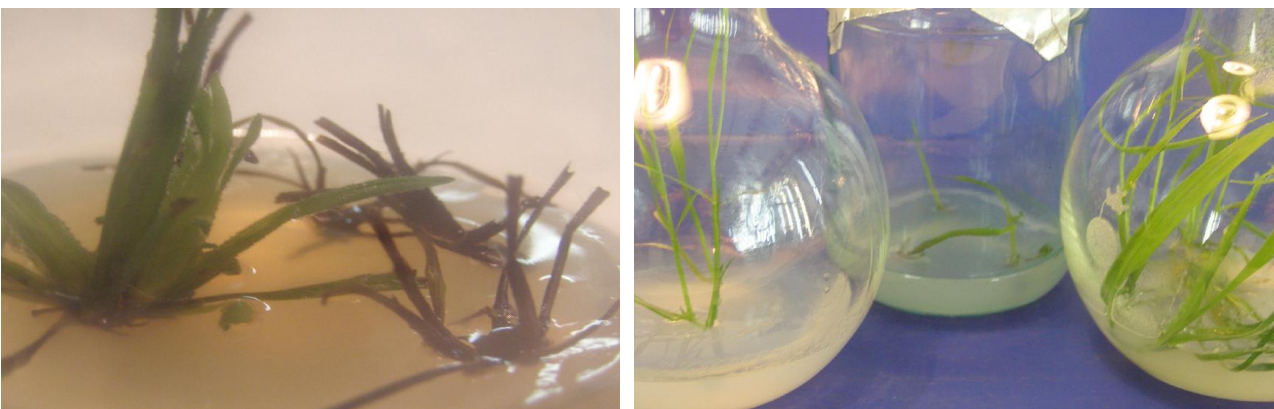


Рис. 3.4 Культура *Miscanthus sinensis* ($2n=38$)

3.2 Поліплоїдизування у культурі *in vitro*

Для поліплоїдизування пагонів використовують живильне середовище для клонування з додаванням колхіцину, масовою часткою 0,02 % (МС№2). У колбу з селективним середовищем для поліплоїдизування висаджують по 5 пагонів. Культивують пагони на селективному середовищі з колхіцином 12 годин за умов культурального приміщення за температури 24 ± 2 °С, освітленні інтенсивністю 3-4 тис. лк. і 16-годинному фотоперіоді (рис. 3.5).



а)

б)

Рис. 3.5 Культивування пагонів міскантусу (а) і
проса прутоподібного (б) на середовищі з колхіцином

Після оброблення культуральних пагонів колхіцином необхідною умовою є вивільнення мутагену з тканин пересаджуванням на свіже живильне середовище для клонування 2-3 рази з інтервалом культивування 1-2 тижні при цьому кожен пагін садять в окрему колбу і нумерують. При клонуванні позначають кожне вегетативне покоління колхіцинованого пагону.

3.3 Добір поліплоїдних форм

У результаті колхіцинування практично неможливо отримати рослину, яка б характеризувалась наявністю тільки тетраплоїдних тканин, оскільки частина клітин залишається диплоїдними, інші характеризуються високим рівнем плоїдності, що зумовлює складну химерну структуру рослини з різним співвідношенням тканин різної плоїдності. Зовні це проявляється у нерівномірному рості, а іноді у розвитку гіпертрофованих листків. Однак, химерність рослин не є стабільною, співвідношення комплексів тканин може змінюватись в онтогенезі рослин. Важливим є добір пагонів, які стабільно зберігають поліплоїдний рівень після дії колхіцину.

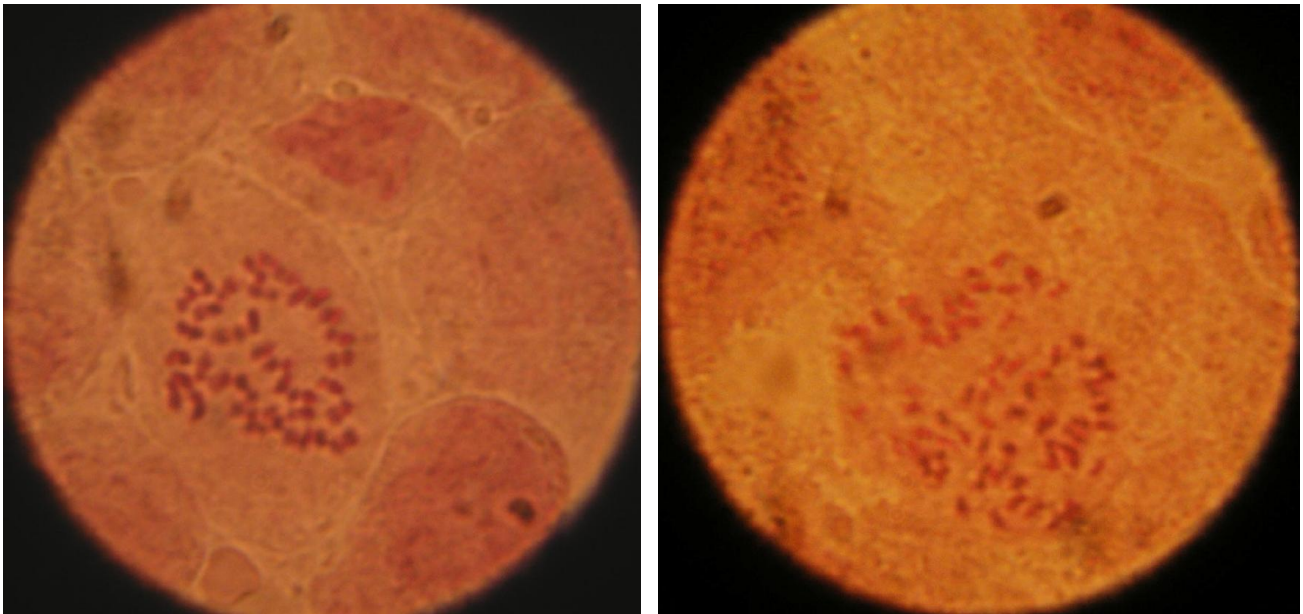
Після п'яти пасажів культивування пагонів міскантусу і проса прутоподібного проводять визначення рівня геному з використанням цитологічного методу аналізу плоїдності за кількістю хромосом у меристематичних клітинах точок росту [9].

Перед фіксацією рослинного матеріалу колби з пагонами ставлять на 12 годин у холодильник за температури +4 °С, потім в термальне приміщення за температури 24±2 °С та з освітленням інтенсивністю 3-4 тис. лк. – на 2,5-3 години.

Після цього у стерильних умовах ламінарної камери відділяють новоутворені пагони, а материнській пагін садять на середовище для розмноження. У новоутворених пагонах виділяють точку росту, яку занурюють у пробірку з водним розчином орто-оксихіноліну (масова частка 0,03 %) на 3 години за кімнатної температури. Після фіксації мітотичних поділів матеріал тричі промивають дистильованою водою з інтервалом 10-15 хв. Мацерацію

тканин проводять розчином спирту і соляної кислоти (дві частини 96 % етилового спирту і одна частина концентрованої соляної кислоти) – за експозиції 6 хв. Після мацерації промивають три рази дистильованою водою з інтервалом 10-15 хв. На предметному склі препарувальною голкою відокремлюють листочки, які прикривають точку росту (розміром 1-2 мм), і фарбують її у краплі розчину оцетоорсеїну (масова частка 3 %) від 3 до 4 хв. Після цього пофарбований об'єкт накривають покривним склом. Фільтрувальним папером легким надавлюванням видаляють зайву фарбу. Дерев'яною паличкою легким надавлюванням на покривне скло готують тимчасовий давлений препарат. Проглядають препарати під мікроскопом при збільшенні об'єктиву $\times 60$, $\times 90$ і окуляру 15 \times , 17 \times .

Залишають для клонального мікророзмноження тільки ті материнські пагони, вегетативне покоління яких визначено як поліплоїдне (рис. 3.6). Застосування клонального мікророзмноження дозволяє від одного пагону після обробки колхіцином за пасаж отримувати від 3 до 10 нових пагонів. В подальших пасажах кількість новоутворених пагонів наближається до показників вихідної форми.



а)

б)

Рис. 3.6 Метафазні пластинки *M. sinensis* ($2n=38$) (а)

та *M. sinensis* ($2n=4x=76$) (б)

Відібраний поліплоїдизований матеріал укорінюють на середовищі МС із додаванням α -нафтилоцтової (α -НОК) і індолілоцтової (ІОК) кислоти – 0,6-0,8 мг/л, сахарози – 30 г/л (МС№3) (рис. 3.7).

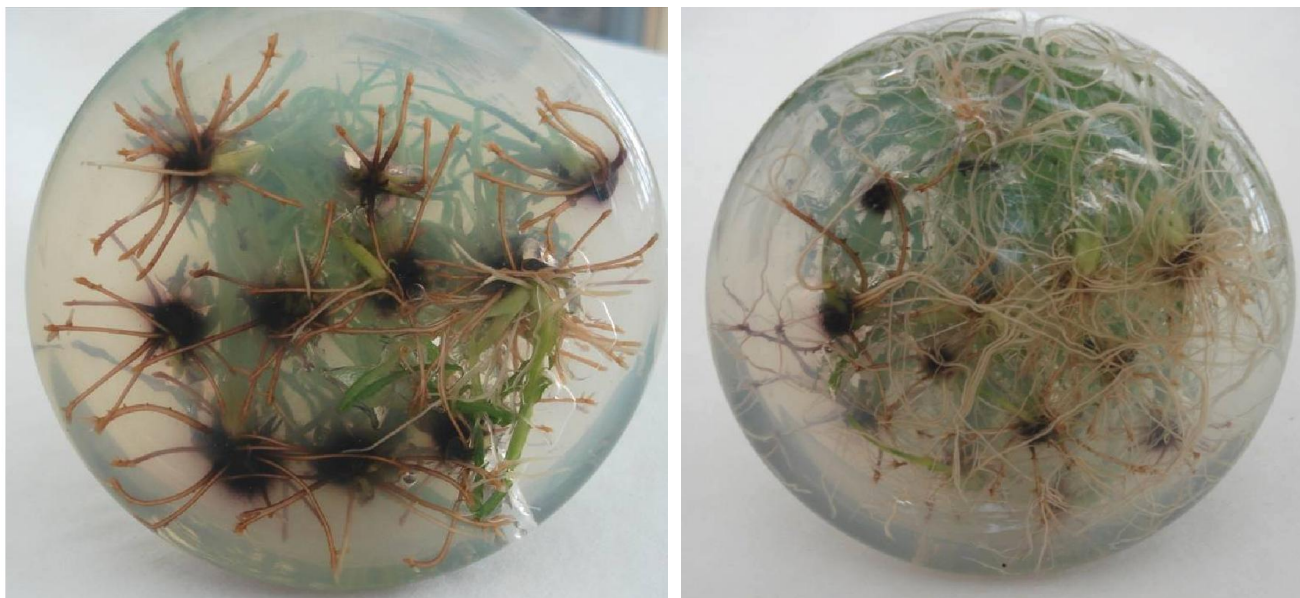


Рис. 3.7 Ризогенез в культурі *in vitro* міскантусу різних генотипів

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гументик М.Я. Урожайність біомаси міскантусу / М.Я. Гументик, В.М. Квак, О.І. Замойський // Біоенергетика. – №2, 2013. – С. 32-35.
2. Роїк М.В. Концепція виробництва і використання твердих видів біопалива в Україні / М.В. Роїк, О.М. Ганженко, В.Л. Тимощук // Біоенергетика. – №1 (5), 2015. – С. 5-8.
3. Голубева Е.С. Разработка комплекса микроорганизмов с высокой целлюлозолитической активностью / Е.С. Голубева, А.В. Брянская, Т.Н. Горячковская, С.Е. Пельтек // ВТСНТ. – 2013. – С. 35-38.
4. Joseph B. Binder Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass / Joseph B. Binder, Ronald T. Raines // Proceeding of the National Academy of Sciences. – U.S.A. – Vol. 107, 2010. – P. 4516-4521.
5. Sultana A. Development of agri-pellet production cost and optimum size / Sultana A., Kumar A. et al. // Bioresource technology. – Vol. 101 (14), 2010. – P. 5609-5621.
6. Роїк М.В. Агропромислові енергетичні плантації – майбутнє України / М.В. Роїк, О.Г. Ягольник // Біоенергетика. – № 2 (6), 2015. – С. 4 7.
7. Панасюк Б.Я. Альтернативні джерела енергії Вінничини // Біоенергетика. – №2 (4), 2014. – С. 18-19.
8. Гелетуха Г.Г. Біоенергетика в Україні: стан розвитку, бар'єри та шляхи їх подолання / Г.Г. Гелетуха, Т.А. Желєзна // Біоенергетика. – № 1(3), 2014. – С. 16-19.
9. Ярмолюк Г.И. Цитологические и цитогенетические исследования в селекции сахарной свеклы. / Г.И. Ярмолюк, Э.И. Ширяева. – К.: Наукова думка, 1982. – 54 с.

Наукове видання

**Створення поліплоїдних форм міскантусу і проса
прутоподібного в культурі *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. дуплікатор.
Ум. Друк. Арк. 1,69. Обл.-вид. арк. 1,04.
Тираж 100. Зам. 17/03.
Видавництво – «ІБКіЦБ НААНУ».
Друк - ІБКіЦБ НААНУ.