

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МЕЛЬНИЧУК ОЛЕКСАНДР ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 58.085

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОДЕРЖАННЯ ПОЛІПЛОЇДНИХ ЛІНІЙ МІСКАНТУСУ ГІГАНТСЬКОГО
(*MISCANTHUS* × *GIGANTEUS* GREEF ET DEU.) В УМОВАХ *IN VITRO* З
ВИКОРИСТАННЯМ АНТИМІТОТИЧНИХ СПОЛУК
ДИНІТРОАНІЛІНОВОГО РЯДУ**

03.00.20 — біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

О. В. Мельничук

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, академік НАН України
Ярослав Борисович Блюм

Київ-2020

АНОТАЦІЯ

Мельничук О. В. Одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антими́тотичних сполук динітроанілінового ряду. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 — біотехнологія.— Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена розробці ефективних методів одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антими́тотичних сполук динітроанілінового ряду з низькою фітотоксичністю.

За допомогою методів *in silico* проведено скрінінг ряду новосинтезованих динітроанілінових сполук на спорідненість до α -тубуліну міскантусу. Здійснено реконструкцію та верифікацію просторової структури молекули α -тубуліну міскантусу. Проведено оцінку здатності нових та широко вживаних сполук динітроанілінового ряду утворювати ліганд-білкові комплекси з α -тубуліном, успадкованим від *M. sinensis* (Q70ZL7).

Серед 83 досліджених в роботі динітроанілінів, за критерієм стабільності комплексів з α -тубуліном та рівнем фітотоксичності відібрано 6 найбільш перспективних сполук для подальшого використання у дослідях з поліплоїдизації рослин роду *Miscanthus*, а саме: 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін; N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін; N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін; N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид; 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид та {2-[4-(2,4-дихлорфеніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид. При виборі сполук для подальшого застосування у поліплоїдизації

міскантусу гігантського, враховували такий критерій як рівень фітотоксичності, дослідження якого були попередньо проведені в нашій установі.

За результатами досліджень розроблено та удосконалено ефективні методики ведення міскантусу гігантського в культуру *in vitro*, які дозволяють використання адвентивних бруньок ризом як експлантів. Розроблена технологія дозволяє одержати 82,2 % стерильних експлантів. Також підібрано оптимальні умови індукції калюсогенезу з використанням різних експлантів *M. x giganteus* та наступної регенерації рослин.

Було проведено поліплоїдизацію *M. x giganteus* шляхом культивування асептичних пагонів в умовах *in vitro* на середовищах доповнених динітроанілінами. Використовували як наведені вище сполуки, так і референтні динітроаніліни (трифлюралін та оризалін). З метою вивчення впливу фітотоксичності на виживання експлантів та здатності сполук індукувати поліплоїдію міскантусу використовували різні концентрації антимітотичних речовин: 3, 5, 10, 25 та 50 мкМ, а також різну тривалість обробки: 7 та 14 діб.

Встановлено, що трифлюралін та оризалін мають високий рівень фітотоксичності порівняно з новосинтезованими сполуками. Так, при використанні останніх речовин в середовищах для мікроклонального розмноження пагонів протягом перших 14 діб у концентрації 50 мкМ рівень виживання експлантів коливався в межах від 83,3 % до 91,6 %, що істотно вище, ніж при використанні вже відомих сполук. При використанні яких у такій концентрації виживання експлантів на 30 добу після початку обробки становило 8,3% як у варіантах з оризаліном, так і з трифлюраліном. Показано, що додавання оризаліну та трифлюраліну в середовище призводить до пригнічення росту рослин, викликає деформації та викликає загибель експлантів міскантусу гігантського.

Проведено визначення рівнів плоїдності отриманих ліній. Для обрахунку кількості хромосом в ядрах клітин отриманих ліній міскантусу гігантського використовували апекси активно ростучих коренів з молодих поодиноких пагонів. Контрольні рослини, які належать до вихідного генотипу, що використовували у

дослідженні, мали стандартну кількість хромосом, властиву триплоїдній формі: $2n=57$. В результаті проведених цитологічних досліджень відібрано 43 поліплоїдні лінії міскантусу гігантського. Ядра клітин відібраних поліплоїдних ліній мали 114 хромосом, що є властивим для гексаплоїдів *M. x giganteus*: $2n=114$. Крім того, спостерігалась поява анеуплоїдних форм. Так, серед ліній, які культивувалися на середовищах, доповнених трифлюраліном у концентрації 10 мкМ, тривалістю 14 діб виявлено лінію, яка має збільшену кількість хромосом в результаті проведення поліплоїдизації в умовах *in vitro*: $2n=76$. Таким чином, встановлено, що досліджувані динітроаніліни, так само як і класичні, здатні індукувати поліплоїдію *M. x giganteus*, та не характеризуються високим фітотоксичним впливом на рослини, що істотно позначається на виживанні та мікроклональному розмноженні експлантів.

Досліджені лінії міскантусу гігантського було вегетативно розмножено та адаптовано до умов відкритого ґрунту. За стандартними методиками проведено вивчення фенотипових особливостей поліплоїдних ліній міскантусу гігантського. Для цього визначали такі важливі морфометричні показники, як висота рослин, структура, кількість пагонів на рослину, кількість листків на стеблах та кількість ризом на кореневищах. Також досліджували якісні показники біомаси. Визначали сиру та суху масу рослин, вміст сухих речовин та золи, вміст загального цукру та моноцукрів, енергетичну цінність біомаси тощо. За отриманими результатами проводили розрахунки виходу біоетанолу. Встановлено, що всі отримані поліплоїдні лінії міскантусу гігантського істотно відрізнялися між собою за досліджуваними морфологічними та біохімічними показниками.

За таким показником як кількість пагонів на рослину лінія 108 переважала інші. Кількість пагонів для неї в середньому за 2 роки становила 24 шт. Також ця лінія мала один з найбільших показників по висоті рослин. Найвищими за даним показником були лінії 108 та 202, середня висота рослин для яких була 211 ± 10 та 223 ± 11 см, відповідно. За результатами дослідження лінія 108 мала найкращі результати за кількістю ризом на кореневищах, в середньому за два роки цей

показник становив 21, в той час як триплоїдний *M. × giganteus* (контроль) мав лише 9 ризом.

При проведенні аналізу накопичення біомаси у надземній частині рослин нових ліній з підвищеним рівнем плоїдності встановлено, що лінія 108 перевищувала інші варіанти за даним показником. Вегетативна маса даної лінії складала 771 г сирої маси рослин, суха маса становила 499 г. Дещо нижчою була біомаса наземної частини рослин лінії 202, яка складала 734 г сирої маси рослин, проте, суха маса рослин цієї лінії мала найвищі показники серед досліджуваних ліній. Триплоїдна форма *M. × giganteus* (контроль) мала відносно невисокі показники: 393 г сирої маси рослин та 345 г сухої маси рослин.

За вмістом сухих речовин всі досліджені поліплоїдні лінії поступались триплоїдній формі міскантусу гігантського (контроль), тут вміст сухих речовин у надземній біомасі складав 87,99 %. Шляхом термічного озолення біомаси встановлено, що вміст золи в біомасі лінії 108 становив 3,5 %, перевищуючи контроль на 0,5 %, тоді як порівняно невисокі показники за часткою золи мали лінія 202 (3,0 %) та лінія 209 (3,1 %).

Найвищий загальний вміст цукрів серед досліджених ліній мали зразки поліплоїдної лінії 109 ($12,9 \pm 1,34$ %). Рослини лінії 156 мали найвищі показники за вмістом моноцукрів ($5,67 \pm 0,66$ %).

Найвищий показник енергетичної цінності мала лінія 202, на рівні 3953 ± 19 ккал, що перевищувало показники контрольних рослин міскантусу гігантського (триплоїдна форма) на 46 ккал.

За розрахунками теоретичного виходу біоетанолу встановлено, що в порівнянні з контролем поліплоїдні лінії 202 та 108, дозволяють отримати до 14,2% більше біоетанолу з 1 га площі за рахунок більшої врожайності біомаси.

Таким чином, поліплоїдні лінії 108 та 202 характеризувались найкращими показниками маси надземної частини рослин, висоти рослин, кількості ризом на кореневищах рослин, кількості листків на стеблі, за вмістом сухих речовин та ін. Також значний інтерес представляє лінія 109, яка також переважає вихідну форму за всіма розглянутими показниками, але поступається лініям 108 та 202 за рівнем

накопичення біомаси. Крім зазначеного вище, під час проведення досліджень лише на рослинах отриманої гексаплоїдної лінії 108 спостерігалось викидання волотей.

Вперше проведено оцінку можливості використання новосинтезованих похідних динітроанілінів з низькою фітотоксичністю та відібрано серед них сполуки для проведення поліплоїдизації міскантусу гігантського. Встановлено, що такі похідні динітроанілінів як: 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін; N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін; N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін; N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид; 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид та {2-[4-(2,4-дихлорфеніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид можуть бути використані для застосування в біотехнологічних методиках для збільшення хромосомних чисел у рослинах. Експериментально підтверджено, що відібрані сполуки класу динітроанілінів мають істотно нижчий рівень фітотоксичності в порівнянні з класичними динітроанілінами (оризалін та трифлюралін) при проведенні поліплоїдизації міскантусу гігантського в умовах *in vitro*.

Отримані поліплоїдні лінії *M. × giganteus* мають практичну цінність як для безпосереднього використання як сировини для біопалива, так і для подальшого залучення до селекційного процесу, оскільки є важливим джерелом збільшення генетичного різноманіття виду та роду в цілому. Запропановано використання ряду новосинтезованих динітроанілінів як для отримання поліплоїдів міскантусу гігантського, так і інших представників цього роду, для розробки методів поліплоїдизації інших рослин, для яких низька ефективність (колхіцин) та висока фітотоксичність (оризалін, трифлюралін) поширених антимітотичних сполук є лімітуючими факторами і є критичними.

Ключові слова: міскантус, *M. × giganteus*, поліплоїдизація, *in vitro*, динітроаніліни, α -тубулін, фітотоксичність, гексаплоїди, біоконверсія, біоетанол.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Баєр О.О., Шиша О.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Поліплоїдизація *Miscanthus sinensis* за допомогою динітроанілінів з низькою фітотоксичністю. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 228–233. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1271> (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).
2. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Rakhmetov D.B., Rakhmetova S.O., Yemets A.I., Blume Ya.B. The technology used for synthetic polyploid production of *Miscanthus* as cellulosic biofuel feedstock. *The Open Agriculture Journal*. 2020. V. 14. №1. P. 3–12. DOI: 10.2174/1874331502014010164. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).
3. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Rakhmetov D.B., Shysha O.M., Rakhmetova S.O., Yemets A.I., Blume Ya.B. Induction of polyploidy in giant miscanthus (*Miscanthus* × *Giganteus* Greef Et Deu.). *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. 2020. V.74. № 3. P. 206–214. DOI: 10.2478/prolas-2020-0032. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті). **Q3**
4. Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Баєр О.О., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Біометричні та біохімічні особливості нових ліній *M. × giganteus* з підвищеним рівнем плоїдності. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 281–286. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).
5. Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Рахметов Д.Б., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Скринінг нітроанілінів на спорідненість до α -тубуліну міскантусу для їх використання у поліплоїдизації рослин цього роду. *Фактори експериментальної*

еволюції організмів. 2016. Т. 18. С. 212–216. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

6. 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*. 2015. Т. 17. С. 209–212. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

7. 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 НУБіП України*. 2015. № 8. С. 57. http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/8.pdf. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

8. Мельничук О.В., Ожередов С.П., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Одержання поліплоїдних рослин міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антимітотичних сполук динітроанілінового ряду. *Сучасні проблеми біології, екології та хімії*: матеріали V-ї міжнар. наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 26 квітня 2017 р. З., 2017. С. 231.

9. Мельничук О.В., Ожередов С.П., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Поліплоїдизація міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антимітотичних сполук динітроанілінового ряду. *Біологія рослин та біотехнологія*: матеріали III-ї конф. молодих учених., м. Київ, 16-18 травня 2017р. К., 2017. С. 41.

10. Мельничук О.В., Ожередов С.П., Ємець А.І., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б. Поліплоїдизація міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) із використанням нових антимітотичних сполук динітроанілінового ряду. *Молодь і поступ біології*: матеріали XIV-ї міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів., м. Львів, 10–12 квітня 2018 р. Л., 2018. С. 59.

11. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Shysha O. O., Rakhmetov D. B., Rakhmetova S. O., Yemets A.I., Blume Ya.B. Induction of polyploidy in giant miscanthus (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) as a raw material for biofuel. *VII Baltic genetics congress*, Riga, Latvia, October 24–27, 2018. P. 37.

12. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Bayer O.O., Shisha O.M., Rakhmetov D.B., Rakhmetova S.O., Yemets A.I., Blume Ya.B. Polyploidy induction in giant miscanthus (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.). *Agrobiodiversity for improve the nutrition, health and quality of human and bees life: IV International Scientific Conference*, Nitra, Slovakia, September 11–13, 2019. P. 46.

SUMMARY

Melnychuk O. V. Obtaining of giant miscanthus polyploids (*Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu.) *in vitro* using compounds of dinitroanilines class. – Manuscript.

The thesis for a candidate of biological science degree in speciality 03.00.20 biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The thesis is devoted to the development of efficient methods of obtaining giant miscanthus polyploid lines (*Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu.) *in vitro* using antimetabolic compounds of the dinitroanilines class with low phytotoxicity.

In silico methods were used for screening of a range of newly synthesized dinitroaniline compounds on their affinity to miscanthus α -tubulin. Reconstruction and verification of the spatial structure of miscanthus α -tubulin molecule were performed. The ability of newly synthesized as well as widely used compounds of dinitroanilines class to form ligand-protein complexes with α -tubulin inherited from *M. sinensis* (Q70ZL7) was evaluated.

According to the criterion of stability of the complexes with α -tubulin and phytotoxicity level, among 83 studied, 6 the most promising dinitroanilines were selected for further use in experiments on polyploidization of plants belonging to genus *Miscanthus*, and namely: 4-methylsulfonyl-2,6-dinitroaniline; N'-(N''-[2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl] propyl)morpholine; N,N'-bis-(2-nitro-phenyl)-hexylene-1,6-diamine; N'-[2,6-dinitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]ethane-1,2-diamine; hydrochloride; 1-{3-[2-(2,6-dinitro-4-trifluoromethyl-phenylamino)-ethyl]-4-methyl-2-phenylamino-2,3-dihydro-thiazole-5-yl}-ethanol hydrochloride; {2-[4-(2,4-dichlorophenyl)-2-phenylamino-thiazole-3-yl]-ethyl}-(2,6-dinitro-4-trifluoromethyl-phenyl)-amine hydrochloride. During selection of compounds for further use in the polyploidization of giant miscanthus, such parameter as phytotoxicity level has been considered as well.

Research of newly synthesized dinitroanilines on their phytotoxicity level was previously conducted in our institute.

According to the results of research, effective methods of giant miscanthus *in vitro* culture establishment have been developed and improved, which allow utilization of adventitious buds as explants. The developed method allows obtaining 82.2% of sterile explants. Also, the optimal conditions for induction of callusogenesis using different explants of *M. x giganteus* and subsequent plant regeneration were determined.

Polyploidization of *M. x giganteus* was conducted by culturing of aseptic shoots *in vitro* on media supplemented with dinitroanilines. Both, newly synthesized compounds listed above, and widely used dinitroanilines (trifluralin and oryzalin) were used in the work. In order to study the effect of phytotoxicity on explant survival rate and ability of compounds to induce polyploidy in miscanthus, different concentrations of antimetabolic agents were used: 3, 5, 10, 25 and 50 μM , as well as different treatment durations: 7 and 14 days.

It has been established that widely used dinitroanilines have significantly higher phytotoxicity level in comparison with newly synthesized dinitroaniline compounds. Thus, when newly synthesized dinitroanilines were used in media for shoots micropropagation during the first 14 days at concentration of 50 μM , the survival rate of explants ranged from 83.3% to 91.6%, which is significantly higher than when widely used compounds were applied. When widely used dinitroanilines were used in such concentration, the survival rate of explants in 30 days after start of the treatment was 8.3% for both compounds (oryzalin and trifluralin). It has been shown that addition of oryzalin and trifluralin to the medium inhibits plant growth, causes deformations and leads to the death of explants.

Ploidy level of obtained lines was determined. Apexes of actively growing roots from young single shoots were used for counting of the chromosome number in the cell nuclei of obtained lines. Control plants belonging to the original *M. x giganteus* genotype used in the study had standard number of chromosomes that matches triploid form: $2n=57$. As a result of cytological studies, 43 polyploid lines were found. The cell nuclei of polyploid lines had 114 chromosomes, which matches *M. x giganteus*

hexaploids ($2n=114$). In addition, aneuploid forms were observed. Thus, a line with increased chromosome number ($2n=76$) was detected among those from variant with trifluralin at concentration $10 \mu\text{m}$ for 14 days. It was found that newly synthesized dinitroanilines, as well as widely used are able to induce polyploidy of *M. x giganteus*. Moreover, newly synthesized compounds do not have high phytotoxicity level, which significantly affects the survival rate and micropropagation of explants.

Obtained polyploid lines of giant miscanthus were vegetatively propagated and adapted for growth in open soil conditions. The phenotypic features of giant miscanthus polyploid lines were studied according to standard methods. Important morphometric parameters such as: plant height, structure of plants, number of shoots per plant, number of leaves on stems and number of rhizomes have been evaluated. Qualitative biomass parameters were studied by biochemical methods. Raw and dry weight of plants, dry matter and ash content, total sugar and monosaccharides content and energy value of biomass were determined. Obtained results were used to calculate the theoretical ethanol yield. It was found that all obtained polyploid lines of giant miscanthus differed significantly in all studied morphophysiological and biochemical parameters.

In number of shoots per plant line 108 prevailed over others. The number of shoots for this line averaged 24 for 2 years. Also, this line was one of the leaders in plant height. The highest results were observed in lines 108 and 202, the average height of plants comprised 211 ± 10 and 223 ± 11 cm, respectively. According to the study, hexaploid line 108 showed the best results in the number of rhizomes, on average for two years this parameter was 21, while triploid *M. x giganteus* (control) had only 9 rhizomes.

In such parameter as biomass accumulation in the aboveground part of plants line 108 showed the best results. The vegetative mass of this line was 771 g of raw plant weight and dry weight was 499 g. Raw plant weight of line 202 was 734 g, however, the dry mass of plants of this line had the highest rates among the studied lines. The triploid form of *M. x giganteus* (control) had relatively low results, 393 g of raw plant mass and 345 g of dry plant mass.

In terms of dry matter content, all studied polyploid lines were inferior to the triploid form of giant miscanthus (control), where the dry matter content in aboveground biomass was 87.99%. Results of the study show that ash content in biomass of line 108 was 3.5%, exceeding the control by 0.5%. While line 202 (3.0%) and line 209 (3.1%) had relatively low ash content.

Samples of polyploid line 109 ($12.9 \pm 1.34\%$) had the highest total sugar content among the studied lines. Plants of line 156 demonstrated the highest content of monosaccharides ($5.67 \pm 0.66\%$).

The highest results in energy value was observed in line 202, as high as 3953 ± 19 kcal, which exceeded the results of control plants (triploid miscanthus) by 46 kcal.

Calculations of theoretical ethanol yield revealed that polyploid lines 202 and 108 can increase ethanol yield up to 14.2% per 1 ha compare to the control, owing to higher biomass yield of these lines.

According to the results of the study, best performing polyploidy lines appeared to be line 108 and line 202. They showed best results in such parameters as mass of the aboveground part of plants, plant height, number of rhizomes, number of leaves on the stem and dry matter content. Also line 109 is of great interest, which also outperforms the original form in all considered parameters, but is inferior to lines 108 and 202 in terms of biomass accumulation. In addition, emergence of panicles was observed in polyploid plants of line 108 only.

For the first time, was evaluated possibility of using newly synthesized dinitroaniline compounds with low phytotoxicity for polyploidization of giant miscanthus. It has been established that newly synthesized dinitroanilines can be used in biotechnology to increase chromosome number in plants. It was experimentally proved that selected newly synthesized compounds of dinitroanilines class have a significantly lower phytotoxicity level compared to widely used dinitroanilines (oryzalin and trifluralin) during *in vitro* polyploidization of *M. x giganteus*.

Obtained in the study polyploid lines of *M. x giganteus* have practical value both for use as a raw material for biofuel and for involving in breeding as they are important source of increasing genetic diversity of the species and the genus as well. Thus,

selected newly synthesized dinitroanilines can be successfully used to induce polyploidy in *M. x giganteus* and other representatives of this genus, as well as for development of new methods of polyploidization of other plants, for which low efficiency (colchicine) and high phytotoxicity (oryzalin, trifluralin) of widely used antimitotic compounds are limiting factors.

Key words: miscanthus, *M. x giganteus*, polyploidization, *in vitro*, dinitroanilines, α -tubulin, phytotoxicity, hexaploids, bioconversion, bioethanol.

ЗМІСТ

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РОДУ МІСКАНТУС ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ В БІОТЕХНОЛОГІЇ	25
1.1. Таксономія, філогенез та поширення	26
1.2. Варіабельність хромосомних наборів та розмірів геномів	29
1.3. Поліплоїдія. Походження <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> та поліплоїдних <i>M.</i> <i>Sacchariflorus</i>	30
1.4. Анеуплоїди та В-хромосоми	32
1.5. Генотипування: генетична варіабельність та фітогеографія	32
1.6. Популяційна генетика та генетичне різноманіття	34
1.7. Зв'язок генотипу з фенотипом	36
1.8. QTL та порівняльна геноміка	36
РОЗДІЛ 2. МІСКАНТУС ЯК ПЕРСПЕКТИВНА ЕНЕРГЕТИЧНА КУЛЬТУРА	39
2.1. Вплив різних фракцій лігніну на ефективність оцукрювання у різних видів міскантусу	41
2.2. Оцінка якості біомаси <i>Miscanthus</i> як вихідної сировини для перетворення на різні біоенергетичні продукти	43
2.3. Стабільність складу клітинної стінки та ефективність сахарифікації міскантусу за різних умов середовища	45
2.4. Аналіз генетичної складності складу клітинної стінки міскантусу та якості біомаси для біопалива	47
2.5. Вплив посухи на ріст та якість міскантусу для виробництва біопалива	47
РОЗДІЛ 3. ПОЛІПОЛОЇДИЗАЦІЯ МІСКАНТУСУ	50
3.1. Методи поліплоїдизації рослин	52
3.2. Антимітотичні речовини для штучної індукції поліплоїдії	54
3.3. Штучні поліплоїди <i>Miscanthus</i> та гаплоїди	58

РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	68
4.1. Об'єкт досліджень	68
4.2. Матеріали використані в роботі	68
4.3. Методи досліджень	69
4.3.1. Структурно-біоінформатичний відбір перспективних сполук динітроанілінового ряду	69
4.3.1.1. Реконструкція просторової структури молекули α -тубуліну міскантусу	70
4.3.1.2. Докінг динітроанілінів у сайт зв'язування α -тубуліну	70
4.3.1.3. Методи оцінки ефективності зв'язування динітроанілінів з білковою мішенню	71
4.3.2. Введення міскантусе гігантського в культуру <i>in vitro</i>	72
4.3.3. Визначення плоідності отриманих ліній	74
4.3.4. Аналіз морфометричних та біохімічних показників	74
4.3.4.1. Вимірювання висоти поліплоїдних рослин	74
4.3.4.2. Обрахунок кількості пагонів на рослині	74
4.3.4.3. Обрахунок кількості листків на стеблах поліплоїдних рослин	74
4.3.4.4. Визначення кількості ризом у поліплоїдних рослин	74
4.3.4.5. Аналіз структури поліплоїдних рослин	75
4.3.4.6. Обрахунок надземної маси поліплоїдних ліній	75
4.3.4.7. Визначення вмісту сухої речовини в поліплоїдних рослинах	75
4.3.4.8. Визначення вмісту золи в поліплоїдних рослинах	75
4.3.4.9. Обрахунок енергетичної цінності біомаси поліплоїдних ліній	76
4.3.4.10. Визначення вмісту цукрів в поліплоїдних рослинах	77
4.3.5. Статистична обробка отриманих даних	78
РОЗДІЛ 5. СТРУКТУРНО-БІОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВЗАЄМОДІЇ ДИНІТРОАНІЛІНІВ З α -ТУБУЛІНОМ МІСКАНТУСУ	79
5.1. Побудова просторової моделі молекули α -тубуліну міскантусу	79
5.2. Докінг перспективних похідних динітроаніліну у сайт їх зв'язування на поверхні молекули α -тубуліну міскантусу	82

5.3. Оцінка рівня спорідненості досліджуваних сполук до α -тубуліну <i>Miscanthus</i>	84
РОЗДІЛ 6. ВВЕДЕННЯ МІСКАНТУСУ ГІГАНТСЬКОГО В КУЛЬТУРУ <i>in vitro</i> ТА ОТРИМАННЯ ЙОГО ПОЛІПЛОЇДНИХ ЛІНІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ДИНІТРОАНІЛІНІВ	89
6.1. Введення міскантусу гігантського в культуру <i>in vitro</i>	89
6.2. Розробка технології поліплоїдизації міскантусу гігантського з використанням динітроанілінів	94
6.3. Оцінка виживання експериментальних ліній після поліплоїдизації	99
6.4. Аналіз хромосомних чисел отриманих поліплоїдних ліній	104
РОЗДІЛ 7. ФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТКА ПОЛІПЛОЇДНИХ ФОРМ МІСКАНТУСУ ТА ЇХ ПРОДУКТИВНІСТЬ	110
7.1. Морфометричні характеристики поліплоїдних ліній рослин	110
7.2. Структура рослин та надземна маса поліплоїдних ліній рослин	114
7.3. Біохімічна характеристика отриманих поліплоїдних рослин (вміст сухої речовини, вміст золи)	116
7.4. Вміст цукрів та енергетична цінність біомаси поліплоїдних ліній	117
7.5. Розрахунок виходу біоетанолу	118
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	124
ВИСНОВКИ	134
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	137
ДОДАТКИ	166

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ

- БАП** - 6-бензиламінопурин
- НОК** - 1-нафтилоцтова кислота
- ДМСО** - диметилсульфоксид
- Мbp** - мільйон пар нуклеотидів
- Gbp** - мільярд пар нуклеотидів
- ДНК** - дезоксирибонуклеїнова кислота
- ФЕ** - фітотоксичний ефект
- ДАPI** - 4,6 -діаміно-2-феніліндол
- Сполука 1** - 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін
- Сполука 2** - N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін
- Сполука 3** - N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін
- Сполука 4** - N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид
- Сполука 5** - 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид
- Сполука 6** - {2-[4-(2,4-дихлор-феніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Серед енергетичних культур все більшої популярності набирає міскантус гігантський (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) (Clifton-Brown *et al.*, 2019; Макаренко, 2012; Ягольник, 2015). За оптимальних умов вирощування його врожайність може сягати 39,9 т/га сухої маси (Bilandzija *et al.*, 2018). *M. × giganteus* є стерильним алотриплоїдом, що утворився внаслідок гібридизації між *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*. Наслідками стерильності цього виду є те, що всі комерційні плантації *M. × giganteus* представлені клонованими рослинами одного генотипу (Clifton-Brown *et al.*, 2008), чим практично унеможлиблюється ведення селекційної роботи з поліпшення цього виду традиційними методами.

Проблема такої стерильності може бути вирішена шляхом штучної поліплоїдії, яка є потужним методом біотехнології рослин та використовується на практиці з 30-х років минулого століття (Blakeslee and Avery, 1937). Відомо, що поліплоїдні рослини здебільшого мають перевагу над диплоїдними формами, маючи кращі показники продуктивності (Yemets and Blume, 2008), і тому широко використовуються у сільському господарстві (Zhang *et al.*, 2019).

Основним інструментом для індукції поліплоїдизації є сполуки, які безпосередньо взаємодіють з тубуліном, основною білковою складовою мікротрубочок, та здатні при цьому порушувати або повністю блокувати поділ клітини (Dane, 2005; Sheval, 2008). Основною сполукою, яка ще з піонерських робіт використовувалась для штучної поліплоїдизації, є колхіцин, хоча до антимітотичних агентів належить широкий спектр сполук, які набули поширення як гербіциди і фунгіциди та як антипротозойні, антигельмінтні та протипухлинні препарати (Брицун, 2009, Ємець, 2007). Серед них значний інтерес мають похідні динітроаніліну, які на відміну від речовин трополонового ряду, до яких саме належить колхіцин, та алкалоїдів *Vinca* (вінбластин і вінкристин), характеризуються високим рівнем спорідненості саме до тубуліну рослинного та протозойного походження (Нипорко *та ін.*, 2009). Саме завдяки цій особливості

були здійснені ефективні спроби використати такі сполуки динітроанілінового ряду, як оризалін та трифлуралін, для поліплоїдизації рослин, в тому числі і міскантусу (Zilbervarg *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2009). Оскільки поліплоїдизація стерильних триплоїдних форм цієї культури дозволяє отримати гексаплоїдні рослини, здатні продукувати життєздатне насіння, що є надзвичайно важливим для розширення генетичного різноманіття стерильного алотриплоїда *M. × giganteus*, актуальним є покращення технології поліплоїдизації з метою підвищення її ефективності. Це пов'язано з тим, що вживані з цією метою динітроанілінові сполуки характеризуються достатньо високим рівнем фітотоксичності. Отже, пошук нових, менш токсичних речовин серед цього класу сполук дозволив би значно покращити ефективність поліплоїдизації не лише міскантусу, але й інших видів рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційну роботу виконано у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України». Дослідження проведені у рамках цільових комплексних програм наукових досліджень НАН України «Створення високоврожайних поліплоїдних ліній міскантусу як сировини для отримання біоетанолу та характеристика їх продуктивності» (номер держреєстрації 0113U004719, 2013-2017 рр.) та «Створення високоврожайних поліплоїдних ліній міскантусу як сировини для отримання біоетанолу та характеристика їх продуктивності» (номер держреєстрації 0118U004719, 2018-2022 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи була розробка ефективного методу поліплоїдизації міскантусу гігантського (*Miscanthus x giganteus*) в умовах *in vitro* за допомогою перспективних антимиотичних сполук динітроанілінового ряду зі зниженою фітотоксичністю та отримання поліплоїдних ліній цієї біоенергетичної культури для подальшої селекційної роботи.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Проаналізувати та узагальнити дані щодо відомих послідовностей α -тубуліну міскантусу як головної білкової мішені для зв'язування сполук динітроанілінового ряду.
2. Реконструювати та верифікувати просторову структуру молекули α -тубуліну міскантусу для подальшої оцінки ефективності зв'язування різних сполук динітроанілінової природи.
3. Провести порівняння ефективності зв'язування референтних (оризалін та трифлюралін) та новосинтезованих сполук динітроанілінового ряду зі зниженою фітотоксичністю зі специфічним сайтом на поверхні молекули α -тубуліну та відібрати найбільш перспективні сполуки для подальших експериментів з поліплоїдизації міскантусу.
4. Оптимізувати умови введення в культуру *in vitro* та умови регенерації рослин міскантусу гігантського.
5. Отримати поліплоїдні лінії міскантусу гігантського з використанням відібраних сполук з антимітотичною активністю та низькою фітотоксичністю.
6. Проаналізувати плоїдність отриманих ліній міскантусу та відібрати поліплоїдні лінії для їх подальшої характеристики їх продуктивності.
7. Проаналізувати морфометричні та біохімічні показники отриманих поліплоїдних ліній міскантусу.
8. Оцінити продуктивність найкращих отриманих поліплоїдних ліній *M. x giganteus* та розрахувати потенційний вихід біостанолу з них.

Об'єкт досліджень - Поліплоїдизація міскантусу гігантського в умовах *in vitro* з використанням антимітотичних сполук динітроанілінового ряду.

Предмет дослідження - Біотехнологічні основи поліплоїдизації *M. x giganteus* з використанням вискоефективних речовин з антимітотичною активністю ряду динітроанілінів.

Методи досліджень: Скрінінг динітроанілінів на споріденість до α -тубуліну міскантусу проводили за допомогою методів *in silico*. При одержанні поліплоїдних рослин міскантусу гігантського із застосуванням антимітотичних сполук використовували загальноприйняті біотехнологічні методи. Робота

проводилась в умовах *in vitro*. Аналіз отриманих форм рослин проводили за допомогою морфологічних і цитоморфологічних методів. Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили за стандартними методиками за допомогою програми Microsoft Excel 12,0.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше застосовано критерії оцінки стабільності комплексів похідних динітроаніліну з α -тубуліном міскантусу гігантського для оцінки можливості використання новосинтезованих сполук цього класу для проведення поліплоїдизації природних триплоїдів міскантусу. Встановлено, що такі похідні динітроаніліну, як 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін; N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметил-феніл]пропіл)морфолін; N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін; N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид; 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідротіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид та {2- [4-(2,4-дихлор-феніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид можуть бути ефективно використані для поліплоїдизації міскантусу. Вперше показано, що відібрані сполуки завдяки високому ступеню спорідненості до α -тубуліну міскантусу мають істотно нижчий рівень фітотоксичності у порівнянні з добре відомими динітроанілінами (оризалін та трифлюралін) при проведенні поліплоїдизації міскантусу гігантського в умовах *in vitro*.

Запропоновано ефективну методику отримання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського за допомогою різних сполук динітроанілінового ряду. Проведено оцінку фенотипових характеристик отриманих поліплоїдних форм міскантусу гігантського та їх продуктивності, включаючи розрахунки потенційного виходу біоетанолу.

Практичне значення отриманих результатів. Відібрані сполуки динітроанілінового ряду з антимітотичними властивостями та низьким рівнем фітотоксичності можуть бути використані у біотехнології рослин як для отримання поліплоїдів міскантусу гігантського та інших представників цього роду, так і для розробки методів поліплоїдизації інших видів рослин, для яких

висока фітотоксичність вже відомих індукторів поліплоїдії є критичним і лімітуючим фактором. Отримані поліплоїдні лінії *M. × giganteus* слугуватимуть основою для створення нових сортів міскантусу гігантського і подальшого залучення до селекційних процесів, оскільки є важливим джерелом збільшення генетичного різноманіття цього роду рослин. Найкращі зі створених поліплоїдних ліній міскантусу самі по собі вже мають практичну цінність для безпосереднього використання у біоконверсії, оскільки характеризуються покращеними показниками продуктивності.

Особистий внесок здобувача. Постановку наукових завдань досліджень, наступну інтерпретацію отриманих результатів та розробку структури дисертаційної роботи було здійснено спільно з науковим керівником. Всі результати експериментальних досліджень, представлені в дисертаційній роботі, були отримані здобувачем особисто.

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з Блюмом Я.Б., Ємець А.І., Ожерєдовим С.П., Баєр Г.Я., Баєром О.О., Секан А.С., Шишою О.М., Рахметовим Д.Б., Рахметовою С.О.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях: X міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м. Чернівці, 14–18 вересня 2015 р.); XI міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м. Одеса, 12–16 вересня 2016 р.); V міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (м. Запоріжжя, 26-28 квітня 2017 р.); III конференції молодих вчених «Біологія рослин та біотехнологія» (м. Київ, 16–18 травня 2017 р.); XIV міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 10–12 квітня 2018 р.); VII Балтійському генетичному конгресі (Рига, Латвія, 24–27 жовтня 2018); XIV міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м. Київ, 15–20

вересня 2019 р.); IV міжнародній науковій конференції «Agrobiodiversity for improve the nutrition, health and quality of human and bees life» (Нітра, Словаччина, 11–13 вересня 2019 р.).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 12 наукових праць в профільних журналах та збірниках матеріалів конференцій, в тому числі 7 статей у фахових наукових виданнях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 176 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 7 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 118 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 13 таблицями та 21 рисунком. Список використаних джерел містить 257 найменування, з них 22 кирилицею та 235 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА РОДУ МІСКАНТУС ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ В БІОТЕХНОЛОГІЇ

На сьогоднішній день в багатьох країнах світу та, зокрема, в Україні питання виробництва і використання енергії є одним з найважливіших. Розробка сталої, раціональної з економічної та екологічної точки зору моделі виробництва і використання енергії є запорукою сталого розвитку країн та їх незалежності від зовнішніх чинників (Блум *та ін.*, 2010). Приблизно 10 % енергії, що використовується у світі, виробляється з біомаси. З року в рік частка біомаси в паливному балансі відновлювальної енергетики зростає (Blanco *et al.*, 2012; Гелетуха, 2014). До біомаси належить будь-яка органічна речовина, здатна перетворювати енергію сонячного світла та накопичувати її у вигляді хімічної енергії. В якості палива можуть бути використані деревина, залишки деревини, солома, гній, цукрова тростина та багато інших залишків сільськогосподарського виробництва (Титко та Калініченко, 2010; Urban and Mitchell, 2011). Важливе місце у виробництві біопалива належить культурам, що не використовуються для одержання харчових продуктів, такі як віничне просо (*Panicum*), міскантус (*Miscanthus*), верба (*Salix*), тополя (*Populus*) та ін. (Oliver *et al.*, 2009, Хіврич та ін., 2011). Серед інших біоенергетичних культур можна виділити міскантус, завдяки його невибагливості до ґрунтових умов та при цьому рекордно високій продуктивності (Макаренко, 2012; Ягольник, 2015).

Фотосинтез у рослин роду міскантус відбувається за енергетично–ефективним шляхом (С 4). Основною перевагою цього типу рослин є ефективність використання води. Так, в порівнянні з кукурудзою *M. × giganteus* має істотно вищу ефективність використання води. Проте за рахунок високої продуктивності біомаси, кількість води має бути достатньою і часто може бути лімітуючим фактором для максимального росту (Walsh and McCarthy, 1998).

Селекційна робота з представниками роду міскантус спрямована на зменшення кількості алелів, які відповідають за наявність небажаних ознак.

Збільшення наявності корисних алелів та зменшення небажаних досягається через повторення циклів рекомбінації та селекції, що вимагає використання максимально розширеного генетичного різноманіття. Отже, це довготривалий процес, і типовий селекційний цикл триває близько 7 років (Casler, 2012). Крім того, оскільки *M. × giganteus* є стерильним алотриплоїдом, то, як і в більшості випадків інтерплоїдної гібридизації, цей вид має проблеми з фертильністю. Утворення триплоїдних форм вимагає подолання такого явища як триплоїдний блок, що призводить до формування нежиттєздатного насіння, як результат інтерпоїдної гібридизації (Kohler *et al.*, 2010; Schatlowski and Kohler, 2012). З одного боку, стерильність *M. × giganteus* надає перевагу цьому виду у тому, що відсутній ризик поширення цього виду за межі плантації у природне середовище з насінням, або шляхом гібридизації через перехресне запилення з дикими видами злакових (Hodkinson *et al.*, 2002), з іншого, унеможлиблює залучення його до селекційного процесу. Отже, підвищення продуктивності та покращення якості біомаси *M. × giganteus* методами традиційної селекції є дуже лімітованим, оскільки одержання життєздатного насіння при статевій гібридизації *M. sinensis* та *M. sacchariflorus*, так само, як і одержання насіння безпосередньо з міскантусу гігантського, є практично неможливим. Це обмежує одержання корисного генетичного різноманіття для селекційного процесу.

Так, вивчення генетичного різноманіття *M. sinensis* та *M. sacchariflorus*, з яких утворився міскантус гігантський виявило велику кількість різноманітних геномів для обох видів (Jorgensen and Muhs, 2001). Проте, за результатами аналізу різних рослин виду *M. × giganteus* генетичних відмінностей між ними майже не спостерігалось. Отже, всі комерційні плантації міскантуса гігантського представлені одним вегетативно розмноженим генотипом (Greef *et al.*, 1997; Clifton-Brown *et al.*, 2001; Hodkinson *et al.*, 2002; Clifton-Brown *et al.*, 2008).

1.1. Таксономія, філогенез та поширення

Міскантус (*Miscanthus* Andersson) – це рід багаторічних рослин, що належать до родини тонконогових (*Poaceae*). Рослини цього роду походять з Південної і

Східної Азії (Clifton-Brown *et al.*, 2007), а також поширені у субтропічних і тропічних регіонах Африки. Проте найбільш різноманітну кількість видів цього роду виявлено у флорі Японії та Китаю (Chen and Renvoize, 2006; Sun *et al.*, 2010).

Рід міскантус нараховує за різними даними від 17 до 40 видів, крім того, їх остаточна кількість постійно переглядається (Brosse *et al.*, 2012). *Miscanthus sensu stricto* (*Miscanthus s. s.*) включає лише представників, що мають моноплоїдний геном з 19 хромосом ($n=19$). Представники цього роду на відміну від інших представників триби Andropogoneae мають двостатеві парні колоски з гермафродитними квітками (Clayton and Renvoize, 1986).

Серед представників роду міскантус є лише три види, що мають вагомий інтерес та потенціал для вирощування в якості енергетичних культур, а саме: *M. sacchariflorus*, *M. sinensis* та *M. × giganteus*. Крім того, інший вид *M. floridulus*, що розглядається як селекційний матеріал для створення нових сортів міскантусу як енергетичної культури. Останній – це потужна, вічнозелена рослина, але культивування її обмежене регіонами з теплими кліматичними умовами (Chen and Renvoize, 2006).

Міскантус цукрокрітковий (*Miscanthus sacchariflorus* Maxim.) – це багаторічна рослина, що росте у районах з помірним кліматом, має довгі повзучі ризоми. Пагони прямостоячі, від 2 до 7,5 м заввишки та 0,8-3,5 см в діаметрі. Листова пластинка 90-100 см довжиною та 1,5–4 см завширшки, з шорсткими краями. Суцвіттям є волоть. Довжина пиляків становить 2 мм. Насіння близько 2 мм за розміром, темно–коричневе. Час цвітіння – з вересня по жовтень. Рослини цього виду перехресно–запилні, не самозапилюються. Насіння визріває не раніше листопада. В теплих регіонах цвітіння може відбуватися в перший рік, більш активний ріст рослин спостерігається на другий та наступні роки.

Міскантус китайський (*Miscanthus sinensis* Anderss) – багаторічна рослина, що має короткі ризоми. Пагони щільно–пучкуваті, прямостоячі або напів-прямостоячі, висотою 0,5–3,3 м та 3–7 мм у діаметрі. Листя 20–70 см довжиною та 0,6–1,2 см шириною, з дуже пильчатими краями. Пиляки 2 мм

довжиною. Насіння рожево-коричневе або темно-коричневе. Цвітіння та визрівання насіння триває з липня по грудень (El Bassam, 2010).

Міскантус гігантський (*Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu.) – це спонтанно утворений гібрид між *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*. Вперше його було виявлено в Японії, після чого інтродуковано в Європу як декоративну садову рослину (Greef and Deuter, 1993). Що цікаво, цей гібрид більше не трапляється у дикій флорі Японії, проте останнім часом його було реінтродуковано до Східної Азії (Хі, 2008). Це багаторічна рослина з потужними, товстими ризомами. Міжвузля неопушені. Пагони *M. × giganteus* товсті, заповнені корком, приблизно 10 мм у діаметрі, за кліматичних умов Європи за перший рік вегетації досягають трохи більше 2 м заввишки та кожен наступний рік висота рослин становить близько 4 м (El Bassam, 1994).

Не зважаючи на той факт, що міскантус є рослиною, яка використовує С 4 шлях фотосинтезу та належить до теплолюбних рослин, деяким його видам притаманні зимостійкість та морозостійкість, що дозволяє їх культивування в кліматичних умовах України. *M. sacchariflorus*, за умов вирощування на багатих гумусом ґрунтах здатний витримувати зимові температури до -21 °С (Хі, 2000). За умов наявності товстих бруньок навколо точок росту та розміщення латентних бруньок на ризомах під шаром ґрунту міскантус здатний витримувати короткочасні весняні заморозки. Проте ростучі пагони та листя за температури -5 °С вимерзають повністю (Rutherford and Heath, 1992). Вегетація *M. sinensis* розпочинається за температури ґрунту вище +10 °С та припиняє вегетацію з настанням приморозків. Оптимальна температура для активного фотосинтезу та росту рослин становить від +28 до +32 °С. Це пов'язане з тим, що міскантус використовує С 4 шлях фотосинтезу, який є більш ефективним при досить високих показниках температури та інтенсивності освітлення. Не зважаючи на той факт, що міскантус віддає перевагу теплим кліматичним умовам, результати досліджень свідчать що міскантус може культивуватися з досить високими результатами виходу сухої біомаси в усіх регіонах Європи (Clifton-Brown and Lewandowski, 2001; Lewandowski and Heinz, 2003).

1.2. Варіабельність хромосомних наборів та розмірів геному

Представники роду *Miscanthus* мають моноплоїдний геном з 19 хромосом ($n=19$). Більшість генотипів міскантусу – це диплоїдні рослини ($2n=2x=38$), до них належать *M. sinensis* та *M. sacchariflorus* з Китаю. Тетраплоїдною формою з роду міскантус ($2n=4x=76$) є *M. sacchariflorus* з Японії, також зустрічаються його диплоїдні форми ($2n=2x=38$) (Kim *et al.*, 2012). Крім того, можливі інші гетероплоїдні та анеуплоїдні форми міскантусу (Liu *et al.*, 1989). Такою формою є *M. × giganteus*, що являє собою стерильний алотриплоїд ($2n=3x=57$). Цей вид утворився внаслідок гібридизації диплоїдного *M. sinensis* з тетраплоїдним *M. sacchariflorus*, обидва види з яких є ендемічними для Південно-Східної Азії та Японії (Hirayoshi *et al.*, 1960).

Результати з РНК секвенування та з використанням основаних на цьому маркерних систем (RNA-Seq) свідчать про походження геному *Miscanthus* ($n=19$) внаслідок дуплікації геному *Sorghum* ($n=10$), з наступним злиттям пари хромосом. Проте, залишається невизначеним тип події поліплоїдизації, в результаті якої утворився геном *Miscanthus* ($n=19$) (Ma *et al.*, 2012; Swaminathan *et al.*, 2010; Swaminathan *et al.*, 2012). Представникам *Miscanthus s. s.* властивий відносно невеликий розмір хромосом, близько 25мкм під час мітотичної метафази, порівняно з іншими злаками (Hodkinson *et al.*, 2001; Chramiec-Glabik *et al.*, 2012).

Щодо вмісту ДНК у моноплоїдному стані ($n=19$), міскантус містить 2150 – 2650 Mbp (Rayburn, 2009), що значно перевищує вміст ДНК у моноплоїдних геномах найближчих родичів міскантусу, таких як цукрова тростина, до якої належать види *Saccharum spontaneum* і *S. officinarum*, які мають 750 та 930 Mbp, відповідно (D’Hont and Glaszmann, 2001), а також сорго звичайне (*Sorghum bicolor*), яке має 730 Mbp у моноплоїдній клітині (Paterson *et al.*, 2009). Розміри геномів диплоїдних рослин роду міскантусу становлять 2,1 Gbp, тетраплоїдні геноми у представників роду мають розмір до 5,62 Gbp (Hodkinson *et al.*, 2015).

Відомо, що загальний розмір геному *M. × giganteus* становить 7 пг, розмір геному *M. sinensis* становить 2,75 пг, а геном - *M. sacchariflorus* 2,25 пг. Отже, *M. × giganteus* є алотриплоїдом, гібридом, що ймовірно утворився внаслідок злиття

2-х *M. sacchariflorus* та 1-х *M. sinensis* гамет ((2 x 2,25) + 2,75 = 7,25 пг), оскільки при наявності 2-х гамет від *M. sinensis* розмір геному *M. × giganteus* мав би становити 7,75 пг ((2 x 2,75) + 2,25 = 7,75 пг) (Rayburn *et al.*, 2009; Chromiec-Glabik *et al.*, 2012).

1.3. Поліплоїдія. Походження *M. × giganteus* та поліплоїдних *M. Sacchariflorus*

Відомо, що за кількістю наборів хромосом поліплоїдні організми поділяються на триплоїди (3n=3x), тетраплоїди (4n=4x), пентаплоїди (5n=5x), гексаплоїди (6n=6x), та октаплоїди (8n=8x) (Ramsey and Schemske, 1998). Проведення досліджень геномів з використанням проточної цитометрії та мікроскопії показало, що серед представників роду *Miscanthus* зустрічаються диплоїди, триплоїди, тетраплоїди, пентаплоїди та гексаплоїди. Крім того, цікавим є факт, що в межах одного виду зустрічаються різні поліплоїдні форми. Так, наприклад, вид *M. sacchariflorus* має такі внутрішньовидові форми: *M. sacchariflorus* var. *brevibarbis* - триплоїд; *M. sacchariflorus* var. *glaber* – триплоїд; *M. ogiformis* - триплоїд; *M. sacchariflorus* f. *latifolius* – пентаплоїд (Adati and Shiotani, 1962). Серед представників виду *M. sinensis* зустрічаються такі аутотриплоїдні форми як: *M. sinensis* «Goliath», *M. sinensis* «Autumn Light» та *M. sinensis* var. *condensatus* (Adati and Mitsuishi, 1956; Adati, 1958; De Cesare, 2012).

Відомо, що за своїм походженням поліплоїдні організми поділяються на 2 типи, а саме: автополіплоїди та алополіплоїди. Автополіплоїдія - спадкова зміна, кратне збільшення числа наборів хромосом в клітинах організму одного і того ж біологічного виду. Алополіплоїдія - кратне збільшення кількості хромосом у гібридних організмів і виникає при міжвидовій і міжродовій гібридизації. Отже, автополіплоїдія виникає в результаті мутації кількості хромосом, в той час як алополіплоїдія є наслідком гібридизації та мутації кількості хромосом (Paterson, 2005). За результатами досліджень подій поліплоїдизації відомо, що деякі тетраплоїдні *M. sacchariflorus* утворились як результат аутополіплоїдії (Adati and Mitsuishi, 1956; Adati, 1958). Проте деякі тетраплоїди *M. sacchariflorus* утворились

внаслідок гібридизації між різними видами з наступним подвоєнням набору хромосом і є аллоплоїдами. Так, в результаті каріотипування та дослідження парування хромосом під час мейозу спостерігали, що тетраплоїдний *M. sacchariflorus* складається з двох різних наборів хромосом, один з яких мав сателітну хромосому, яка була відсутня в другому. Таким чином, було встановлено, що два набори хромосом були гомологічними до *M. sinensis* в той час як два інших набори були лише частково гомологічними (Adati and Shiotani, 1962). Саме тому, за рахунок великої кількості різноманітних форм з різними рівнями плоідності та комбінаціями наборів хромосом *M. sacchariflorus* вважається найбільш складним видом роду *Miscanthus* та потребує подальшого вивчення, тим більше, що відмінностей за морфологічними ознаками не достатньо для повної систематизації та класифікації виду (Lledo *et al.*, 2001).

Географічні, морфологічні, цитологічні та молекулярно-генетичні дослідження міскантусу гігантського підтверджують, що цей вид є аллополіплоїдом. Так, за результатами спостереження парування хромосом під час мейозу знайдено лише декілька тривалентів, тоді як кількість бівалентів та юнівалентів була в приблизно однаковою, це свідчить про те, що два набори хромосом з трьох є гомологічними, а один істотно відрізняється за гомологією (Linde-Laursen, 1993). І навпаки, при дослідженні парування хромосом ауоттриплоїдного *M. sinensis* var. *condensatus* спостерігалась велика кількість утворення тривалентів під час метафази 1, що свідчить про його аутополіплоїдне походження (Adati, 1958).

Дослідження з використанням послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера (ITS) ядерної рибосомної ДНК *M. × giganteus* дозволили визначити, що до складу його геному входять як геном *M. sinensis*, так і геном *M. sacchariflorus*. Одна послідовність ITS *M. × giganteus* відповідала послідовності ITS ядерної рибосомної ДНК *M. sinensis*, друга з послідовностей відповідала послідовності *M. sacchariflorus*. Також ці результати були підтвержені з використанням AFLP та ISSR маркерів (Hodkinson *et al.*, 2002a; Hodkinson *et al.*, 2002b).

Відомо, що пластиди, основні органели рослин, у злаків успадковуються від материнських рослин. Дослідження мітохондріальної ДНК та пластидного геному показало що пластиди *M. × giganteus* успадковані від *M. sacchariflorus* (Hodkinson *et al.*, 2002a; Feng *et al.*, 2014). Проте при проведенні штучного схрещування *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*, деякі з отриманих гібридів мали пластиди від *M. sinensis*. Це вказує на той факт, що гібридизація можлива в обох варіантах запилення цих видів (De Cesare, 2012). Більшість досліджених природних генотипів *M. × giganteus* показали, що успадкування пластид відбувалося від *M. sacchariflorus*. Крім того, в ареалах спільного зростання *M. sacchariflorus* та *M. sinensis* в Японії триплоїдне насіння було знайдене саме в суцвіттях *M. sacchariflorus* (Nishiwaki *et al.*, 2011).

1.4. Анеуплоїди та В-хромосоми

Дані про анеуплоїди міскантусу зустрічаються в літературних джерелах, присвячених дослідженню *M. × giganteus*, де більшість клітин були трисомними і мали 58 хромосом, тоді як невелика частина клітин мала 57 хромосом з однією метацентричною, супутниковою хромосомою. Крім того, клітини мали 1 – 4 додаткові В-хромосоми, довжина яких становила від 2,3 μм до 7,1 μм (Linde-Laursen, 1993). Наявність додаткових В-хромосом також була опублікована в кількості 1- 4 у дослідженні *M. × giganteus*, 2 В-хромосоми у дослідженні *M. sinensis* та 4 В-хромосоми були знайдені в ядрах *M. sacchariflorus* (Chramiec-Glabik *et al.*, 2012). В результаті цитологічних досліджень 6 клонів *M. floridulus* було встановлено присутність В-хромосом в ядрах клітин у кількості 0 – 6 (Price, 1963).

1.5. Генотипування: генетична варіабельність та фітогеографія

За літературними джерелами, проведено велику кількість досліджень з генотипування для визначення генетичної варіабельності роду міскантусу. Серед маркерів які були використані в генетичних дослідженнях такі багатолокусні маркерні системи, як ISSR-ПЛР (Hodkinson *et al.*, 2002c; Zhang *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2013b), RFLP (Hernandez *et al.*, 2001), RAPD (Chiang *et al.*, 2003), AFLP

(Greef *et al.*, 1997; Hodkinson *et al.*, 2002c). Також використовували днолокусні кодомінантні маркерні системи для проведення досліджень з молекулярної генетики. Розроблено велику кількість праймерів для простих повторів послідовностей (Simple Sequence Repeats, SSR) як для досліджень ядерного геному (Hernandez *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013), так і для вивчення пластидного геному (De Cesare *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013). Використання цих маркерів дозволило визначити шаблони змін в популяційній структурі *M. sinensis*, які безпосередньо зумовлені змінами клімату від останнього льодовикового періоду. (Clark *et al.*, 2014). Дослідження однонуклеотидного поліморфізму (Single nucleotide polymorphism, SNP) було проведено для вивчення генетичних популяцій *M. sinensis* (Slavov *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 2014). З використанням цих сучасних маркерних систем також проведено дослідження генетичної варіабельності *M. × giganteus*. Результати якого підтвердили, що генетична варіабельність цього виду є критично низьким, навіть враховуючи соматичні мутанти цього виду (Głowacka *et al.*, 2014a; Głowacka *et al.*, 2014b). Для проведення цих досліджень використовували прості повтори послідовностей (SSR) ядерного ДНК та ДНК хлоропластів в поєднанні з RAD (restriction site associated DNA) генетичними маркерами дослідили генетичну варіабельність 30 генотипів *M. × giganteus* що культивуються як в Європі, так і в Північній Америці. Так, за результатами цих досліджень встановлено, що генетично всі генотипи не відрізнялися від оригінального *M. × giganteus* що зростає в дикій флорі Японії. Генетично не відрізнялися навіть нові генотипи *M. × giganteus*, отримані з насіння.

Щодо інших видів роду міскантус, використання маркерних систем дозволило встановити істотне генетичне різноманіття як в межах одного виду, так і між видами. Генетичні маркерні системи AFLP виявилися здатними ідентифікувати та відрізнити навіть внутрішньовидові форми міскантусу. Проте, як і за результатами інших досліджень, ці маркерні системи не виявили істотного

генетичної варіабельності серед клонів *M. × giganteus* (Greef *et al.*, 1997; Hodkinson *et al.*, 2002c).

1.6. Популяційна генетика та генетичне різноманіття

Дослідження популяційної генетики є важливим інструментом для вивчення еволюції роду *Miscanthus*, його походження та впливу кліматичних змін на його розповсюдження в минулому. Накопичення цих знань дозволяє визначити майбутні тенденції поширення та наслідки глобальних кліматичних змін для розповсюдження виду (Clark *et al.*, 2014; Hodkinson *et al.*, 2011; De Souza *et al.*, 2013). Вивчення генетичного різноманіття міскантусу є необхідним для проведення селекційної роботи з цими видами та розуміння фізіологічних процесів адаптації рослин до абіотичних стресів, таких як посуха, засоленість ґрунту, холодостійкість та ін. Ці фактори є критичними для культивування рослин на землях, не придатних для ведення сільського господарства, та на територіях з важкими кліматичними умовами. Так, при дослідженні північних популяцій *M. sacchariflorus* виявлено, що вони мали найкращі показники на дослідних ділянках, розташованих в північних регіонах, завдяки своїй холодостійкості. Отже, як селекційний матеріал вони є важливим джерелом для отримання холодостійких та морозостійких форм (Jones *et al.*, 2015). За літературними джерелами дослідження популяційної генетики роду міскантусу обмежені двома видами, *M. sinensis* та *M. floridulus*.

Спосіб запилення відіграє важливу роль у формуванні генетичного різноманіття. Це підтверджено дослідженнями з використанням генетичних маркерів RAPD та варіації послідовностей ДНК у аутбридної форми *M. sinensis* (з Японії, Китаю і Тайваню) та інбридного *M. sinensis var. condensatus* з Тайваню. В результаті встановлено, що низький рівень генетичного різноманіття *M. sinensis var. condensatus* є наслідком самозапилення в усіх його популяціях (Chiang *et al.*, 2003). Використання молекулярних маркерів RFLP та AFLP *M. sinensis var. condensatus* дозволило виявити три підгрупи *M. sinensis var. condensatus* на одному з островів Японії. Крім того був виявлений один незвичний для цього

місця гаплотип, ймовірно занесений на острів з інших територій (Iwata *et al.*, 2004).

Дослідження більше ніж 600 зразків *M. sinensis* з Китаю, Південної Кореї та Японії з використанням SNP маркерів та 10 мікросателітів пластид виявило 6 генетичних кластерів з географічно віддалених регіонів. Чотири кластери походили з території материкової Азії, два інших з Південної та Північної Японії. Також в цьому дослідженні використовували зразки *M. floridulus*. За отриманими результатами *M. floridulus* виявився дуже близьким до *M. sinensis*. Всі досліджені пластиди *M. floridulus* за гаплотипом відповідали пластидам *M. sinensis* (Clark *et al.*, 2014). Результати щодо генетичної спорідненості цих двох видів вже були отримані в попередніх дослідженнях (Hodkinson *et al.*, 2002a).

Дослідження походження *M. sinensis* з використанням аналізу ДНК хлоропластів виявило 9 гаплотипів з 600 проаналізованих рослин, які було взято з 30 популяцій Японії. Подальший генетичний аналіз виявив дві групи, які ймовірно дали початок іншим гаплотипам, та вказав на той факт, що *M. sinensis* походить з території Китаю і подальша міграція на територію Японії відбулась через Тайвань, або через Корейський півострів (Shimono *et al.*, 2013). Те, що місцем походження *M. sinensis* є Південно- Східний Китай також підтверджено іншими генетичними дослідженнями виду (Clark *et al.*, 2014).

Генетичне різноманіття *M. sinensis* на території Китаю досліджували з використанням 23 SSR генетичних маркерів. За результатами дослідження 450 зразків *M. sinensis* встановлено високий рівень генетичного різноманіття. Гаплотипи утворювали кластери, які відповідали їх географічному розповсюдженню (Zhao *et al.*, 2013a). Також, з використанням SNP та SSR генетичних маркерів досліджували генетичне різноманіття *M. sinensis*, крім того, до уваги брали 17 фенотипових ознак, пов'язаних з біомасою, морфологією, складом клітинної стінки та ін. В результаті дослідження виявлено високий рівень генетичного різноманіття *M. sinensis* на території від Кореї до Японії. Отримані результати використовували для асоціативного картування та геномної селекції (Slavov *et al.*, 2014).

1.7. Зв'язок генотипу з фенотипом

Останнім часом для вивчення фенотипових варіацій роду *Miscanthus* проведено велику кількість досліджень з експресії генів. Зокрема за допомогою RNA-Seq - технології секвенування, яка дозволяє виявити наявність та кількість РНК у біологічному зразку в даний момент, аналізуючи постійно мінливий клітинний транскрипт та інших сучасних методів досліджень геному були створені EST каталоги (expressed sequence tag). Дослідження проводили використовуючи методи порівняльної геноміки та знання транскриптому найближчих родичів роду *Miscanthus* таких як *Sorghum bicolor*. Проведено кількісний аналіз експресії генів в різних тканинах та на різних стадіях розвитку рослин. Крім того, експресію генів в ризомах визначали на початку вегетації (навесні) та наприкінці вегетаційного періоду (восени), це було проведено для вивчення біологічних шляхів регуляції експресії генів (Barling *et al.*, 2013). З використанням RNA-Seq технологій, також проведено дослідження експресії генів *Miscanthus*. За результатами дослідження створено базу даних послідовностей екзонів з подальшою функціональною анотацією (Chouvarine *et al.*, 2012). За допомогою генетичних маркерів SSR вдалося виявити 9 простих повторів послідовностей, які відповідали за накопичення біомаси, та початок цвітіння (Zhao *et al.*, 2013 a; Zhao *et al.*, 2013 b). З метою вивчення генетичних варіацій генів, що відповідають за утворення лігніну, було проведено дослідження поліморфізму видів, які належать до комплексу *Saccharinae*, до яких відноситься і рід *Miscanthus*, з використанням генетичних маркерів TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) (Suman *et al.*, 2011).

1.8. QTL та порівняльна геноміка

За літературними джерелами, перша карта генетичних зв'язків для *M. sinensis* була розроблена з використанням генетичних маркерів RAPD у 2002 році (Atienza *et al.*, 2002). На основі цієї мапи було проведено вивчення полімерії *M. sinensis*. Полімерія (quantitative trait locus, QTL) - один з типів взаємодії генів, за якого ступінь розвитку однієї тієї самої ознаки обумовлений впливом так званих

полімерних генів (які проявляються подібним чином). За результатами дослідження, серед 11 потенційних QTL було виявлено три, які відповідали за висоту рослин, товщину стебла базальної частини та висоту розвитку прапорцевого листка (Atienza *et al.*, 2003a). В іншому дослідженні виявили 20 потенційних QTL, безпосередньо пов'язаних з врожайністю біомаси *M. sinensis* (Atienza *et al.*, 2003c). Використовуючи систему генетичних маркерів RAPD, цією групою дослідників вдалося встановити ймовірні QTL *M. sinensis*, які відповідали за накопичення кальцію (2 локуси), сірки (2 локуси) та фосфору (5 локусів). Загалом 9 потенційних QTL (Atienza *et al.*, 2003d). Також ними визначено 4 QTL відповідальних за накопичення хлору та 2 QTL, які відповідали за накопичення калію (Atienza *et al.*, 2003b). Використання генетичних маркерів SNP, отриманих в результаті (RAD) секвенування, дозволило ідентифікувати QTL, відповідальні за фенотипи зі смужками, що є бажаною ознакою для використання міскантусу як декоративно-листяної культури в ландшафтному дизайні (Liu *et al.*, 2011).

На сьогоднішній день, знання в області геному представників *Miscanthus* обмежені лише декількома каталогами EST, в порівнянні з добре дослідженими QTL, анотованими геномами представників інших видів, таких як *Sorghum* (Zhang *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2013b; Kim *et al.*, 2014). Завдяки високому рівню синтенії геномів *Miscanthus* та *Sorghum*, QTL, знайдені у представників *Sorghum*, з високою ймовірністю мають містити QTL у гомологічних регіонах *Miscanthus*. Таким чином, використання інструментів порівняльної геноміки дозволяє пришвидшити QTL картування та характеризувати функції генів, які до них належать. Порівняльна геноміка - це напрямок біологічних досліджень, в якому порівнюються геномні особливості різних організмів. Геномні ознаки можуть включати послідовність ДНК, гени, порядок генів, регуляторні послідовності та інші геномні структурні компоненти. Так, при дослідженні строків викидання волоті *M. sinensis* встановлено 1 QTL, асоційований з цією ознакою (Gifford *et al.*, 2015). Проведені іншою групою вчених дослідження дозволили визначити 3 QTL *M. sinensis*, які виявилися відповідальними за регуляцію строків викидання волоті, серед яких і описаний вище QTL, розміщений в тій самій позиції на тій же

хромосомі (Weijde, 2016). Крім того, QTL, відповідальний за регуляцію строків викидання волоті, визначений в попередніх дослідженнях геному *Sorghum bicolor* (Murray *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2012; Felderhoff *et al.*, 2013), відповідав одному з трьох визначених QTL *M. sinensis* та був розташований в тій самій позиції на гомологічній хромосомі міскантусу (Weijde, 2016).

Серед корисних інструментів порівняльної геноміки, які можуть бути застосовані для вивчення геному міскантусу, є база даних CSGRqtl (<http://helos.pgml.uga.edu/qtl/>). Як референтну основу, ця база даних використовує геном *Sorghum*. Отже, ці інструменти порівняльної геноміки у вивченні функцій генів та їх регуляції можуть бути застосовані для роду *Miscanthus*, оскільки в основі його геному лежить дуплікований в процесі еволюції геном *Sorghum* (Hodkinson *et al.*, 2015).

Таким чином, рід міскантус представляє собою складний комплекс поліплоїдних видів. Серед найбільш поширених і перспективних видів цього роду виділяються *Miscanthus sinensis*, *M. sacchariflorus* та *M. × giganteus*. Представники цього роду мають високий рівень генетичного різноманіття, проте найбільш перспективний для виробництва біопалива вид, *M. × giganteus*, за рахунок своєї стерильності у більшості насаджень, представлений одним вегетативно розмноженим генотипом. Природне генетичне різноманіття роду *Miscanthus* має великий потенціал для проведення робіт з селекції, маніпуляцій з рівнем плоїдності і дозволяє використання молекулярно генетичних маркерів для пришвидшення селекційних процесів.

РОЗДІЛ 2

МІСКАНТУС ЯК ПЕРСПЕКТИВНА ЕНЕРГЕТИЧНА КУЛЬТУРА

Технології виробництва біоетанолу другого покоління є більш досконалішими та розробляються у зв'язку з тим, що виробництво біопалива першого покоління має дуже істотні обмеження. Зокрема існування межі, за якою ці технології не здатні забезпечити потреби у біопаливі без загрози біорізноманіттю та сільськогосподарському виробництву (Evans, 2008). Технології виробництва біоетанолу другого покоління спрямовані на використання біомаси сільськогосподарських рослин, що не використовуються у харчовій промисловості (стебла, листя та ін.), а також культури, що не використовуються для одержання продуктів харчування. Це віничне просо (*Panicum*), міскантус (*Miscanthus*), верба (*Salix*), тополя (*Populus*) та відходи промислового виробництва (гілки деревних порід, огранічні залишки будь якого виробництва). Біомаса всіх рослин формується переважно з лігніну, геміцелюлози та целюлози, які є складними молекулами вуглеводів, що, в свою чергу складаються з простих цукрів, тому принцип цієї технології направлений на вивільнення та використання цих цукрів для виробництва різних форм біопалива, в першу чергу біоетанолу (Weijde *et al.*, 2017).

Міскантус набув популярності як енергетична культура для регіонів з помірним кліматом завдяки багатьом показникам, а саме, високій врожайності, невибагливості до ґрунтових умов та холодостійкості (Robson *et al.*, 2012). Вміст целюлози в біомасі міскантусу становить від 40 до 64-71%, в залежності від виду. Найменший вміст целюлози у *M. sinensis* – 42%, *M. sacchariflorus* містить 46-53% целюлози та *M. × giganteus* має найбільший вміст целюлози, близько 68-70%. Отже, оскільки *M. × giganteus* характеризується високим відсотком целюлози у своєму складі, він є цінною сировиною для паперової промисловості, його використовують у виробництві будівельних матеріалів, а також це робить його пріоритетною біоенергетичною культурою для вдосконалених технологій

виробництва біоетанолу другого покоління. Представникам цього роду характерний високий вміст лігніну та лігноцелюлозних волокон (El Bassam, 2010).

Продуктивність біомаси *Miscanthus* × *giganteus* наближається до теоретичного максимуму продуктивності, що може бути забезпечений доступною енергією Сонця (Beale *et al.*, 1996). За оптимальних умов вирощування врожайність *M. × giganteus* може сягати 39,89 т/га сухої маси. (Bilandzija *et al.*, 2018). Важливим моментом є те, що тривалість комерційного використання плантації міскантусу складає близько 20 років при щорічному одержанні біомаси (Зинченко, 2011). Представники роду міскантус стійкі до хвороб, тому хімічний захист не потрібний. Потреба міскантусу в добривах є відносно невисокою. При помірному внесенні добрив та продуктивності сухої маси 20 т/га міскантус виносить з ґрунту близько 60 кг N, 16 кг P₂O₅, 80 кг K₂O (Романчук, 2014).

Також важливою особливістю плантацій *M. × giganteus* є здатність до ґрунтового секвестру вуглецю в твердій органічній формі, це забезпечує протидію таким процесам, як акумуляція парникових газів в атмосфері та глобальне потепління, що на сьогоднішній день є важливою проблемою (Robertson *et al.*, 2017). Так, за результатами досліджень, здатність до ґрунтового секвестру вуглецю плантації міскантуса (0.64 т С га⁻¹ рік⁻¹) більше, ніж в два рази перевищує здатність до ґрунтового секвестру вуглецю плантації верби (0.30 т С га⁻¹ рік⁻¹) (Borzecka-Walker *et al.*, 2008). Щільність енергії у міскантуса становить 18,2 МДж/кг, що є досить високим показником. Біомаса міскантусу має надзвичайно низький вміст золи та азотних сполук. За цими показниками міскантус не поступається найбільш поширеним енергетичним культурам, таким як тополя, верба, віничне просо та ін. (El Bassam, 2008).

Таким чином, *M. × giganteus*, завдяки його невибагливості до ґрунтових умов та рекордно високій продуктивності, може бути використаний як сировина для виготовлення твердого біопалива у вигляді пелет, брикетів або тріски на паливо та має перспективи у використанні як сировина для технологій виробництва біоетанолу другого покоління. Проте, для забезпечення генетичного

різноманіття, зокрема у випадку стерильного міскантуса гігантського, поліплоїдизація є незамінним методом одержання нових популяцій цих рослин.

2.1. Вплив різних фракцій лігніну на ефективність оцукрювання у різних видів міскантусу

Лігнін – це один з основних компонентів, який обмежує процес перетворення біомаси на біопаливо. У складі клітинної стінки лігнін, поєднаний з геміцелюлозними полісахаридами, утворюючи міцну клітинну оболонку, і є основною перешкодою під час хімічного або ферментативного гідролізу целюлози, основного джерела цукрів (Grabber *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2012). Таким чином, зменшення частки лігніну в складі клітинної стінки, або зміна його складу є одним з головних факторів зниження собівартості біопалива (Simmons *et al.*, 2010).

Лігнін - це складний ароматичний гетерополімер, до складу якого входять три основні фенілпропаноїдні компоненти у різних співвідношеннях: *p*-гідроксіфеніл (H), гуаїцил (G) та сирінгіл (S) (Fukushima and Dehority, 2000; Bonawitz and Chapple, 2010). Лігнін має негативний вплив на ефективність таких процесів як ферментація та анаеробне, метанове бродіння, проте позитивно впливає на енергетичну цінність біомаси при безпосередньому спалюванні (Lewandowski and Kicherer, 1997; Jorgensen *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2012). Завдяки своїм хімічним та фізичним властивостям лігнін важко ізолювати та очистити, охарактеризувати його структуру та вирахувати його кількість (Davin *et al.*, 2008).

На сьогоднішній день існує декілька методів визначення вмісту лігніну. Серед них найбільш поширеними є гравіметричний та спектрофотометричний методи. Як в промисловості, так і в наукових дослідженнях гравіметричний метод визначення кількості лігніну є більш поширеним (Hatfield and Fukushima, 2005; Vermerris and Nicholson, 2006; Frei, 2013). Перший метод визначення кількості лігніну в сировині був розроблений на початку минулого століття шведським вченим Класоном. Метод Класона оснований на гідролізі полісахаридів клітинної стінки з використанням сірчаної кислоти та наступним гравіметричним

вимірюванням нерозчинних залишків (лігнін Класона) (Browning, 1967; Vermerris and Nicholson, 2006). Інший метод визначення кількості лігніну оснований на видаленні білку та інших компонентів перед гідролізом полісахаридів. Цей метод широко застосовується для аналізу кормових культур, багатих на білки. Проведення такого аналізу включає послідовне використання нейтральних розчинників, кислих розчинників та розчинів сірчаної кислоти (Van Soest, 1963; Van Soest, 1967). Спектрофотометричний метод оснований на поглинанні світла певної довжини хвилі розчиненим лігніном. Проте, на точність цього методу можуть впливати домішки інших компонентів клітинної стінки (Hatfield and Fukushima, 2005).

При застосуванні різних методів визначення кількості лігніну для однакових зразків, різниця в отриманих результатах може коливатися більш, ніж в два рази (Fukushima and Hatfield, 2004). Отже, виникає припущення що різні методи визначення кількості лігніну вимірюють кількість різних фракцій лігніну, і вміст цих фракцій істотно коливається між зразками (Weijde, 2016).

Досліджено можливість визначення ефективності оцукрювання біомаси міскантусу з використанням трьох різних методів визначення кількості лігніну (Weijde *et al.*, 2016b). Для проведення дослідження використовували такі методи визначення кількості лігніну, як визначення кількості розчинного в кислоті лігніну (acid detergent lignin, ADL), визначення кількості лігніну за Класоном (Klason lignin, KL) та спектрофотометричний метод, з використанням в якості розчинника ацетил броміду (acetyl bromide lignin, ABL). Використовували 6 генотипів міскантусу, 2 генотипи *M. sinensis*, 2 генотипи *M. sacchariflorus* та 2 генотипи *M. × giganteus*. За результатами дослідження, суха біомаса всіх зразків в середньому складалася на 85% з матеріалів клітинних стінок, 46 % становила целюлоза та 31 % становили геміцелюлозні полісахариди. Серед інших видів *M. sacchariflorus* мав найвищі показники за вмістом целюлози, глюкози та ксилоли. Зразки *M. sinensis* мали найвищі показники за вмістом геміцелюлозних полісахаридів та арабінози. Гібридний *M. × giganteus* мав середні показники за вмістом целюлози, проте вміст геміцелюлозних полісахаридів виявився

найнижчим серед досліджуваних зразків. Найкращі показники за вмістом потенційно доступної глюкози для процесів оцукрювання мав зразок, який належав *M. sacchariflorus*, сорту *Robustus*. Також цей зразок мав найвищі показники за часткою клітинних стінок в сухій біомасі (87,06 %) та найвищі показники за вмістом глюкози в клітинних стінках (43,96 %).

За результатами дослідження спостерігалась істотна різниця між результатами, отриманими з різних методів визначення кількості лігніну. Так, найвищий відсоток лігніну у зразках був виявлений спектрофотометричним методом (16 - 22 %), при використанні методу визначення кількості лігніну за Класоном вміст лігніну у зразках коливався від 13 до 20 %. Найнижчий вміст лігніну у досліджуваних зразках спостерігався при використанні методу визначення кількості розчинного в кислоті лігніну, тут цей показник становив 7 – 14 %. Низький вміст лігніну за результатами цього методу може бути пояснений вимиванням лігніну під час екстракції (Hatfield *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 1999). Серед методів визначення кількості лігніну, які були використані в дослідженні, найбільш придатним для визначення ефективності оцукрювання виявився модифікований метод за Класоном (KL) (Weijde, 2016).

2.2. Оцінка якості біомаси *Miscanthus* як вихідної сировини для перетворення у різні біоенергетичні продукти

Існує декілька методів оптимізації та покращення якості біомаси в залежності від напрямку її біоконверсії, які дозволяють пришвидшити відповідні термохімічні процеси при її використанні. В першу чергу це можливо завдяки селекції та виведенню нових форм з бажаними якісними властивостями. Також це може бути досягнуто за рахунок внесення добрив, або підбором та змінами часу збору врожаю (Lewandowski and Heinz, 2003; Iqbal and Lewandowski, 2014). З метою оцінити якість біомаси *M. sinensis* як вихідної сировини для перетворення на різноманітні біоенергетичні продукти, проведено дослідження, де визначали та оцінювали такі показники, як: полімерний склад клітинної стінки, кількість моносахаридів у клітинній стінці, вміст золи та мінералів, вихід біогазу при

метановому бродінні, ефективність оцукрювання для виробництва біоетанолу та ін. В дослідженні використовували 8 генотипів *M. sinensis*. При порівнянні двох систем за кількістю разів збору врожаю біомаси, одноукісної та двоукісної, встановлено, що врожайність біомаси при дворазовому укосі істотно поступалась врожайності при одноразовому укосі. Крім того, проведено біохімічний аналіз зразків літнього та зимового укосів. Так, суха біомаса під час літнього укосу містила 82 % клітинних стінок, тоді як клітинні стінки при зимовому укосі становили 92 % сухої біомаси. Істотно відрізнявся хімічний склад біомаси при різних строках укосу, так при літньому укосі спостерігався менший вміст целюлози та лігніну в порівнянні з зимовим укосом, проте вміст геміцелюлози був вищим. За вмістом лігніну, стебла рослин, що були скошені влітку, переважали листя, проте, аналіз рослин, скошених взимку, показав протилежні результати.

Досліджувані генотипи проявили істотну відмінність за багатьма важливими якісними показниками для виробництва біоетанолу. Ефективність оцукрювання була істотно вищою у всіх зразків літнього укосу в порівнянні з зимовим укосом. Ефективність оцукрювання розраховували як сумарний вихід ферментованих цукрів, глюкози та ксилози, у відсотках від сухої маси. Незважаючи на істотну різницю між зразками за вмістом геміцелюлози, істотної різниці між зразками, зрізаними влітку, за часткою перетвореної ксилози не виявлено. Проте, такі показники як вихід ксилози, вихід та частка перетвореної глюкози істотно відрізнялися між собою у зразків літнього укосу. Різниця за таким показником, як частка перетвореної глюкози, особливо у зразків літнього укосу, була істотною. Так, в залежності від генотипа *M. sinensis* цей показник коливався від 33 до 50 %. Щодо виходу біогазу, то зразки літнього укосу мали кращі результати ніж зразки зимового укосу. В середньому за генотипами, в результаті метанового бродіння, зразки зимового укосу мали вихід біогазу 441 – 520 мл/г сухої речовини, а зразки літнього укосу 539–591 мл/г сухої речовини. Частка метану у виробленому біогазі складала близько 52 % незалежно від строків укосу біомаси (Weijde *et al.*, 2016a).

Для використання біомаси шляхом безпосереднього спалювання дуже важливим показником є вміст золи. За результатами цього дослідження вміст золи в молодих рослинах *M. sinensis* літнього укусу майже в два рази перевищував вміст золи в старих рослинах зимового укусу (Weijde, 2016). Так, для літнього укусу цей показник становив в середньому 3,28 %, тоді як для зимового укусу вміст золи в середньому становив 1,54 %. Серед зразків зимового укусу не виявлено істотної різниці за часткою золи, проте зразки літнього укусу істотно відрізнялись за цим показником.

Проведені за цим напрямком дослідження виявили істотну різницю між генотипами міскантусу за багатьма важливими якісними ознаками для виробництва різних видів біопалива, таких як виробництво біоетанолу та виробництво біогазу. Таким чином, одним з напрямків підвищення економічної ефективності процесів біоконверсії є ретельний добір джерел біомаси (Hodgson *et al.*, 2010; Weijde *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016).

2.3. Стабільність складу клітинної стінки та ефективність сахарифікації міскантусу за різних умов середовища

Більша частина потенційної енергії лігноцелюлозної біомаси знаходиться у вторинній клітинній стінці, а саме, целюлоза, полімери лігніну та ксилану, що утворюють відносно складний комплекс (McCann and Carpita, 2008; Chundawat *et al.*, 2011). Біосинтез клітинної стінки, у тому числі і накопичення лігніну, регулюється під час росту та розвитку рослини, тому як і будь який інший метаболічний процес може бути перепрограмований внаслідок сигналів навколишнього середовища (Voerjan *et al.*, 2003; Pauly and Keegstra, 2010).

Проведено дослідження 15 генотипів *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* та *M. × giganteus* з п'яти різних регіонів Європи, з використанням біохімічних методів визначення складу клітинних стінок. За результатами цього дослідження був визначений вплив навколишнього середовища на структурні компоненти клітинних стінок та якість біомаси (Hodgson *et al.*, 2010). Схоже дослідження якісних показників біомаси міскантусу було проведене з порівнянням 6

географічно віддалених регіонів Європи. У трирічному дослідженні використовували 4 генотипи *M. sacchariflorus*, 5 генотипів *M. sinensis* та 6 генотипів *M. × giganteus*. Біомасу для проведення біохімічних аналізів збирали в зимовий період або на початку весни, в залежності від регіону. Досліджували такі параметри, як вплив регіону вирощування та вік плантації на якість біомаси за генотипами. За результатами дослідження встановлено, що істотний вплив на показники якості біомаси мав вік плантації та регіон вирощування, оскільки міскантус є багаторічною рослиною і швидкість фомування плантації, як і визрівання рослин в північних широтах, відбувається повільніше, ніж в широтах, що розташовані південніше (Lewandowski *et al.*, 2000; Clifton-Brown *et al.*, 2001). Регіон вирощування мав особливо великий вплив на фракцію лігніну в клітинній стінці біомаси. Так, різниця за цим показником в залежності від регіону могла досягати до 51,8 г/кг сухої маси для одного з генотипів *M. sacchariflorus*, з середнім показником 96,1 г/кг сухої маси. Найменший вплив регіону культивування на вміст лігніну спостерігався у одного з досліджуваних гібридів *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*, тут різниця між варіантами становила 19,1 г/кг сухої маси, при середньому показнику 98,0 г/кг сухої маси. Також регіон вирощування мав істотний вплив на вміст целюлози, вміст геміцелюлозних полісахаридів та показники ефективності їх перетворення. Найбільш велика різниця за показниками складу клітинної стінки була між регіонами розташованими в таких місцях, як Москва (РФ) та Вагенінген (Нідерланди). Результати дослідження перетворення целюлози свідчать про те, що в середньому за зразками цей показник варіював в межах 17,3 – 26,4 % - з найменшим показником у Вагенінгені та найбільшим у Москві. Навпаки, при дослідженні ефективності перетворення геміцелюлози найвищі показники за цим параметром були зафіксовані в Вагенінгені (12,3 %) та найнижчі показники за ефективністю перетворення геміцелюлози зафіксовані в с. Поташ (Черкаська область, Україна). Такий показник, як розрахунковий вихід етанолу, коливався від 65,6 г/кг сухої маси (Вагенінген) до 83,5 г/кг сухої маси (Москва).

В цілому, найбільш чутливим до умов навколишнього середовища виявився один з гібридних генотипів *M. × giganteus*, в той час як найменш чутливим до умов культивування виявився один з досліджуваних генотипів *M. sacchariflorus* (Weijde, 2016).

2.4. Аналіз генетичної складності складу клітинної стінки міскантусу та якості біомаси для біопалива

Високий рівень синтенії геномів *Miscanthus* та *Sorghum* дозволяє використання біоінформатичних інструментів для пришвидшення досліджень з генетичного мапування та ін. З метою визначення асоціативних зв'язків регіонів геному зі складом клітинної стінки та ефективності перетворення її компонентів було створено популяцію з гібридів першого покоління (182 лінії) шляхом схрещування двох видів *M. sinensis* з протилежно різними показниками якості біомаси та проведено дослідження QTL. Отримана гібридна популяція мала істотний рівень успадкованого різноманіття за всіма якісними ознаками біомаси. Дослідження якості біомаси проводили після другого і третього року вирощування. В результаті проведеного дослідження було встановлено 73 QTL, серед яких 9 виявилися асоційованими зі складом клітинної стінки стебла, 5 відповідали за целюлозу, 6 були пов'язані з геміцелюлозними полісахаридами, 22 з лігніном та 12 були асоційованими з вмістом нейтральних цукрів. Крім того, було визначено 18 QTL, пов'язаних з показниками ефективності перетворення компонентів клітинної стінки, 7 з яких відповідали за ефективність сахарифікації, 4 асоційовані з перетворенням целюлози, 2 з перетворенням геміцелюлози, 2 з перетворенням глюкози та 3 пов'язані з перетворенням ксилози (Weijde, 2016).

2.5. Вплив посухи на ріст та якість міскантусу для виробництва біопалива

Той факт, що посуха негативно впливає на розвиток рослини, за рахунок зниження тургору і, як наслідок, виникає навантаження на клітинну стінку, яка забезпечує збереження структури. На сьогоднішній день вплив посухи на зміни у складі клітинної стінки є мало дослідженим (Moore *et al.*, 2008; Tenhaken, 2015).

З метою вивчення впливу посухи на ріст та якісні показники рослин проведено дослідження з використанням 50 генотипів *Miscanthus*, з них 35 генотипів *M. sinensis*, 8 генотипів *M. sacchariflorus* та 5 гібридних генотипів *M. sinensis* та *M. sacchariflorus*. Для дослідження впливу посухи рослини вирощували в умовах достатнього зволоження протягом 84 днів, після того, рандомізовано відібрана половина рослин вирощувалась без зволоження ґрунту протягом 28 діб, друга половина вирощувалась в умовах достатнього зволоження і використовувалась як контроль. Після 28 діб стресових умов рослини зрізали, висушували і проводили біохімічний аналіз клітинних стінок. Всі процедури були аналогічними для контрольних зразків. Досліджували ріст рослин, склад клітинних стінок та ефективність біоконверсії. За результатами дослідження встановлено, що все генотипи по різному реагували на вплив посухи. Встановлено що за умов достатнього зволоження частка стебла в середньому складала 47,6 % від загальної сухої маси рослин, під впливом посухи збільшувалась частка стебла від загальної сухої маси рослин. Суха маса рослин в середньому становила 20,1 г для контролю, проте, під впливом посухи середня суха маса рослин була 11,1 г. Посуха мала істотний негативний вплив на вміст целюлози, геміцелюлозних полісахаридів, та ефективність перетворення целюлози. Посуха мала незначний вплив на вміст лігніну в клітинних стінках стебла та не мала істотного впливу на вміст лігніну в листі. Проте такі показники, як ефективність оцукрювання під впливом посухи зросли як для зразків стебла (9 %), так і для листя (4 %). Так, одним з найбільш негативних наслідків посухи, виявилось зниження вмісту клітинних стінок в зразках. Так, в зразках стебла вміст клітинних стінок знизився на 11,62 % та на 10,43 % в зразках листя. Свої результати вже були опубліковані при дослідженні впливу посухи на *M. × giganteus*. Проте, за результатами дослідження *M. × giganteus* встановлено що навіть за умов недостатнього зволоження, і тому зниження виходу біомаси на 15 %, врожайність його біомаси була вищою ніж вихід біомаси залишків кукурудзи в аналогічних умовах (Emerson *et al.*, 2014). Той факт, що ефективність оцукрювання підвищується при зниженні вмісту клітинних стінок в біомасі

зустрічається в результатах декількох інших досліджень (Torres *et al.*, 2014; Weijde *et al.*, 2016).

Отже, ефективність сахарифікації значною мірою залежить від кількості лігніну в сировині. Ефективність виробництва різних видів біопалива залежить від генотипу міскантусу та потребує проведення досліджень для відбору генотипів з оптимальними якісними ознаками. Процеси регулювання біосинтезу клітинної стінки можуть бути змінені внаслідок сигналів навколишнього середовища. Як свідчать результати аналізу літературних джерел, посуха значною мірою впливає як на кількісні, так і на якісні показники біомаси. Проте, навіть за умов недостатнього зволоження завдяки високому врожаю біомаси міскантус може використовуватись як біоенергетична культура.

РОЗДІЛ 3

ПОЛІПОЛОЇДИЗАЦІЯ МІСКАНТУСУ

Поліплоїдія - це спадкове збільшення кількості копій геному організмів, що значною мірою визначає різноманіття рослинного світу (Lutz, 1907; Stebbins, 1950; Grant, 1981). За результатами досліджень 15% видів покритонасінних та 31 % видів голонасінних з'явилися в результаті поліплоїдизації (Wood *et al.*, 2009). Поліплоїдні рослини здебільшого мають перевагу над диплоїдними формами за розміром клітин та кращі показники продуктивності (Birchler *et al.*, 2003, Del Pozo and Ramirez-Parra, 2015; Tavan *et al.*, 2015; Vergara *et al.*, 2016; Munzbergova, 2017; Pavlikova *et al.*, 2017). Встановлено, що поліпоїди мають більші за розміром квітки та листя, ніж відповідні диплоїдні рослини (Talebi *et al.*, 2017). Поліплоїдія широко застосовується в сільському господарстві, і на сьогоднішній день є велика кількість нових культур та поліплоїдних форм як дводольних, так і однодольних рослин що набули популярності та вирощуються замість диплоїдних форм. Важливою властивістю поліплоїдів є відновлення фертильності та набуття організмом здатності до безстатевого розмноження (Comai, 2005). В більшості випадків поліпоїди мають парну кількість наборів хромосом, і найчастіше є тетраплоїдами.

Поліплоїди можуть виникати в природі випадково як результат декількох процесів, а саме проблеми з поділом клітини під час мейозу та мітозу та злиття двох диплоїдних ($2n$) гамет (Comai, 2005). У квіткових рослин спонтанні поліплоїди виникають достатньо часто, 1:100000. Якщо диплоїдна гамета, що є доволі рідкісним явищем, зливається з гаплоїдною гаметою, то в результаті утворюється триплоїдна зигота. Організми що виникли таким чином, є генетично нестабільними і їм властива стерильність. При злитті двох диплоїдних гамет виникає тетраплоїдна зигота. Організми, які виникають в результаті такого злиття, в більшості випадків відрізняються генетичною стабільністю та здатні розмножуватися статеві (Ramsey and Schemske, 1998).

Поліплоїдні організми мають певні переваги в порівнянні з диплоїдними організмами, до яких слід віднести гетерозис, наявність надлишкової кількості генів та здатність до відновлення фертильності. Результатом гетерозису є вігор поліплоїдних рослин. У випадку алополіплоїдів це пояснюється фіксацією різних батьківських геномів перманентно в одному організмі (Groose and Bingham, 1991; Tanaka and Baba, 2005). У випадку автополіплоїдів, цікавим є той факт, що гетерозис у автополіплоїдних гібридів проявляється більш істотно, ніж у відповідних диплоїдних гібридів, в той самий час у автополіплоїдних гібридів спостерігається вищий рівень інбредної депресії, ніж у відповідних диплоїдних гібридів при самозапиленні (Birchler *et al.*, 2003; Auger, 2005). Проте поліплоїдні організми мають ряд недоліків, що спричиняють певні проблеми під час поділу клітин та функціонування організму. Ці проблеми викликані змінами в структурі клітин а, отже в регуляторних процесах, складнощами, що виникають під час мітозу та мейозу, змінами в регуляції експресії генів, епігенетичною нестабільністю (Kondorosi *et al.*, 2000; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003; Risso-Pascotto *et al.*, 2005; Santos, 2003; Weiss and Maluszynska, 2000; He *et al.*, 2003; Kashkush *et al.*, 2003).

На сьогоднішній день поліплоїдні рослини широко використовуються в сільському господарстві, маніпуляції з плоїдністю дозволяють успішно проводити як міжвидові, так і міжродові схрещування, що значно розширює можливості селекційного процесу. За принципом штучної автополіплоїдії синтезовані нові форми і сорти жита, гречки, цукрового буряка та інших рослин. Поліплоїди широко використовуються для отримання безнасінневих фруктів сільськогосподарських культур. Яскравим прикладом практичного застосування стерильності триплоїдних форм є культивування безнасінневого кавуна. Для цього схрещують тетраплоїдну форму з диплоїдною формою кавуна, а вже для отримання безнасінневого врожаю запилюють триплоїдну форму пилком диплоїдного кавуна. Отримання анеуплоїдів дозволяє створення стійких до хвороб рослин шляхом додавання додаткових хромосом в геном рослини. Таким методом було передано стійкість до стеблової іржі з *Aegilops umbellulata* до

Tricum aestivum (Acquaah, 2007). Важливим є той факт, що поліплоїдія призводить до значних змін багатьох фізіологічних властивостей рослин. Так, за результатами досліджень, після подвоєння хромосом спостерігалось підвищення рівня як вторинного, так і первинного метаболізму (Levin, 1983). Більше того, рівень метаболізму в деяких випадках збільшувався вдвічі. Це спостерігалось при подвоєнні хромосом у таких рослин, як *Cannabis*, *Datura* та *Atropa* (Dhawan and Lavania, 1996). Також розроблена система з використанням поліплоїдів для продукування вторинних метаболітів в умовах *in vitro*. Так, створення та використання тетраплоїдної форми з дикого диплоїдного типу *Artemisia annua* L. (clone YUT16) призвело до збільшення продукування артемісініну в 6 разів (De Jesus-Gonzalez and Weathers, 2003). Кількісні та якісні зміни в метаболізмі рослин, а також в біоактивності продуктів метаболізму спостерігалися при вивченні отриманих поліплоїдних форм *Tetradenia riparia* (Hannweg *et al.*, 2016).

3.1. Методи поліплоїдизації рослин

Поліплоїдизація реалізується за рахунок двох механізмів: мітотична поліплоїдизація, де в основі лежить подвоєння хромосом у клітинах соматичної тканини, та мейотична поліплоїдизація, під час якої утворюється диплоїдна ($2n$) гамета (Ramsey and Schemske, 1998). Оскільки такі дигаметоїдні рослини можуть одразу бути використані в експериментах з гібридизацією, це значно пришвидшує селекційний процес. Крім того, дигаметоїдні рослини сприяють збільшенню генетичного різноманіття в наступних поколіннях (Dhooghe *et al.*, 2011).

Поліплоїдія рослин може бути штучно індукована за умов обробки антимітотичними речовинами насіння, паростків, верхівок пагонів *in vivo* або обробки асептичних експлантів в умовах *in vitro* (Dermen, 1940; Petersen *et al.*, 2003; Talebi *et al.*, 2017). Важливим параметром при доборі методу та матеріалу для обробки є отримання одноманітного генетично стабільного матеріалу в наступних поколіннях, а отже використання насіння в більшості випадків не відповідає даному критерію за рахунок сегрегації та розчеплення за генотипом. Проте за умов використання методів мікроклонального розмноження навіть після

30 циклів мікроклонального розмноження спостерігається генетична та біохімічна стабільність отриманих клонів (Talebi *et al.*, 2017). Отже, якщо метою поліплоїдизації є покращення культури або створення нових високопродуктивних поліплоїдних форм, використовують вегетативно розмножені клони певних елітних генотипів. Найчастіше з цією метою використовують методи *in vitro*. Обробку антимітотичною речовиною проводять в асептичних умовах на твердому або рідкому живильному середовищі. Такими способами отримано поліплоїдні форми *Saccharum officinarum* (Heinz and Mee, 1970), *Citrus* (Gmitter *et al.*, 1991), *Miscanthus x giganteus* (Yu *et al.*, 2009) та ін. В той самий час, при проведенні поліплоїдизації для екологічних та популяційних досліджень в більшості випадків використовують насіння або пагони видів рослин, зібраних в природних умовах, і проводять їх обробку антимітотичною речовиною (Husband *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2010; Munzbergova, 2017).

Для проведення поліплоїдизації в умовах *in vivo* використовують насіння, молоді, активно ростучі, пагони рослин, які обробляють антимітотичною речовиною. Цей метод є довготривалим, оскільки в більшості випадків рослини лише після цвітіння, запилення та формування насіння здатні дати початок поліплоїдним формам (Husband *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2018).

Важливим є метод отримання дигаплоїдів, що базується на використанні антимітотичних речовин та андрогенезу в асептичних умовах. Цей метод значно прискорює селекційні процеси сільськогосподарських рослин і вимагає поєднання штучної поліплоїдизації з використанням антимітотичних речовин та методів *in vitro*. *In vitro* андрогенез – це культура пиляків, або ізольованих мікроспор. Обидва методи культури гаплоїдів належать до найбільш застосовуваних методів для виробництва дигаплоїдів зернових культур. Ці методи вже вдало застосовані для пшениці (Hu and Kasha, 1997; Tuveesson *et al.*, 2000; Zhou and Konzak, 1989), жита, ячменю (Pickering and Devaux, 1992; Cistue, 1994) та тритикале (Gonzalez and Jouve, 2000). Велика перевага андрогенезу *in vitro* полягає в тому, що кожен пиляк містить велику кількість мікроспор всередині та кожна з них здатна дати початок гаплоїдній рослині (Lantos *et al.*, 2013).

На сьогоднішній день поліплоїдизація в умовах *in vitro* та одержання тетраплоїдів, фертильних амфідиплоїдів або гексаплоїдів вже успішно застосовано як для міскантусу китайського та гігантського (Jain and Gupta, 2013; Glowacka *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2003), так і для близьких до них видів (Thomas, 1993). Нові продуктивні гібриди на основі явища гетерозису можуть також бути одержані при використанні нових поліплоїдних генотипів міскантусу. Крім того, поліплоїдизація відкриває можливість для проведення гібридизації між гексаплоїдними фертильними генотипами міскантусу гігантського, або міжвидових схрещувань між тетраплоїдами міскантусу китайського, цукроцвіткового та інших видів міскантусу (Yu *et al.*, 2009).

Таким чином, поліплоїди заслуговують на увагу завдяки своїм властивостям та широким спектром застосування, починаючи від використання в селекційних програмах для створення нових генотипів та покращення існуючих рослин і до використання у синтезі продуктів метаболізму як у відкритому ґрунті, так і в умовах *in vitro*. Поліплоїдизація стерильних триплоїдних форм дозволяє отримати гексаплоїдні рослини, здатні продукувати життєздатне насіння, що є надзвичайно важливим для розширення генетичного різноманіття стерильного алотриплоїда *M. × giganteus*. Використання методів *in vitro* дозволяє швидко і якісно провести обробку матеріалу антимиотичною речовиною і надає можливість швидко отримати велику кількість клонів отриманих поліплоїдів. Проте, відповідно до літературних джерел, незважаючи на результати досліджень з проведення поліплоїдизації *M. × giganteus*, проблема відновлення фертильності та використання гексаплоїдних форм *M. × giganteus* в селекційних програмах все ще є не вирішеною та потребує подальших досліджень.

3.2. Антимиотичні речовини для штучної індукції поліплоїдії

Відомі антимиотичні речовини можна поділити на класичні, такі як колхіцин, та нові, до яких можна віднести такі речовини, як динітроаніліни (трифлюралін, оризалін, еталфлюралін, пендиметалін, бенфлюралін та ін.) та

фосфоротіоамідати (аміпрофосфометил, кремарт та ін.) (Ramulu *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 2011; Niimi *et al.*, 2015).

Колхіцин, оризалін та трифлюралін – це найбільш поширені антимиіотичні агенти, які зв'язуються з димерами тубуліну під час поділу клітин, перешкоджаючи таким чином формуванню мікротрубочок, а отже, утворенню веретена поділу (Petersen *et al.*, 2003). Колхіцин – найбільш популярна речовина, яка використовується для подвоєння хромосом ще з 1930-х років (Blakeslee and Avery, 1937). Проте для багатьох видів рослин в більшості випадків обробка колхіцином призводить до таких побічних ефектів як стерильність, порушення росту рослин, втрата хромосом та призводить до мутації генів (Luckett, 1989). Такі речовини, як оризалін та трифлюралін, зарекомендували себе як сполуки, здатні викликати подвоєння хромосом, проте не є такими високотоксичними, як колхіцин. Оризалін та трифлюралін – це сполуки динітроанілінового ряду, що набули поширення як досходові гербіциди, механізм дії яких полягає у деполімеризації мікротрубочок клітини, і таким чином пригнічується розвиток кореневої системи рослин (Taiz and Zeiger, 2010; Grover *et al.*, 1997). Отже, обробка рослинних тканин сполуками динітроанілінового ряду призводить до поліплоїдизації клітин, як і обробка колхіцином. Але спорідненість колхіцину, як і близьких до нього сполук, саме до тубуліну рослин дуже низька, тому використання динітроанілінів набуває все більшого поширення як сполук, здатних деполімеризувати мікротрубочки, блокуючи утворення веретена поділу (Yemets and Blume, 2008). Перспективними сполуками динітроанілінового ряду для одержання поліплоїдів є: N,N-диетил-2,6-динітро-4-(трифторметил) анілін (Br-15) та N-(2,6-динітро-4-трифторметилфеніл) пропанол (Br-47), при взаємодії яких з рослинним тубуліном істотно знижується або повністю блокується полімеризація тубуліну (Ожередов та ін., 2009; Ожередов та ін., 2011). Важливим моментом є те, що при високій гомологічності амінокислотних послідовностей всіх тубулінів динітроаніліни слабо взаємодіють з тубулінами грибів та тварин, маючи при цьому високу спорідненість до тубуліну рослин (Morejohn and Fosket, 1991; Ємець та Блюм, 1999; Banerjee *et al.*, 2007; Spasevska *et al.*, 2017).

Аналіз літературних джерел свідчить про те, що при проведенні поліплоїдизації *M. x giganteus* в умовах *in vitro*, ефективність оризаліну є вищою порівняно з колхіцином. В той же час, при застосуванні оризаліну зафіксовано зменшення кількості утворених регенерантів поліплоїдних рослин, порівняно з дослідями з використанням колхіцину, що вказує на його високий рівень фітотоксичності (Yu *et al.*, 2009). Схожі результати отримані також при проведенні поліплоїдизації на інших злакових рослинах (Wan *et al.*, 1991). Все це свідчить про недостатньо високу ефективність використання класичних динітроанілінових сполук з метою отримання поліплоїдних рослин що, в першу чергу, пов'язано з високим рівнем їх фітотоксичності. Тому актуальним питанням є пошук та використання нових динітроанілінів, які мали б значно нижчий рівень фітотоксичності у порівнянні з вже апробованими представниками даного класу сполук (оризалін, трифлюралін) та не поступались би їм за здатністю блокувати полімеризацію тубуліну (Ожередов *та ін.*, 2009; Ожередов *та ін.*, 2010).

При використанні антимітотичних речовин важливими є такі параметри як експозиція та концентрація речовини. Кожен вид рослин при проведенні поліплоїдизації потребує проведення підбору цих умов, оскільки низька концентрація антимітотичної речовини не є ефективною, в той час як висока концентрація призводить до загибелі рослинного матеріалу. Крім того, зависока концентрація, так само як і збільшена тривалість обробки, призводять до повторного подвоєння кількості хромосом та отримання ліній з більшим рівнем плоїдності, ніж потрібно (Allum *et al.*, 2007). Також було продемонстровано, що найбільш ефективна антимітотична речовина, її концентрація та тривалість обробки залежить від виду рослин. На сьогоднішній день колхіцин найчастіше використовують в експериментах з поліплоїдизації плодових, овочевих та інших сільськогосподарських культур. Проте під час поліплоїдизації декоративно - листяних видів рослин найчастіше використовують оризалін та трифлюралін (Dhooghe *et al.*, 2011).

Колхіцин є найбільш вивченим з антимітотичних речовин. Приєднуючись до молекули тубуліну зі стехіометричним коефіцієнтом, що дорівнює 1, ця

речовина повністю блокує процес полімеризації мікротрубочок (Urpuluri *et al.*, 1993). Взаємодія колхіцину з тубуліном носить незворотній характер на відміну від колцеміду, де цей процес зворотній. Ця особливість пов'язана з В-кільцем колхіцину, оскільки це єдина структурна відмінність між цими двома сполуками (Ray *et al.*, 1981). За результатами досліджень принцип взаємодії полягає в тому, що колхіцин стабілізує власний сайт зв'язування (Sherline *et al.*, 1975), стимулює активність ГТФаз (David-Pfeuty *et al.*, 1979), призводить до незначних структурних змін тубуліну (Andreu and Timasheff, 1982).

Дослідження гербіцидного впливу антимітотичних речовин динітроанілінів, таких як оризалін на рослини, його здатності блокувати полімеризацію мікротрубочок, тим самим блокуючи мітоз, розпочалися у 80-х роках минулого століття (Morejohn and Fosket., 1987). Подальші дослідження встановили, що процес зв'язування оризаліну з рослинним тубуліном відбувається дуже швидко та формування комплексу оризалін-тубулін має зворотній характер. Таким чином, механізм взаємодії динітроанілінів з тубуліном простіший на відміну від колхіцину, де утворення комплексу білок-ліганд відбувається в 2 етапи, час необхідний для зв'язування якого з тубуліном триває 2-4 год, та утворений комплекс колхіцин-тубулін не здатний до дисоціації (Hugdahl and Morejohn, 1993).

З появою секвенованих геномів з різних організмів та розвитком біоінформатики стало можливим проведення досліджень взаємодії антимітотичних речовин з білковими мішенями з використанням методів *in silico*, а саме, моделювання структури білків, створення баз даних антимітотичних речовин, проведення молекулярного докінгу та оцінка утворюваних в результаті взаємодії комплексів. За допомогою цих методів були встановлені спільні консервативні ділянки α -тубуліну для всіх видів рослин, як вищих так і нижчих, та α -тубуліну тваринного походження. Крім того, з використанням методу електронної кристалографії створено атомну модель α/β гетеродимерів тубуліну. Так було визначено, що треонін в 239 позиції (Thr 239) є консервативним для всіх відомих рослин та тварин, що підкреслює функціональну роль цієї ділянки білку.

За результатами досліджень, стійкість рослин до динітроанілінових гербіцидів виникає в результаті мутації саме в цій позиції (Nogales *et al.*, 1998; Blume *et al.*, 2003).

3.3. Штучні поліплоїди *Miscanthus* та гаплоїди

Використання колхіцину для поліплоїдизації міскантусу. На сьогодні проведено ряд досліджень з одержання поліплоїдів різних видів міскантусу в культурі *in vitro* з використанням колхіцину (Petersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2009; Glowacka *et al.*, 2010a; Glowacka *et al.*, 2010b). Петерсен та ін. (2003) дослідили такі параметри, як: концентрацію колхіцину та тривалість обробки та тип експланту для проведення поліплоїдизації *M. sinensis*. Як матеріал для обробки антимиотичною речовиною використовували як цілісні рослини, так і їх пагони, апекси пагонів, експланти з листя, а також *in vitro* стебла та ембріогенний калюс, індукований з незрілих суцвіть.

При спробі обробки рослин *in vivo* колхіцином для поліплоїдизації *M. sinensis* встановлено, що кількість нових пагонів через 12 тижнів після обробки зменшувалася при збільшенні концентрації колхіцину. Так, при обробці рослин колхіцином у концентрації 626 мкМ кількість нових пагонів становила 52, а при збільшенні концентрації до 1252 мкМ та 2404 мкМ кількість пагонів що утворилися після через 12 тижнів становила лише 30 та 14, відповідно. Ці результати відповідають результатам попередніх досліджень з обробки рослин *M. sinensis* колхіцином (Petersen *et al.*, 2003). В цьому експерименті рослини з ґрунту промивали водою та обробляли колхіцином, розведеним у воді, до необхідної концентрації, для покращення поглинання антимиотичної речовини тканинами розчин містив 1,5 %-ний DMSO. Після обробки колхіцином рослини обрізали та пагони довжиною 5 см висаджували в закритомі ґрунті. Через 12 тижнів після обробки підраховували кількість рослин, що вижили, та кількість нових пагонів, що утворилися. Рівень плоідності окремих пагонів визначали за допомогою проточної цитометрії. В результаті цього експерименту не було отримано тетраплоїдних рослин *M. sinensis*. Лише 3 пагони з 52 отриманих після обробки

колхіцином у концентрації 626 мкМ мали як тетралоїдні, так і диплоїдні ядра, та 1 пагін з 14 отриманих після обробки колхіцином у концентрації 2404 мкМ також виявився химерою (Petersen *et al.*, 2002).

При обробці колхіцином окремих пагонів *M. sinensis in vitro* використовували концентрації 156, 313, 626, 1252 та 2504 мкМ протягом 6 та 18 год. В результаті виживання пагонів спостерігалось лише у варіантах, де концентрація колхіцину була не вищою 313 мкМ. За результатами цього дослідження найкращі результати були при обробці колхіцином у концентрації 156 мкМ протягом 6 год, тут кількість отриманих тетраплоїдних рослин була найвищою - 39,3%. Крім того, з 6 оброблених пагонів після 12 тижнів культивування отримано 99 рослин, 84 з яких було протестовано та 33 з них виявилися тетраплоїдами. При обробці пагонів колхіцином у концентрації 313 мкМ протягом 18 год з 6 оброблених пагонів через 12 тижнів було одержано 27 пагонів, серед яких 2 виявилися тетраплоїдами та 2 химерними. Цей метод обробки колхіцином виявився залежним від генотипу, оскільки при обробці інших генотипів *M. sinensis* було отримано лише декілька тетраплоїдних рослин. Також спостерігалась велика кількість утворення химерних ліній (Petersen *et al.*, 2003).

Для обробки колхіцином також використовували рослини *M. sinensis* в умовах *in vitro*. Після вкорінення на живильному середовищі рослини занурювали на 6 год в розчин колхіцину в концентрації 156 та 313 мкМ. Обробку проводили на світлі при температурі 24 С. Після обробки рослини обрізали та пагони 5 см довжиною акліматизували і вирощували в умовах закритого ґрунту. Виживання експлантів підраховували через 4 тижні після обробки, кількість отриманих пагонів та рівень їх плоїдності визначали через 9 тижнів після обробки. За результатами проведеного дослідження 7 генотипів *M. sinensis* після обробки колхіцином у концентраціях 156 та 313 мкМ не показали істотної різниці за таким параметром як виживання експлантів через 4 тижні після обробки, проте спостерігалось істотне коливання у кількості отриманих пагонів з одного обробленого експланту через 9 тижнів після обробки. Так, при обробці 64 рослин колхіцином у концентрації 156 мкМ отримано 395 пагонів, серед яких 9

виявилися тетраплоїдами та 15 химерними. Коефіцієнт вегетативного розмноження за цих умов становив 6,2. Варіант, де використовували колхіцин у концентрації 313 мкМ мав коефіцієнт розмноження 4,5. Тут з 62 оброблених рослин було отримано 279 пагонів, серед яких лише 7 виявились тетраплоїдами, та 22 мали як диплоїдні так і тетраплоїдні клітини (Petersen *et al.*, 2003).

Також було досліджено індукцію калюсу з незрілих суцвіть, апексів пагонів та фрагментів листя на середовищі, доповненому колхіцином, з подальшою регенерацією (Petersen *et al.*, 2003). В результаті було встановлено, що використання колхіцину під час індукції калюсу є більш ефективним, ніж обробк рослин, оскільки більшість регенерованих рослин *M. sinensis* були тетраплоїдами. Авторами встановлено, що кращим експлантом для цього є верхівка пагону, оскільки індукція пагоноутворюючого калюсу є менш залежною від генотипу, ніж індукція ембріогенного калюсу. Кращі результати були одержані на середовищі для індукції калюсогенезу що містило 2,5 г/л колхіцину протягом 4 діб. В результаті близько 80% оброблених апексів регенерували тетраплоїдні рослини.

Іншою групою дослідників також проведено поліплоїдизацію *M. sinensis* та *M. × giganteus* з використанням колхіцину. Досліджено ефективність обробки колхіцином пагонів *in vitro* (Glowacka *et al.*, 2010a), а також досліджено ефективність обробки колхіцину під час індукції калюсогенезу та під час регенерації рослин з калюсу (Glowacka *et al.*, 2010b). При обробці асептичних пагонів колхіцином використовували окремі пагони 5 см довжиною. Обробку проводили протягом 6, 8 та 24 год, використовуючи концентрації 156,5, 313, 626 та 1252 мкМ. Після обробки пагони тричі промивали стерильною водою та переносили на середовище МС (Murasige and Skoog, 1962), яке містило 2 мг/л БАП. Рослини культивували протягом 12 тижнів. В результаті експерименту з 1800 оброблених експлантів вижило 524, таким чином середнє виживання експлантів склало 29,1%. При концентрації колхіцину 1252 мкМ та тривалості обробки 24 год. один генотип *M. sinensis*, який досліджували, як і генотип *M. × giganteus*, не мали експлантів, що вижили. Два інших генотипи MS11 та MS16 мали показники по виживанню експлантів на рівні 3,3 та 10,0% відповідно. Проте

жодної поліплоїдної лінії не було отримано в результаті цього варіанту обробки колхіцином. Найефективнішим для поліплоїдизації *M. sinensis* виявився варіант з використанням концентрації колхіцину 313 мкМ протягом 18 год., де відсоток поліплоїдизованих ліній був на рівні 55% та виживання експлантів після обробки становило 20%.

У випадку *M. × giganteus* найефективнішим виявився варіант, де пагони обробляли колхіцином у концентрації 1252 мкМ протягом 18 год (Głowacka *et al.*, 2010a). В результаті цього варіанту рівень поліплоїдизації становив 7,1%, виживання експлантів після обробки було на рівні 23,3%. При обробці колхіцином у концентрації 626 мкМ та тривалістю обробки 6 год. ефективність поліплоїдизації становила 4,3% при виживанні експлантів 33,3%. При обробці в цій концентрації протягом 18 год. відповідні показники були 4,1% та 36,7%, відповідно. Зниження концентрації колхіцину до 313 мкМ призвело до збільшення відсотку експлантів що вижили після обробки, цей показник становив 53,3% при тривалості обробки 24 год. В цьому варіанті ефективність поліплоїдизації була на рівні 3,6%. Всі інші варіанти обробок пагонів *M. × giganteus* колхіцином не призвели до утворення поліплоїдів (Głowacka *et al.*, 2010a).

При проведенні дослідження з поліплоїдизації *M. × giganteus* та *M. sinensis* під час індукції калюсогенезу використовували колхіцин у концентраціях 313 та 626 мкМ (Głowacka *et al.*, 2010b). Незрілі суцвіття використовували як експланти для калюсогенезу, які культивували на середовищах для індукції калюсогенезу з додаванням колхіцину протягом перших 2, 4 та 7 діб. Через 12 тижнів після початку культивування з 5040 експлантів було отримано 30238 фрагментів калюсної культури. Після регенерації рослин з калюсу встановлювали рівень плоїдності отриманих ліній. Найефективнішим варіантом під час поліплоїдизації *M. sinensis* виявився варіант культивування на середовищі з колхіцином у концентрації 313 мкМ протягом 7 діб. Із 207 проаналізованих пагонів 60 виявилися поліплоїдами, таким чином, рівень поліплоїдизації становив 29,0%. При підвищенні концентрації колхіцину у середовищі до 626 мкМ в більшості

варіантів не було отримано поліплоїдних ліній *M. sinensis*. Під час поліплоїдизації *M. × giganteus* найефективнішим виявився варіант з концентрацією колхіцину у середовищі для індукції калюсогенезу 626 мкМ та тривалістю культивування 4 доби. Так, за результатами експерименту з 101 проаналізованого пагона було отримано 29 гексаплоїдних ліній, отже ефективність поліплоїдизації становила 28,7%. Проте, як і у випадку *M. sinensis*, при підвищенні концентрації колхіцину у середовищі для індукції калюсогенезу до 626 мкМ та тривалості культивування 7 діб не було отримано поліплоїдних ліній. Важливо зазначити, що 2 генотипи *M. sinensis* (MS16, MS21) та генотип *M. × giganteus* (MG1), що використовували в дослідженні, мали вищі показники за інтенсивністю індукції калюсогенезу на середовищі, що містило колхіцин, ніж на середовищі без колхіцину (контроль).

Також проведено дослідження з обробки колхіцином під час регенерації рослин з калюсу (Głowacka *et al.*, 2010b). Колхіцин у концентрації 313 мкМ додавали у середовище для регенерації та культивували калюс протягом перших 2, 4 та 7 діб. Як контроль використовували варіант з безпосереднім перенесенням калюсу з середовища для проліферації на регенераційне середовище, яке не містило колхіцину. Через 20 тижнів після початку культивування калюсу на регенераційному середовищі пагони переносили на середовище для вкорінення та проводили визначення рівня плоїдності отриманих рослин. У випадку *M. sinensis* такий показник, як здатність до регенерації рослин з калюсу виявився залежним від генотипу. В результаті дослідження отримано 4716 пагонів обох видів міскантусу. Для *M. × giganteus*, так як і для гексаплоїдного генотипу *M. sinensis* (MS19), найбільш ефективним виявився варіант з попереднім культивуванням калюсу на регенераційному середовищі, вільному від колхіцину, протягом 4 діб на світлі до початку експерименту. Таким чином, з 136 проаналізованих рослин *M. × giganteus*, які було регеновано на середовищі з колхіцином перші 4 доби, 28 виявилися гексаплоїдними, що становило 20,6%. Ефективність поліплоїдизації була найвищою серед інших варіантів за аналогічних умов для генотипу *M. sinensis* (MS19) і становила 40%. Проте в цьому варіанті було отримано лише 10

гексаплоїдних рослин з 25 регенерованих та проаналізованих, що підкреслює залежність регенерації рослин з калюсу на середовищі з колхіцином від генотипу.

Для диплоїдного *M. sinensis* найефективнішим виявився варіант з культивуванням калюсу на середовищі з концентрацією колхіцину 313 мкМ протягом 2 діб без попереднього культивування на світлі. Кількість регенерованих тетраплоїдів становила 69 з 233 отриманих та проаналізованих рослин (26,9%) (Glowacka *et al.*, 2010b).

В іншій лабораторії в дослідженнях з поліплоїдизації *M. × giganteus* як матеріал для обробки використовували калюс індукований з незрілих суцвіть (Yu *et al.*, 2009). Проведено порівняння ефективності різних концентрацій і тривалості культивування калюсної культури на середовищі з колхіцином, як на твердому, так і на рідкому середовищі. В результаті після обробки триплоїдної калюсної культури були регенеровані гексаплоїдні рослини. Результати цього дослідження свідчать про те, що культивування калюсу на рідкому середовищі з додаванням колхіцину є більш ефективним для одержання поліплоїдного калюсу, ніж культивування на твердому середовищі. Вживання калюсу після культивування на рідкому середовищі з колхіцином у концентрації 313 мкМ після 7 діб було на рівні 80%, а при збільшенні концентрації до 939 мкМ виживання калюсу становило 27,5%. При культивуванні калюсної культури на твердому середовищі ці показники були на рівні 75 та 50%. В той же час 66,7 % клітин калюсу, що культивували на рідкому середовищі з колхіцином у концентрації 939 мкМ протягом 2 діб, виявилися гексаплоїдними, а відсоток поліплоїдних клітин калюсу, що культивували на твердому середовищі, становив лише 44 %. Це вказує на те, що антимиотична речовина абсорбується клітинами калюсу ефективніше в умовах рідкого середовища. Проте, відсоток регенерованих рослин був на рівні 8,9 %. Та всього 2 рослини з 23 регенерованих з калюсу, що культивували на рідкому середовищі рослин виявилися гексаплоїдними, та жодної гексаплоїдної рослини не було отримано за умов культивування калюсу на твердому середовищі з колхіцином (Yu *et al.*, 2009).

Колхіцин також використовували для поліплоїдизації диплоїдного *M. sacchariflorus*. Культивували меристеми з верхівок пагонів довжиною 3 мм на регенераційному живильному середовищі, що містить 2,0 г/л колхіцину протягом 16 год у темряві без ініціації калюсу. Вживання експлантів за цих умов було на рівні 31,2 %. Цей метод дозволив одержати 3 тетраплоїдні рослини, решта була диплоїдами та анеуплоїдами. Цей метод дозволив отримати тетраплоїдні рослини *M. sacchariflorus*, уникаючи можливих соматональних варіацій, оскільки він оснований на прямому органогенезі (Jain and Dutta Gupta, 2013).

Використання динітроанілінів для поліплоїдизації міскантусу.

Опубліковано ряд результатів досліджень, що вказують як на високу ефективність, так і фітотоксичність класичних динітроанілінів при проведенні поліплоїдизації як однодольних, так і дводольних рослин. Так, висока токсичність оризаліну і трифлюраліну спостерігалась при поліплоїдизації м'яти котячої (*Nepeta sp.* L), де мікроживці культивували на живильному середовищі з додаванням динітроанілінів. Фітотоксичний вплив обох сполук на ріст та розвиток експлантів був у даному випадку однаково високим (Zilbervarg *et al.*, 1997). Схожі результати були отримані при проведенні досліджень з поліплоїдизації різних видів міскантусу в культурі *in vitro* із використанням оризаліну (Petersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2009).

З метою розробки незалежного від генотипу методу поліплоїдизації *M. sinensis* проведено дослідження з використанням оризаліну як антимиотичної речовини, в якому експлантати слугували рослини, пагони *in vitro* та калюсна культура. Для покращення поглинання антимиотичної речовини тканинами розчини містили 1,5 %-ний DMSO. Обробка окремих пагонів *in vitro* оризаліном у концентраціях 30, 60 та 120 мкМ протягом 18 год. виявилася надзвичайно токсичною та лише декілька експлантів вижили після обробки оризаліном у найнижчих концентраціях. В результаті серед цих отриманих експлантів отримано 2 поліплоїдних лінії. При використанні оризаліну в концентраціях 5, 10 та 15 мкМ та з меншим часом обробки - 4 та 7 год. вживання експлантів мало істотно вищі показники. Так, при обробці верхівок пагонів *M. sinensis* оризаліном

у концентрації 15 мкМ протягом 7 діб, з 26 отриманих та проаналізованих рослин 21 виявилися тетраплоїдними, отже інтенсивність поліплоїдизації була на рівні 80,7%. Проте найбільша кількість тетраплоїдів була отримана у варіанті з концентрацією оризаліну 10 мкМ та тривалістю обробки 4 доби. За результатами цього варіанту отримано 24 тетраплоїдні рослини, хоча ефективність поліплоїдизації становила лише 60%. Досліджено ефективність обробки ембріогенного калюсу *M. sinensis* оризаліном. Калюсну культуру, яка була отримана з незрілих суцвіть, перед перенесенням на середовище для регенерації обробляли антими́отиком протягом 2 та 4 діб. В результаті досліджень після обробки оризаліном було отримано 124 регенеранта рослини, проте, лише один з них виявився тетраплоїдним (Petersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2003).

Дослідження з поліплоїдизації *M. × giganteus* продемонстрували, що оризалін більш ефективний за колхіцин. Проте кількість регенованих рослин після обробки калюса оризаліном у концентраціях 5, 10, 15 та 30 мкМ протягом 2, 4 та 7 діб була нижчою, ніж кількість регенованих рослин після обробки колхіцином, 8,9 % та 6,0 %, відповідно. При концентрації оризаліну 20 мкМ та тривалості обробки 7 діб у рідкому середовищі спостерігалась повна загибель експлантів. За аналогічних умов на твердому середовищі виживання експлантів було на рівні 12,5%. Результати аналізу обробленого калюсу за допомогою проточної цитометрії свідчать про пряму залежність кількості гексаплоїдних та химерних клітин від концентрації оризаліну у середовищі для поліплоїдизації. Так, при використанні оризаліну у концентрації 5 мкМ цей показник становив 20%. Збільшенні його концентрації до 15 мкМ супроводжувалось зростанням відсотку гексаплоїдних та химерних клітин до 63%. Після регенерації рослин з калюсу, який обробляли оризаліном було отримано 10 рослин, серед яких 5 виявилися гексаплоїдами. Найбільш ефективним виявився варіант із застосуванням 10 мкМ оризаліну у рідкому середовищі та тривалістю обробки 4 доби. За цих умов було регеновано 3 рослини, 2 з яких виявилися гексаплоїдами (Yu *et al.*, 2009).

Встановлено, що обробка вкорінених рослин *in vitro* є не ефективним методом, оскільки при використанні вкорінених рослин як експлантів

спостерігалася невелика частка тетраплоїдів та велика кількість химерних ліній (Petersen *et al.*, 2003).

Отримання гаплоїдів *Miscanthus*. В основі методу отримання гаплоїдів є зміна шляху розвитку мікроспори в процесі андрогенезу, що досягається комплексним застосуванням температурного шоку в комбінації з осмотичним стресом (Wedzony *et al.*, 2009; Dubas *et al.*, 2010). Стресові умови можуть бути застосовані на різних етапах: до рослин вцілому, до зібраних колосків, ізольованих пиляків або мікроспор. За результатами досліджень з андрогенезу *M. × giganteus* застосування комбінацій різних стресових умов не призвело до ініціації андрогенезу ні при використанні культури пиляків, ні при використанні культури ізольованих мікроспор. Низькі температури (4 °C), так само як і тепловий шок (30-32 °C) мали негативний вплив на життєздатність мікроспор *M. × giganteus*. Культивування суспензії мікроспор протягом перших 7 діб при температурі 4 °C, так само як і інкубація волотей при температурі 10 °C, мало бути оптимальним варіантом обробки для ініціації андрогенезу *M. × giganteus*. Проте дуже низька ефективність та відсутність регенованих андрогенних структур не дозволяють практично використовувати цей метод в біотехнології. За допомогою цитологічного аналізу виявлено, що причиною нездатності до андрогенезу є міжвидове гібридне походження *M. × giganteus* та проблеми під час мейотичного поділу клітин (Zur *et al.*, 2013). Схожі результати були попередньо отримані та аналогічні висновки були зроблені при спробі отримання гаплоїдів *M. × giganteus* іншою групою дослідників. За цими результатами встановлено, що проблеми під час мейозу призводять до формування мікроспор з різним набором хромосом, які істотно різняться за розміром та життєздатністю (Slomka *et al.*, 2012).

Отримання гаплоїдів та дигаплоїдів *M. sinensis*, на відміну від попереднього виду не має складнощів і розроблені методи культури пиляків дозволяють отримання гаплоїдних рослин (Glowacka *et al.*, 2009b; Glowacka *et al.*, 2012).

Таким чином, встановлено, що серед відомих антимітотичних речовин найбільш поширеними є колхіцин, трифлуралін та оризалін. Колхіцин є

високотоксичним та його спорідненість до молекул α -тубуліну рослин набагато нижча ніж до α -тубуліну тварин. Оризалін та трифлюралін є одночасно більш ефективними, але в той же час високотоксичними для рослин. Дослідження та використання нових динітроанілінів є перспективним напрямком отримання штучних поліплоїдів з метою зниження фітотоксичності для рослин. Отримання поліплоїдів міскантусу гігантського дозволить використання цього виду в селекційних процесах за рахунок можливого відновлення фертильності цього стерильного гібриду.

РОЗДІЛ 4

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Рослинний матеріал

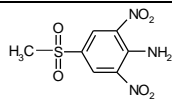
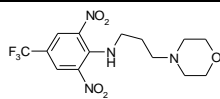
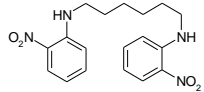
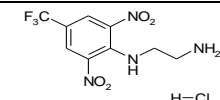
В експериментах використовували рослини *M. x giganteus*, сорт «Гулівер». Рослинний матеріал отримано з робочої колекції відділу нових культур Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України.

4.2. Матеріали, використані в роботі

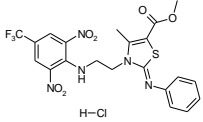
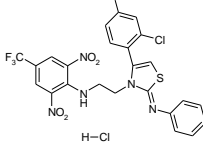
Усі реактиви, що використовували в роботі, мали кваліфікацію ч.д.а. і о.с.ч. Антимітотичні сполуки: трифлюралін – (2,6-динітро-*N,N*-дипропіл – 1 – 4 – (трифторметил)-анілін, $C_{13}H_{16}N_3F_3O_4$, м.м. - 335,5) та оризалін – ($C_{12}H_{18}N_4O_6S$, м.м. – 346,36), (Fluka, Швейцарія). В роботі також були використані похідні нітро- та динітроанілінів, синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України (Додаток А). Перелік відібраних перспективних динітроанілінів наведено в Таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Перелік нових антимітотичних речовин, використаних для поліплоїдизації міскантусу гігантського

№ з/п	Хімічна назва	Формула	
1	4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін	$C_7H_7N_3SO_6$	
2	N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін	$C_{14}H_{17}O_5N_4F_3$	
3	N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін	$C_{18}H_{22}N_4O_4$	
4	N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид	$C_9H_{10}ClF_3N_4O_4$	

Продовження таблиці 4.1

5	1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид	$C_{21}H_{19}ClF_3N_5O_5S$	
6	{2-[4-(2,4-дихлор-феніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін	$C_{24}H_{17}Cl_3F_3N_5O_4S$	

Примітка: представлені речовини синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України

Похідні динітроаніліну розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО), готували маточні розчини в концентрації 10 мкМ та зберігали їх при температурі – 20 С. Для проведення експериментів готували свіжі робочі розчини різних концентрацій на основі дистильованої води. Загальна концентрація ДМСО в розчинах не перевищувала 0,5 %. Динітроаніліни стерилізували за допомогою фільтрів та додавали в стерилізоване автоклавуванням охолоджене до 45 - 50 °С середовище.

4.3. Методи досліджень

4.3.1. Структурно-біоінформатичний відбір перспективних сполук динітроанілінового ряду

Первинний добір ефективних сполук нітро- та динітроанілінового ряду для отримання поліплоїдних рослин *Miscanthus* × *giganteus* здійснювали з використанням методів *in silico*. Протоколом досліджень передбачалося:

1. Реконструкція просторової структури молекули α -тубуліну з *Miscanthus* × *giganteus*, як мішені для взаємодії досліджуваних сполук.
2. Оцінка здатності нових сполук динітроанілінового ряду утворювати ліганд-білкові комплекси шляхом доування лігандів у раніше описаний сайт їх

зв'язування з α -тубуліном та їх порівняння з класичними речовинами даного класу.

3. Оцінка ефективності зв'язування досліджуваних сполук з цільовим білком шляхом аналізу стабільності отриманих комплексів.

4.3.1.1. Реконструкція просторової структури молекули α -тубуліну міскантусу

Для реконструкції просторової структури молекул α -тубулінів з *Miscanthus* використовували відомі послідовності з банку амінокислотних послідовностей UniProt (www.expasy.org). Пошук та аналіз знайдених амінокислотних послідовностей здійснювали за допомогою вбудованих *on line* сервісів UniProt.

Реконструкцію просторової структури відібраного білку здійснювали методом гомологічного (профільного) моделювання за допомогою *on-line* сервісу I-TASSER (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) (Yang and Zhang, 2015). Пошук та добір матричних структур здійснювали у базі даних RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). Оптимізацію геометрії побудованих промоделей здійснювали шляхом мінімізації енергії методом L-BFGS. Верифікацію якості промоделей здійснювали за допомогою сервісу MolProbity (molprobity.biochem.duke.edu).

4.3.1.2. Докінг динітроанілінів у сайт зв'язування α -тубуліну

Докінг лігандів здійснювали у раніше описаний сайт поверхні молекули α -тубуліну (Blume *et al.*, 2003, Нипорко *та ін.*, 2009, Ожерєдов *та ін.*, 2019). Для цього використовували область навколо атому N залишку Arg2 у зону радіусом 20 Å молекули α -тубуліну. Докінг досліджуваних сполук у сайт зв'язування та оцінку отриманих комплексів здійснювали за допомогою програмного пакету CCDC GOLD, який працює на основі генетичного алгоритму для створення нових конформацій ліганду (www.ccdc.cam.ac.uk). Під часу докінгу використовували стандартні параметри. Ефективності пошуку було встановлено на 100%, що дозволяло всім рухомим фрагментам молекули ліганду обертатися під час докінгу для досягнення їх максимальної оптимізації з оточенням. Результати докінгу оцінювали за допомогою таких оціночних функцій, як ChemScore, GoldScore та

ASP, кожна з яких давала вичерпну інформацію щодо конформації ліганду в отриманому комплексі.

4.3.1.3. Методи оцінки ефективності зв'язування дінітроанілінів з білковою мішенню

Тестування стабільності отриманих комплексів здійснювали за допомогою симуляції їх молекулярної динаміки у фізіологічному розчині. Для цього використовували спеціалізований програмний пакет «Gromacs 4.5.7» та силове поле charmm27 (www.gromacs.org). Тривалість траєкторії складала 30 нс з кроком 1 нс. Дані з топології лігандів для силового поля charmm27 було отримано за допомогою web-сервісу бази даних SwissParam (www.swissparam.ch). Всі обчислення процесу молекулярної динаміки було виконано за допомогою обчислювального кластеру «IFBG Claster», інтегрованого в Українську Національну Grid мережу.

Аналіз ефективності зв'язування лігандів визначали на підставі таких показників, як енергія зв'язування, а також утворення й стабільність водневих зв'язків.

Енергію зв'язування низькомолекулярних лігандів з молекулою α -тубуліну визначали за наступною формулою:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha(\langle V_{l-s}^{\text{wdw}} \rangle_p - \langle V_{l-s}^{\text{wdw}} \rangle_w) + \beta(\langle V_{l-s}^{\text{el}} \rangle_p - \langle V_{l-s}^{\text{el}} \rangle_w) \dots (4,1)$$

де: $\langle V_{l-s}^{\text{wdw}} \rangle_p$ – енергія Ван дер Ваальсових взаємодій ліганда у комплексі;

$\langle V_{l-s}^{\text{wdw}} \rangle_w$ – енергія Ван дер Ваальсових взаємодій ліганда у вільному стані;

$\langle V_{l-s}^{\text{el}} \rangle_p$ – енергія електростатичних взаємодій ліганда у комплексі;

$\langle V_{l-s}^{\text{el}} \rangle_w$ – енергія електростатичних взаємодій ліганда у вільному стані;

$\alpha = 0,18$, $\beta = 0,50$ (Aqvist and Marelis, 2001, Almlof *et al.*, 2004).

Результати обрахунку молекулярної динаміки для вільних та зв'язаних лігандів оцінювали за такими критеріями, як середньоквадратичне відхилення (СКВ) між атомами (рівень молекулярних коливань) та конформаційна енергія (сума енергій електростатичних та кулоновських взаємодій).

Візуалізацію результатів та їх аналіз було виконано за допомогою програмних пакетів BIOVIA DS Visualizer (www.3dsbiovia.com) та PyMOL 2.4 (pymol.org).

4.3.2. Введення міскантусу гігантського в культуру *in vitro*

Всі маніпуляції з рослинним матеріалом проводили в камерах з ламінарним потоком стерильного повітря для виключення можливості бактеріального та грибкового зараження. Поверхневу стерилізацію проводили в асептичних умовах. Як експланти використовували кореневі придаткові бруньки з невеликими фрагментами ризом. Експланти відбирали зі свіжих та ретельно відмитих від ґрунту коренів рослин. Головними критеріями відбору експлантів були оптимальний розмір адвентивних бруньок кореневищ (0,3–1,0), наявність ознак життєздатності та відсутність механічних пошкоджень. З метою підбору найбільш ефективного методу стерилізації ризом *M. x giganteus* використовували різноманітні комбінації стерилізаторів. Використовували такі речовини, як: хлор (Cl_2), перекис водню (H_2O_2), гіпохлорит натрію ($NaOCl$), бордоська суміш, 70%-ний етанол, нітрат срібла ($AgNO_3$) та ін. Як допоміжні речовини використовували детергент Tween 20, антибіотики цефотаксим та канаміцин, фунгіцид превікур.

Оброблені експланти культивували на твердому середовищі МС з використанням як джерела вуглецю 30 г/л цукрози. Для зниження рівня накопичення фенольних сполук середовище доповнювали 50 мг/л цистеїну. Всі інші варіанти живильних середовищ, що використовували в роботі, також містили в своєму складі цистеїн (Gubisova *et al.*, 2013). Культивування відбувалось за умов 16/8 год. фотоперіоду та температури 24°C.

Мікроклональне розмноження шляхом прямого морфогенезу. Для отримання необхідної кількості асептичних пагонів шляхом мікроклонального розмноження використовували тверде середовище МС. Для активного формування адвентивних бруньок, пагоноутворення та росту пагонів в середовище додавали 6-бензиламинопурин (БАП), у кількості 2 мг/л. Культивування відбувалось за умов 16/8 год. фотоперіоду та температури 24°C.

Мікроклональне розмноження шляхом непрямого морфогенезу.

Індукцію калюсогенезу проводили шляхом культивування асептичних пагонів на твердому середовищі МС. Як джерело вуглецю використовували 30 г/л цукрози. Для цього до середовища додавали БАП (0,05мг/л, 0,1мг/л, 0,2мг/л) та 2,4–дихлорфеноксіоцтову кислоту (2,4Д) (2,5мг/л, 5,0мг/л) у різних співвідношеннях. Як експланти використовували асептичні зелені пагони, одержані безпосередньо з бруньок ризом, або мікроклонально розмножені пагони. Культивування здійснювали в чашках Петрі, які містили 30 мл середовища. Експланти довжиною 50–100 мм поміщали в чашки по 5 шт. без занурення у середовище. Експланти культивували при температурі 24°C у темряві. Кожні 14 днів експланти переносили на свіже живильне середовище з відповідною комбінацією регуляторів росту.

Для отримання регенерантів рослин з калюсу, останній переносили на тверде середовище МС із додаванням БАП, у кількості 2 мг/л. Як джерело вуглецю використовували 30 г/л цукрози. Культивування відбувалось за умов 16/8 год. фотоперіоду та температури 24°C.

Укорінення, акліматизація та пересадка рослин в ґрунт. Отримані лінії вкорінювали на твердому середовищі МС з додаванням НОК у концентрації 1 мг/л та культивували за умов 16/8 год. фотоперіоду та температури 24°C (Gubisova *et al.*, 2013). Через 3 тижні культивування на базальній частині пагонів спостерігалось утворення від трьох до десяти добре розвинених коренів. Вкорінені пагони промивали під проточною водою для видалення залишків живильного середовища та висаджували в касети для розсади на 77 вічок, розміром 45x45x62 мм, заповнені універсальним субстратом для розсади, до складу якого входить якісний верховий, перехідний та низинний торф, фракції 1–6 мм, пісок, перліт, мікроелементи (Fe, Mn, B, Cu, Zn, Mo), показники рН 5,5–6,5. Висаджені в ґрунт рослини культивували при температурі 18–25°C та регулярному зволоженні субстрату. Акліматизовані рослини переносили до умов відкритого ґрунту для проведення подальших досліджень.

4.3.3. Визначення плоідності отриманих ліній

Визначення рівня плоідності отриманих ліній проводили шляхом підрахунку кількості хромосом у клітинах апікальної меристеми коренів міскантусу. Матеріал для мікроскопічних досліджень фіксували протягом 2–4 год. при температурі 18-20° С у суміші Кларка (96% етиловий спирт та льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3:1) та відмивали у 70%-ному розчині етилового спирту (Кундельчук, 2002). Мацерацію матеріалу здійснювали в 1Н НСІ та фарбували 1%-ним розчином орсеїну або карміну в 45%-ній оцтовій кислоті. Тимчасові давлені препарати готували в 45%-ній молочній кислоті (Паушева, 1988). Дослідження проводили із використанням мікроскопа Zeiss, Axioscop 40. Результати документували за допомогою цифрової камери Zeiss, AxioCam MRC 5 та програмного забезпечення Axivision Rel. 4.7.

4.3.4. Аналіз морфометричних та біохімічних показників

Під час виконання досліджень за зазначеною темою використовували загальноприйнятні методики проведення досліджень.

4.3.4.1. Вимірювання висоти поліплоїдних рослин

Рослини зрізали біля основи до 1-го міжвузля. На зрізаних рослинах в лабораторних умовах проводили вимірювання загальної висоти рослин. До фази викидання волоті висоту рослини визначали від поверхні ґрунту до верхівки самого довгого розправленого листка, а після викидання волоті – до верхівки волоті.

4.3.4.2. Обрахунок кількості пагонів на рослині

У зрізаних рослин в лабораторних умовах проводили обрахунок кількості пагонів на рослині.

4.3.4.3 Обрахунок кількості листків на стеблах поліплоїдних рослин

У зрізаних наприкінці вегетаційного сезону рослин в лабораторних умовах проводили обрахунок кількості листків на рослинах.

4.3.4.4. Визначення кількості ризом у поліплоїдних рослин

Наприкінці вегетаційного сезону після зрізання надземної частини досліджуваних рослин кореневу систему викопували. Ризоми обтрушували від

грунту, промивали під проточною водою. Рахували кількість утворених ризом на поліплоїдних рослинах.

4.3.4.5. Аналіз структури поліплоїдних рослин

У зрізаних для проведення дослідження рослин в лабораторних умовах відокремлювали пагони від листя і проводили вимірювання маси стебла та маси листя поліплоїдних рослин. Після зважування окремо кожної з частин рослин визначали відсоткове співвідношення сирої маси пагонів до сирої маси листя.

4.3.4.6. Обрахунок надземної маси поліплоїдних ліній

Зрізані наприкінці вегетації поліплоїдні рослини в зважували в лабораторних умовах. Рослини зрізали біля основи до 1-го міжвузля.

4.3.4.7. Визначення вмісту сухої речовини в поліплоїдних рослинах

Наважки для визначення вмісту сухої речовини брали з однієї подрібненої середньої проби. Із середньої подрібненої проби міскантусу після ретельного перемішування брали 3 наважки по 25–50 г з точністю до 0,01 г та клали у попередньо зважені чашки Петрі. Після зважування чашки з наважками переносили до сушильної шафи, нагрітої до 120°C і витримували 20–30 хв. за температури 100–102°C для гальмування життєвих процесів у матеріалі, потім висушували за 60–70°C у сушильній шафі до повітряно-сухого стану. Легка ламкість матеріалу вказувала, що основну масу води видалено. Після цього проби міскантуса гігантського сушили протягом 4 год, за температури 100°C. Охолоджені в ексікаторі чашки з сухою речовиною зважували і знову сушили упродовж години за температури 100°C. Далі знову охолоджували і зважували. Коли різниця між двома зважуваннями перевищувала 0,01–0,02 г, досушували ще півгодини, знову охолоджували і зважували, результати фіксували.

4.3.4.8. Визначення вмісту золи в поліплоїдних рослинах

Наважку з подрібнених середніх проб ліній міскантусу озолювали, обережно прожарюючи за вільного доступу повітря. За таких умов вуглець, водень, азот і частково кисень вилітають, залишаються лише мінеральні речовини у вигляді окисних сполук. Вимиті фарфорові тиглі попередньо прожарювали у муфельній печі протягом однієї години, охолоджували і зважували на аналітичних

вагах. З кожної середньої проби відбирали по дві наважки 2,0–2,5 г повітряно-сухої речовини, наважку в тигель клали нещільно, щоб кисень повітря легко проходив у нижні її шари. При закладанні експерименту враховували той факт, що розмелювання середніх проб до часток діаметром менше 1 мм обмежує озолення, ускладнюючи доступ кисню до часток озолюваної речовини. Тиглі з наважками поміщали у муфельну піч, дверцята закривали нещільно. Обвуглення органічної речовини проводили за умов слабого нагрівання печі. Після того, як речовина у тиглях переставала диміти і обвуглювалась, нагрівання муфеля зупиняли. Озолення вважали закінченим, коли в золі були відсутні частки недогорілого вугілля світло-сірого кольору або, залежно від присутності оксиду заліза, буро-червоного, а інколи зеленуватого (за наявності сполук марганцю). Тиглі охолоджували в ексикаторі протягом 30–40 хв. і зважували. Після цього повторно прожарювали у печі протягом 30 хв. і знову зважували. Коли маса тиглів із золою не змінювалась, озолення вважалось закінченим. Якщо різниця між наважками була більшою ніж 0,0005 г прожарювання повторювали. При збільшенні маси після повторного прожарювання для розрахунку використовували першу масу.

Зольність визначають за формулою:

$$\frac{b \times 100 \times 100}{a (100 - v)} \dots\dots\dots(4.2)$$

де: a – наважка повітряно-сухої речовини, г;

b – маса золи, г;

v – гігроскопічна волога, %.

Розходження між двома паралельними визначеннями не перевищувало 0,05 %.

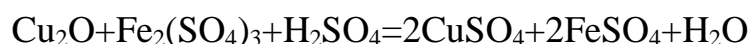
4.3.4.9. Обрахунок енергетичної цінності біомаси поліплоїдних ліній

Енергетичну цінність сировини визначали на калориметрі ІСО 200. Енергетичну продуктивність рослин визначали на основі теплоємності та урожайності фітосировини з урахуванням стандартних методик (Дубровін *та ін.*, 2013).

4.3.4.10. Визначення вмісту цукрів в поліплоїдних рослинах

Метод кількісного визначення вмісту цукрів (за Бертраном), який був використаний в роботі, базується на здатності редукуючих цукрів, які мають вільну альдегідну або кетонну групу, відновлювати в лужному середовищі сірчаної кислоти мідь у закисну. Осад закису міді розчиняли у сірчаної кислоти залізі у присутності сірчаної кислоти. При цьому закис міді окислюється залізом, відновлюючи його в закисне, а останнє окислюється розчином перманганату калію. Вміст дицукрів визначали за цим методом, але лише після гідролізу їх розведеними мінеральними кислотами.

Для визначення кількості моноцукрів у зразках поліплоїдних ліній міскантусу гігантського дві паралельні проби фільтрату по 20 мл (залежно від вмісту цукру) переносили піпеткою до конічних колб ємністю 200 мл. До кожної колби перед кип'ятінням додавали по 20 мл розчину сірчаної кислоти міді й лужного розчину сегнетової солі (реактив Фелінга). Вміст колб обережно перемішували і кип'ятили протягом 3 хв. Після відстоювання закису міді (1-2 хв.) рідину фільтрували. Фільтрування проводили через азбестовий фільтр у колбу Бунзена, користуючись водоструменевим або масляним насосом Косовського. Потім осад у колбі промивали тричі гарячою дистильованою водою шляхом декантації (не переносячи на фільтр більшої частини осаду), приливаючи кожного разу до колби по 10 мл води доти, поки промивна вода мала тільки блакитнуватий відтінок. До осаду закису міді додавали 20 мл розчину залізо-амонійних галунів або окисного сірчаної кислоти заліза. При цьому закис міді окислюється в сірчаної кислоти мідь, а відповідна кількість заліза переходить із окисної форми в закисну:



Після окислення закису міді утворювалась прозора світло-зелена рідина, яку фільтрували крізь той же фільтр для розчинення закису міді, який залишився на фільтрі. Колбу, в якій був розчин, кілька разів споліскували гарячою дистильованою водою, змиваючи її також на фільтр. Гарячий фільтрат у колбі Бунзена відразу ж титрували розчином 0,1 Н перманганату калію з

бюретки зі скляним краном до появи рожевого забарвлення (від останньої краплі перманганату), яке не зникає протягом півхвилини.

Перманганат калію в кислому середовищі окислює утворене закисне залізо в окисне за рівнянням:



За титрування двох паралельних проб різниця була не більше 0,05 мл за витрати на пробу 6–8 мл розчину перманганату калію, при витраті розчину перманганату калію 10–12 мл, допустиме розходження було до 0,1 мл. Визначення вмісту цукру, починаючи з моменту додавання реактивів і до кінця титрування, тривало не більше 15–20 хв. За кількістю 0,1 Н розчину перманганату калію, яку витрачено на титрування, і титр перманганату за міддю, знаходили вміст моноцукрів у досліджуваному розчині.

4.3.5. Статистична обробка отриманих даних

Всі досліди проводили в 3-кратній повторності. Для визначення статистично подібних/відмінних груп, використовували тест Фішера, за достовірності $p < 0,05$. Обробку результатів експериментальних досліджень здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel 12,0.

РОЗДІЛ 5

СТРУКТУРНО-БІОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВЗАЄМОДІЇ ДИНІТРОАНІЛІНІВ З α -ТУБУЛІНОМ МІСКАНТУСУ

5.1. Побудова просторової моделі молекули α -тубуліну міскантусу

Для реконструкції просторової структури молекули α -тубуліну міскантусу було проведено сканування бази даних UniProt на наявність відомих амінокислотних послідовностей α -тубулінів з *Miscanthus*. За результатами пошуку було знайдено 19 неанотованих амінокислотних послідовностей α -тубуліну з *Miscanthus*, як різних ізотипів так і їх фрагментів, в тому числі 11 з *Miscanthus sinensis*. З метою відбору послідовності для подальшого використання знайдені сіквенси були проаналізовані за допомогою методу множинного вирівнювання за допомогою ClustalX2.1 (www.clustal.org).

```

1-4
MREI
Q9M4L4_MISSI MREFISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIIEPDGTMPSDTSVGVADDAFNTFFSETGSGK 60
Q70ZL6_MISSI MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIIEPDGTMPSDTSVGVADDAFNTFFSETGSGK 60
Q70Z34_MISSI MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIIEPDGTMPSDTSVGVADDAFNTFFSETGSGK 60
Q70Z33_MISSI MREFISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIIEPDGTMPSDTSVGAADDAFNTFFSETGSGQ 60
Q70ZL7_MISSI MREFISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIIEPDGTMPSDTSVGVADDAFNTFFSETGSGK 60
H9B8E4_MISSI MRECIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIIEADGQMPGDKTIGGGDDAFNTFFSETGAGK 60
H9B8F3_MISSI MRECIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIIEADGQMPGDKTIGGGDDAFNTFFSETGAGK 60
H9B8E5_MISSI MRECIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIIEADGQVPGDKTAGHHDDAFSTFFSQTGAGK 60
*** :*:*****:*****: * :*.*: * .***.***:***:

Q9M4L4_MISSI HVPRAIFVDLEPTVIDEVRTGYSYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLD 120
Q70ZL6_MISSI HVPRAIFVDLEPTVIDEVRTGYSYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLD 120
Q70Z34_MISSI HVPRAIFVDLEPTVIDEVRTGYSYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLD 120
Q70Z33_MISSI HVPRAIFVDLEPTVIDEVRTGYSYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLD 120
Q70ZL7_MISSI HVPRAIFVDLEPTVIDEVRTGYSYRQLFHPEQLISGKENAANNFARGHYTVGKEIVDLCLD 120
H9B8E4_MISSI HVPRAIFVDLEPTVIDEVRTGYSYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLD 120
H9B8F3_MISSI HVPRAIFVDLEPTVIDEVRTGYSYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLD 120
H9B8E5_MISSI HVPRAIFVDLEPTVIDEVRTGYSYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLD 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

129-134 162-165
CTGLQG GKKS
Q9M4L4_MISSI RVRKLADNCTGLQGFVFNVAAGGGTGSGLGSLLLERLSVDY GKKSKLGFYIYSPQVSTA 180
Q70ZL6_MISSI RVRKLADNCTGLQGFVFNVAAGGGTGSGLGSLLLERLSVDY GKKSKLGFYIYSPQVSTA 180
Q70Z34_MISSI RVRKLADNCTGLQGFVFNVAAGGGTGSGLGSLLLERLSVDY GKKSKLGFYIYSPQVSTA 180
Q70Z33_MISSI RVRKLADNCTGLQGFVFNVAAGGGTGSGLGSLLLERLSVDY GKKSKLGFYIYSPQVSTA 180
Q70ZL7_MISSI RVRKLADNCTGLQGFVFNVAAGGGTGSGLGSLLLERLSVDY GKKSKLGFYIYSPQVSTA 180
H9B8E4_MISSI RVRKLADNCTGLQGFVFNVAAGGGTGSGLGSLLLERLSVDY GKKSKLGFYIYSPQVSTA 180
H9B8F3_MISSI RVRKLADNCTGLQGFVFNVAAGGGTGSGLGSLLLERLSVDY GKKSKLGFYIYSPQVSTA 180
H9B8E5_MISSI RVRKLADNCTGLQGFVFNVAAGGGTGSGLGSLLLERLSVDY GKKSKLGFYIYSPQVSTA 180
*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

```

```

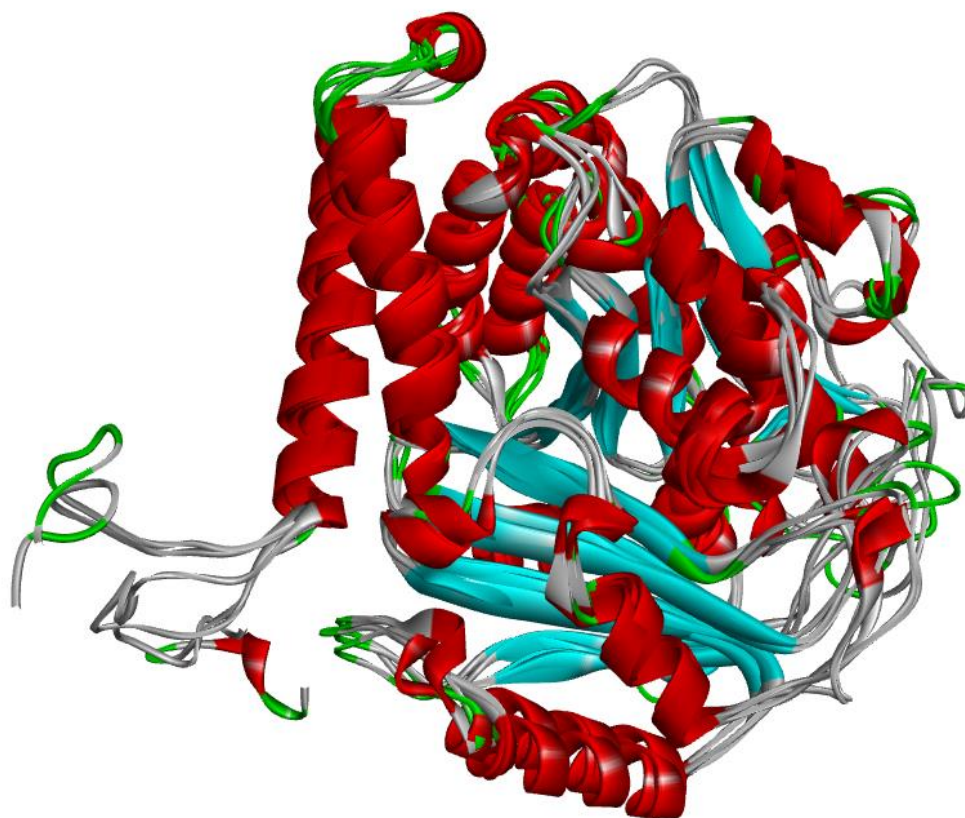
Q9M4L4_MISSI VVEPYNSVLSTHSLEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLLITQIISLTT 240
Q70ZL6_MISSI VVEPYNSVLSTHSLEHTDVAVLLDNGAIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLLISQIISLTT 240
Q70Z34_MISSI VVEPYNSVLSTHSLEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLLISQIISLTT 240
Q70Z33_MISSI VVEPYNSVLSTHSLEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLLISQIISLTT 240
Q70ZL7_MISSI VVEPYNSVLSTHSLEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLLISQIISLTT 240
H9B8E4_MISSI VVEPYNSVLSTHSLEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLLVSVQVISSLTA 240
H9B8F3_MISSI VVEPYNSVLSTHSLEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLLVSVQVISSLTA 240
H9B8E5_MISSI VVEPYNSVLSTHSLEHTDVSILLDNEAIYDICRRSLDIERPNYSNLNRLLVSVQVISSLTA 240
*****:**** *****.*:*****:*.*****:
      242-243   245-255   257-258
      LR DGAINVDVTEF TN
Q9M4L4_MISSI SLRFDGAINVDVTEFQTNLVYPYRIHFMLSSYAPLISAEKAYHEQLSVPEITSVAVFEPSS 300
Q70ZL6_MISSI SLRFDGAINVDVTEFQTNLVYPYRIHMLSSYAPVISA EKAYHEQLSVPEITNAVFEPPSS 300
Q70Z34_MISSI SLRFDGAINVDVTEFQTNLVYPYRIHFMLSSYAPVISA EKAYHEQLSVPEITNAVFEPPSS 300
Q70Z33_MISSI SLRFDGAINVDVTEFQTNLVYPYRIHFMLSSYAPVISA EKAYHEQLSVPEITSVAVFEPSS 300
Q70ZL7_MISSI SLRFDGAINVDVTEFQTNLVYPYRIHFMLSSYAPVISA EKAYHEQLSVPEITNAVFEPPSS 300
H9B8E4_MISSI SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPYRIHFMLSSYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNSAFEPSS 300
H9B8F3_MISSI SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPYRIHFMLSSYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNSAFEPSS 300
H9B8E5_MISSI SLRFDGALNVDVNEFQTNLVYPYRIHFMLSSYAPVISA KAFHEQLSVAEITSSAFEPAS 300
*****:****.* *****:*****:*.*****:*****.*
Q9M4L4_MISSI MMAKCDPRRGKYMACCLMYRGDVPKDVNAAVATIKTKRTVQFVDWCPTAFKCGINYP 360
Q70ZL6_MISSI MMAKCDPRHGKYMACCLMYRGDVPKDVNAAVATIKAKRTVQFVDWCPTGFKCGINYP 360
Q70Z34_MISSI MMAKCDPRHGKYMACCLMYRGDVPKDVNAAVATIKTKRTVQFVDWCPTGFKCGINYP 360
Q70Z33_MISSI MMAKCDPRHGKYMACCLMYRGDVPKDVNAAVATIKTKRTVQFVDWCPTGFKCGINYP 360
Q70ZL7_MISSI MMAKCDPRHGKYMACCLMYRGDVPKDVNAAVATIKTKRTVQFVDWCPTGFKCGINYP 360
H9B8E4_MISSI MMAKCDPRHGKYMACCLMYRGDVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGINYP 360
H9B8F3_MISSI MMAKCDPRHGKYMACCLMYRGDVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGINYP 360
H9B8E5_MISSI MMVKCDPRHGKYMACCLMYRGDVPKDVNAAVALIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGINYP 360
**.******:*****:*****.* *****:*****:*****.*
Q9M4L4_MISSI SVVPGD LAKVQRAVWMI SNNTAVAEVFSRIDHKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE 420
Q70ZL6_MISSI SVVPGD LAKVQRAVWMI SNNTAVAEVFSRIDHKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE 420
Q70Z34_MISSI SVVPGD LAKVQRAVWMI SNNTAVAEVFSRIDHKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE 420
Q70Z33_MISSI SVVPGD LAKVQRAVWMI SNNTAVAEVFSRIDHKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE 420
Q70ZL7_MISSI SVVPGD LAKVQRAVWMI SNNTAVAEVFSRIDHKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE 420
H9B8E4_MISSI SVVPGD LAKVQRAVWMI SNSTSVVEVFSRIDHKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE 420
H9B8F3_MISSI SVVPGD LAKVQRAVWMI SNSTSVVEVFSRIDHKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE 420
H9B8E5_MISSI TVVPGAD LAKVQRAVWMI SNSTSVVEVFSRINSKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE 420
:****.* *****:*****:*****.* *****:*****:*****.*
Q9M4L4_MISSI AREDLA ALEKDYEEVGAEGADD-EGDEGDDC 450
Q70ZL6_MISSI AREDLA ALEKDYEEVGAEGADD-EGDEGDDY 450
Q70Z34_MISSI AREDLA ALEKDYEEVGAEGADD-EGDEGDDY 450
Q70Z33_MISSI AREDLA ALEKDYEEVGAEGADD-EGDEGDDY 450
Q70ZL7_MISSI AREDLA ALEKDYEEVGAEGADD-EGDEGDDY 450
H9B8E4_MISSI AREDLA ALEKDYEEVGAEFDEGEGDEGDEY 451
H9B8F3_MISSI AREDLA ALEKDYEEVGAEFEEGEDGDEGDEY 451
H9B8E5_MISSI AREDLA ALEKDYEEVAAEG-GGDDGEEDEEY 450
*****.* ** . :*:*.::

```

Рис. 5.1. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей α -тубуліну з *Miscanthus sinensis*.

Результати множинного вирівнювання відібраних послідовностей α -тубуліну з *M. sinensis* (Рис. 5.1) свідчать про те, що вони мають високий рівень

схожості. Порівняльний аналіз потенційного сайту зв'язування α -тубуліну з *M. sinensis* із сполуками динітроанілінового ряду (на Рис. 5.1 позначено кольором) за даними літературних джерел (Blume *et al.*, 2003, Нипорко *та ін.*, 2009, Ожередов *та ін.*, 2019) також вказує на високий рівень його консервативності. Слід також зазначити, що даний сайт включає до себе T7-петлю α -тубуліну, яка бере безпосередню участь в процесі гідролізу ГТФ в нуклеотидобмінному сайті сусіднього димеру в складі протофіламенту мікротрубочки (Nogales *et al.*, 1998, Löwe *et al.*, 2001). Зв'язування низькомолекулярної сполуки в зазначеному сайті на поверхні α -тубуліну призведе до порушення функціонування філаменту і, як наслідок, мікротрубочки в цілому.



Name	C-score	Exp.TM-Score	Exp.RMSD	No.of decoys	Cluster density
Model1:	1.37	0.90+-0.06	4.2+-2.8	2375	0.7197
Model2:	0.10			573	0.2011
Model3:	-1.56			92	0.0383
Model4:	-3.03			36	0.0088
Model5:	1.39			2367	0.7306

Рис. 5.2. Промоделі просторової структури молекули α -тубуліну *M. sinensis* (Q70ZL7).

Отже, аналіз отриманих результатів множинного вирівнювання відібраних послідовностей α -тубуліну з *Miscanthus sinensis* вказує на можливість використання будь-якої з проаналізованих амінокислотних послідовностей ізотипів α -тубуліну для реконструкції просторової структури цієї молекули з метою вивчення білок-лігандних взаємодій та екстраполяції отриманих результатів на інші відомі ізоטיפи α -тубуліну з високим рівнем ймовірності. Для подальшої роботи нами було відібрано послідовність Q70ZL7 α -тубуліну (ген TUA1) з *M. sinensis*.

Реконструкцію просторової структури молекули α -тубуліну здійснювали за допомогою *on-line* сервісу I-TASSER. Нами були отримані 5 промоделей просторової структури молекул α -тубуліну (Рис. 5.2). Відбір промоделей для подальшої роботи здійснювали за допомогою оціночних функцій сервісу I-TASSER, а саме C-score, TM-Score, та щільністю кластерів. Найбільш якісними були моделі 1 та 5 (Рис. 5.2).

5.2 Докінг похідних динітроаніліну з молекулою α -тубуліну міскантусу у потенційний сайт їх зв'язування

З метою оцінки потенціалу досліджуваних сполук динітроанілінового ряду як антимітотичних агентів нами було проведено аналіз можливості утворення стабільного ліганд-білкового комплексу при їх взаємодії з молекулою α -тубуліну міскантусу. Для цього було проведено докування лігандів на поверхню цільового білку, просторову структуру якого було реконструйовано на попередніх етапах досліджень. Докування проводили у задану область поверхні молекули з радіусом 20 Å навколо атому N залишку Arg2. Досить значний розмір потенційного сайту взаємодії було використано з метою максимально повного визначення конформацій потенційно можливих ліганд-білкових комплексів.

Як показали результати молекулярного докінгу, всі досліджувані ліганди потенційно здатні утворювати комплекси із α -тубулінами міскантусу. Потенційний сайт їх зв'язування знаходиться на поверхні білкової глобули, що свідчить про високу ймовірність утворення ліганд-білкового комплексу (Рис. 5.3).

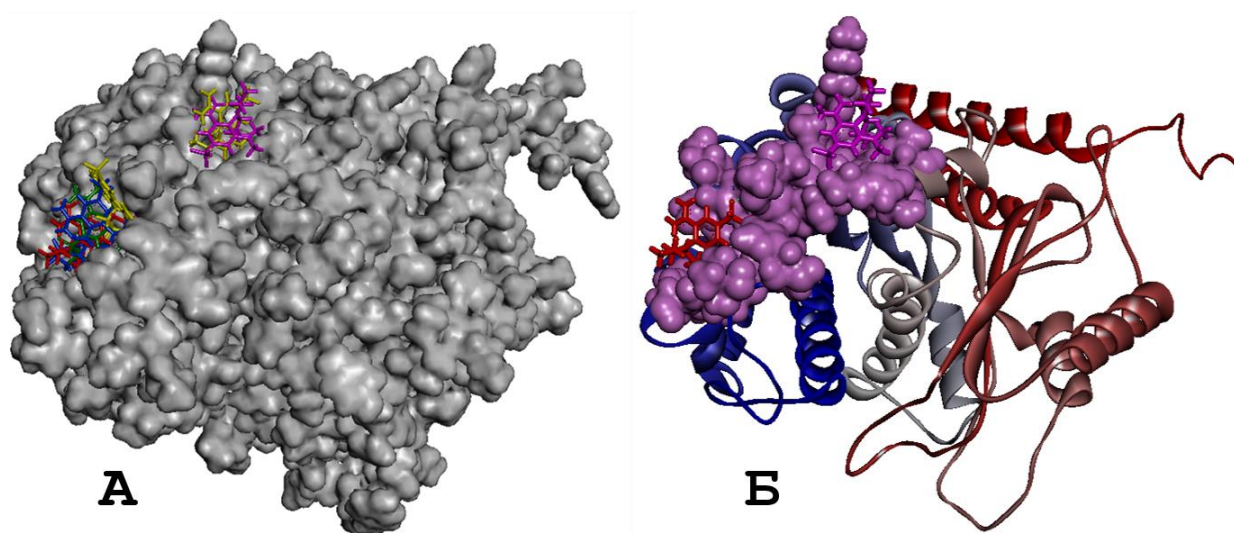


Рис. 5.3. Результати докингу динітроанілінових сполук на поверхню α -тубуліну з *M. sinensis* за допомогою програми CCDC GOLD: **А** – білок показано у вигляді його поверхні Ван-дер-Ваальса, ліганди – у вигляді паличкових моделей; **Б** – стрічкова модель білку з амінокислотними залишками сайту зв'язування (відображено сферами) та паличковими моделями лігандів.

Для оцінки коректності застосованих нами умов для докингу та достовірності отриманих результатів було також здійснено докування референтної сполуки (трифлюраліну) з експериментально доведеною антимітотичною активністю, яка також належить до динітроанілінів, з цільовим білком. Результати аналізу сайту зв'язування референтної сполуки з α -тубуліном з *M. Sinensis* (Рис.5.4), визначеного за результатами докингу ліганд-білкового комплексу, виявили його ідентичність до описаного раніше (Blume *et al.*, 2003, Нипорко *та ін.*, 2009, Ожерєдов *та ін.*, 2019).

Також за допомогою оціночних функцій CCDC GOLD нами було проведено порівняльний аналіз якості отриманих комплексів за такими показниками, як GoldScore та ChemScore. За результатами оцінки для подальших досліджень були відібрані найбільш перспективні сполуки з потенційно-високим рівнем спорідненості до α -тубуліну з *M. sinensis*: 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін (сполука 1); N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін (сполука

2); N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін (сполука 3); N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид (сполука 4); 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид (сполука 5); {2-[4-(2,4-дихлор-феніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид (сполука 6).

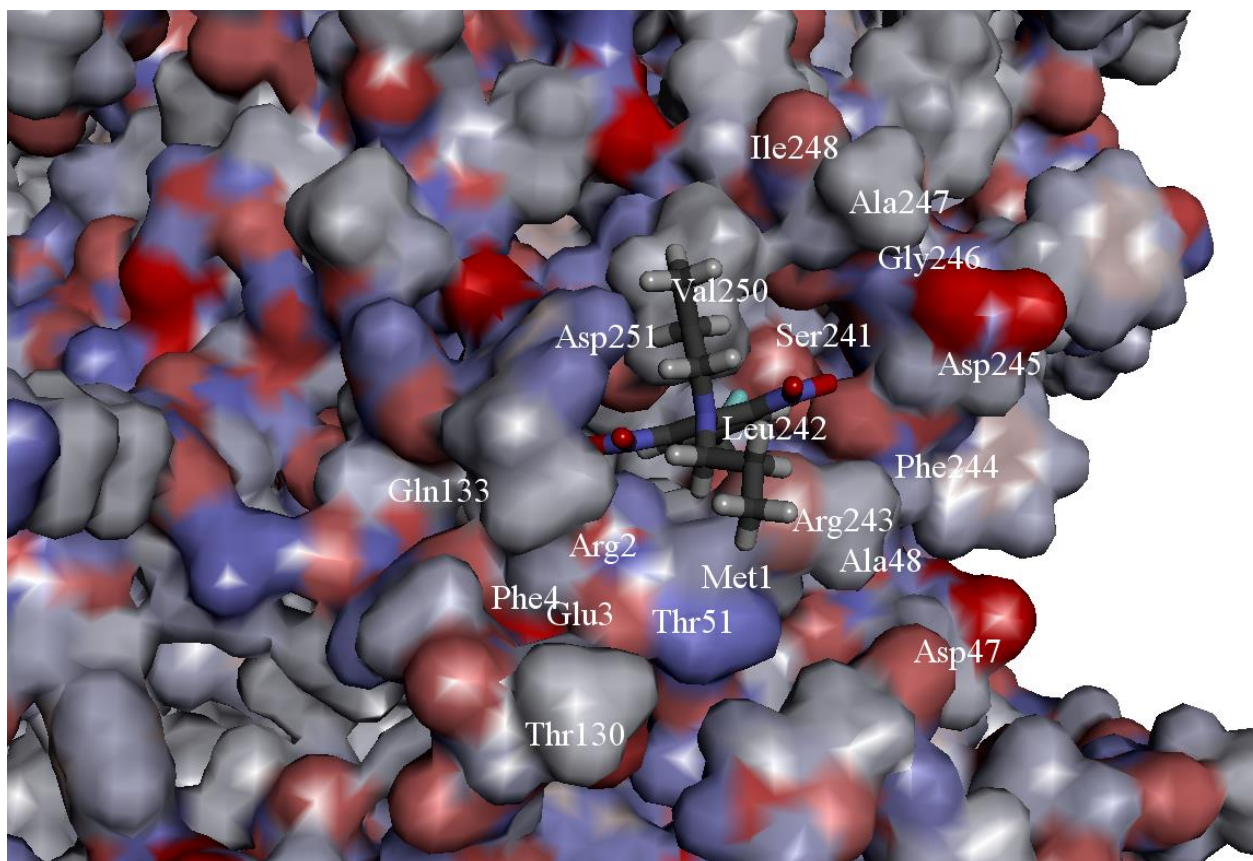


Рис. 5.4. Положення трифлюораліну на поверхні α -тубуліну з *Miscanthus sinensis* у потенційному сайті зв'язування за результатами докінгу з використанням CCDC GOLD.

5.3. Оцінка рівня спорідненості досліджуваних сполук до α -тубуліну *Miscanthus*

Механізм дії антимиотичних сполук динітроанілінового ряду тісно пов'язаний з їх здатністю утворювати стійкі комплекси з α -тубуліном, а отже залежить від рівня спорідненості ліганду до цільового білка. Також відомо, що

зниження рівня конформаційної енергії ліганду при переміщенні його з водного оточення до певної області білку (сайту зв'язування) є достатньою підставою для ствердження про можливість утворення ліганд-білок комплексу (Ramachandran *et al.*, 2008).

З метою визначення стабільності відібраних нами на підставі оцінки результатів докинуто лігандів з α -тубуліном ліганд-білкових комплексів було проведено обрахунок їх тривалої молекулярної динаміки. Аналіз отриманих результатів здійснювали за такими показниками, як зміна рівня конформаційної енергії ліганду у вільному стані та у складі ліганд-білкового комплексу (ΔG_{bind}) і кількості утворених водневих зв'язків між лігандом та білком в середньому протягом проведення обрахунку. Під час проведення обрахунку молекулярної динаміки як для лігандів, так і для їх комплексів з α -тубуліном міскантусу повідомлення щодо некоректних або критичних похибок були відсутні, що свідчить про коректність вхідних даних (файлів, які описують структуру цільового білку та лігандів) та заданих при проведенні обрахунку умов (термостат, розмір боксу, тощо).

Як свідчать отримані результати, всі досліджувані сполуки, за виключенням сполуки 3, потенційно здатні до утворення комплексу з α -тубуліну з *M. sinensis*. Про що свідчить зниження рівня конформаційної енергії досліджуваних лігандів при переносі їх з водного оточення до потенційного сайту зв'язування на поверхні цільового білку та негативне значення ΔG_{bind} . Приклади графіків зміни конформаційних енергій та середнє значення ΔG_{bind} лігандів наведено на Рис. 5.5 та в Табл. 5.1. Результати аналізу також вказують на незначні зміни конформаційної енергії сполуки 3 при переносі її з водного оточення до потенційного сайту зв'язування, що може свідчити про низьку стабільність досліджуваного комплексу (Мельничук *та ін.*, 2016).

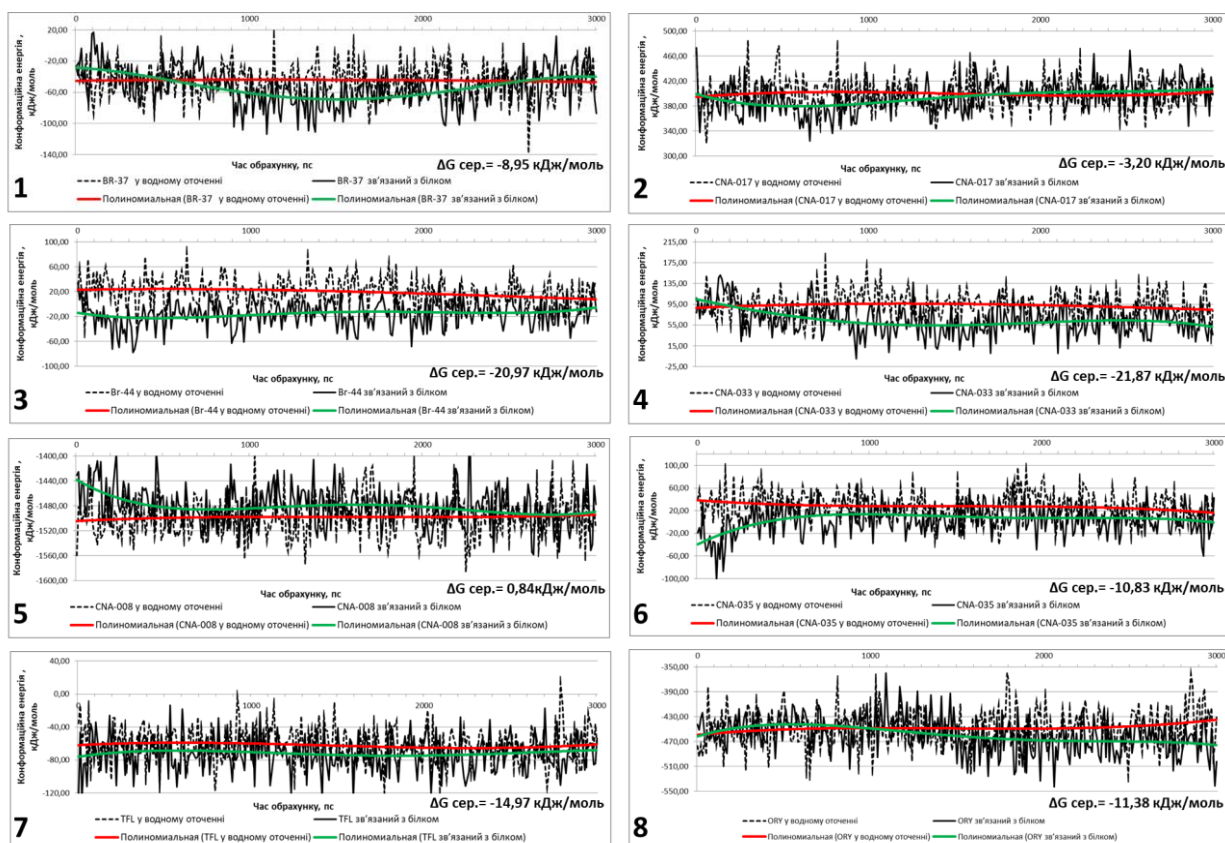


Рисунок 5.5. Конформаційні енергії лігандів у водному оточенні (червоний) та у складі комплексу з білком (зелений): 1 – сполука №1; 2 – сполука №4; 3 – сполука №2; 4 – сполука №5; 5 – сполука №3; 6 – сполука №6; 7 - трифлуралін; 8 – оризалін

Також результати аналізу виявили, що частина досліджуваних сполук була краща за контрольну сполуку – трифлуралін - за значенням енергії зв'язування. Так, для сполук 2 та 5 значення показника ΔG_{bind} було на рівні -20,97 кДж/моль та -21,87 кДж/моль, в той час як для трифлураліна цей показник склав -14,97 кДж/моль. Також із використанням аналітичного модуля програмного пакету GROMACS було обраховано середню кількість водневих зв'язків між лігандом та білком для досліджуваних комплексів. Як свідчать отримані дані (Таб. 5.1), середня кількість водневих зв'язків для більшості сполук знаходилась в межах 1-2. Також спостерігали сполуки, які утворювали в середньому менше, ніж один водневий зв'язок з α -тубуліном, а саме сполука 3 та сполука 4. Це свідчить про низький рівень стабільності їх комплексів з α -тубуліном *M. sinensis*, що також

підтверджується низьким значенням показнику ΔG_{bind} на рівні 0,84 кДж/моль та -2,20 кДж/моль, відповідно.

Таблиця 5.1

Середній рівень конформаційних енергій лігандів (кДж/моль) та утворених водневих зв'язків ліганду з α -тубуліном *M. sinensis* (Q70ZL7)

Речовина	ΔG_{bind} , кДж/моль	Утворено водневих зв'язків	
		max	середнє
1	-8,95	2	1
2	-20,97	2	1
3	0,84	5	0
4	-3,20	1	0
5	-21,87	2	1
6	-10,83	2	1
Трифлюоралін	-14,97	2	1
Оризалін	-11,38	3	1

Отже, для подальшого використання з метою отримання поліплоїдних рослин міскантусу гігантського в умовах *in vitro* як найбільш перспективні були відібрані сполуки N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін (сполука 2) та 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид (сполука 5). Крім того, враховуючі рівень фітоксичності інших сполук, дослідження якого проводилося раніше на модельних рослинних об'єктах (Ожерєдов *та ін.*, 2009, Мельничук *та ін.*, 2016), а також їх потенційну здатність утворювати комплекс з α -тубуліном, вони також можуть бути використані при отриманні рослин міскантусу гігантського з підвищеним рівнем плоїдності.

Висновки до розділу 5:

1. Реконструйовано та верифіковано просторову структуру молекули α -тубуліну *M. sinensis* (Q70ZL7).
2. Проведено порівняльну оцінку нових сполук динітроанілінового класу на здатність утворювати ліганд-білкові комплекси з α -тубуліном *M. sinensis* (Q70ZL7) та відібрані найбільш перспективні з них з огляду на їх здатність ефективно взаємодіяти з α -тубуліном.
3. За критерієм стабільності комплексів з α -тубуліном для подальшого використання у досліджах з поліплоїдизації рослин родини *M. x giganteus* відібрано найбільш перспективні сполуки динітроанілінового ряду N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін (сполука 2); 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид (сполука 5).
4. Показано, що сполуки 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін (сполука 1); N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін (сполука 3); N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид (сполука 4); {2- [4-(2,4-дихлор-феніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид (сполука 6), мають нижчий рівень афінності до α -тубуліну *M. sinensis*, але завдяки низькому рівню фітотоксичності можуть бути використані для проведення поліплоїдизації *Miscanthus*.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікації:

Мельничук О. В., Ожередов С. П., Рахметов Д. Б., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Скринінг нітроанілінів на спорідненість до α -тубуліну міскантусу для їх використання у поліплоїдизації рослин цього роду. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Т. 18. С. 212–216. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

РОЗДІЛ 6

ВВЕДЕННЯ МІСКАНТУСУ ГІГАНТСЬКОГО В КУЛЬТУРУ *in vitro* ТА ОТРИМАННЯ ЙОГО ПОЛІПЛОЇДНИХ ЛІНІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ДИНІТРОАНІЛІНІВ

6.1. Введення міскантусу гігантського в культуру *in vitro*

Існує декілька проблем при введенні міскантусу в культуру *in vitro*. По-перше, залежність від сезону одержання високопродуктивних експлантів таких, як незрілі суцвіття для індукції калюсу та високий рівень контамінації експлантів при введенні в асептичні умови підземних органів рослини міскантусу. Це може бути вирішено за рахунок використання як експлантів зрілого насіння, але *M. x giganteus* є стерильним. Вирішення другої проблеми можливе за рахунок використання кореневих придаткових бруньок як експлантів. Однак при стерилізації частин ризом, які знаходяться у ґрунті, та верхівок пагонів значна їх частка залишається контамінованою, що є головною перешкодою для використання підземних органів міскантусу для введення в культуру (Lewandowski and Kicherer, 1997). Таким чином, це обумовлює необхідність розробки ефективного протоколу стерилізації підземних органів міскантусу.

З метою розробки ефективної методики поверхневої стерилізації експлантів з підземної частини рослин міскантусу для введення в культуру *in vitro* було проведено дослідження з використанням різних схем стерилізації. Як експланти, використовували кореневі придаткові бруньки з фрагментами ризом. Експланти добирали зі щойно викопаних та ретельно відмитих від ґрунту коренів рослин. Головними критеріями відбору експлантів були оптимальний розмір бруньок (0,3–1,0 см), наявність ознак життєздатності та відсутність механічних пошкоджень.

При обробці експлантів використовували наступні варіанти поверхневої стерилізації:

Варіант 1. Стерилізацію експлантів здійснювали за допомогою сухої обробки газом Cl_2 з експозицією 120 хвилин.

Варіант 2. Даний варіант передбачав обробку експлантів 70 %-ним розчином етанолу протягом 3-х хв., з наступною стерилізацією їх у розчині канаміцину (500 мг/л) протягом 5 хв та стерилізацією Бордоською сумішшю протягом 20 хв. при постійному помішуванні.

Варіант 3. У цьому варіанті відібрані експланти обробляли 4%-ним розчином Tween 20 протягом 10 хв, з наступним двократним ополіскуванням та подальшою обробкою у 70%-му розчині етанолу протягом 3 хв при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15%) із додаванням 2%-ного Tween 20 з експозицією 20 хв. Далі експланти двічі промивали стерильною водою та переносили до 4%-ного розчину перексиду водню на 20 хв, постійно помішуючи.

Варіант 4. Відібрані експланти обробляли 4%-ним розчином Tween 20 протягом 10 хв, з наступним двократним ополіскуванням та подальшою обробкою у 70%-му розчині етанолу протягом 3 хв при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15%) із додаванням 2%-го Tween 20 з експозицією 20 хв. Далі експланти двічі промивали стерильною водою та переносили до 8%-ного розчину перексиду водню на 20 хв, постійно помішуючи.

Варіант 5. Експланти обробляли 70 %-ним етанолом протягом 3-х хв. при постійному помішуванні, після чого переносили до 0,04 %-го розчину нітрату срібла (AgNO_3) з додаванням цефотаксиму у концентрації 250 мг/л (експозиція 20 хв. при постійному перемішуванні). Подальшу обробку експлантів здійснювали у 0,15 %-ному розчині фунгіциду превікур протягом 15 хв., після чого експланти перенесли до 6 %-ного розчину перекису водню, час обробки складав 60 хв. при постійному помішуванні. Після стерилізації експланти підсушувалися на стерильному фільтровальному папері.

Варіант 6. Експланти обробляли 70 %-ним етанолом протягом 3-х хв. при постійному помішуванні, після чого переносили до 9%-ного розчину гіпохлориту натрію (NaOCl) з додаванням цефотаксиму у концентрації 250 мг/л (експозиція 20 хвилин при постійному перемішуванні). Подальшу обробку експлантів

здійснювали у 0,15 %-му розчині фунгіциду превікур протягом 15 хв., після чого експланти перенесли до 6 %-ного розчину перекису водню, час обробки складав 60 хв. при постійному помішуванні. Після стерилізації експланти підсушувалися на стерильному фільтровальному папері.

Варіант 7. Цей варіант передбачав попередню обробку відібраних експлантів у 4 %-ному розчині Tween 20 протягом 10 хв., з наступним двократним ополіскуванням стерильною дистильованою водою. Подальшу обробку здійснювали у 70 %-ному розчині етанолу протягом 3 хв. при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15 %) із додаванням 2% Tween 20 з експозицією 20 хв. після чого експланти двічі промивали стерильною дистильованою водою та перенесли до розчину AgNO_3 (0,02 %) з додаванням Tween 20 (2 %) на 20 хв. Після стерилізації експланти були тричі промиті стерильною дистильованою водою, 10 хвилин кожний та висушені на стерильному фільтровальному папері.

Варіант 8. Відібрані експланти попередньо обробляли 4 %-ним розчином Tween 20 протягом 10 хв. з наступним двократним ополіскуванням стерильною дистильованою водою. Подальшу обробку здійснювали у 70 %-ному розчині етанолу протягом 3 хв. при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15 %) із додаванням 2% Tween 20 з експозицією 20 хв. після чого експланти двічі були промиті стерильною дистильованою водою та перенесені до розчину AgNO_3 (0,04 %) із додаванням Tween 20 (2 %) на 20 хв. Після стерилізації експланти тричі промивались стерильною дистильованою водою, 10 хв. кожний та висушувались на стерильному фільтровальному папері.

Варіант 9. У цьому випадку відібрані експланти обробляли 4%-ним розчином Tween 20 протягом 10 хв з наступним двократним ополіскуванням. Подальшу обробку здійснювали у 70%-ному розчині етанолу протягом 3 хв при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15 %) із додаванням 2%-ного Tween 20 з експозицією 20 хв, після чого експланти двічі промивали стерильною водою та

переносили до розчину гіпохлориту натрію (NaOCl) у концентрації 6 % з додаванням Tween 20 (2%) на 20 хв. Після стерилізації експланти тричі промивали водою, 10 хв кожний.

Варіант 10. Цей варіант передбачав обробку відібраних експлантів 4%-ним розчином Tween 20 протягом 10 хв з наступним двократним ополіскуванням. Подальшу обробку здійснювали у 70%-му розчині етанолу протягом 3 хв при постійному помішуванні. Наступним кроком була обробка розчинами цефотаксиму (250 мг/л) та превікуру (0,15 %) із додаванням 2%-го Tween 20 з експозицією 20 хв, після чого експланти двічі промивали стерильною водою та переносили до розчину гіпохлориту натрію (NaOCl) у концентрації 12 % із додаванням Tween 20 (2%) на 20 хв. Після стерилізації експланти тричі промивали водою протягом 10 хв кожного разу.

Варіант 11. Експланти попередньо обробляли 50%-ним розчином комерційного препарату «Білизна» (3%-ний розчин гіпохлориту натрію) протягом 20 хв з постійним помішуванням, тричі промивали стерильною водою та в асептичних умовах з бруньок видаляли поверхневі луски і частину ризом. Підготовлені експланти повторно стерилізували у 50%-ному розчині «Білизна» протягом 20 хв з постійним помішуванням, тричі промивали стерильною водою, протягом 10 хв кожний.

Варіант 12. Цей варіант був аналогічним до варіанту 11 за виключенням другого етапу обробки, який передбачав повторну стерилізацію експлантів у 0,08%-ному розчині нітрату срібла (AgNO_3) протягом 20 хв з постійним помішуванням.

Після поверхневої стерилізації просушені на фільтрувальному папері експланти переносили в чашки Петрі, які містили живильне середовище МС без додавання гормонів. Культивування експлантів здійснювали за температури 24°C за умов 16/8 год. фотоперіоду. Підрахунок контамінованих та стерильних експлантів здійснювали на 7-му добу культивування. Як видно з Рис.6.1, цього часу достатньо для проявлення контамінації при її наявності після поверхневої стерилізації.

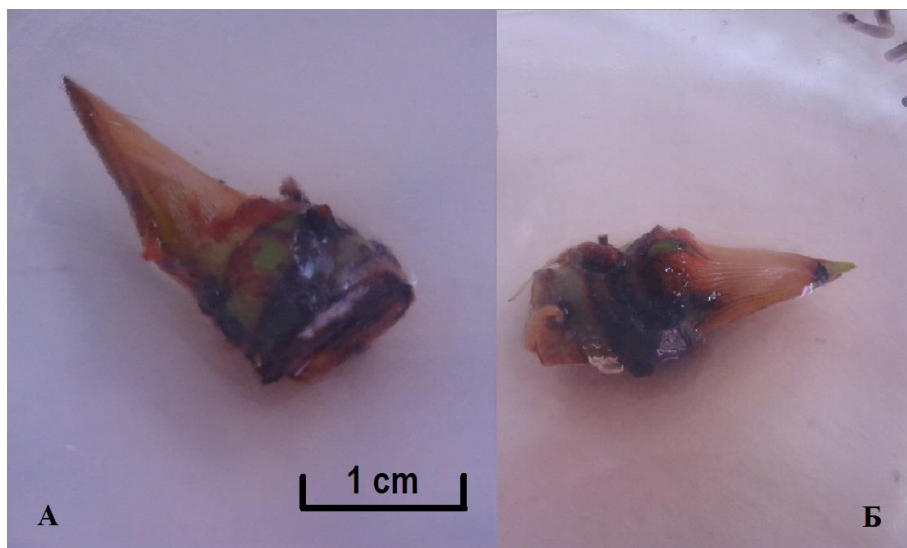


Рис. 6.1. Вигляд експлантів *M. x giganteus* на 7-му добу після поверхневої стерилізації: **А** – контамінований, **Б** – стерильний.

Як свідчать результати дослідження найбільш ефективним методом поверхневої стерилізації виявився протокол поверхневої стерилізації із використанням 50%-го розчину «Білизна», видаленням зовнішніх лусок бруньок та частини ризом та обробка 0,08 %-им розчином нітрату срібла, як описано у варіанті 12 (Рис. 6.2). Цей варіант дозволив одержати 82,2 % стерильних експлантів.

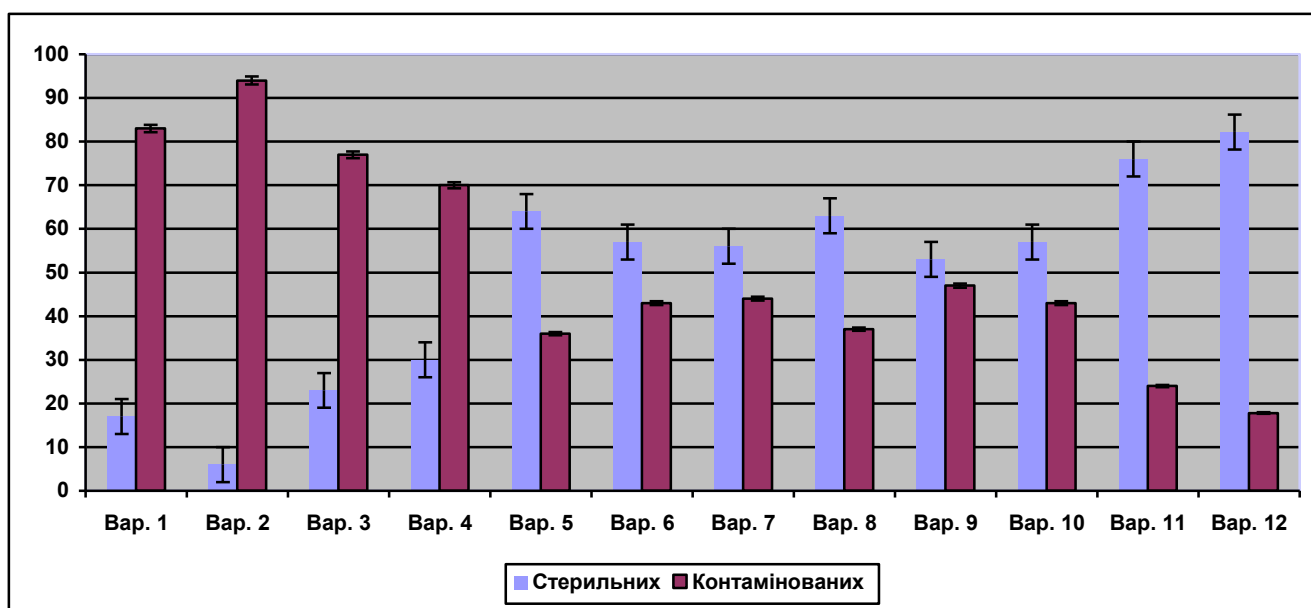


Рис. 6.2. Ефективність методів поверхневої стерилізації експлантів з підземної частини рослин *M. x giganteus*, %.

Досить високий рівень ефективності стерилізації виявився і при обробці експлантів за протоколами відповідно до варіантів 7 та 8, які також передбачали застосування AgNO_3 . Так при обробці 0,02 %-ним розчином нітрату срібла (Варіант 7) ефективність стерилізації визначалася на рівні 56 % стерильних експлантів *M. x giganteus*, а при стерилізації 0,04 % розчином AgNO_3 , кількість стерильних експлантів зростала до 63,6 % (Рис. 6.2.). Проте використання навіть найбільш ефективних протоколів стерилізації в нашому експерименті дозволили одержати результати, коли рівень зараження експлантів був досить високим, але значно перевищував за ефективністю результати інших авторів, де кількість заражених експлантів при введенні міскантусу в культуру *in vitro* із використанням підземних частин рослин значно перевищувала 50 % (Lewandowski and Kicherer, 1997; Jain and Dutta Gupta, 2013). Варіанти 1 та 2 які передбачали обробку експлантів Cl_2 та бордоською сумішшю відповідно були менш ефективними. Ефективність поверхневої стерилізації за даними варіантами знаходилась в межах 5,2–16,5 %, що значно нижче за варіанти з використанням нітрату срібла та гіпохлориду натрію (Мельничук *та ін.*, 2015а; Мельничук *та ін.* 2015б).

6.2. Розробка технології поліплоїдизації міскантусу гігантського з використанням динітроанілінів

Поліплоїдизація міскантусу шляхом непрямого морфогенезу. При проведенні поліплоїдизації міскантусу шляхом непрямого морфогенезу антимітотичні речовини додавали у середовище для індукції калюсогенезу з подальшою регенерацією рослин з калюсу. З метою підбору оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції калюсогенезу *M. x giganteus* сорту «Гулівер» було проведено дослідження з використанням 6 різних комбінацій ауксинів та цитокінінів (Табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Вплив комбінації регуляторів росту на індукцію калюсогенезу

M. giganteus

№ з/п	Речовина	Концентрація, мг/л	Живих експлантів, %	Експлантів з ембріогенним та пагоноутворюючим калюсом, %	Експлантів з жовтим та водянистим калюсом, %
1	БАП	0,05	82,1	12,5	29,7
	2,4 Д	2,5			
2	БАП	0,1	86,7	6,0	32,0
	2,4 Д	2,5			
3	БАП	0,2	85,9	8,1	31,2
	2,4 Д	2,5			
4	БАП	0,05	92,2	34,6	27,2
	2,4 Д	5,0			
5	БАП	0,1	87,7	61,6	34,8
	2,4 Д	5,0			
6	БАП	0,2	92,7	31,4	48,3
	2,4 Д	5,0			

Примітка: на 30 добу культивування

Підрахунок та оцінку калюсу проводили на 30-ту добу культивування. Підрахунок проводили за кількістю експлантів, з яких калюсна культура була отримана. Калюсна культура оцінювалась за кольором та структурою. Калюс оцінювали візуально, умовно відрізняючи чотири типи, серед яких: білий ембріогенний калюс; калюс пагоноутворюючий, у доброму стані; в'ялий, темно-жовтий калюс; темно-коричневий, нежиттєздатний калюс.

За результатами проведеного дослідження встановлено, що найбільшу кількість ембріогенного калюсу та пагоноутворюючого калюсу можливо отримати на середовищі, доповненому 5,0 мг/л 2,4Д та 0,1 мг/л БАП (Таб. 6.1.). Схожі результати були отримані при використанні асептичних бруньок ризом (Рис 6.3.), та пагонів, що були отримані шляхом мікроклонального розмноження (Рис 6.4.). Через 16–18 днів після початку культивування на експлантах з'являлась перша дедиференційована тканина та після двох місяців культивування експланти повністю покривалися калюсом з великою кількістю ембріоподібних структур.



Рис. 6.3. Індукція калюсогенезу на бруньках ризом *M. × giganteus*.



Рис. 6.4. Індукція калюсогенезу на *in vitro* пагонах *M. × giganteus*.

Хоча питання щодо індукції калюсогенезу та регенерації рослин з калюсу *M. × giganteus* на сьогоднішній день є добре опрацьованим (Petersen *et al.*, 2003; Plazek and Dubert, 2010; Yu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Zang *et al.*, 2012), опублікована велика кількість результатів щодо використання ініціації калюсу багатьох видів експлантів, а саме, апексів пагонів, незрілих суцвіть, примордії та фрагменти листя. Найчастіше використовуються для індукції калюсу, незважаючи на сезонність, незрілі суцвіття. Перевагою цього виду матеріалу є те, що з одного незрілого суцвіття можливо отримати більше, ніж 200 експлантів. Крім того, відзначається невисокий відсоток зараження експлантів при введенні в культуру *in vitro* в порівнянні з іншими типами експлантів (Lewandowski and Kicherer, 1997).

В той же самий час, при індукції калюсу кукурудзи, як і для більшості зернових культур, кращим експлантом є незрілий зародок (Armstrong *et al.*, 1985; Rhodes *et al.*, 1986).

Якщо розглядати експланти з точки зору індукції різних типів калюсу, то тип експланту відіграє важливу роль в індукції морфогенного калюсу. Використання апексів пагонів для ініціації калюсу вважається менш продуктивним за незрілі суцвіття, але кращим за фрагменти листя (Jain and Dutta Gupta, 2013). Також результати ряду досліджень вказують на те, що експланти з менших за розміром суцвіть продукують більше ембріогенного та пагоноутворюючого типів калюсу, ніж інших його типів (Holme and Petersen, 1996; Glowacka *et al.*, 2010a; Glowacka *et al.*, 2010b; Gubisova *et al.*, 2013). Зріле насіння є гарним експлантом для введення в асептичні умови та дозволяє одержати достатньо велику кількість калюсу. Так Ванг та ін. (2011) успішно індукували калюс з насіння на середовищі МС, доповненому відносно високою концентрацією (5 мг/л) 2,4-Д та відносно низькому рівні (0,01 мг/л) БА. Це співвідношення фітогормонів дозволило одержати найвищий відсоток компактного калюсу (22,9 %) порівняно з іншими варіантами (Wang *et al.*, 2011). Проте цей метод не може бути використаний для індукції калюсогенезу *M. x giganteus* внаслідок стерильності його насіння.

За літературними даними, при індукції калюсогенезу з апексів пагонів міскантусу цукроквіткового 90 % калюсу утворювалось ембріогенного типу, тоді як при використанні латеральних бруньок лише 31 %. В той же час, при використанні апексів пагонів міскантусу гігантського лише 17 % експлантів з були здатні індукувати калюс, а при використанні латеральних бруньок - лише 10% (Dalton *et al.*, 1999). При культивуванні дуже великих верхівок пагонів міскантусу гігантського (6–9 см довжиною) як експлантів на середовищі для індукції калюсогенезу можливе одержання морфогенного калюсу з 100 % експлантів (Christian and Haase, 2001). Декількома авторами опубліковано, що кількість 2 – 3 мг/л 2,4-Д є достатньою для ефективною індукції ембріогенного калюсу з експлантів міскантусу гігантського, китайського та цукроцвітного

(Christian and Haase, 2001; Zili *et al.*, 2004; Jain and Dutta Gupta, 2013), тим більше, що невисока концентрація ауксинів дозволяє мінімізувати утворення соматоклональних мінливостей та не впливає на подальшу регенерацію рослин (Plazek *et al.*, 2007).

Як свідчать результати наших досліджень, найбільша кількість білого ембріогенного та пагоноутворюючого калюсу утворюється на середовищі доповненому 5,0 мг/л 2,4-Д. Зменшення концентрації 2,4-Д у середовищі призводило до зниження ефективності калюсогенезу, і утворення білого, життєздатного калюсу спостерігалось лише у 8,1 % експлантів (Таб. 6.1.). Схожі результати експериментів з індукції калюсу з експлантів міскантусу з додаванням до живильного середовища 2,4-Д у концентрації 5 мг/л отримано іншими дослідниками (Holme and Petersen, 1996; Petersen, 1997). Для ініціації калюсогенезу до середовища також може додаватися 0,1–2 мг/л БАП. Але деякі генотипи міскантусу не спроможні утворювати калюс при додаванні БАП у концентраціях, вищих за 0,01 мг/л (Jain and Dutta Gupta, 2013). Нами було встановлено, що найбільш ефективним для отримання білого ембріогенного та пагоноутворюючого калюсу є додавання до середовища БАП у концентрації 0,1 мг/л. Збільшення концентрації БАП до 0,2 мг/л обумовлювало утворення в'ялого, темно-жовтого, нежиттєздатного калюсу кількість якого складала 48,3 %, що істотно вище ніж при додаванні в середовище 0,1 мг/л БАП, де кількість експлантів з нежиттєздатним калюсом склала 34,8 % (Таб. 6.1.).

Для регенерації рослин з калюсу використовуються живильні середовища, доповнені різними комбінаціями стимуляторів росту. Найчастіше для цього використовують живильні середовища на базі середовища МС з додаванням НОК або 2,4-Д в поєднанні з БАП або кінетином (Holme and Petersen, 1996; Zili *et al.*, 2004; Glowacka *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). В нашій роботі при регенерації рослин з калюсу, так і при мікрональному розмноженні в середовище додавали БАП у кількості 2 мг/л, що забезпечувало кращі результати. Відповідно до результатів інших дослідників, ефективний ріст пагонів можливий на середовищі, яке містить лише 2–2,5 мг/л БАП (Petersen *et al.*, 2003; Glowacka *et al.*,

2010). Вирощування пагонів на середовищі, в якому вміст БАП складає 1-2 мг/л, призводить до погіршення росту та життєздатності при наступних субкультивуваннях (Jain and Dutta Gupta, 2013).

Для отримання поліплоїдних ліній *M. × giganteus* калюсну культуру переносили на середовища для регенерації, які містили антимітотичні речовини (трифлюралін та оризалін) протягом перших 7 діб диференціації калюсної культури. Після того калюс переносили на свіже середовище для регенерації, яке не містило динітроанілінів. Регенеровані рослини вкорінювали та проводили подальші аналізи.

Поліплоїдизація міскантусу шляхом прямого морфогенезу.

Поліплоїдизацію проводили шляхом культивування окремих асептичних пагонів на середовищах, доповнених динітроанілінами, час культивування 7 та 14 діб. Використовували тверде середовище МС, як джерело вуглецю використовували 30 г/л цукрози. Для зниження рівня накопичення фенольних сполук середовище доповнювали 50 мг/л цистеїну (Gubisova *et al.*, 2013). Для активного формування адвентивних бруньок, пагоноутворення та росту пагонів в середовище додавали БАП, у кількості 2 мг/л. Використовували концентрації 3, 5, 10, 25 та 50 мкМ. Культивування відбувалось за умов 16/8 год. фотоперіоду та температурі 24°C. Через 7 або 14 діб, в залежності від варіанта дослідження, пагони переносили на свіже, вільне від антимітотичних речовин середовище. Через 30 діб після початку культивування на середовищі з динітроанілінами одержані в результаті мікроклонального розмноження пагони розділяли, рахували та пересаджували окремо для проведення аналізу та визначення рівня плоїдності.

6.3. Оцінка виживання експериментальних ліній після поліплоїдизації

В таблиці 6.2. представлені результати диференціації калюсної культури та регенерації рослин міскантусу гігантського на середовищах, що містили класичні антимітотичні речовини (трифлюралін та оризалін) протягом перших 7 діб диференціації калюсної культури. Обидві речовини проявляли високу фітотоксичність, зокрема оризалін. Калюсна культура на такому середовищі темніла та втрачала життєздатність. Виживання калюсу навіть при невисоких

концентраціях трифлюораліну (3 мкМ) становило лише 33,3 %, а при збільшенні концентрації до 10 мкМ виживання калюсу становило лише 9,3 %. При використанні оризаліну як антимітотичної речовини, у концентрації 3 мкМ виживання експлантів не перевищувало 20 %, та при підвищенні концентрації до 10 мкМ відсоток калюсу, що виживав, був на рівні лише 6,7 %. Кількість регенерованих рослин з калюсу, що вижив, істотно не відрізнялась в залежності від концентрації та антимітотичного агенту і коливалась в межах 16–23,3 %. Враховуючи довготривалість, складність та низьку ефективність методу, експерименти з новими динітроанілінами не закладалися.

Таблиця 6.2

Регенерація рослин *M. × giganteus* з калюсу на середовищах, що містять антимітотичні речовини (перші 7 діб) на 30-у добу культивування

Речовина	Концентрація, мкМ					
	3		5		10	
	Регенеровано, %	Живих, %	Регенеровано, %	Живих, %	Регенеровано, %	Живих, %
Трифлюоралін	16,0	33,3	16,3	20,0	18,3	9,3
Оризалін	22,6	20,0	22,7	11,0	23,3	6,7

Отже, одним з важливих чинників, що визначає ефективність антимітотичної речовини при використанні для отримання поліплоїдів є її токсичність для рослини. Встановлено, що застосування колхіцину у невисокій концентрації 313 мкМ забезпечує найбільшу кількість отриманих поліплоїдів, та забезпечує високий відсоток виживання експлантів після обробки як калюса так і пагонів *in vitro* (Glowacka *et al.*, 2010a; Glowacka *et al.*, 2010b). Як показали інші

дослідження, найбільшу кількість тетраплоїдних рослин можливо отримати при обробці колхіцином у невисокій концентрації (156 мкМ) використовуючи як експланти пагони *in vitro*. Проте при обробці оризалином спостерігалась майже повна загибель експлантів, та лише 2 тетраплоїдні лінії були отримані (Petersen *et al.*, 2002). Також, за результатами одного з досліджень поліплоїдизації міскантусу, використання оризалину в рідкому середовищі виявилось більш ефективним за обробку колхіцином, проте висока фітотоксичність першого мала негативний вплив на виживання експлантів та, відповідно, на кількість отриманих поліплоїдів. Більш того, обробка оризалином пригнічувала процес регенерації рослин з калюсу (Yu *et al.*, 2009). Схожі дані були отримані при поліплоїдизації кукурудзи, де обробка оризалином призвела до зменшення частки калюсу здатного до регенерації, і було отримано менше регенерантів (Wan *et al.*, 1991). Результати наших досліджень з використанням оризалину відповідають наведеним вище даним, що підкреслює високий рівень фітотоксичності оризалину (Melnychuk *et al.*, 2020a; Melnychuk *et al.*, 2020b; Мельничук *та ін.*, 2020). Так, при культивуванні калюсу *M. × giganteus* на твердому середовищі, доповненому 10 мкМ оризалину, протягом 14 діб виживання експлантів не перевищило 6,7 %, і лише 20% з яких виявилися здатними регенерувати зелені рослини. Схожі результати отримано також при культивуванні асептичних пагонів протягом 14 діб на середовищі з додаванням оризалину та трифлюораліну у концентрації 50 мкМ. Виживання експлантів при використанні як однієї так і іншої сполуки складало близько 8,3 % для обох варіантів обробки.

На пагонах що культивували на середовищах з класичними динітроанілінами, незалежно від концентрації, спостерігалась деформація та відбувалися зміни в рості і розвитку експлантів, що мало істотний вплив на здатність експлантів до подальшого мікроклонального розмноження, а отже, знижуючи ефективність поліплоїдизації міскантусу гігантського. На Рис. 6.5 показано вплив трифлюораліну (10 мкМ) на ріст та розвиток експлантів *M. × giganteus*.



Рис. 6.5. Деформації експлантів *M. x giganteus* на середовищах з типовим динітроаніліном (трифлюралін, 10 мкМ).

За нашими результатами, при використанні відібраних за допомогою методів *in silico* сполук для отримання поліплоїдів спостерігалось істотне зниження рівня фітотоксичності порівняно з трифлюраліном та оризалином, що позитивно вплинуло на рівень виживання оброблених експлантів. Так, при використанні новосинтезованих речовин в середовищах для мікроклонального розмноження пагонів протягом перших 14 діб у концентрації 50 мкМ рівень виживання експлантів коливався в межах від 83,3 % до 91,6 %, що істотно перевищує ніж при використанні таких сполук, як оризалин та трифлюралін. При використанні останніх у такій концентрації виживання експлантів на 30 добу після початку обробки становило 8,3% як у варіантах з оризалином, так і з трифлюраліном (Таб. 6.3, Таб. 6.4). Як новосинтезовані, так і добре вже відомі динітроаніліни виявилися здатними до поліплоїдизації *M. x giganteus* (Melnychuk *et al.*, 2020a; Melnychuk *et al.*, 2020b).

Таблиця 6.3

**Вживання експлантів після 7 днів культивування
на середовищах з динітроанілінами**

Речовина	Концентрація, мкМ				
	3	5	10	25	50
Трифлюоралін	90,40	88,00	74,50	27,30	8,30
Оризалін	89,00	85,70	44,90	25,00	16,60
сполука 1	97,00	98,40	96,00	91,60	91,60
сполука 2	98,80	98,60	98,00	91,60	83,30
сполука 3	98,80	98,80	98,80	91,60	91,60
сполука 4	98,50	96,80	96,40	91,60	85,70
сполука 5	98,80	96,60	97,50	90,90	90,00
сполука 6	98,80	98,50	97,00	91,60	90,90
Контроль	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Примітка: на 30 добу культивування

Таблиця 6.4

**Вживання експлантів після 14 днів культивування
на середовищах з динітроанілінами**

Речовина	Концентрація, мкМ				
	3	5	10	25	50
Трифлюоралін	88,00	68,50	54,00	16,60	8,30

Продовження таблиці 6.4

Оризалін	84,00	76,00	21,00	16,60	8,30
сполука 1	97,10	96,70	95,30	91,60	91,60
сполука 2	98,80	98,00	97,60	90,90	83,30
сполука 3	98,80	98,80	98,00	84,60	85,70
сполука 4	97,00	97,00	96,40	91,60	85,30
сполука 5	98,00	96,80	97,40	90,00	90,00
сполука 6	98,00	97,60	97,20	90,90	83,30
Контроль	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Примітка: на 30 добу культивування

6.4. Аналіз хромосомних чисел отриманих поліплоїдних ліній

Для обрахунку кількості хромосом в ядрах клітин отриманих ліній міскантусу гігантського використовували апекси активно ростучих коренів з молодих поодиноких пагонів (Рис. 6.6).

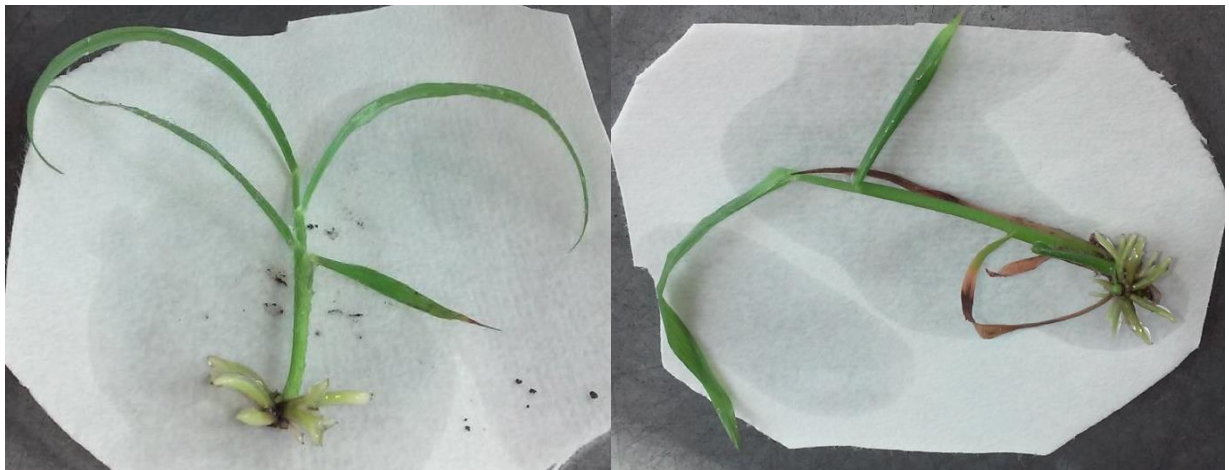


Рис. 6.6. Вкорінені лінії *M. giganteus* для приготування препаратів при проведенні цитологічних досліджень методами світлової мікроскопії.

За результатами цитологічних досліджень встановлено, що всі антимиотичні речовини динітроанілінового ряду, використані в роботі, виявилися здатними індукувати поліплоїдію *M. x giganteus*. Кількість досліджених ліній та кількість ліній, які мали збільшений набір хромосом наведено в Таблиці 6.5.

Таблиця 6.5

Поліплоїдизація *M. x giganteus* на середовищі з динітроанілінами

Речовина	Концентрація, мМ	Тривалість культ., діб	Перевірено ліній, шт.	Поліплоїдних ліній, шт.
Трифлюралін	3	7	4	0
	5		7	1
	10		13	2
	3	14	6	1
	5		7	1
	10		16	3
Оризалін	3	7	5	1
	5		5	1
	10		12	2
	3	14	7	1
	5		8	0
	10		15	3
Сполука 1	3	7	4	0
	5		7	1
	10		5	1
	3	14	7	1
	5		7	0
	10		8	1
Сполука 2	3	7	6	0
	5		6	0
	10		6	1
	3	14	6	1
	5		7	0
	10		4	1
Сполука 3	3	7	8	0
	5		9	1
	10		11	1
	3	14	4	1
	5		9	0
	10		9	1

Продовження таблиці 6.5

Сполука 4	3	7	7	0
	5		8	1
	10		8	1
	3	14	8	1
	5		13	0
	10		9	1
Сполука 5	3	7	9	1
	5		8	0
	10		15	2
	3	14	3	0
	5		7	0
	10		13	2
Сполука 6	3	7	4	0
	5		8	1
	10		6	1
	3	14	8	0
	5		8	2
	10		16	3

Отже, оскільки поліплоїдизація передбачає збільшення кількості хромосом кратне двом, то повноцінні гексаплоїдні форми, одержані в результаті проведення поліплоїдизації в умовах *in vitro*, повинні мати 114 хромосом. Лінії, в яких відбулось збільшення хромосом не кратне двом, є анеуплоїдами, незалежно від кількості хромосом.

В результаті проведеного визначення рівнів плоїдності, як контрольних, які не культивувалися на середовищах з антимиотичними речовинами, так і ліній *M. × giganteus*, одержаних після культивування на середовищах, доповнених динітроанілінами, знайдено рослини з різними варіаціями за кількістю хромосом (Melnychuk *et al.*, 2020a; Melnychuk *et al.*, 2020b). Контрольні рослини, які належать до вихідного генотипу мали стандартну кількість хромосом, що властива триплоїдній формі *M. × giganteus* ($2n=57$). Дослідження кількості хромосом у ліній, отриманих після культивування на середовищі з трифлураліном у різних концентраціях та тривалістю культивування дозволили виявити зразки з різними наборами хромосом. Декілька з одержаних ліній мали незмінену кількість хромосом порівняно з контролем ($2n=57$).

В результаті проведених цитологічних досліджень відібрано 43 поліплоїдні лінії, ядра клітин яких мали 114 хромосом, що є властивим для гексаплоїдів *M. x giganteus* ($2n=114$). Серед ліній, які культивувалися на середовищах, доповнених трифлюораліном у концентрації 10 мкМ тривалістю 14 діб виявлено лінію, яка має збільшену кількість хромосом в результаті поліплоїдизації в умовах *in vitro* ($2n=76$).

На Рис. 6.7 проілюстровані ядра клітин міскантусу гігантського, які мають 57 хромосом (А), що властиво триплоїдному виду *M. x giganteus* (контроль), а також ядра клітин зі збільшеною кількістю хромосом (Б, В), які є анеуплоїдами *M. x giganteus*. Також на цьому рисунку представлені ядра клітин отриманих поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (Г, Д, Є), які мають 114 хромосом і є гексаплоїдними.

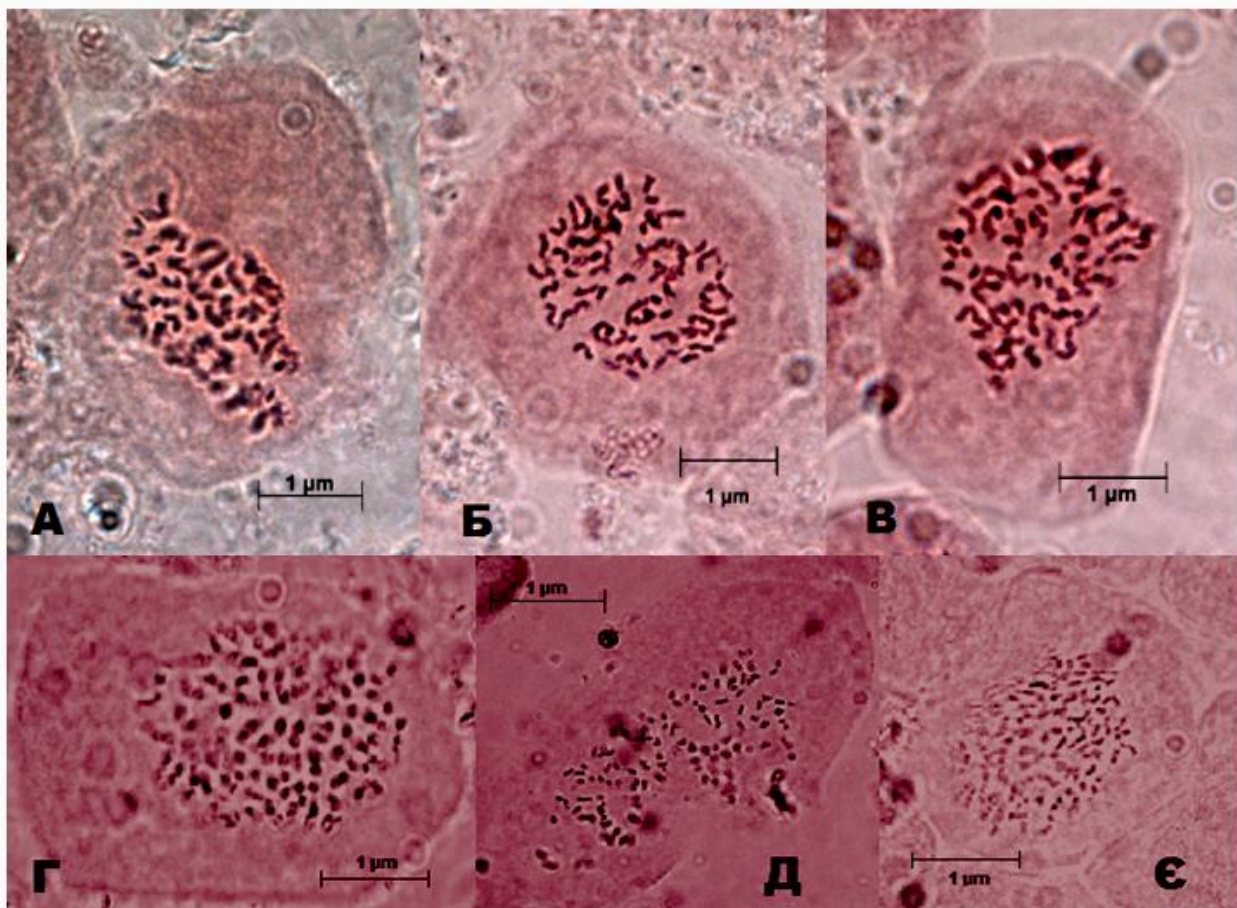


Рис. 6.7. Кількість хромосом у клітинах апікальної меристеми кореня *M. x giganteus*: А – контроль, 57 хромосом; Б, В – лінії, 76 хромосом; Г, Д, Є – лінії, які мають 114 хромосом.

Висновки до розділу 6:

1. Розроблено ефективний протокол введення в культуру *in vitro* *M. × giganteus*, з використанням адвентивних бруньок ризом як експлантів. За допомогою цього протоколу одержано 82,2 % стерильних експлантів, які виявились здатними як до індукції калюсогенезу та наступної регенерації рослин міскантусу гігантського з калюсу, так і до мікроклонального розмноження шляхом прямого морфогенезу.

2. Шляхом культивування асептичних пагонів в умовах *in vitro* на середовищах доповнених динітроанілінами проведено поліплоїдизацію *M. × giganteus*. Для цього було використано як референтні сполуки такі динітроаніліни, як трифлуралін та оризалін, а як тестовані сполуки використовували 6 новосинтезованих похідних динітроаніліну (Таб. 4.1.).

3. Доведено високий рівень фітотоксичності класичних динітроанілінів. Показано, що додавання оризаліну та трифлураліну в середовище призводить до пригнічення росту рослин, викликає деформації та викликає загибель експлантів.

4. Встановлено що новосинтезовані динітроаніліни, так само як і уже добре відомі, здатні індукувати поліплоїдію *M. × giganteus*, але не мають такого високого фітотоксичного впливу на рослини, що істотно позначається на виживанні та мікроклональному розмноженні експлантів.

5. В результаті досліджень за результатами підрахунку хромосомних наборів відібрано 43 поліплоїдні лінії *M. × giganteus*. Відібрані лінії адаптовані до умов відкритого ґрунту для подальшого вивчення та аналізу.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях:

Мельничук О. В., Ожерєдов С. П., Секан А. С., Баєр Г. Я., Шиша О. М., Емець А. І. Розробка та відпрацювання методики введення в культуру *in vitro* рослин міскантусу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 209–212. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

Мельничук О. В., Ожерєдов 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 НУБіП України*. 2015. № 8. С. 57. http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/8.pdf. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

Melnychuk O. V., Ozheredov S. P., Rakhmetov D. B., Shysha O. M., Rakhmetova S. O., Yemets A. I., Blume Ya. B. Induction of polyploidy in giant miscanthus (*Miscanthus* × *Giganteus* Greef Et Deu.). *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. 2020. V.74. № 3. P. 206–214. DOI: 10.2478/prolas-2020-0032. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

Melnychuk O. V., Ozheredov S. P., Rakhmetov D. B., Rakhmetova S. O., Yemets A. I., Blume Ya. B. The technology used for synthetic polyploid production of *Miscanthus* as cellulosic biofuel feedstock. *The Open Agriculture Journal*. 2020. V. 14. №1. P. 3–12. DOI: 10.2174/1874331502014010164. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Баєр О.О., Шиша О.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Поліплоїдизація *Miscanthus sinensis* за допомогою динітроанілінів з низькою фітотоксичністю. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 228–233. DOI: <https://doi.org/10.7124/FЕЕО.v26.1271> (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

РОЗДІЛ 7

ФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТКА ПОЛІПЛОЇДНИХ ФОРМ МІСКАНТУСУ ТА ЇХ ПРОДУКТИВНІСТЬ

7.1. Морфометричні характеристики поліплоїдних ліній рослин

Однією з важливих ознак, які визначають накопичення біомаси міскантусу є висота рослин (Рис. 7.1, 7.2). Для досліджуваних ліній цей показник варіював у межах від 144 до 223 см. Найвищими за даним показником були лінії 108 та 202, середня висота рослин для яких становила 211 та 223 см, відповідно. Рослини лінії 114 були всього 144 см заввишки. Висота триплоїдних рослин *M. ×giganteus* (контроль, № 161 на рис. 7.1.) становила 197 см (Рис. 7.2). Висота рослин для інших досліджуваних ліній знаходилася в межах від 168 см до 182 см (Мельничук *та ін.*, 2019). Проте, за результатами інших дослідників, гексаплоїдні форми міскантусу гігантського поступаються за висотою рослин триплоїдним формам. Так, наприклад, триплоїдні форми виявилися на 32 см вищими від гексаплоїдних форм *M. ×giganteus* (Glowacka *et al.*, 2010b).

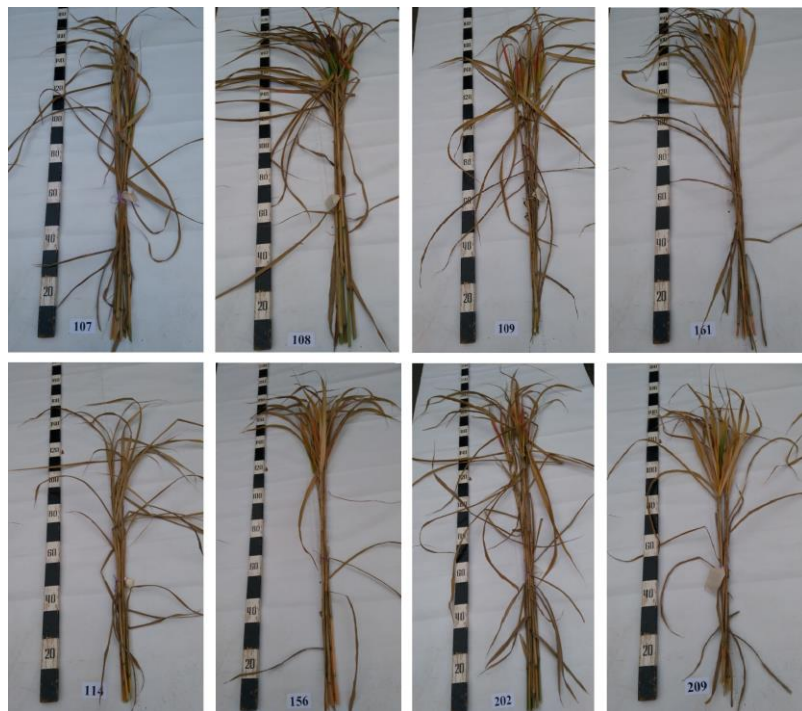


Рис. 7.1. Різні лінії поліплоїдних рослин *M. ×giganteus*, отримані при використанні відібраних новосинтезованих динітроанілінів.

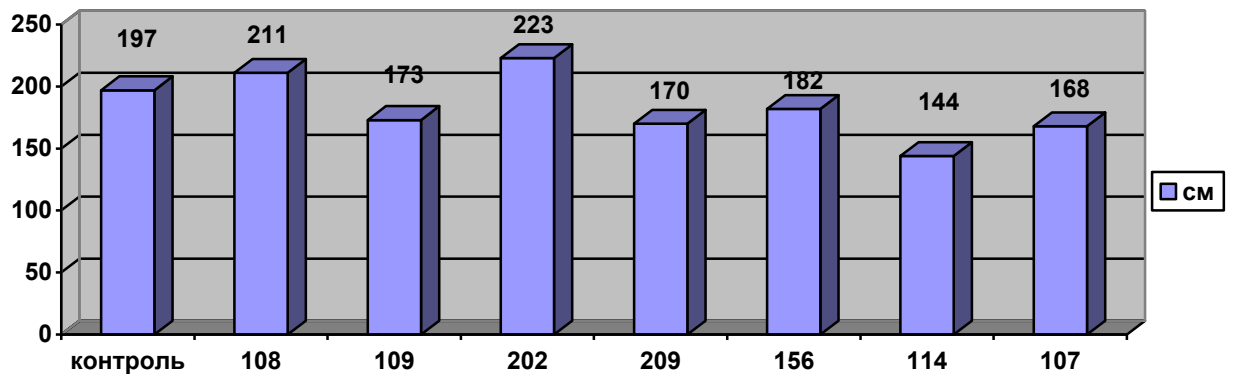


Рис. 7.2. Висота рослин отриманих поліплоїдних ліній міскантусу гігантського, см (середнє за 2 роки).

За таким показником як кількість пагонів на рослину лінія 108 переважала інші: тут кількість пагонів в середньому за 2 роки становила 24 шт. В контролі кількість пагонів на рослинах була 12 шт. Рослини лінії 114 в середньому формували 15 пагонів на рослину. Лінії 107, 156 та 209 мали цей показник на рівні 10-13 пагонів на рослину. Найменшу кількість пагонів мали рослини лінії 109, тут рослини мали в середньому по 7 пагонів (Рис. 7.3).

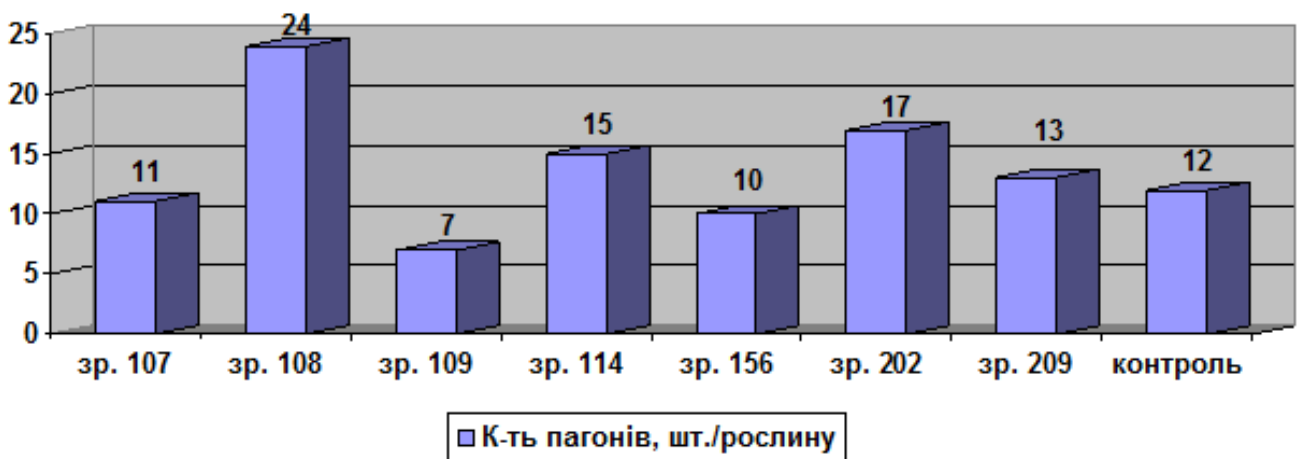


Рис. 7.3. Кількість пагонів на рослинах отриманих ліній міскантусу гігантського (середнє за 2 роки).

Важливим морфологічним показником є облистяність стебла рослин, тому що цей показник безпосередньо впливає на ефективність фотосинтезу та накопичення біомаси. Середня кількість листків на стеблах рослин отриманих ліній коливалась в межах від 7 до 10 шт/стебло (Таб. 7.1.). Найменша кількість листків спостерігалась у рослин ліній 114 та 156 та була в середньому на рівні 7 шт/стебло. Поліплоїдні зразки 107, 109, 209 та триплоїдна форма *M. × giganteus* мали в середньому 8 листків. Найвищий рівень облистяності спостерігали у ліній 202 та 108, а саме 9 та 10 листків на стебло.

Таблиця 7.1

Біометричні показники надземної частини рослин *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плоїдності (середнє за 2 роки)

Зразок	Висота рослин, см	Пагони		Листя	
		шт/рослину	%	шт/стебло	%
107	168 ± 8	11	60,7	8	39,3
108	211 ± 10	24	61,5	10	38,5
109	173 ± 8	7	77	8	23
114	144 ± 7	15	59,7	7	40,3
156	182 ± 9	10	63,1	7	36,9
202	223 ± 11	17	62,1	9	37,9
209	170 ± 9	13	58,2	8	41,8
Контроль (№ 161)	197 ± 10	12	75,7	8	24,3

Ще одним важливим показником, від якого безпосередньо залежить коефіцієнт вегетативного розмноження рослин, це кількість ризом на кореневищах (Рис. 7.4). За результатами нашого дослідження зразок 108 мав найвищі результати за цим показником, середня кількість ризом на його

кореневищах була 21, в той час як триплоїдний *M. × giganteus* (контроль) мав лише 9 ризом. Найменша кількість ризом на кореневищах спостерігалась у ліній 109 та 156, по 4 та 6, відповідно (Рис. 7.4, Рис. 7.5).

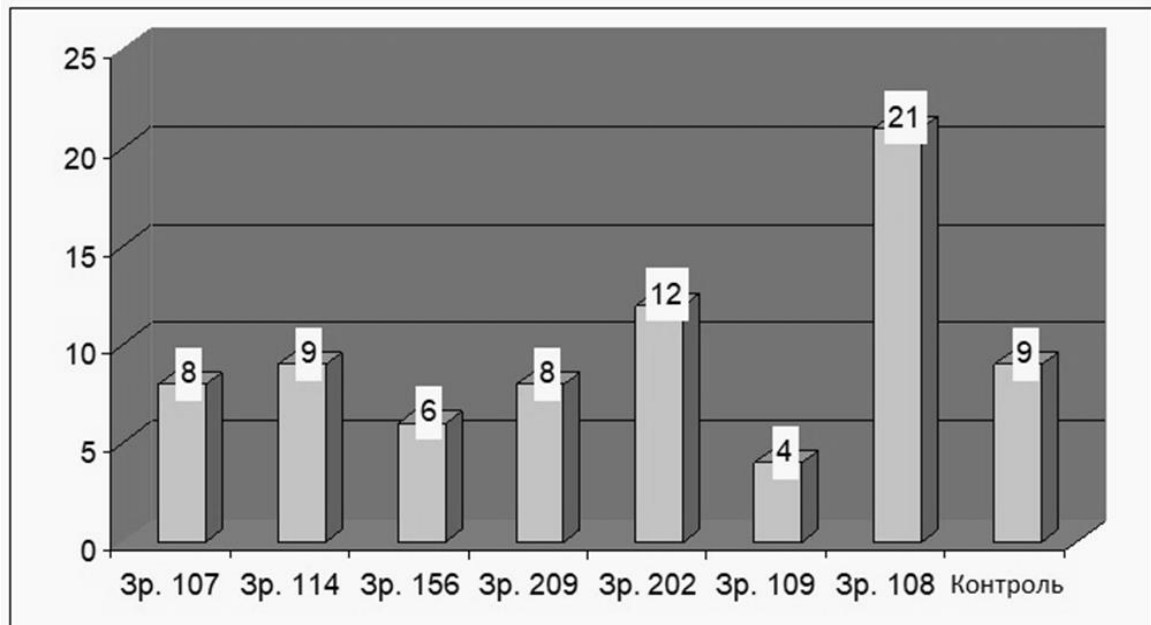


Рис. 7.4. Кількість ризом на кореневищах ліній *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плоідності (середнє за 2 роки).

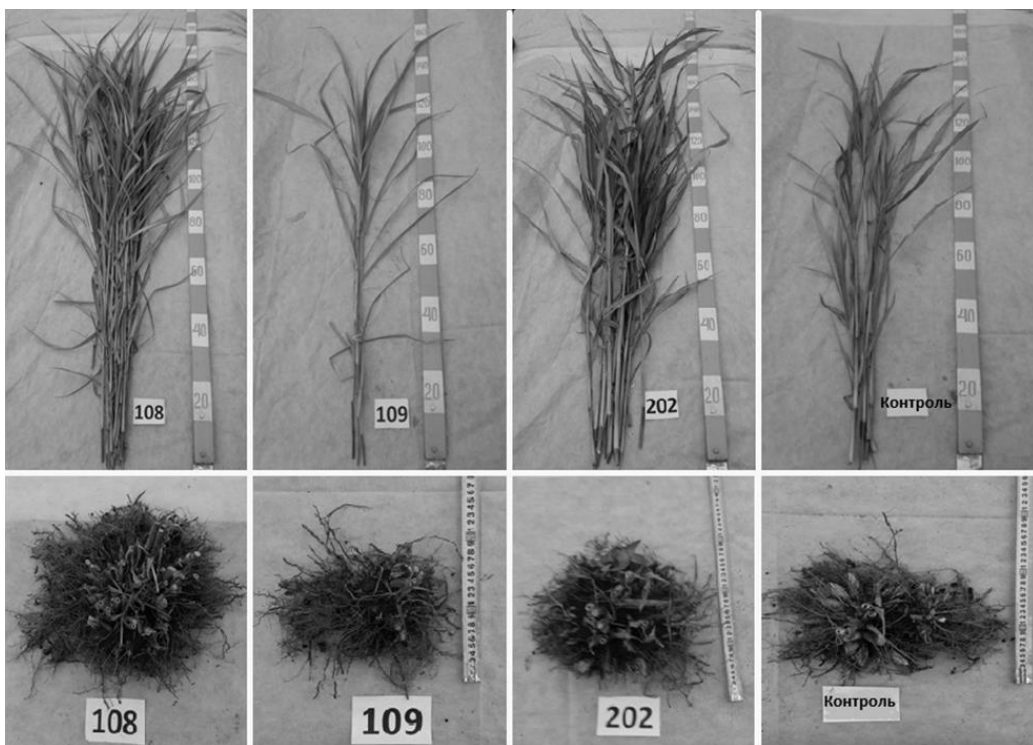


Рис. 7.5. Надземна частина та ризоми рослин ліній *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плоідності.

7.2. Структура рослин та надземна маса поліплоїдних ліній рослин

Для уточнення потенціалу біомаси досліджені лінії міскантусу було проаналізовано також за елементами формування продуктивності рослин, а саме накопиченням наземної біомаси та співвідношенням стебло/листя за вагою (Рис. 7.6). Лінія 108 мала середній показник за цим параметром, тут частка стебла становила 61,5 %, а частка листя - 38,5 % від загальної маси рослин. Схожі показники за співвідношенням маси стебла та листя відмічені за результатами аналізу у ліній 107, 114, 156, 202 та 209, що істотно відрізнялось від цих параметрів у контрольних рослин та лінії 109. Співвідношення для триплоїдних рослин міскантусу в середньому за 2 роки було 75,7 % стебла та 24,3 % листя. Для лінії 109 співвідношення маси стебла до маси листя становило в середньому за 2 роки 77 % до 23%.

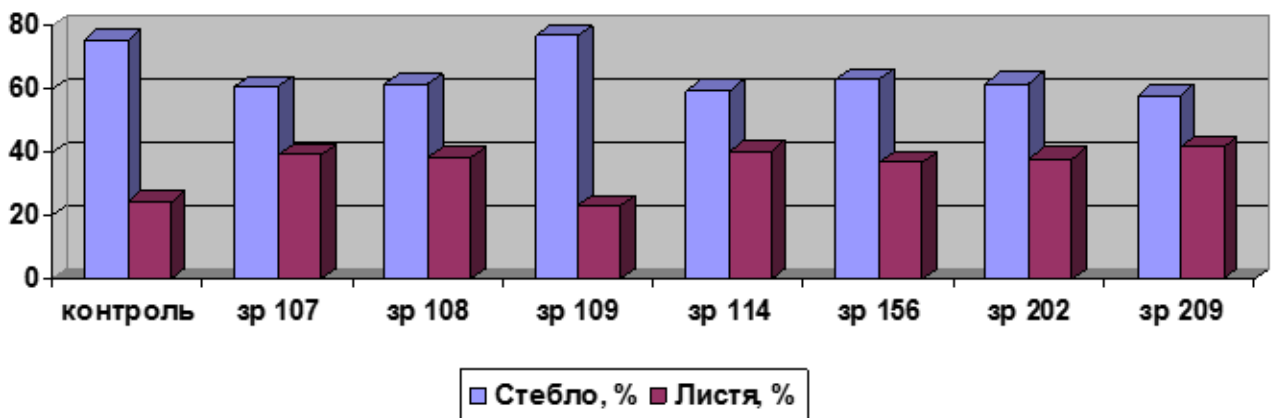


Рис. 7.6. Структура надземної частини рослин *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плоїдності, % (середнє за 2 роки).

Як відомо з літературних джерел, в середньому для представників роду *Miscanthus* частка стебла займає 47,6 % від загальної сухої маси рослин. Так, за результатами дослідження впливу посухи на накопичення та якість біомаси встановлено, що за умов достатнього зволоження цей показник може коливатись від 35,5 до 59,9 % в залежності від виду (Weijde, 2016).

В результаті аналізу накопичення біомаси у надземній частині рослин нових ліній міскантусу з підвищеним рівнем плоїдності встановлено, що лінія 108

перевищувала інші варіанти за даним показником (Рис. 7.7.). Вегетативна маса даного варіанту складала 771 г сирої маси на рослину, а суха маса становила 499 г. Дещо нижчою була біомаса наземної частини рослин лінії 202, яка складала 734 г сирої маси рослин, проте, суха маса рослин цієї лінії мала найвищі показники серед досліджуваних ліній. Вихідна форма *M. × giganteus* (контроль) характеризувалась відносно невисокими показниками – 393 г сирої маси рослин та 345 г сухої маси рослин. Отже, поліплоїдна лінія 108 за таким показником, як сира маса надземної частини рослин, майже вдвічі перевищувала контроль, а саме на 378 г (Рис. 7.7.).

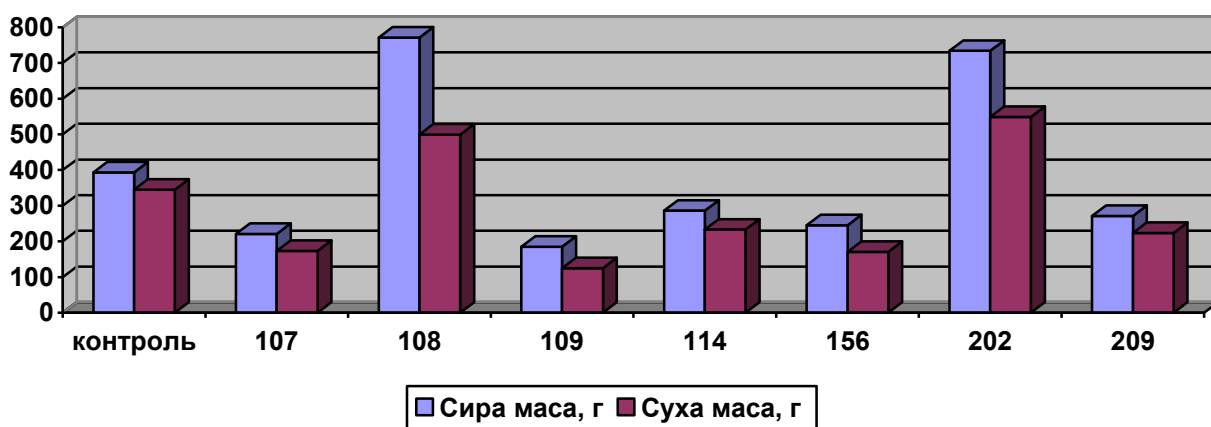


Рис. 7.7. Надземна маса рослин ліній *M. × giganteus* з підвищеним рівнем плідності, г (середнє за 2 роки).

Іншими дослідниками опубліковані результати, де продемонстровано, що, не зважаючи на переваги гексаплоїдних форм *M. × giganteus* за товщиною стебла, вони істотно поступаються триплоїдним формам за накопиченням надземної біомаси рослин. Різниця між варіантами становила 700 г (Głowacka *et al.*, 2010b).

Лінія 109 мала найнижчі показники за сирою надземною масою рослин, лише 185 г та за сухою масою надземної частини рослин 125 г. Всі інші досліджувані лінії мали сирю масу надземної частини в межах 221-286 г. За сухою масою надземної частини рослин ця величина коливалась від 171 до 233 г (Мельничук *та ін.*, 2019; Melnychuk *et al.*, 2020a).

Отримані нами результати досліджень відповідають результатам інших дослідників, підкреслюючи істотне варіювання між лініями за такими показниками як маса надземної частини, висота рослин, товщина стебла та ін. (Yu *et al.*, 2009; Glowacka *et al.*, 2010b).

7.3. Біохімічна характеристика отриманих поліплоїдних рослин (вміст сухої речовини, вміст золи)

Вміст сухої речовини для всіх проаналізованих ліній міскантусу був у межах від 64,69 до 87,99 %. За цим показником контроль переважав отримані поліплоїдні лінії. Для даного зразка вміст сухої речовини у надземній біомасі складав 87,99 %. Для інших ліній даний показник знаходився в межах від 67,61 до 82,69 % (Рис. 7.8).

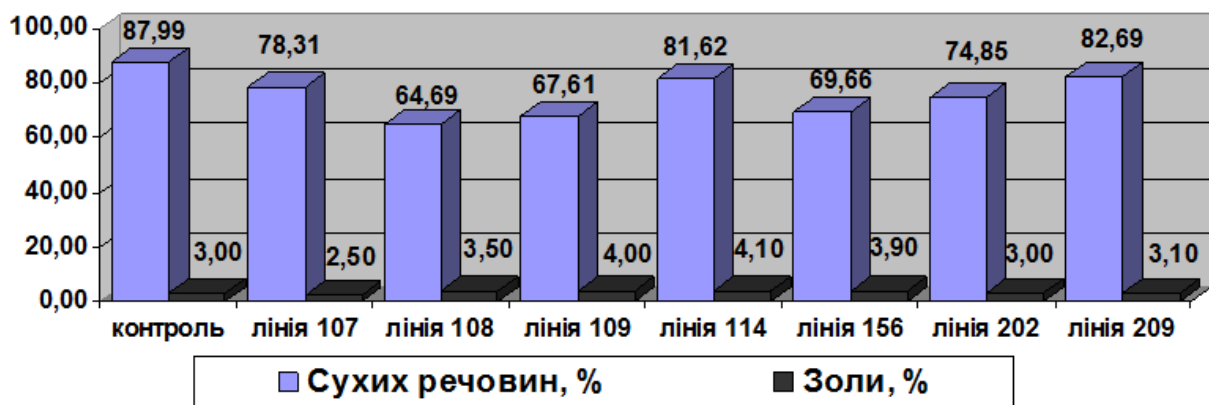


Рис. 7.8. Вміст сухих речовин та золи в зразках рослин поліплоїдних ліній міскантусу (середнє за 2 роки).

Для використання біомаси шляхом безпосереднього спалювання, дуже важливим показником є вміст золи. За результатами нашого дослідження зразки всіх досліджуваних ліній, зібрані по завершенню вегетаційного періоду, переважали показники зразків лінії 107 за вмістом золи. Вміст золи для цих рослин був на рівні 2,5 %. Для триплоїдної форми *M. × giganteus* (контроль) вміст золи складав 3 %. Як видно з Рис. 7.8 поліплоїдна лінія 108 мала відносно високу частку золи. Зольність лінії 108 становила 3,5 %, тоді як порівняно невисокі показники за часткою золи мали лінія 202 (3,0 %) та лінія 209 (3,1 %) (Мельничук *та ін.*, 2019). За результатами інших досліджень, вміст золи в молодих рослинах

M. sinensis літнього укусу майже в два рази перевищує частку золи в старих рослинах зимового укусу. Так, для літнього укусу цей показник становить в середньому 3,28 %, тоді як для зимового укусу вміст золи в середньому 1,54 % (Weijde, 2016).

7.4. Вміст цукрів та енергетична цінність біомаси поліплоїдних ліній

Одним з найважливішим показників для енергетичних культур є вміст загальних цукрів та моноцукрів в рослинному матеріалі. В Табл. 7.2 наведені результати визначення вмісту загальних цукрів та моноцукрів в зразках отриманих поліплоїдних ліній міскантусу.

Таблиця 7.2

Вміст цукрів та енергетична цінність біомаси поліплоїдних ліній *M. × giganteus* (середнє за 2 роки)

Зразок №	Загальний вміст цукрів, %	Вміст моноцукрів, %	Енергетична цінність біомаси, ккал/кг
Контроль	11,93±1,73	4,95±0,74	3906±12
107	9,81±1,66	3,35±0,71	3742±18
108	7,01±1,08	3,31±0,80	3820±17
109	12,9±1,34	5,25±0,77	3875±17
114	7,89±1,38	3,21±0,48	3757±18
156	9,5±1,44	5,67±0,66	3815±18
202	8,07±1,12	4,13±0,52	3953±19
209	9,13±1,33	5,05±0,75	3853±16

За результатами дослідження триплоїдні форми *M. × giganteus* (контроль) мали відносно високі показники за вмістом загальних цукрів. Для контролю цей показник був 11,93 %. Найвищий загальний вміст цукрів мали зразки поліплоїдної лінії 109 (12,9 %). Поліплоїдна лінія 108 характеризувалась найнижчим вмістом загальних цукрів у своїх зразках, де цей показник становив лише 7,01 %. Порівняно невисокі показники за вмістом загального цукру спостерігались у лінії 114 (7,89 %), лінії 202 (8,07 %) та лінії 209 (9,13 %). Високий вміст загальних цукрів мали такі лінії міскантусу, як 107 (9,81 %) та лінія 156, де цей показник був на рівні 9,5%. Крім того, варто зазначити, що рослини лінії 156 мали найвищі

показники за вмістом моноцукрів (5,67 %). Лінія 109 також істотно відрізнялась від інших за вмістом моноцукрів (5,25 %), перевищуючи всі інші лінії за цим показником. Як видно з Табл. 7.2, найнижчі показники за рівнем моноцукрів мала лінія 114, для зразків цієї лінії вони склали лише 3,21 %. Вміст моноцукрів в контрольному триплоїдному варіанті міскантусу гігантського становив 4,95 %.

За енергетичною цінністю проаналізовані зразки не мали суттєвої різниці. Як видно з Табл. 7.2, ці показники знаходились в межах від 3742 до 3953 ккал/кг. Найвищий показник енергетичної цінності мала лінія 202, на рівні 3953 ккал/кг. Найнижчий показник енергетичної цінності мала лінія 107. Для даного варіанту цей показник був на рівні 3742 ккал/кг, а у контролі - на рівні 3906 ккал/кг. Показник енергетичної цінності для гексаплоїдної лінії міскантусу гігантського 108 був на рівні 3820 ккал/кг біомаси (Таб. 7.2).

7.5. Розрахунок виходу біоетанолу

Висока продуктивність однодольних багаторічних рослин, таких як міскантус гігантський, зумовлена високою швидкістю росту та високою ефективністю фотосинтезу. Крім того, багаторічні злаки більш ефективно використовують поживні речовини з ґрунту, що робить їх менш вибагливими до внесення добрив та інших агротехнічних операцій (Lewandowski and Schmidt, 2006; Dohleman *et al.*, 2012; Kvak *et al.*, 2018). За результатами проведених багаторічних досліджень найвища врожайність біомаси з плантації міскантусу гігантського за сирою масою може бути отримана на 5-ий рік вирощування. Врожайність плантації з 6-го по 9-ий рік поступово знижується (на 1% за рік), на 10-ий рік вирощування знову спостерігається підвищення виходу біомаси (Dubis *et al.*, 2019). На основі цих результатів по приросту врожайності сухої біомаси міскантусу було побудовано поліноміальну регресійну модель, яка описує зміну врожайності міскантусу за часовим інтервалом з 1-го по 11-й роки вирощування (Рис. 7.9).

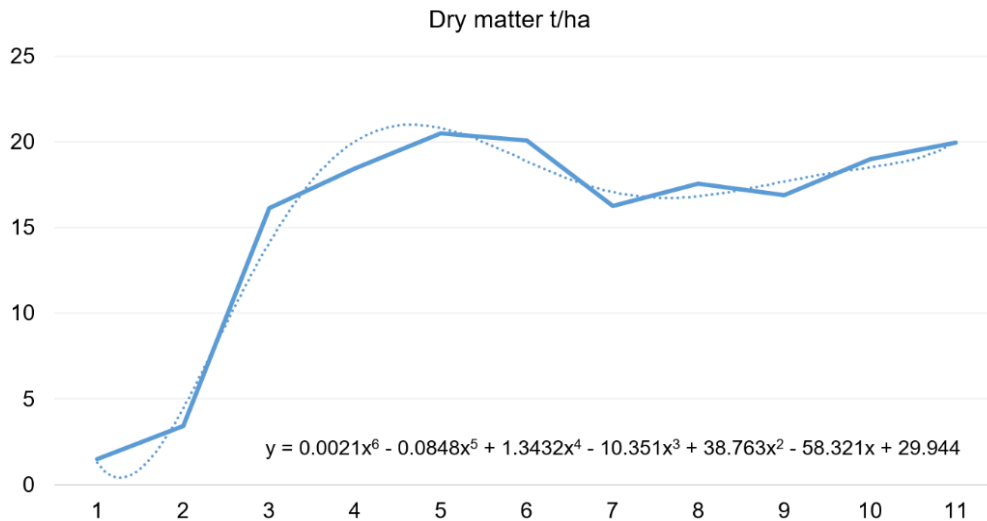


Рис. 7.9. Графік приросту врожайності сухої біомаси міскантусу з 1-го по 11-й рік культивування (за даними 2007-2017 рр., Dubis *et al.*, 2019) та побудована поліноміальна модель зміни врожайності.

Модель приросту врожайності сухої біомаси міскантусу гігантського представлена на Рис. 7.9 описується такою функцією:

$$y = 0.0021x^6 - 0.0848x^5 + 1.3432x^4 - 10.351x^3 + 38.763x^2 - 58.321x + 29.944$$

Аналогічним чином була побудована модель зміни річної врожайності, що описується логарифмічною функцією: $y = 7.4576 \ln(x) + 3.5624$ (Рис. 7.10).

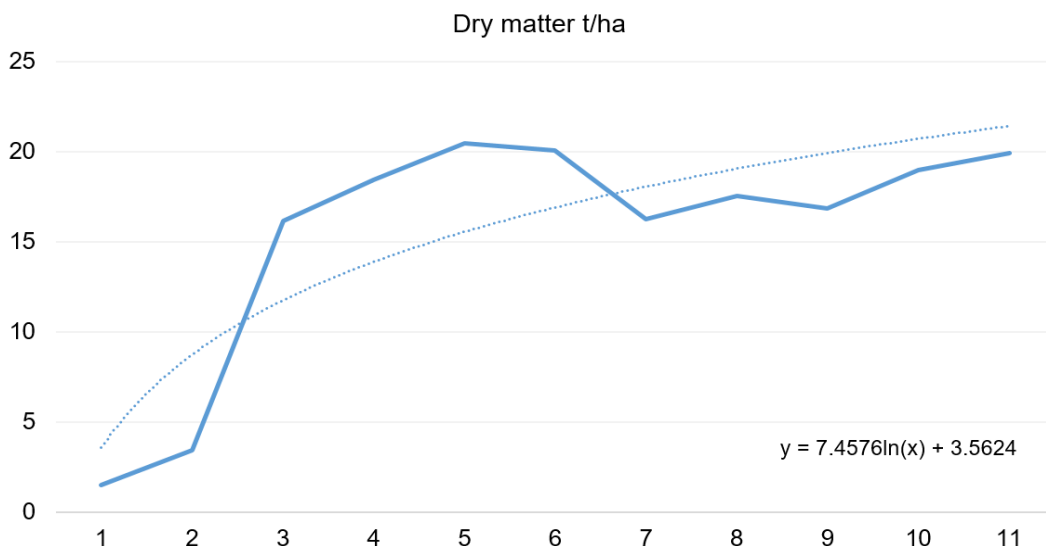


Рис. 7.10. Графік приросту врожайності сухої біомаси міскантусу з 1-го по 11-й рік культивування (за даними 2007-2017 рр., Dubis *et al.*, 2019) та побудована логарифмічна модель зміни врожайності.

Найбільш точно відображає річні зміни врожайності поліноміальна модель, враховуючи різке збільшення врожайності з 3-го по 6-й роки культивування та спад продуктивності рослин, починаючи з 7-го року. В той же час логарифмічна модель погано відображає зміни в продуктивності міскантусу за перші 5 років культивування (Табл. 7.3).

Таблиця 7.3

Експериментально визначена та математично прогнозована врожайність сухої біомаси (т/га) міскантусу зі звичайною та збільшеною плоїдністю

Зразок №	Врожай сухої маси (другий рік), т/га	За поліноміальною моделлю (3-11 рр.), т/га	За поліноміальною моделлю (6-11 рр.), т/га	За логарифмічною моделлю (6-11 рр.), т/га	Усереднене значення продуктивності за обома моделями (після 3-го року), т/га*
Контроль	5,39	22,48	23,56	21,34	22,46b
107	2,70	19,79	20,87	18,65	19,77c
108	7,80	24,89	25,97	23,75	24,87a
109	1,95	19,04	20,12	17,90	19,02c
114	3,64	20,73	21,81	19,59	20,71bc
156	2,67	19,76	20,84	18,62	19,74c
202	8,58	25,67	26,75	24,53	25,65a
209	3,50	20,59	21,67	19,45	20,57bc

*- латинські літери вказують статистично подібні/відмінні групи, визначені тестом Фішера, за достовірності $p < 0,05$.

Для проведення розрахунків експоненційна модель нами не розглядалася, оскільки вона не дозволяє адекватно описати реальну динаміку акумуляції біомаси рослинами на різних етапах їхнього культивування, а отже, дає або занижені значення врожайності, або значно завищені.

За результатами досліджень теоретичні значення конверсії біомаси міскантусу в біоетанол – 440, 453 та 465 л/т сухої біомаси (Scagline-Mellor *et al.*, 2018). Розрахунки конверсії біомаси міскантусу в біоетанол здійснювали за наступною формулою:

$$\frac{L \text{ ethanol}}{\text{ha}} = \frac{t \text{ biomass}}{\text{ha}} \times \% \text{ dry biomass} \times \frac{L \text{ ethanol}}{t \text{ dry biomass}} \quad (7.1.)$$

Проте подібна методика та формула розрахунку (7.1) є ідеалістичною, оскільки враховує усі наявні вуглеводи у біомасі, в тому числі і ті, що не доступні для ферментації. Такий метод розрахунку значно завищує показники виходу етанолу. Так, згідно цих розрахунків контрольна триплоїдна форма міскантусу потенційно могла б забезпечити виробництво біоетанолу до 10166 л/га, в той час як продуктивність поліплоїдних ліній становила би 11257-11610 л/га.

Отже, для більш точного розрахунку теоретичного виходу біоетанолу краще використовувати модифіковану версію формули (Rakhmetova *et al.*, 2020):

$$\frac{L \text{ ethanol}}{\text{ha}} = \frac{t \text{ biomass}}{\text{ha}} \times \% \text{ dry biomass} \times \frac{g \text{ released sugars}}{g \text{ treated biomass}} \times \frac{0.53 L \text{ ethanol}}{kg \text{ sugars}}, \quad (7.2)$$

де:

g released sugars

g treated biomass – величина, що вказує на кількість вивільнених цукрів (гексоз та пентоз) під час гідролізу у % (w/w, або г/г).

За результатами останніх досліджень в результаті ферментативного гідролізу біомаси міскантусу можливе отримання до 54,2 % (г/г) розчинних цукрів із сухої біомаси, використовуючи лігнін-деградуючі штами *Pseudomonas* sp. AS1 (Guo *et al.*, 2019). Спираючись на наведені результати та модифіковану формулу (7.2) нами було проведено оцінку потенційного виходу етанолу з біомаси триплоїдної форми та поліплоїдних ліній *M. x giganteus*, розраховані на основі змодельованої врожайності міскантусу після третього року вирощування (Рис. 7.11).

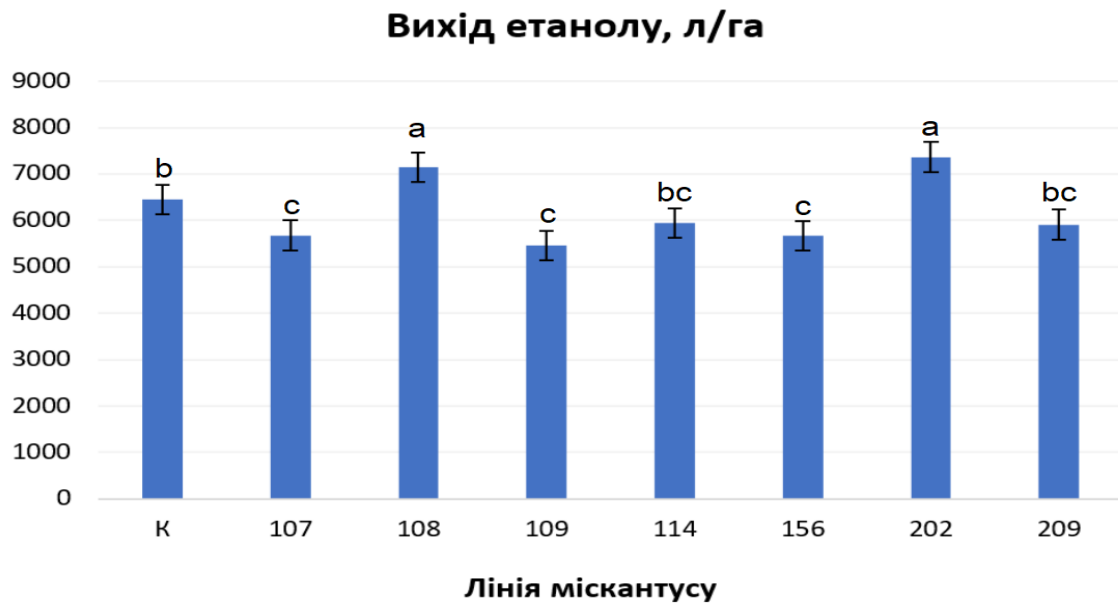


Рис. 7.11. Значення потенційного виходу етанолу з біомаси ліній звичайного та поліплоїдного міскантусу, розраховані на основі змодельованої врожайності міскантусу після третього року культивування.

Як видно з Рис. 7.11, найбільш продуктивною за виходом етанолу виявилась поліплоїдна лінія 202, яка істотно перевищує показники контролю за виходом етанолу в середньому на 14,2%. При цьому потенційний вихід етанолу з біомаси триплоїдних форм *M. x giganteus* становить 6451 л/га, в той час як вихід етанолу з лінії 202 – 7368 л/га та максимально міг би сягати 7684 л/га. Найнижчі показники за виходом етанолу мала лінія 109, що істотно поступалась як контролю, так і лініям 108, 114 та 209. Також невисокою виявилась розрахована продуктивність ліній 107 та 156. Високопродуктивною за виходом біоетанолу виявилась лінія 108, яка істотно перевищувала показники контролю та неістотно поступалась лінії 202 за виходом етанолу з одиниці площі.

Висновки до розділу 7:

1. Встановлено, що всі отримані поліплоїдні лінії *M. x giganteus* істотно відрізнялися між собою за досліджуваними морфологічними та біохімічними показниками.

2. Найкращі результати за такими показниками, як маса надземної частини рослин, висота рослин, кількість ризом на кореневищах рослин, кількість листків на стеблі, вміст сухих речовин та ін. спостерігалися у ліній 108 та 202.

3. З практичної точки зору також значний інтерес представляє лінія 109, яка також переважає вихідну форму за всіма розглянутими показниками, але поступається лініям 108 та 202 за рівнем накопичення біомаси.

4. Крім зазначеного вище під час проведення досліджень лише на рослинах поліплоїдної лінії 108 спостерігалось викидання волотей.

5. За розрахунками теоретичного виходу біоетанолу встановлено, що в порівнянні з контролем поліплоїдні лінії 202 та 108, дозволяють отримати до 14,2% більше біоетанолу з 1 га площі за рахунок більшої врожайності біомаси міскантусу.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях:

Мельничук О. В., Ожерєдов С. П., Рахметов Д. Б., Рахметова С. О., Баєр О. О., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Біометричні та біохімічні особливості нових ліній *M. × giganteus* з підвищеним рівнем плоїдності. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 281–286. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

Melnychuk O. V., Ozheredov S. P., Rakhmetov D. B., Rakhmetova S. O., Yemets A. I., Blume Ya. B. The technology used for synthetic polyploid production of *Miscanthus* as cellulosic biofuel feedstock. *The Open Agriculture Journal*. 2020. V. 14. №1. P. 3–12.

DOI: 10.2174/1874331502014010164. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У дисертаційній роботі представлені результати досліджень щодо розробки ефективного методу отримання поліплоїдів міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus*) в культурі *in vitro* з використанням ново синтезованих перспективних сполук динітроанілінового ряду, завдяки чому отримано і охарактеризовано 43 поліплоїдні лінії цього виду.

На першому етапі дисертаційного дослідження за допомогою методів *in silico* проведено скрінінг перспективних динітроанілінових сполук на спорідненість до α -тубулінів міскантусу. Здійснено реконструкцію та верифікацію просторової структури молекули α -тубуліну міскантусу. З метою відбору послідовності для подальшого використання знайдені неанотовані амінокислотні послідовності α -тубуліну *Miscanthus* були проаналізовані за допомогою методу множинного вирівнювання. За результатами множинного вирівнювання відібраних послідовностей α -тубуліну *Miscanthus sinensis* встановлено можливість використання будь-якої з проаналізованих амінокислотних послідовностей ізотипів α -тубуліну для реконструкції просторової структури цієї молекули з метою вивчення білок-лігандних взаємодій та екстраполяції отриманих результатів на інші відомі ізотипи α -тубуліну з високим рівнем ймовірності. Для подальшої роботи нами було відібрано послідовність Q70ZL7 α -тубуліну (ген TUA1) з *M. sinensis*. З метою оцінки потенціалу досліджуваних сполук динітроанілінового ряду як антими́тотичних агентів, проведено аналіз можливості утворення стабільного ліганд-білкового комплексу при їх взаємодії з молекулою α -тубуліну міскантусу. Для цього було проведено докування лігандів на поверхню цільового білку. Як свідчать отримані результати молекулярного докінгу, всі досліджувані ліганди потенційно здатні утворювати комплекси із α -тубулінами міскантусу. Потенційний сайт їх зв'язування знаходиться на поверхні білкової глобули, що вказує про високу ймовірність утворення ліганд-білкового комплексу. З метою визначення стабільності відібраних нами на підставі оцінки результатів докінгу лігандів з α -тубуліном ліганд-білкових комплексів було

проведено обрахунок їх тривалої молекулярної динаміки. Аналіз отриманих результатів здійснювали за такими показниками, як зміна рівня конформаційної енергії ліганда як у вільному стані, так і у складі ліганд-білкового комплексу та кількості утворених водневих зв'язків між лігандом та білком в середньому протягом проведення обрахунку. Результати аналізу виявили, що частина досліджуваних сполук була краща за контрольну сполуку – трифлюоралін за значенням енергії зв'язування. Таким чином, проведено порівняльну оцінку новосинтезованих сполук динітроанілінового класу на здатність утворювати ліганд-білковий комплекс з α -тубуліном, що належить до субгеному *M. sinensis* (Q70ZL7) та відібрані найбільш перспективні з них.

Серед 83 досліджених ново синтезованих динітроанілінів за критерієм стабільності комплексів з α -тубуліном та рівнем фітотоксичності відібрано 6 найбільш перспективних сполук для подальшого використання у дослідках з поліплоїдизації рослин родини *Miscanthus*, а саме: 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін; N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін; N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін; N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид; 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид та {2-[4-(2,4-дихлор-феніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид. При виборі сполук для подальшого використання в експериментах з поліплоїдизації міскантусу гігантського враховували такий критерій як рівень фітотоксичності, дослідження якого були попередньо проведені в нашій установі. Таким чином, за критерієм стабільності комплексів з α -тубуліном для подальшого використання у дослідках з поліплоїдизації рослин родини *Miscanthus* відібрано 2 найбільш перспективні сполуки динітроанілінового ряду, що мали кращі показники за контрольну сполуку трифлюоралін за значенням енергії зв'язування: N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін (сполука 2) та 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид (сполука 5). Також показано, що сполуки 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін (сполука 1); N,N'-біс-

(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін (сполука 3); N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид (сполука 4) та {2-[4-(2,4-дихлор-феніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид, мають нижчі показники за контрольну сполуку трифлюралін за значенням енергії зв'язування з α -тубуліном *M. sinensis*, але завдяки низькому рівню фітотоксичності можуть бути використані для проведення поліплоїдизації рослин родини *Miscanthus*.

На наступному етапі роботи розроблено та відпрацьовано ефективні методики ведення міскантусу в культуру *in vitro*, які дозволяють використовувати адвентивні бруньки ризом як експланти. Як видно з результатів дослідження найбільш ефективним методом поверхневої стерилізації виявився багатокроковий метод поверхневої стерилізації з використанням розчину «Білизни» та розчину нітрату срібла. Цей метод включав попередню обробку експлантів 50%-им розчином комерційного препарату «Білизни» (3%-ий розчин гіпохлориту натрію) протягом 20 хв з постійним помішуванням після чого експланти тричі промивали стерильною дистильованою водою та в асептичних умовах з бруньок видаляли поверхневі луски і частину ризом. Підготовлені експланти повторно стерилізували у 0,08 %-му розчині нітрату срібла протягом 20 хв з постійним помішуванням, тричі промивали стерильною дистильованою водою, протягом 10 хв кожний. Розроблений метод дозволяє одержати 82,2 % стерильних експлантів.

З метою підбору оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції калюсогенезу *M. x giganteus* сорту «Гулівер» проведено дослідження з використанням 6-ти різних комбінацій ауксинів та цитокінінів. За результатами дослідження підібрано оптимальні умови індукції калюсогенезу з використанням різних експлантів *M. x giganteus* та наступної регенерації з них рослин. Встановлено, що найбільшу кількість ембріогенного та пагоноутворюючого калюсу можливо отримати на середовищі доповненому 5,0 мг/л 2,4Д та 0,1 мг/л БАП. Використання цих регуляторів росту в таких концентраціях в середовищі призводило до утворення білого, життєздатного калюсу на 61,6% експлантів. Зменшення концентрації 2,4-Д у середовищі призводило до зниження

ефективності калюсогенезу і утворення білого, життєздатного калюсу спостерігалось лише на 8,1 % експлантів. А збільшення концентрації БАП до 0,2 мг/л обумовлювало утворення в'ялого, темно-жовтого, нежиттєздатного калюсу кількість якого складала 48,3 %, що істотно вище ніж при додаванні в середовище 0,1 мг/л БАП, де кількість експлантів з нежиттєздатним калюсом склала 34,8 %. Схожі результати були отримані при використанні асептичних бруньок ризом, та пагонів, що були отримані шляхом мікроклонального розмноження. Через 16–18 днів після початку культивування на експлантах з'являлась перша дедиференційована тканина та після двох місяців культивування експланти повністю покривалися калюсом з великою кількістю ембріоподібних структур.

Далі, використовуючи загальноприйняті біотехнологічні методи проведено поліплоїдизацію міскантусу шляхом непрямого морфогенезу. Для отримання поліплоїдних ліній *M. × giganteus* калюсну культуру переносили на середовища для регенерації, які містили антимиотичні речовини (трифлюралін та оризалін) протягом перших 7 діб диференціації калюсної культури. Після того калюс переносили на свіже середовище для регенерації, яке не містило динітроанілінів. Регенеровані рослини вкорінювали та проводили подальші аналізи. При використанні оризаліну як антимиотичної речовини, у концентрації 3 мкМ виживання експлантів не перевищувало 20 %, та при підвищенні концентрації до 10 мкМ відсоток калюсу, що виживав, був на рівні лише 6,7 %. Кількість регенерованих рослин з калюсу, що вижив, істотно не відрізнялась в залежності від концентрації та антимиотичного агенту і коливалась в межах 16–23,3 %. Враховуючи довготривалість, складність та низьку ефективність методу, експерименти з новими динітроанілінами не закладалися.

Також проведено поліплоїдизацію *M. × giganteus* шляхом культивування асептичних пагонів в умовах *in vitro* на середовищах, доповнених динітроанілінами. Використовували як відібрані новосинтезовані сполуки, так і референтні, добре відомі динітроаніліни: трифлюралін та оризалін. З метою вивчення впливу фітотоксичності на виживання експлантів, та здатності сполук індукувати поліплоїдію міскантусу використовували різні концентрації

антимітотичних речовин (3, 5, 10, 25 та 50 мкМ), а також різну тривалість обробки: 7 та 14 діб.

За отриманими результатами було встановлено, що оризалін та трифлюралін характеризуються високим рівнем фітотоксичності порівняно з тестованими сполуками. За нашими результатами, при використанні відібраних за допомогою методів *in silico* сполук для отримання поліплоїдів спостерігалось істотне зниження рівня фітотоксичності порівняно з трифлюраліном та оризаліном, що позитивно вплинуло на рівень виживання оброблених експлантів. Так, при використанні новосинтезованих речовин в середовищах для мікроклонального розмноження пагонів протягом перших 14 діб у концентрації 50 мкМ рівень виживання експлантів коливався в межах від 83,3 % до 91,6 %, що є істотно вищим ніж при використанні референтних сполук. При використанні класичних динітроанілінів у такій концентрації виживання експлантів на 30 добу після початку обробки становило 8,3% як у варіантах з оризаліном, так і з трифлюраліном. Показано, що додавання оризаліну та трифлюраліну в середовище призводить до пригнічення росту рослин, викликає деформації та викликає загибель експлантів міскантусу гігантського.

Використовуючи методи світлової мікроскопії проведено визначення рівня плоїдності отриманих ліній. Для обрахунку кількості хромосом в ядрах клітин отриманих ліній міскантусу гігантського використовували апекси активно ростучих коренів з молодих поодиноких пагонів. Контрольні рослини міскантусу гігантського, які належать до вихідного генотипу, використаного у дослідженні, мали стандартну кількість хромосом, характерну триплоїдній формі ($2n=57$). В результаті проведених цитологічних досліджень було відібрано 43 поліплоїдні лінії. Ядра клітин поліплоїдних ліній мали 114 хромосом, що є властивим для гексаплоїдів *M. x giganteus* ($2n=114$). Крім того, у деяких випадках спостерігалась поява анеуплоїдних форм. Так, серед ліній, які культивувалися на середовищах, доповнених трифлюраліном у концентрації 10 мкМ тривалістю 14 діб, виявлено лінію, яка мала збільшену кількість хромосом в результаті проведення поліплоїдизації в умовах *in vitro* ($2n=76$).

Таким чином, встановлено що тестовані динітроаніліни, так само як і референтні, здатні індукувати поліплоїдію *M. x giganteus*, але не мають високого фітотоксичного впливу на рослини, що істотно позначається на виживанні та мікроклональному розмноженні експлантів. Досліджені лінії міскантусу гігантського було вегетативно розмножено та адаптовано до умов відкритого ґрунту.

На заключному етапі дисертаційного дослідження за стандартними методиками проведено вивчення фенотипових особливостей отриманих поліплоїдних ліній міскантусу гігантського. Нами були визначені такі важливі морфометричні показники, як висота рослин, структура, кількість пагонів на рослину, кількість листків на стеблах та кількість ризом на кореневищах. Також за допомогою біохімічних методів досліджували якісні показники біомаси. Зокрема, було визначено сиру та суху масу рослин, вміст сухих речовин та золи, вміст загального цукру та моноцукрів, енергетичну цінність біомаси тощо. Встановлено, що всі отримані поліплоїдні лінії міскантусу гігантського істотно відрізнялися між собою за досліджуваними морфофізіологічними та біохімічними показниками.

При проведенні досліджень висоти рослин отриманих поліплоїдних ліній встановлено, що цей показник варіював у межах 144-223 см. Найвищими за даним показником були лінії 108 та 202, середня висота рослин для яких становила 211 та 223 см, відповідно. Рослини лінії 114 були лише 144 см заввишки. Висота триплоїдних рослин *M. x giganteus* (контроль) становила 197 см. Висота рослин для інших досліджуваних ліній знаходилася в межах від 168 см до 182 см. За таким показником як кількість пагонів на рослину лінія 108 переважала інші, тут кількість пагонів в середньому за 2 роки становила 24 шт. Для триплоїдного контролю кількість пагонів на рослинах була 12 шт. Рослини лінії 114 в середньому формували 15 пагонів на рослину. Для ліній 107, 156 та 209 цей показник був на рівні 10-13 пагонів на рослину. Найменшу кількість пагонів мали рослини лінії 109, тут рослини мали в середньому по 7 пагонів. Середня кількість листків на стеблах рослин отриманих ліній коливалась від 7-ми до 10-ти

шт/стебло. Найменша кількість листків спостерігалась у рослин ліній 114 та 156 та була в середньому на рівні 7-ми шт/стебло. Поліплоїдні зразки 107, 109, 209 та триплоїдна форма *M. × giganteus* мали в середньому 8 листків. Найвищий рівень облистяності спостерігали у ліній 202 та 108, а саме 9 та 10 листків на стебло. За результатами дослідження лінія 108 мала найкращі показники за кількістю ризом на кореневищах: в середньому за два роки цей показник становив 21 ризому на рослину, в той час як триплоїдний *M. × giganteus* (контроль) мав лише 9 ризом. Найменша кількість ризом на кореневищах спостерігалась у ліній 109 та 156, по 4 та 6 ризом, відповідно.

Отримані поліплоїдні лінії міскантусу гігантського було проаналізовано також за елементами формування продуктивності рослин, а саме накопиченням наземної біомаси та співвідношенням стебло/листя за вагою. Лінія 108 мала середній показник за цим параметром, тут частка стебла становила 61,5 %, а частка листя - 38,5 % від загальної маси рослин. Схожі показники за співвідношенням маси стебла та листя відмічені за результатами аналізу у ліній 107, 114, 156, 202 та 209, що істотно відрізнялось від цих параметрів у контрольних рослин та лінії 109. Співвідношення для триплоїдних рослин міскантусу в середньому за 2 роки було 75,7 % стебла та 24,3 % листя. Для лінії 109 співвідношення маси стебла до маси листя становило в середньому за 2 роки 77 % до 23%. При проведенні аналізу накопичення біомаси у надземній частині рослин нових ліній з підвищеним рівнем плоїдності встановлено, що лінія 108 перевищувала інші лінії за даним показником. Вегетативна маса даного варіанту складала 771 г сирої маси рослин, суха маса становила 499 г. Дещо нижчою була біомаса наземної частини рослин лінії 202, яка складала 734 г сирої маси рослин, проте суха маса рослин цієї лінії мала найвищі показники серед досліджуваних ліній. Триплоїдна форма *M. × giganteus* (контроль) мала відносно невисокі показники – 393 г сирої маси рослин та 345 г сухої маси рослин. Отже, поліплоїдна лінія 108 за таким показником, як сира маса надземної частини рослин, майже вдвічі перевищувала контроль, а саме на 378 г.

Вміст сухої речовини для всіх проаналізованих ліній був у межах 64,69-87,99 %. За цим показником триплоїдний контроль переважав поліплоїдні лінії міскантусу гігантського. Вміст сухої речовини у надземній біомасі контролю складав 87,99 % в той час як для отриманих ліній даний показник знаходився в межах 67,6-82,69 %. Шляхом термічного озолення біомаси було визначено частку золи в біомасі рослин поліплоїдних ліній міскантусу гігантського. За результатами нашого дослідження зразки всіх досліджуваних ліній, зібрані по завершенню вегетаційного періоду, переважали показники зразків лінії 107 за вмістом золи. Вміст золи для цих рослин був на рівні 2,5 %. Для триплоїдної форми *M. × giganteus* (контроль) вміст золи складав 3 %. Поліплоїдна лінія 108 мала відносно високу частку золи. Зольність лінії 108 становила 3,5 %, тоді як порівняно невисокі показники за часткою золи мали лінія 202 (3,0 %) та лінія 209 (3,1 %). За результатами дослідження триплоїдні форми *M. × giganteus* (контроль) мали відносно високі показники за вмістом загальних цукрів. Для контролю цей показник був 11,93 %. Найвищий загальний вміст цукрів мали зразки поліплоїдної лінії 109 (12,9 %). Порівняно невисокі показники за вмістом загального цукру спостерігались у лінії 108 (7,01 %), 114 (7,89 %), лінії 202 (8,07 %) та лінії 209 (9,13 %). Високий вміст загальних цукрів мали такі лінії міскантусу, як 107 (9,81 %) та лінія 156, де цей показник був на рівні 9,5%. Крім того, варто зазначити, що рослини лінії 156 мали найвищі показники за вмістом моноцукрів (5,67 %). Лінія 109 також істотно відрізнялась від інших за вмістом моноцукрів (5,25 %), перевищуючи всі інші лінії за цим показником. Найнижчі показники за рівнем моноцукрів мала лінія 114, для зразків цієї лінії вони склали лише 3,21 %. Вміст моноцукрів в контролі становив 4,95 %.

За енергетичною цінністю проаналізовані зразки не мали суттєвої різниці. Даний показник для них знаходився в межах від 3742 до 3953 ккал/кг. Найвищий показник енергетичної цінності мала лінія 202, на рівні 3953 ккал. Найнижчий показник енергетичної цінності мала лінія 107. Для даного варіанту цей показник був на рівні 3742 ккал, а у контролі - на рівні 3906 ккал.

Було проведено оцінку потенційного виходу етанолу з біомаси триплоїдної

форми та поліплоїдних ліній *M. x giganteus*. Розрахунки проводили на основі змодельованої врожайності міскантусу після третього року вирощування. Для цього на основі результатів по приросту врожайності сухої біомаси міскантусу гігантського було побудовано поліноміальну регресійну та логарифмічну моделі які описують зміну врожайності міскантусу за часовим інтервалом з 1-го по 11-й роки вирощування. За результатами розрахунків найбільш продуктивною за виходом етанолу виявилась поліплоїдна лінія 202, яка істотно перевищує показники контролю за виходом етанолу в середньому на 14,2%. При цьому потенційний вихід етанолу з біомаси триплоїдних форм *M. x giganteus* становить 6451 л/га, в той час як вихід етанолу з лінії 202–7368 л/га та максимально міг би сягати 7684 л/га. Найнижчі показники за виходом етанолу мала лінія 109, що істотно поступалась як контролю, так і лініям 108, 114 та 209. Також невисокою виявилась розрахована продуктивність ліній 107 та 156. Високопродуктивною за виходом біоетанолу виявилась лінія 108, яка істотно перевищувала показники контролю та неістотно поступалась лінії 202 за виходом етанолу з одиниці площі.

За результатами дослідження, 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, вміст сухих речовин та ін. Також значний інтерес представляє лінія 109, яка також переважає вихідну форму за всіма розглянутими показниками, але поступається лініям 108 та 202 за рівнем накопичення біомаси. Крім зазначеного вище, під час проведення досліджень лише на рослинах гексаплоїдної лінії 108 спостерігалось викидання волотей.

Отже в дисертаційні роботі представлені результати використання нових перспективних сполук динітроанілінового ряду з низькою фітотоксичністю для отримання поліплоїдів міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus*) в культурі *in vitro*, завдяки чому отримано і охарактеризовано 43 поліплоїдні лінії цього виду рослин з підвищеною продуктивністю. Відібрані сполуки динітроанілінового ряду з антимітотичними властивостями та низьким рівнем

фітотоксичності можуть бути використані у біотехнології рослин як для отримання поліплоїдів міскантусу гігантського та інших представників цього роду, так і для розробки методів поліплоїдизації інших видів рослин, для яких висока фітотоксичність вже відомих індукторів поліплоїдії є критичним і лімітуючим фактором. Отримані поліплоїдні лінії *M. × giganteus* слугуватимуть основою для створення нових сортів міскантусу гігантського, і подальшого залучення до селекційних процесів, оскільки є важливим джерелом збільшення генетичного різноманіття цього роду рослин. Найкращі зі створених поліплоїдних ліній міскантусу вже мають практичну цінність для безпосереднього використання у біоконверсії, оскільки характеризуються покращеними показниками продуктивності.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень розроблено та відпрацьовано ефективний метод отримання поліплоїдів міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus*) в культурі *in vitro* з використанням нових сполук динітроанілінового ряду з низькою фітотоксичністю, завдяки чому отримано і охарактеризовано 43 поліплоїдні лінії цього виду рослин з підвищеною продуктивністю. Зокрема, було отримано наступні результати:

1. Проведено біоінформатичний пошук та аналіз відомих послідовностей α -тубуліну міскантусу як головної білкової мішені для зв'язування сполук динітроанілінового ряду, що послужило основою для подальшого моделювання тривимірної моделі молекули цього білку.

2. Реконструйовано та верифіковано просторову структуру молекули α -тубуліну міскантусу, що належить до субгеному *M. sinensis* (Q70ZL7), та охарактеризовано сайт зв'язування динітроанілінових сполук на її поверхні.

3. Проведено оцінку здатності референтних (оризалін та трифлуралін) та новосинтезованих сполук динітроанілінового ряду зі зниженою фітотоксичністю утворювати ліганд-білкові комплекси з α -тубуліном *M. sinensis* (Q70ZL7).

4. За критерієм стабільності комплексів з α -тубуліном та рівнем фітотоксичності відібрано 6-ть найбільш перспективних новосинтезованих динітроанілінів для подальшого використання у дослідях з поліплоїдизації міскантусу гігантського, а саме: 4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін; N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін; N,N'-біс-(2-нітро-феніл)-гексилен-1,6-діамін; N'-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид; 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид та {2-[4-(2,4-дихлорфеніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид.

5. Розроблено ефективну методику введення в культуру *in vitro* *M. × giganteus*, яка передбачає використання адвентивних бруньок ризом в якості

експлантів. Завдяки цій методиці одержано 82,2 % стерильних експлантів міскантусу гігантського, здатних як до індукції калюсогенезу та наступної регенерації рослин з калюсу, так і до мікроклонального розмноження шляхом прямого морфогенезу.

6. Проведено оцінку поліплоїдизації *M. × giganteus* шляхом культивування асептичних пагонів в умовах *in vitro* на середовищах, доповнених відібраними сполуками динітроанілінового ряду, у порівнянні із застосуванням оризаліну та трифлюраліну.

7. Показано, що на відміну від оризаліну та трифлюраліну, які завдяки високому рівню фітотоксичності пригнічують ріст експериментального матеріалу *M. × giganteus*, викликають деформації та загибель експлантів, тестовані динітроаніліни, так само як і референтні, здатні індукувати поліплоїдію *M. × giganteus*, проте характеризуються нижчим рівнем фітотоксичного впливу на рослини, що істотно позначається на виживанні та подальшому мікроклональному розмноженні експлантів.

8. За результатами характеристики хромосомних наборів експериментально отриманих ліній міскантусу гігантського відібрано 43 поліплоїдні лінії, які було адаптовано до умов відкритого ґрунту та вегетативно розмножено.

9. Проведено оцінку фенотипових (якісних та кількісних) показників врожайності отриманих поліплоїдних ліній *M. × giganteus*, що дозволило відібрати найкращі лінії за досліджуваними морфо-фізіологічними та біохімічними показниками. Найкращими з них за такими показниками, як маса надземної частини рослин, їх висота, кількість ризом на кореневищах, кількість листків на стеблі, вміст сухих речовин, виявились гексаплоїдні лінії 108 та 202. Додаткову увагу привертає лінія 109, яка хоча і поступається лініям 108 та 202 за рівнем накопичення біомаси, але також має перевагу над вихідною формою за всіма розглянутими показниками. Крім того, під час проведення досліджень відмічено викидання волотей у гексаплоїдних рослинах лінії 108.

10. За розрахунками теоретичного виходу біоетанолу встановлено, що в порівнянні з контролем поліплоїдні лінії 108 та 202 дозволяють отримати до 14,2% більше біоетанолу з 1 га площі за рахунок більшої врожайності біомаси.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Acquaah G. Principles of plant genetics and breeding. Wiley-Blackwell, Malden. 2007. Vol. 54 (1). P. 113–120.
2. Adati S., Mitsuishi S. Wild growing forage plants of the Far East, especially Japan, suitable for breeding purposes, part 1, karyological study in Miscanthus. Bulletin of the Faculty of Agriculture Mie University. 1956. № 12. P. 1–10.
3. Adati S. Studies on the genus Miscanthus with special reference to the Japanese species suitable for breeding purposes as fodder crops. Bulletin of the Faculty of Agriculture Mie University. 1958. № 17. P. 1–112.
4. Adati S., Shiotani I. The cytotaxonomy of the genus Miscanthus and its phylogenetic status. Bulletin of the Faculty of Agriculture Mie University. 1962. № 25. P. 1–24.
5. Allum J.F., Bringloe D.H., Roberts A.V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Rep.* 2007. № 26. P. 1977 – 1984.
6. Almlof M., Brandsdal B.O., Aqvist J. Binding affinity prediction with different force fields: Examination of the linear interaction energy method. *J. Comput. Chem.* 2004. Vol. 25. P. 1242–1254. <https://doi.org/10.1002/jcc.20047>
7. Andreu J.M., Timasheff S.N. Conformational states of tubulin liganded to colchicine, tropolone methyl ether and podophyllotoxin. *Biochemistry*, 1982. Vol. 21(18). P. 6465–6476.
8. Aqvist J., Marelius J. The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2001. Vol. 8. P. 613–626. doi: 10.2174/1386207013330661.
9. Armstrong C.L., Green C.E., Phillips R.L., Stucker R.E. Genetic control of plant regeneration from maize tissue cultures. *Maize Genet. Cooperation Newslett.* 1985. № 1. P. 92–93.

10. Atienza S.G., Satovic Z., Petersen K.K., Dolstra O., Martin A. Preliminary genetic linkage map of *Miscanthus sinensis* with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002. Vol. 105. P. 946–952.
11. Atienza S.G., Satovic Z., Petersen K.K., Dolstra O., Martin A. Identification of QTLs influencing agronomic traits in *Miscanthus sinensis* Anderss. I. Total height, flagleaf height and stem diameter. *Theoretical and Applied genetics*. 2003. Vol. 107 P. 123–129 (a).
12. Atienza S.G., Satovic Z., Petersen K.K., Dolstra O., Martin A. Identification of QTLs influencing combustion quality in *Miscanthus sinensis* Anderss. II. Chlorine and potassium content. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003. Vol. 107. P. 857–863 (b).
13. Atienza S.G., Satovic Z., Petersen K.K., Dolstra O., Martin A. Identification of QTLs associated with yield and its components in *Miscanthus sinensis* Anderss. *Euphytica*. 2003. № 132. P. 353–361 (c).
14. Atienza S.G., Satovic Z., Petersen K.K., Dolstra O., Martin A. Influencing combustion quality in *Miscanthus sinensis* Anderss.: identification of QTLs for calcium, phosphorus and sulphur content. *Plant Breeding*. 2003. № 122. P. 141–145 (d).
15. Auger D.L. Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics*. 2005. № 169. P. 389–397.
16. Banerjee M., Roy D., Bhattacharyya B., Basu G. Differential colchicine-binding across eukaryotic families: The role of highly conserved Pro268b and Ala248b residues in animal tubulin. *FEBS Lett*. 2007. Vol. 581. P. 5019–5023.
17. Barling A., Swaminathan K., Mitros T., James B. T., Morris J., Ngamboma O., Hall M. C., Kirkpatrick J., Alabady M., Spence A. K., Hudson M. E., Rokhsar D. S., Moose S. P. A detailed gene expression study of the *Miscanthus* genus reveals changes in the transcriptome associated with the rejuvenation of spring rhizomes. *BMC Genomics*. 2013. Vol. 14. P. 864. doi:10.1186/1471-2164-14-864.

18. Beale C.V., Bint D.A., Long S.P. Leaf photosynthesis in the C₄- grass *Miscanthus* × *giganteus*, growing in the cool temperate climate of southern England, *J. Exp. Bot.* 1996. Vol. 47. P. 267–273.
19. Birchler J.A., Auger D.L., Riddle N.C. In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell.* 2003. № 15. P. 2236–2239.
20. Bilandzija N., Vocan N., Leto J., Jurisic V., Grubor M., Matin A., Gersic A., Krisca T. Yield and biomass composition of *Miscanthus x giganteus* in the mountain area of Croatia. *J Transactions FAMENA.* 2018. Vol. 42. P. 51 – 60.
21. Blakeslee A.F., Avery A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants, *Journal of Heredity.* 1937. № 28. P. 393–411.
22. Blanco M., Adenauer M., Shrestha S., Becker A. Methodology to assess EU biofuel policies: the CAPRI approach. Institute for Prospective and Technological Studies, Joint Research Centre. 2012. P. 17–23.
23. Blume Ya.B., Nyporko A.Y., Yemets A., Baird W. Structural modeling of the interaction of plant α -tubulin with dinitroaniline and phosphoroamidate herbicides. *Cell Biol. Int.* 2003. Vol. 27. P. 171–174. 10.1016/S1065-6995(02)00298-6.
24. Boerjan W., Ralph J., Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology.* 2003. Vol. 54. P. 519–546.
25. Bonawitz N., Chapple C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics.* 2010. Vol. 44. P. 337–363.
26. Borzecka-Walker M., Faber A., Borek R. Evaluation of carbon sequestration in energetic crops (*Miscanthus* and coppice willow.). *Int Agrophysics.* 2008. Vol. 22. P. 185–190.
27. Brosse N., Dufour A., Meng X. *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 2012. № 26. P. 151–152. <https://doi.org/10.1002/bbb.1353>

28. Browning B.L. Methods of wood chemistry. Wiley, New York. 1967. Vol. 1. P. 245–232.
29. Casler M. Switchgrass breeding, genetics and genomics. In: Switchgrass, green energy and technology Monti A, ed. London: Springer-Verlag. 2012. P. 29–53.
30. Caslin B., Finnan J., Johnston C. Miscanthus. Best practice guidelines. Ecclesville Printing Services Ltd. 2015. ISBN number 1-84170-611-5.
31. Castro M., Castro S., Loureiro J. Production of synthetic tetraploids as a tool for polyploid research. *Web Ecol.* 2018. № 18. P. 129–141.
32. Chramiec-Glabik A., Grabowska-Joachimiak A., Sliwinska E., Legutko J., Kula A. Cytogenetic analysis of *Miscanthus J giganteus* and its parent forms. *Caryologia.* 2012. Vol. 65. P. 234–242.
33. Chiang Y., Chou C., Huang S. Chiang T. Possible consequences of fungal contamination on the RAPD fingerprinting in *Miscanthus (Poaceae)*. *Australian Journal of Botany.* 2003. Vol. 51. P. 197.
34. Chen S.L., Renvoize S.A. Miscanthus. *Flora of China.* 2006. Vol. 22. P. 581–583.
35. Chouvarine P., Cooksey A.M., McCarthy F.M., Ray D.A., Baldwin B.S., Burgess S. C., Peterson D. G. Transcriptome-based differentiation of closely-related *Miscanthus* lines. *PloS One.* 2012. Vol. 7(1). P. 298. doi:10.1371/journal.pone.0029850.
36. Christian D.G., Haase E. Agronomy of *Miscanthus* in *Miscanthus* for energy and fibre. James and James (ed.). Mary Walsh. 2001. P. 46–68.
37. Chundawat S.P.S., Beckham G.T., Himmel M.E., Dale B.E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering.* 2011. № 2. P. 121–145.
38. Cistue L., Ramos A., Castillo A.M., Romagosa I. Production of large number of doubled haploid plants from barley anther pretreated with high concentration of mannitol. *Plant Cell Rep.* 1994. № 13. P. 709–712.

39. Clark L.V., Brummer J.E., Głowacka K., Hall M., Heo K., Long S.P., Peng J., Yamada T., Yoo J.H., Yu C.Y., Zhao H., Sacks E.J. A footprint of past global climate change on the population genetic structure of *Miscanthus sinensis*. *Annals of Botany*. 2014. Vol. 144. P. 97–107.
40. Clayton W.D., Renvoize S.A. *Genera Graminum, Grasses of the World*. Kew Bulletin Additional Series XIII. UK, Kew Publishing. 1986.
41. Clifton-Brown J.C., Lewandowski I. Performance of 15 *Miscanthus* genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal*. 2001. № 93. P. 1013–1019.
42. Clifton-Brown J.C., Long S.P., Jorgensen U. *Miscanthus* productivity. In *Miscanthus for Energy and Fibre*, M. B. Jones and M. Walsh. James and James. London eds. 2001. 46–67 p.
43. Clifton-Brown J.C., Breuer J., Jones M.B. Carbon mitigation by the energy crop *Miscanthus*/ *Global Change Biology*. 2007. № 11. P. 2296–2307.
44. Clifton-Brown J., Chiang Y.C., Hodkinson T.R. *Miscanthus*: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production. In *Aspects of Applied Biology, Biomass and Energy Crops III*, Association of Applied Biologists, Warwick, U.K., University of York, U.K. (E. Booth, M. Green, A. Karp, I. Shield, D. Stock and D. Turley, eds.). 2008. P. 273–294.
45. Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*. 2005. № 6 (11). P. 836–846.
46. Dalton S.J., Bettany A.J., Timms E., Morris P. Co-transformed, diploid *Lolium perenne* (perennial ryegrass), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) and *Lolium temulentum* (darnel) plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep*. 1999. № 18. P. 721–726.
47. Dane F. The effects of fungicide benomyl (benlate) on growth and mitosis in onion (*Allium cepa* L.) root apical meristem. *Acta Biol. Hung*. 2005. Vol. 56, № 1-2. P. 119–128.

48. David-Pfeuty T., Simon C., Pantaloni D. Effect of antimitotic drugs on tubulin GTPase activity and self-assembly, *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 11696–11702.
49. Davin L.B., Patten A.M., Jourdes M., Lewis N.G. Lignins: A Twenty-First Century Challenge. In: *Biomass Recalcitrance*. (ed Himmel ME) pp Page. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd. 2008. P. 59–64.
50. De Cesare M., Hodkinson T.R., Barth S. Chloroplast DNA markers (cpSSRs, SNPs) for *Miscanthus*, *Saccharum* and related grasses (Panicoideae, Poaceae). *Molecular Breeding*. 2010. Vol. 26. P. 539–544.
51. De Cesare M. Characterisation of *Miscanthus* genetic resources: a combined analysis of plastid and nuclear microsatellites, nrDNA sequences, flow cytometry and morphology, PhD Thesis. University of Dublin, Trinity College Dublin, Ireland. 2012.
52. De Jesus-Gonzalez L., Weathers P. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep.* 2003. № 21. P. 809–813.
53. Del Pozo J.C., Ramirez-Parra E. Whole genome duplications in plants: an overview from *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 2015. № 66. P. 6991–7003.
54. De Souza A.P., Arundale R.A., Dohleman F.G., Long S.P., Buckeridge M.S. Will the exceptional productivity of *Miscanthus J giganteus* increase further under rising atmospheric CO₂? *Agricultural and Forest Meteorology*. 2013. Vol. 171. P. 82–92.
55. Dermen H. Colchicine polyploidy and technique. *Bot. Rev.* 1940. № 6. P. 599–635.
56. Dhawan O., Lavania U. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*. 1996. № 87. P. 81–89.
57. Dhooghe E., Van Laere K., Eeckhaut T., Leus L., Van Huylenbroeck J. Mitotic chromosome doubling of plant tissue *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2011. № 104. P. 359 – 373.

58. D'Hont A., Glaszmann J. C. Sugarcane genome analysis with molecular markers: a first decade of research. In *International society of Sugar Cane Technologists. Proceedings of the XXIV Congress*. Edited by HD M. Brisbane, Australia. 2001. P. 556-559.
59. Dohleman F.G., Heaton E.A., Arundale R.A., Long S.P. Seasonal dynamics of above and below ground biomass and nitrogen partitioning in *Miscanthus × giganteus* and *Panicum virgatum* across three growing seasons. *Global Change Biology Bioenergy*. 2012. Vol. 4. P. 534–544. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2011.01153.x>
60. Dubas E., Wedzony M., Petrovska B., Salaj J., Zur I. Cell structural reorganization during induction of androgenesis in isolated microspore cultures of triticale (9Triticosecale Wittm.). *Acta Biol Crac Ser Bot*. 2010. Vol. 52(1). P. 73–86.
61. Dubis B., Jankowski K.J., Załuski D., Bórawski P., Szempliński W. Biomass production and energy balance of *Miscanthus* over a period of 11 years: A case study in a large - scale farm in Poland. *GCB Bioenergy*. 2019. Vol. 11. P. 1187–1201. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12625>
62. El Bassam N. “*Miscanthus – stand und perspektiven in Europa*”. Forum für Zukunfts-energien e.V. – Energetische Nutzung von Biomasse im Konsenz mit Osteuropa. Jena. March 1994. International Meeting. 1994. 201–212 p.
63. El Bassam N. Biomass from *Miscanthus* for Heat, Electricity and Transportation Fuel Generation. *IFEED Publication*. 2008. № 338. P. 75–135.
64. El Bassam N. *Handbook of bioenergy crops: A complete reference to species, development and applications*. Routledge, Taylor and Francis Group Ltd, Oxford 2010.
65. Emerson R., Hoover A., Ray A. Drought effects on composition and yield for corn stover, mixed grasses, and *Miscanthus* as bioenergy feedstocks. *Biofuels*. 2014. Vol. 5. P. 275-291.

66. Evans G. International Biofuels Strategy Project. Liquid Transport Biofuels - Technology Status Report, NNFCC 08-017. National Non-Food Crops Centre, 2008–04–14. 2011. P. 2–16.
67. Felderhoff T.J., Murray S.C., Klein P.E., Sharma A., Hamblin M.T., Kresovich S., Vermerris W., Rooney W.L. QTLs for Energy-related Traits in a Sweet × Grain Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Mapping Population. *Crop Science*. 2012. Vol. 52. P. 2040-2049.
68. Feng X.P., Lourgant K., Castric V., Saumitou-Laprade P., Zheng B.S., Jiang D.M., Brancourt-Hulmel M. The discovery of natural accessions related to *Miscanthus J giganteus* using chloroplast DNA. *Crop Science*. 2014. Vol. 54. P. 1645–1655.
69. Frei M. Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *The Scientific World Journal*. 2013. P. 1-25.
70. Fukushima R.S., Dehority B.A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses. *Journal of Animal Science*. 2000. Vol. 78. P. 3135–3143.
71. Fukushima R.S., Hatfield R.D. Comparison of the Acetyl Bromide Spectrophotometric Method with Other Analytical Lignin Methods for Determining Lignin Concentration in Forage Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. Vol. 52. P. 3713-3720.
72. Gifford J.M., Chae W.B., Swaminathan K., Moose S.P., Juvik J.A. Mapping the genome of *Miscanthus sinensis* for QTL associated with biomass productivity. *GCB Bioenergy*. 2015. Vol. 7. P. 797-810.
73. Glowacka K., Jezowski S., Kaczmarek Z. Polyploidization of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus J giganteus* by plant colchicine treatment. *Industrial Crops and Products*. 2009. Vol. 30. P. 444–446 (a).
74. Glowacka K., Jezowski S. Genetic and nongenetic factors influencing callus induction in *Miscanthus sinensis* (Anderss.) anther cultures, *Journal of Applied Genetics*. 2009. № 50. P. 341–345 (b).

75. Glowacka K., Jezowski S., Kaczmarek Z. *In vitro* induction of polyploidy by colchicines treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. *Ind Crop Prod.* 2010. №. 32. P. 88–96 (a).
76. Glowacka K., Jezowski S., Kaczmarek Z. Impact of colchicine application during callus induction and shoot regeneration on micropropagation and polyploidisation rates in two *Miscanthus* species. *In vitro Cell Dev Biol Plant.* 2010. № 46. P. 161–171 (b).
77. Glowacka K., Kaczmarek Z., Jezowski S. Androgenesis in the bioenergy plant: from calli induction to plant regeneration. *Crop Science.* 2012. Vol. 52. P. 26-59.
78. Glowacka K., Adhikari S., Peng J., Gifford J., Juvik J. A., Long S. P., Sacks E. J. Variation in chilling tolerance for photosynthesis and leaf extension growth among genotypes related to the C4 grass *Miscanthus J giganteus*. *Journal of Experimental Botany.* 2014(a). doi:10.1093/jxb/eru287.
79. Glowacka K., Clark L.V., Adhikari S., Peng J., Stewart J.R., Nishiwaki A., Yamada T., Jorgensen U., Hodkinson T.R., Gifford J., Juvik J. A., Sacks E.J. Genetic variation in *Miscanthus J giganteus* and the importance of estimating genetic distance thresholds for differentiating clones. *GCB Bioenergy.* 2014(b). doi:10.1111/gcbb.12166.
80. Gmitter F.G., Ling X., Cai C., Grosser J.W. Colchicine induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Sci.* 1991. № 74. P. 135–141.
81. Gonzalez J.M., Jouve N. Improvement of anther culture media for haploid production in triticale. *Cereal Res. Commun.* 2000. № 28. P. 65–72.
82. Grabber J.H., Ralph J., Lapierre C., Barrière Y. Genetic and molecular basis of grass cell wall degradability. I. Lignin – cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies.* 2004. Vol. 327. P. 455-465.
83. Grant V. *Plant Speciation.* New York: Columbia Univ Press. 1981. P. 27.

84. Greef J.M., Deuter M. Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu.', *Angew. Bot.* 1993. № 67. P. 87–90.
85. Greef J. M., Deuter M., Jung C., Schondelmaier J. Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 1997. Vol. 44. P. 185–195.
86. Groose R.W., Bingham E.T. Gametophytic heterosis for *in vitro* pollen traits in alfalfa. *Crop Sci.* 1991. № 31. P. 1510–1513.
87. Grover R., Wolt J.D., Cessna A.J., Schiefer H.B. Environmental fate of trifluralin, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 1997. № 153. P. 65-90.
88. Gubisova M., Gubis J., Zofajova A., Mihalik D., Kraic J. Enhanced *in vitro* propagation of *Miscanthus x giganteus*. *J Ind Crop Prod.* 2013. № 41. P. 279–282.
89. Guo H., Zhao Y., Chen X., Shao Q., Qin W. Pretreatment of *Miscanthus* with biomass-degrading bacteria for increasing delignification and enzymatic hydrolysability. *Microbial Biotechnology*, 2019, Vol. 12(4). P. 787–798. doi:10.1111/1751-7915.13430
90. Hannweg K., Visser G., de Jager K., Bertling I. *In vitro*-induced polyploidy and its effect on horticultural characteristics, essential oil composition and bioactivity of *Tetradenia riparia*. *South African Journal of Botany.* 2016. № 106. P. 186–191.
91. Hatfield R. D., Jung H. G., Ralph J., Buxton D. R., Weimer P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1994. Vol. 65. P. 51-58.
92. Hatfield R., Fukushima R. S. Can lignin be accurately measured? *Crop Science.* 2005. Vol. 45. P. 832-839.
93. He P., Friebe B.R., Gill B.S., Zhou J.M. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol. Biol.* 2003. № 52. P. 401–414.
94. Heinz D. J., Mee G. W. Colchicine-induced polyploids from cell suspension cultures of sugarcane. *Crop Sci.* 1970. № 10. P. 696–699.

95. Hernandez P., Dorado G., Laurie D., Martin A., Snape J. W. Microsatellites and RFLP probes from maize are efficient sources of molecular markers for the biomass energy crop *Miscanthus*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001. Vol. 102. P. 616–622.
96. Hess B., Kutzner C., Spoel D., Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. № 4. P. 435 – 447.
97. Hirayoshi I., Nishikawa K., Hakura A. Cytogenetical forage studies on forage plants: 3- and 4-hybrids raised from the cross, *Miscanthus sinensis* var. *condensatus* *M. sacchariflorus*. Research Bulletin of the Faculty of Agriculture Gifu University. 1960. № 12. P. 82–88.
98. Ho C., Wu T., Hsu T., Huang J., Huang C., Chiang T. Development of 12 genic microsatellite loci for a biofuel grass, *Miscanthus sinensis* (*Poaceae*). *American Journal of Botany*. 2011. Vol. 98. P. 201–203.
99. Hodkinson T.R., Chase M.W. Renvoize S. A. Genetic resources of *Miscanthus*. *Aspects of Applied Biology*. 2001. Vol. 65. P. 239–248.
100. Hodkinson T.R., Chase M.W., Takahashi C., Leitch I., Bennett M.D. Renvoize S. A. The use of DNA sequencing (ITS and trnL-F), AFLP, and fluorescent in situ hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (*Poaceae*). *American Journal of Botany*. 2002. Vol. - 89: 279–286.
101. Hodkinson T.R., Renvoize S.A., Chase M.W. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (*Saccharinae*, *Andropogoneae*, *Poaceae*) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany*. 2002. Vol. 89. P. 627–636(a).
102. Hodkinson T.R., Chase M.W., Lledo D., Salamin N., Renvoize S.A. Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (*Saccharinae*, *Andropogoneae*, *Poaceae*) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA. *Journal of Plant Research*. 2002. Vol 115. P. 381–392(b).

103. Hodkinson T.R., Chase M.W., Takahashi C., Leitch I., Bennett M.D., Renvoize S.A. The use of DNA sequencing (ITS and trnL-F), AFLP, and fluorescent in situ hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *American Journal of Botany*. 2002. Vol. 89. P. 279–286(c).
104. Hodkinson T.R., Klaas M., Jones M.B., Prickett R., Barth S. *Miscanthus*: a case study for the utilization of natural genetic variation. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 2015. Vol. 13:3. P. 219–237. doi:10.1017/S147926211400094X
105. Hodgson E.M., Lister S.J., Bridgwater A.V., Clifton-Brown J., Donnison I.S. Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of *Miscanthus* in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass and Bioenergy*. 2010. Vol. 34. P. 652–660.
106. Holme I.B., Petersen K.K. Callus induction and plant regeneration from different explants types of *Miscanthus x ogiformis* Honda ‘Giganteus’. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 1996. № 45. P. 43–52.
107. Hu T., Kasha K.J. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Rep*. 1997. № 16. P. 520–252.
108. Hu X., Diao Y., Zheng X., Qu Z., Zhou F., Hu Z. Isolation and characterization of simple sequence repeat loci in *Miscanthus floridulus* and their potential use as markers in related species. *Biomass and Bioenergy*. 2012. Vol. 46. P. 801–804.
109. Hugdahl J.D., Morejohn L.C. Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *zea mays* L. *Plant Physiol*. 1993. Vol. 102(3). P. 725–740. doi: 10.1104/pp.102.3.725.
110. Hung K., Chiang T., Chiu C., Hsu T., Ho C. Isolation and characterization of microsatellite loci from a potential biofuel plant *Miscanthus sinensis* (Poaceae). *Conservation Genetics*. 2009. Vol. 10. P. 1377–1380.

111. Husband B.C., Ozimec B., Martin S.L., Pollock L. Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. *Int. J. Plant Sci.* 2008. № 169. P. 195–206.
112. Iqbal Y., Lewandowski I. Inter-annual variation in biomass combustion quality traits over five years in fifteen *Miscanthus* genotypes in south Germany. *Fuel Processing Technology.* 2014. № 121. P. 47-55.
113. Iwata H., Kamijo T., Tsumura Y. Genetic structure of *Miscanthus sinensis* ssp. *condensatus* (Poaceae) on Miyake Island: implications for revegetation of volcanically devastated sites. *Ecological Research.* 2004. Vol. 20. P. 233–238.
114. Jain S.M., Dutta G. Biotechnology of neglected and underutilized crops.: *Springer Science and Business Media Dordrecht.* 2013. P. 247.
115. Jiang J., Wang Z., Tang B., Xiao L, Ai X., Yi Z. Development of novel chloroplast microsatellite markers for *Miscanthus* species (Poaceae). *American Journal of Botany.* 2012. Vol. 99. P. 230–233.
116. Jones M. B., Finnan J. Hodkinson T. R. Morphological and physiological traits for higher biomass production in perennial rhizomatous grasses grown on marginal land GCB Bioenergy. 2015. Vol. 7. P. 375–385. doi: 10.1111/gcbb.12203
117. Jorgensen U., Muhs H. J. 'Miscanthus breeding and improvement', in M.B. Jones and M. Walsh (eds.), *Miscanthus for Energy and Fibre*, London, James & James. 2001.
118. Jorgensen H., Kristensen J. B., Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* 2007. Vol. 1. P. 119-134.
119. Jung H., Varel V. H., Weimer P. J., Ralph J. Accuracy of Klason lignin and acid detergent lignin methods as assessed by bomb calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1999. Vol. 47. P. 2005-2008.

120. Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genet.* 2003. № 33. P. 102–106.
121. Kim C., Zhang D., Auckland S.A., Rainville S.A., Jacob K., Kronmiller B., Sacks E.J., Deuter M., Patterson A. SSR-based genetic maps of *Miscanthus sinensis* and *M. sacchariflorus*, and their comparison to sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 2012. Vol. 124. P. 1325–1338. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1790-1>.
122. Kim C., Lee T., Guo H., Chung S.J., Paterson A.H., Kim D., Lee G. Sequencing of transcriptomes from two *Miscanthus* species reveals functional specificity in rhizomes, and clarifies evolutionary relationships. *BMC Plant Biology.* 2014. Vol. 14. P. 134. doi:10.1186/1471-2229-14-134.
123. Kohler C., Mittelsten S. O, Erilova A. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploidy plants. *Trends Genetics.* 2010. № 26. P. 142–148.
124. Kondorosi E., Roudier F., Gendreau E. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000. № 3. P. 488–492.
125. Kvak V., Stefanovska T., Pidlisnyuk V., Alasmay Z., Kharytonov M. The long-term assessment of *Miscanthus* × *giganteus* cultivation in the Forest-Steppe zone of Ukraine. *INMATEH-Agricultural Engineering.* 2018. Vol. 54 (1). P. 113–120.
126. Lantos C., Weyen J., Orsini J.M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontovski S., Jacobi A., Mihaly R., Broughton S., Pauk J. Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programs. *Plant Breed.* 2013. № 132. P. 149–154.
127. Levin D. Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist.* 1983. № 122. P. 1–25.
128. 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.

129. 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. 19. P. 209-227.
130. Lewandowski I., Clifton-Brown J. C., Andersson B., Basch G., Christian D. G., Jorgensen U., Jones M. B., Riche A. B., Schwarz K. U., Tayebi K., Teixeira F. Environment and harvest time affects the combustion qualities of *Miscanthus* genotypes. *Agronomy Journal*. 2003. № 95. P. 1274–1280.
131. Lewandowski I., Heinz A. Delayed harvest of miscanthus—influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy*. 2003. № 19. P. 45-63.
132. Lewandowski I., Schmidt U. Nitrogen, energy and land use efficiencies of miscanthus, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2006. Vol. 112. P. 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.08.003>
133. Linde-Laursen I. B. Cytogenetic analysis of *Miscanthus* ‘*Giganteus*’, an interspecific hybrid. *Hereditas*. 1993. №119. P. 297–300.
134. Liu S., Clark L. V., Swaminathan K., Gifford J. M., Juvik J. A., Sacks E. J. High-density genetic map of *Miscanthus sinensis* reveals inheritance of zebra stripe. *GCB Bioenergy*. 2015. Vol. 8(3). P. 616-630. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12275>
135. Lledo M. D., Renvoize S. A., Chase M. W. *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus sacchariflorus*: a confusing pair of species. *Aspects of Applied Biology*. 2001. № 65. P. 249–254.
136. Lockett D. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica*. 1989. № 42. P. 177 – 182.
137. Lutz A. M. A preliminary note on the chromosomes of *Oenothera Lamarckiana* and one of its mutants, *O. gigas*. *Science*. 1907. № 26. P. 151–152.
138. Ma X., Jensen E., Alexandrov N., Troukhan M., Zhang L., Thomas- Jones S., Farrar K., Clifton-Brown J., Donnison I., Swaller T., Flavell R. High resolution

- genetic mapping by genome sequencing reveals genome duplication and tetraploid genetic structure of the diploid *Miscanthus sinensis*. *PLoS One*. 2012. 7(3):e33821. doi: 10.1371/journal.pone.0033821.
139. McCann M. C., Carpita N. C. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. Vol. 11. P. 314–320.
140. Melnychuk O. V., Ozheredov S. P., Rakhmetov D. B., Shysha O. M., Rakhmetova S. O., Yemets A. I., Blume Ya. B. Induction of polyploidy in giant miscanthus (*Miscanthus* × *Giganteus* Greef Et Deu.). *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. 2020. V.74. № 3. P. 206–214 (a). DOI: 10.2478/prolas-2020-0032.
141. Melnychuk O. V., Ozheredov S. P., Rakhmetov D. B., Rakhmetova S. O., Yemets A. I., Blume Ya. B. The technology used for synthetic polyploid production of *Miscanthus* as cellulosic biofuel feedstock. *The Open Agriculture Journal*. 2020. Vol. 14(1). P. 3–12 (b). DOI: 10.2174/1874331502014010164.
142. Moore J. P., Vicre-Gibouin M., Farrant J. M., Driouich A. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum*. 2008. Vol. 134. P. 237-245.
143. Morejohn L. C., Fosket D. E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. *Pharm. Ther.* 1991. № 51. P. 217– 230.
144. Munzbergova Z. Colchicine application significantly affects plant performance in the second generation of synthetic polyploids and its effects vary between populations. *Ann. Bot.* 2017. № 120. P. 329–339.
145. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 1962. № 15. P. 473–497.
146. Murray, S. C., Rooney W. L., Mitchell S. E., Sharma A., Klein P. E., Mullet J. E., Kresovich S. Genetic Improvement of Sorghum as a Biofuel Feedstock: II. QTL for Stem and Leaf Structural Carbohydrates. *Crop Science*. 2008. № 48. P. 2180-2193.

147. Niimi H., Watanabe M., Serizawa H., Koba T., Nakamura I., Mii M. Amiprophosmethyl-induced efficient in vitro production of polyploids in raphanobrassica with the aid of aminoethoxyvinylglycine (AVG) in the culture medium. *Breed Sci.* 2015. № 65 (5). P. 396–402.
148. Nishiwaki A., Mizuguti A., Kuwabara S., Toma Y., Ishigaki G., Miyashita T., Yamada T., Matuura H., Yamaguchi S., Rayburn A. L., Akashi R., Stewart J. R. Discovery of natural *Miscanthus* (*Poaceae*) triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan. *American Journal of Botany.* 2011. Vol. 98. P. 154–159.
149. Nogales E., Wolf S. G., Downing K. H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* 1998. Vol. 391(6663). P. 199-203. doi:10.1038/34465.
150. Oliver R. J., Finch J. W., Taylor G. Second generation bioenergy crops and climate change: a review of the effects of elevated atmospheric CO₂ and drought on water use and the implications for yield. *GCB-Bioenergy.* 2009. Vol. 1, № 2. P. 97-114. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01011.x>
151. Ozheredov S, Yemets A, Lytvyn D, Brytsun V, Schwartau V, Lozynskiy M, Blume Ya. New 2,6-dinitroaniline compounds with antimitotic mode of action and their synergistic activity in compositions with graminicides. *Cytol Genetics* 2010. № 5. P. 306–312.
152. Paterson A. H., Bowers J. E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberer G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H., Wang X., Wicker T., Bharti A.K., Chapman J., Feltus F. A., Gowik U., Grigoriev I. V., Lyons E., Maher C., Martis M., Narechania A., Ollilar R. P., Penning B. W., Salamov A., Wang Y., Zhang L., Carpita N. C., Freeling M., Gingle A. R., Hash C. T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M. C., Ming R., Peterson D. G., Mehboob-ur-Rahman, Ware D., Westhoff P., Mayer K. F. X., Messing J., Rokhsar D. S. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature.* 2009. № 457. P. 551-556.

153. Pauly M., Keegstra K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010. Vol. 13. P. 304-311.
154. Pavlikova Z., Pastova L., Munzbergova Z. Synthetic polyploids in *Vicia cracca*: methodology, effects on plant performance and aneuploidy. *Plant Syst. Evol.* 2017. № 303. P. 827–839.
155. Petersen K. K. Callus induction and plant regeneration in *Miscanthus x ogiformis* Honda ‘Giganteus’ as influenced by benzyladenine. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 1997. № 49. P. 137-140.
156. Petersen K. K., Hagberg P., Kristiansen K. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. *Plant Breed.* 2002. № 121. P. 445–450.
157. Petersen K. K., Hagberg P., Kristiansen K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2003. № 73. P. 137–146.
158. Pickering R. A., Devaux P. Haploid production: approaches and use in plant breeding / ed. P. R. Shewry. CAB International, Oxford, 1992. 519–547 p.
159. Plazek A., Dubert F., Zur I., Waligorski P. *In vitro* culture of *Miscanthus x giganteus*. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych.* 2007. № 523. P. 175–184.
160. Plazek A., Dubert F. Improvement of medium for *Miscanthus x giganteus* callus induction and plant regeneration. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 2010. № 52. P. 105-110.
161. Price S. Accessory chromosomes in *Miscanthus floridulus*. *Journal of Heredity.* 1963. Vol. 54. P. 13–16.
162. Rakhmetova S.O., Vergun O.M., Blume R.Y., Bondarchuk O.P., Shymanska O.V., Tsygankov S.P., Yemets A.I., Blume Ya.B., Rakhmetov D.B. Ethanol production potential of sweet sorghum in North and Central Ukraine. *The Open Agriculture Journal*, 2020, 14: 321-338. DOI: 10.2174/1874331502014010321.

163. Ramachandran A., Mary S., Yamuna A., Murugesan N., Snehalatha C. High prevalence of diabetes and cardiovascular risk factors associated with urbanization in India. *Diabetes Care*. 2008. Vol. 31(5) P. 893–898. doi: 10.2337/dc07-1207.
164. Ramsey J., Schemske D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1998. № 29. P. 467–501.
165. Ramulu K. S., Dijkhuis P., Famelaer I., Cardi T., Verhoeven H. A. Cremart: A new chemical for efficient induction of micronuclei in cells and protoplasts for partial genome transfer. *Plant Cell Rep.* 1994. № 13(12). P. 687–691.
166. Ray K., Bhattacharyya B., Biswas B. Role of B-ring of Colchicine in Its Binding to Tubulin, *The Journal of Biological Chemistry*. 1981. Vol. 256, No. 12. P. 6241-6244.
167. Rayburn A., Crawford J., Rayburn C., Juvik J. Genome size of three *Miscanthus* species. *Plant Mol Biol Rep.* 2009. №27. P. 184–188.
168. Rhodes C. A., Green C. E., Phillips R. L. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. *Plant Sci.* 1986. № 46. P. 225–232.
169. Risso-Pascotto C., Pagliarini M. S., Valle C. B. Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). *Plant Cell Rep.* 2005. № 23. P. 522–527.
170. Robertson A., Whitaker J., Morrison R., Davies C., Smith P., Mcnamara N. A. *Miscanthus* plantation can be carbon neutral without increasing soil carbon stocks. *GCB Bioenergy*. 2017. Vol. 9. P. 645–661.
171. Robson P., Mos M., Clifton-Brown J., Donnison I. Phenotypic variation in senescence in *Miscanthus*: Towards optimising biomass quality and quantity. *Bioenerg Res.* 2012. Vol. 5(1). P. 95–105.
172. Rodrigues F. A., Rodrigues Soares J. D., Santos R. R., Pasqual M., Silva S. O. Colchicine and amiprofos-methyl (APM) in polyploidy induction in banana plant *African Journal of Biotechnology*. 2011. № 10 (62). P. 13476–13481.

173. Rutherford L., Heath M. C. (eds) *The Potential of Miscanthus as a Fuel Crop*, Energy Technology Support Unit (ETSU) B1354, Harwell, UK, 1992.
174. Santos J. L. Partial diploidization of meiosis in autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2003. № 165. P. 1533–1540.
175. Scagline-Mellor, S., Griggs, T., Skousen, J., Wolfrum E., Holásková I. Switchgrass and Giant Miscanthus Biomass and Theoretical Ethanol Production from Reclaimed Mine Lands. *Bioenerg. Res.* 2018. Vol. 11. P. 562 – 73. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9915-2>
176. Schatlowski N, Kohler C. Tearing down barriers: understanding the molecular mechanisms of interploidy hybridizations. *J Exp Bot.* 2012. Vol. 63(17). P. 6059–6067.
177. Sherline P., Leung J. T., Kipnis D. M. Binding of colchicine to purified microtubule protein. *J Biol Chem.* 1975. Vol. 250. P. 5481–5486.
178. Sheval E.V. Trifluralin-induced disorganization of microtubular cytoskeleton alters the development of roots in *Hordeum vulgare* L. / E.V.Sheval, Y.I.Kazhura, N.A.Poleshuk, E.M.Lazareva, E.A.Smirnova, N.P.Maximova, V.Y.Polyakov // *Acta Biol. Hung.* 2008. Vol. 59. № 4. P. 465-478.
179. Shimono Y., Kurokawa S., Nishida T., Ikeda H., Futagami N. Phylogeography based on intraspecific sequence variation in chloroplast DNA of *Miscanthus sinensis* (*Poaceae*), a native pioneer grass in Japan. *Botany*. 2013. Vol. 91. P. 449–456.
180. Simmons B. A., Loque D., Ralph J. Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010. Vol. 13. P. 312-319.
181. Slavov G. T., Nipper R., Robson P., Farrar K., Allison G. G., Bosch M., Clifton-Brown J. C. , Donnison I. S., Jensen E. Genome-wide association studies and prediction of 17 traits related to phenology, biomass and cell wall composition in the energy grass *Miscanthus sinensis*. *New Phytologist*. 2014. Vol. 201 P. 1227–1239.

182. Slomka A., Kuta E., Plazek A., Dubert F., Zur I., Dubas E., Kopec P, Zurek G. Sterility of *Miscanthus x Giganteus* results from hybrid incompatibility. *Acta Biol Crac Bot.* 2012. Vol. 54(1). P. 1–8
183. Spasevska I., Ayoub A., Winter P., Preto J., Wong G., Dumontet C., Tuszynski J. Modeling the *Colchicum autumnale* tubulin and a comparison of its interaction with colchicine to human tubulin. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18(8) P. 1676. doi: 10.3390/ijms18081676.
184. Stebbins G. L. Variation and Evolution in Plants. New York: Columbia Univ Press, 1950. P. 680.
185. Sugimoto-Shirasu K., Roberts K. “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. № 6. P. 544–553.
186. Suman A., Ali K., Arro J., Parco A. S., Kimbeng C. A., Baisakh N. Molecular diversity among members of the Saccharum complex assessed using TRAP markers based on lignin-related genes. *BioEnergy Research.* 2011. Vol. 5. P. 197–205.
187. Sun Q., Lin Q., Yi Z. L., Yang Z. R., Zhou F. S. A taxonomic revision of *Miscanthus* s.l. (*Poaceae*) from China. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 2010. Vol. 164. P.178–220.
188. Swaminathan K., Alabady M. S., Varala K., De Paoli E., Ho I., Rokhsar Dan S., Arumuganathan A. K., Ming R., Green P. J., Meyers B. C., Moose S. P., Hudson M. E. Genomic and small RNA sequencing of *Miscanthus J giganteus* shows the utility of sorghum as a reference genome sequence for Andropogoneae grasses. *Genome biology.* 2010 Vol. 11. p 12.
189. Swaminathan K., Chae W. B., Mitros T., Varala K., Xie L., Barling A., Glowacka K., Hall M., Jezowski S., Ming R., Hudson M., Juvik J. A., Rokhsar D. S., Moose S. P. A framework genetic map for *Miscanthus sinensis* from RNAseqbased markers shows recent tetraploidy. *BMC genomics.* 2012. Vol. 13. P. 142.
190. Taiz L., Zeiger E. *Plant Physiology.* 2010. № 5. P. 443–444.

191. Talebi S. F., Saharkhiz M. J., Kermani M. J., Sharafi Y. Raouf Fard F. Effect of different antimetabolic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.) *Caryologia*. 2017. Vol. 70. P. 184-193.
192. Tanaka H., Baba T. Gene expression in spermiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. № 62. P. 344–354.
193. Tavan M., Mirjalili M. H., Karimzadeh G. *In vitro* polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015. № 122. P. 573–583.
194. Tenhaken R. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 5(771). DOI: 10.3389/fpls.2014.00771
195. Thomas H. Chromosome manipulation and polyploidy, In: Plant breeding: Principals and prospects. eds Hayward M., Bosemark N., Romagosa I.: Chapman and Hall, London. 1993. P. 79–92 .
196. Thompson D. I., Anderson N. O., Van Staden J. Colchicine induced somatic polyploids from *in vitro*-germinated seeds of South African *Watsonia* species. *HortScience*. 2010. № 45. P. 1398–1402.
197. Torres A., Noordam-Boot C. M., Dolstra O. Cell Wall Diversity in Forage Maize: Genetic Complexity and Bioenergy Potential. *BioEnergy Research*. 2014. Vol. 8. P. 187-202.
198. Torres A. F., Slegers P. M., Noordam-Boot C. M. Maize feedstocks with improved digestibility reduce the costs and environmental impacts of biomass pretreatment and saccharification. *Biotechnology for Biofuels*. 2016. Vol. 9. P. 1-15. doi:10.1186/s13068-016-0479-0.
199. Tuvešson S., Ljungberg A., Johansson N., Karlsson K.E., Suijs L.W., Josset J.P. Large- scale production of wheat and triticales double haploids through the use of a single- anther culture method. *Plant Breed.* 2000. № 119. P. 455–459.

200. Urban F., Mitchell T. Climate change, disasters and electricity generation. London: Overseas Development Institute and Institute of Development Studies. 2011. P. 326.
201. Van Soest P. J. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1963. Vol. 46. P. 829-835.
202. Van Soest P. J. Development of a Comprehensive System of Feed Analyses and its Application to Forages. *Journal of Animal Science*. 1967. Vol. 26. P. 119-128.
203. Vergara F., Kikuchi J., Breuer C. Artificial Autopolyploidization Modifies the Tricarboxylic Acid Cycle and GABA Shunt in *Arabidopsis thaliana* Col-0. *Sci Rep*. 2016. № 6. P. 26–51.
204. Vermerris W., Nicholson R. Isolation and Identification of Phenolic Compounds. In: *Phenolic Compound Biochemistry*. 2006 Springer Netherlands.
205. Walsh M, McCarthy S. 1998. *Miscanthus* handbook. In Biomass for Energy and Industry, Proceedings of the 10th European Bioenergy Conference, Würzburg, Germany, June 1998. C.A.R.M.E.N. Publishers, Rimpfing. P. 1071–1074.
206. Wan Y., Ducan D., Rayburn A., Widholm J. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther culture derived maize callus. *Theor Appl Genetics*. 1991. Vol. 81. P. 205–211.
207. Wang X., Yamada T., Kong F. J., Abe Y., Hoshino Y., Sato H., Takamizo T., Kanazawa A., Yamada T. Establishment of an efficient in vitro culture and particle bombardment-mediated transformation systems in *Miscanthus sinensis* Anders., a potential bioenergy crop. *Global Change Biology Bioenergy*. 2011. № 4. P. 322-332.
208. Wedzony M., Forster B. P., Zur I., Golemić E., Szechynska-Hebda M., Dubas E., Golebiowska G. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: Touraev A, Foster BP, Jain SM (eds) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer Science+ Business Media BV. 2009. P. 1–33.

209. Weijde T., Alvim Kamei C. L., Torres A. F., Vermerris W., Dolstra O., Visser R. G. F., Trindade L. M. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. *Frontiers in Plant Science*. 2013. Vol. 4. P.1-18.
210. Weijde T. Targets and tools for optimizing lignocellulosic biomass quality of miscanthus. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL. 2016. DOI 10.18174/384361
211. Weijde T., Torres A. F., Dolstra O., Dechesne A., Visser R. G. F., Trindade L. M. Impact of Different Lignin Fractions on Saccharification Efficiency in Diverse Species of the Bioenergy Crop Miscanthus. *BioEnergy Research*. 2016. Vol. 9(1). P. 146-156.
212. Weijde T., Kiesel A., Iqbal Y., Muylle H., Dolstra O., Visser R.G.F., Lewandowski I., Trindade L. M. Evaluation of *Miscanthus sinensis* biomass quality as feedstock for conversion into different bioenergy products. *GCB Bioenergy*. 2016 (a). doi:10.1111/gcbb.12355.
213. Weijde T., Torres A. F., Dolstra O., Dechesne A., Visser R. G. F., Trindade L. M. Impact of Different Lignin Fractions on Saccharification Efficiency in Diverse Species of the Bioenergy Crop Miscanthus. *BioEnergy Research*. 2016 (b). Vol. 9. P. 146-156.
214. Weijde T., Kiesel A., Iqbal Y., Muylle H., Dolstra O., Visser R., Lewandowski I., Trindade L. Evaluation of *Miscanthus sinensis* biomass quality as feedstock for conversion into different bioenergy products. *GCB Bioenergy*. 2017. Vol. 9. P. 176-190.
215. Weiss H., Maluszynska J. Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas*. 2000. № 133. P. 255–261.
216. Wood T. E., Takebayashi N., Barker M. S., Mayrose I., Greenspoon P. B., Rieseberg L. H. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceeding of the National Academy of Science*. 2009. № 106 (33). P. 13875–13879.

217. Xi Q. “Investigation on the distribution and potential of giant grasses in China”, PhD dissertation, University of Kiel, Cuvillier Verlag, Goettingen, 2000. 34p.
218. Xi Q. G. Description of an Introduced Plant *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu. *Pratacultural Science*. 2008. № 2. P. 87–90.
219. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*. 2015. Vol. 43 (1). P. 174–181. doi:10.1093/nar/gkv342
220. Yemets A. I., Blume Ya. B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. *The Open Horticulture J*. 2008. № 1. P. 15– 20.
221. Yu C. Y., Kim H. S., Burn A. L., Widholm J. M., Juvik J. A. Chromosome doubling of the bioenergy crop, *Miscanthus x giganteus*. *Global Change Biology Bioenergy*. 2009. № 1. P. 404–412.
222. Yu J., Zhao H., Zhu T., Chen L., Peng J. Transferability of rice SSR markers to *Miscanthus sinensis*, a potential biofuel crop. *Euphytica*. 2013. Vol. 191. P. 455–468.
223. Zhang Q. X., Sun Y., Hu H. K., Chen B., Hong C. T., Guo H. P., Pan Y. H., Zheng B. S. Micropropagation and plant regeneration from embryogenic callus of *Miscanthus sinensis*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2012. № 48. P. 50–57.
224. Zhang D., Guo H., Kim C., Lee T., Li J., Robertson J., Wang X., Wang Z., Paterson A. H. CSGRqtl, a comparative quantitative trait locus database for Saccharinae grasses. *Plant Physiology*. 2013. Vol. 161. P. 594–599(a).
225. Zhang Q. X., Shen Y. K., Shao R. X., Fang J., He Y. Q., Ren J. X., Zheng B. S., Chen G. J. Genetic diversity of natural *Miscanthus sinensis* populations in China revealed by ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2013. Vol. 48. P. 248–256(b).

226. Zhang K., Wang X., Cheng F. Plant polyploidy: origin, evolution, and its influence on crop domestication. *Hortic. Plant J.* 2019. Vol. 5. N 6. P. 231–239. doi: 10.1016/j.hpj.2019.11.003.
227. Zhao X., Zhang L., Liu D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* 2012. Vol. 6. P. 465-482.
228. Zhao H., Wang B., He J., Yang J., Pan L., Sun D., Peng J. Genetic diversity and population structure of *Miscanthus sinensis* germplasm in China. *PLoS One.* 2013. Vol. 8. P. 756- 772 (a).
229. Zhao H., Li Q., He J., Yu J., Yang J., Liu C., Peng J. Genotypic variation of cell wall composition and its conversion efficiency in *Miscanthus sinensis*, a potential biomass feedstock crop in China. *GCB Bioenergy.* 2013 (b). doi:10.1111/gcbb.12115
230. Zhou H., Konzak C.F. Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. *Crop Sci.* 1989. № 29. P. 817–821.
231. Zhou H., Li S., Ge S. Development of microsatellite markers for *Miscanthus sinensis* (*Poaceae*) and cross-amplification in other related species. *American Journal of Botany.* 2011. Vol. 98. P. 195–197.
232. Zilbervarg I., Mitrofanova I., Mitrofanova O., Rabotyagov V., Blume Ya. Using oryzalin and aminophosmethyl obtaining isospe and nep polyploid forms *in vitro*. *Cell Biol Int.* 1997. Vol. 21(12). P. 914–915.
233. Zili Y., Puhua Z., Chengcai C., Xiang L., Wenzhong T., Li W., Shouyun C., Zuoshun T. Establishment of genetic transformation system for *Miscanthus sacchariflorus* and obtaining of its transgenic plants. *High Tech Lett.* 2004. № 10. P. 27–31.
234. Zou G., Zhai G., Feng Q., Yan S., Wang A., Zhao Q., Shao J., Zhang Z., Zou J., Han B., Tao Y. Identification of QTLs for eight agronomically important traits using an ultra-high-density map based on SNPs generated from high-throughput

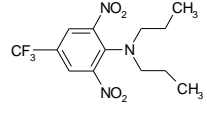
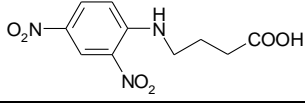
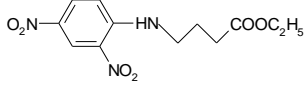
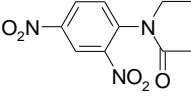
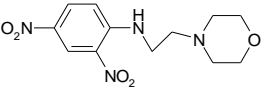
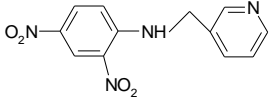
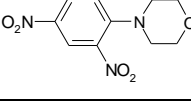
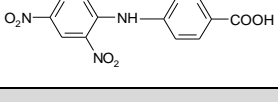
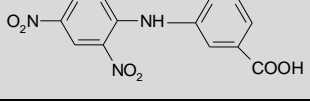
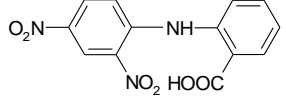
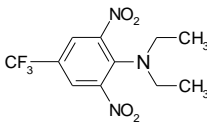
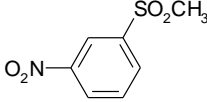
- sequencing in sorghum under contrasting photoperiods. *Journal of Experimental Botany*. 2012. № 63. P. 5451-5462.
235. Zur I., Dubas E., Slomka A., Dubert F., Kuta E., Plazek A. Failure of androgenesis in *Miscanthus J giganteus* in vitro culture of cytologically unbalanced microspores. *Plant Reproduction*. 2013. Vol. 26. P. 297–307.
236. Блюм Я. Б., Гелету́ха Г. Г., Григорюк І. П. Новітні технології біоенергоконверсії. К: «Аграр Медіа Груп», 2010. 326с.
237. Брицун В.М. 2,6 - Динітроаніліни: синтез, гербіцидні й антипротозойні властивості / В.М. Брицун, А.І. Ємець, М.О. Лозинський, Я.Б. Блюм // *Ukrainica Bioorganica Acta*. - 2009. - Т.7, № 1. - С.16 - 27.
238. Гелету́ха Г. Г., Желе́зна Т. А., Кучерук П. П., Олі́йник Є. М. Сучасний стан та перспективи розвитку біоенергетики в Україні. Аналітична записка БАУ №9. – Біоенергетична асоціація України, 2014. – 32 с. – Режим доступу: <http://uabio.org/img/files/docs/position-paper-uabio-9-ua.pdf>.
239. Дубровін В.О., Голуб Г.А., Драгнєв С.В. Методика узагальненої оцінки технічно досяжного енергетичного потенціалу біомаси. К.: ТОВ «Віолпринт», 2013. С. 25.
240. Емец А. И., Блюм Я. Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов. *Физиол. раст.* 1999. № 6. С. 899– 907.
241. Емец А.И. Мутантные гены тубулинов растений как маркерные селективные гены для генетической инженерии / А.И.Емец, Я.Б.Блюм // *Цитология и генетика*. 2007. Т.41(3). С. 29-43.
242. Зинченко В. Энергия Мискантса. Леспроминформ. 2011. № 6. С. 134–140.
243. Кундельчук О.П. Сравнение действия ампифосметила на структуру клеток корня у чувствительных и устойчивых линий *Nicotiana plumbaginifolia* / О.П.Кундельчук, Л.В.Тарасенко, Я.Б.Блюм // *Физиол. раст.* 2002. Т.49, № 3. С. 425-430.

244. Макаренко В. Слонова трава – прорив в сільському господарстві.: Агро Перспектива. 2012. С. 32–37.
245. 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*. 2015. Т. 17. С. 209–212 (а).
246. 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 НУБіП України*. 2015. № 8. С. 57 (б). http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/8.pdf.
247. Мельничук О. В., Ожередов С. П., Рахметов Д. Б., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Скринінг нітроанілінів на спорідненість до α -тубуліну міскантусу для їх використання у поліплоїдизації рослин цього роду. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Т. 18. С. 212–216.
248. Мельничук О. В., Ожередов С. П., Рахметов Д. Б., Рахметова С. О., Баєр О. О., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Біометричні та біохімічні особливості нових ліній *M. × giganteus* з підвищеним рівнем плоїдності. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 281–286.
249. Мельничук О.В., Ожередов С.П., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Баєр О.О., Шиша О.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Поліплоїдизація *Miscanthus sinensis* за допомогою динітроанілінів з низькою фітотоксичністю. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 228–233. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1271>.
250. Ныпорко А.Ю., Емец А.И., Брицун В.М., Лозинский М.О., Блюм Я.Б. Структурно-биологическая характеристика взаимодействия тубулина с динитроанилинами. *Цитология и генетика*, 2009, т. 43, N 4, с. 56-70.
251. Ожередов С. П., Емец А. И., Брицун В. Н., Ожередова И. П., Лозинский М. О., Блюм Я. Б. Скрининг новых производных 2,4 и 2,6 динитроанилинов на

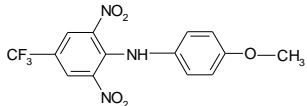
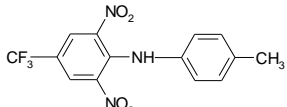
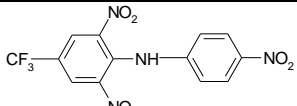
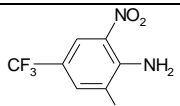
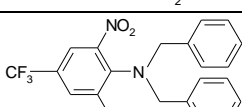
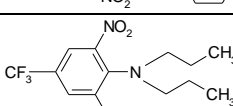
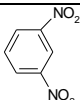
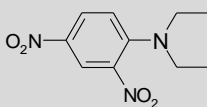
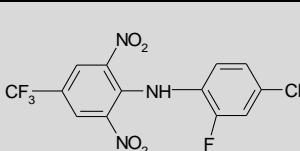
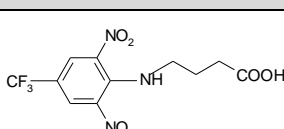
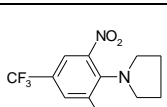
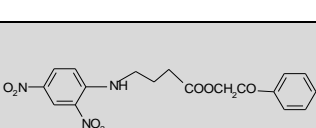
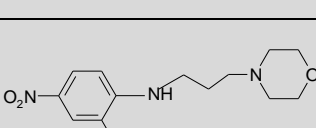
- фитотоксичность и антимитотическую активность. *Цитология и генетика*. 2009. № 5. С. 3–13.
252. Ожередов С. П., Емец А. И., Брицун В. Н., Лозинский М. О., Швартау В. В., Блюм Я. Б. Повышение эффективности гербицидов – ингибиторов ацетил КоА карбоксилазы при использовании их в композиции с новыми производными динитроанилинов. *Физиология и биохимия культур. растений*. 2011. № 2. С. 96–102.
253. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / Зоя Петровна Паушева. - М.: Агропромиздат. 1988. С. 271.
254. Романчук Л.Д., Зінченко В.О., Василюк Т.П. Особливості вирощування енергетичних культур в умовах Полісся України: з кн. Перспективи розвитку альтернативної енергетики на Поліссі України. К.: Центр учбової літератури, 2014. С. 81-111.
255. Титко Р., Калініченко В.. Відновлювальні джерела енергії (Досвід Польщі для України).- Варшава.: OWG, 2010. С. 533.
256. Хіврич О. Б., Квак В. М., Каськів В. В. Енергетичні рослини як альтернатива традиційним видам палива. *Агробіологія*. 2011. № 6. С. 153–157.
257. Ягольник О.О. Міскантус витримав удар і виграв перший раунд в Україні. *Біоенергетика*. 2015. № 2. С. 18–24.

Додаток А

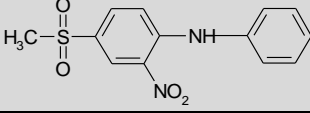
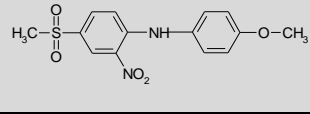
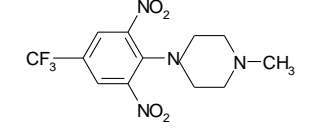
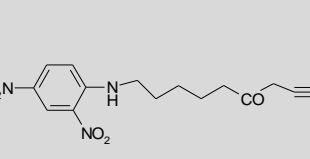
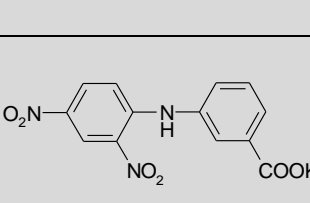
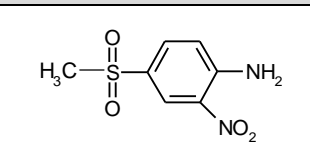
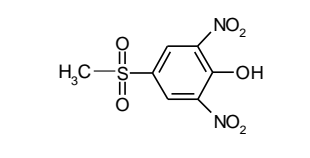
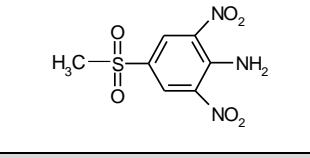
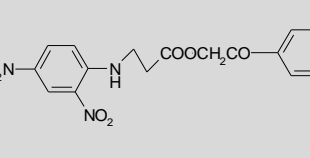
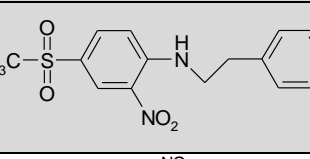
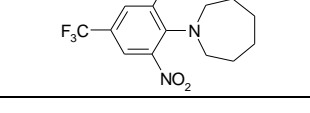
Перелік та характеристика сполук динітроанілінового ряду,
використаних в роботі

№ п/п	№ катал	Сполука, номенклатура IUPAC	Хімічна формула		Mr
1.	TFL	2,6-динітро-N,N-дипропіл-1-4-(трифторметил)-анілін	$C_{13}H_{16}N_3F_3O_4$		335
2.	BR-1	γ -(2,4-динітрофеніл) аміноасляна кислота	$C_{10}H_{11}N_3O_6$		269
3.	BR-2	Етиловий естер γ -(2,4 динітрофеніл) аміноасляної кислоти	$C_{12}H_{15}N_3O_6$		297
4.	BR-5	N-(2,4-динітрофеніл) – 3-оксопіролідин	$C_{10}H_9N_3O_5$		251
5.	BR-6	2-(2,4-динітрофеніл) етилморфолін	$C_{12}H_{16}N_4O_5$		296
6.	BR-7	N-(2,4-динітрофеніл) аміном етил-3-піридин	$C_{12}H_{10}N_4O_4$		274
7.	BR-8	N-(2,4-динітрофеніл) морфолін	$C_{10}H_{11}N_3O_5$		253
8.	BR-12	2-(2,4-динітрофеніл) етилморфолін	$C_{13}H_9N_3O_6$		303
9.	BR-13	N-(2,4-динітрофеніл)-мета-амінобензойна кислота	$C_{13}H_9N_3O_6$		303
10.	BR-14	N-(2,4-динітрофеніл)-орто-амінобензойна кислота	$C_{13}H_9N_3O_6$		303
11.	BR-15	N,N-диетил-2,6-динітро-4-(трифторметил)анілін	$C_{11}H_{12}N_3F_3O_4$		307
12.	BR-16	1-метилсульфоніл-3-нітробензол	$C_7H_7NSO_4$		201

Продовження додатку А

13.	BR-17	N-(4-метоксифеніл)- 2,6-динітро-4- (трифторметил) анілін	$C_{14}H_{10}N_3F_3O_5$		357
14.	BR-18	N-(4-метилфеніл)- 2,6-динітро-4- (трифторметил) анілін	$C_{14}H_{10}N_3F_3O_4$		341
15.	BR-19	N-(4-нітрофеніл) 2,6 динітро-4- (трифторметил) анілін	$C_{13}H_7N_4F_3O_6$		372
16.	BR-20	2,6 динітро-4- (трифторметил)- анілін	$C_7H_4N_3F_3O_4$		251
17.	BR-21	N, N-добензіл-2,6 динітро-4- (трифторметил) анілін	$C_{21}H_{16}N_3F_3O_4$		431
18.	BR-22 (TFL)	N, N-дипропіл-2,6- динітро-4- (трифторметил) анілін	$C_{13}H_{16}N_3O_4F_3$		335
19.	BR-23	<i>мета</i> -динітробензол	$C_6H_4N_2O_4$		168
20.	BR-24	N-(2,4-динітрофеніл) піролідин	$C_{10}H_{11}N_3O_4$		237
21.	BR-25	N-(4-хлор-2- фторфеніл)-2,6- динітро-4- (трифторметил) анілін	$C_{13}H_6N_3F_4ClO_4$		379,4
22.	BR-26	N-(2,6-динітро-4- трифторметилфеніл) -3- аміноасяна кислота	$C_{11}H_{10}N_3F_3O_6$		337
23.	BR-27	N-(2,6-динітро-4- трифторметилфеніл) -піролідин	$C_{11}H_{10}N_3F_3O_4$		305
24.	BR-28	N-(2,4- динітрофеніл)-3- аміноасяної кислоти фенациловий естер	$C_{18}H_{17}N_3O_7$		387
25.	BR-29	N-(2,4- динітрофеніл)-N- амінопропілмофолін	$C_{13}H_{18}N_4O_5$		310

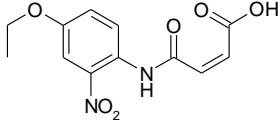
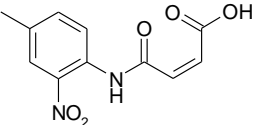
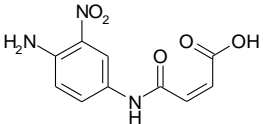
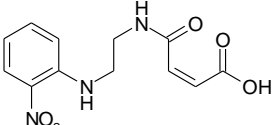
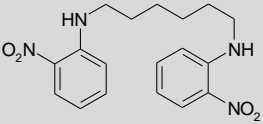
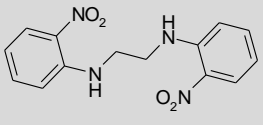
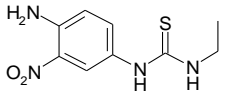
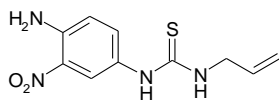
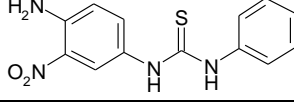
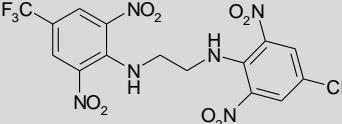
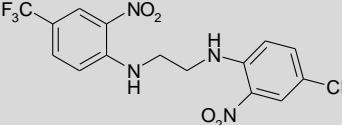
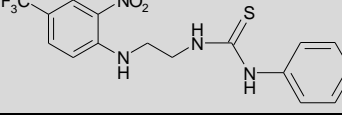
Продовження додатку А

26.	BR-30	N-(4-метилсульфоніл-2-нітрофеніл) анілін	$C_{13}H_{12}O_4N_2S$		292
27.	BR-31	N-(4-метилсульфоніл-2-нітрофеніл) анізидін	$C_{14}H_{14}O_5N_2S$		322
28.	BR-32	N ¹ -метил- N ² -(2,6-динітро-4-трифторметилфеніл)-піперазин	$C_{12}H_{13}N_4F_3O_4$		334
29.	BR-33	N-(2,4-динітрофеніл)-5-амінокапронової кислоти пропаргіловий естер	$C_{15}H_{17}O_6N_3$		335
30.	BR-34	3-[N-(2,4-динітрофеніл)]-амінобензойної кислоти калійна сіль	$C_{13}H_8O_6N_3K$		341
31.	BR-35	4-метилсульфоніл-2-нітрофеніламін	$C_7H_8N_2SO_4$		216
32.	BR-36	4-метилсульфоніл-2,6-динітрофенол	$C_7H_6N_2SO_7$		262
33.	BR-37	4-метилсульфоніл-2,6-динітроанілін	$C_7H_7N_3SO_6$		261
34.	BR-38	N-(2,4-динітрофеніл)-3-амінокапронової кислоти фенацетилний естер	$C_{17}H_{15}O_7N_3$		373
35.	BR-39	N-(2-фенілетил)-4-метилсульфоніл-2-нітроанілін	$C_{15}H_{15}N_2O_4S$		320
36.	BR-40	N-(2,6-динітро-4-трифторметилфеніл) гексаметиленімін	$C_{13}H_{14}O_4N_3F_3$		333

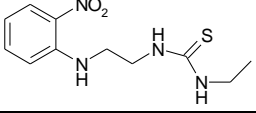
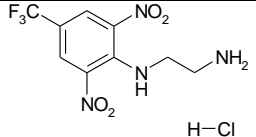
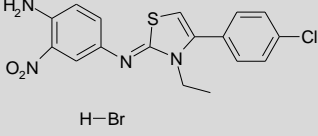
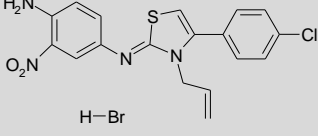
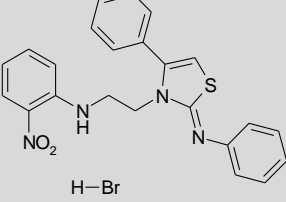
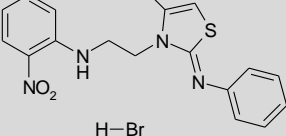
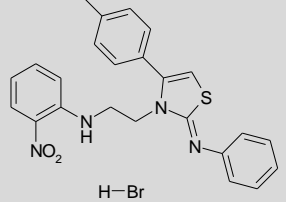
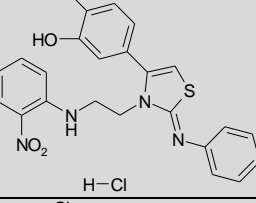
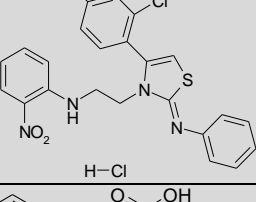
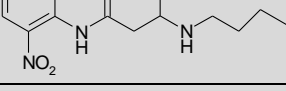
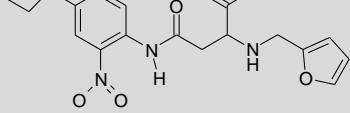
Продовження додатку А

37.	BR-41	N-(2,6-динітро-4-трифторметилфеніл)-2,3-дихлоранілін	$C_{13}H_{14}N_3O_4Cl_2F_3$		396
38.	BR-42	N-(2-фенілетил)-2,4-динітроанілін	$C_{14}H_{13}O_4N_3$		287
39.	BR-43	N-(бромпропіл)-2,6-динітро-4-трифторметиланілін	$C_{10}H_9N_3O_4F_3Br$		372
40.	BR-44	N'-(N''-[2,6-динітро-4-трифторметилфеніл]пропіл)морфолін	$C_{14}H_{17}O_5N_4F_3$		378
41.	BR-45	N-(4-метилсульфоніл-2-нітрофеніл)пропаном	$C_{10}H_{14}N_2O_5S$		274
42.	BR-46	N-(2-фенілетил)-2,6-динітро-4-трифторметиланілін	$C_{15}H_{12}N_3O_4F_3$		355
43.	BR-47	N-(2,6-динітро-4-трифторметилфеніл)пропаном	$C_{10}H_{10}N_3O_5F_3$		309
44.	BR-48	N-(2,6-динітро-4-трифторметилфеніл)етилморфолін	$C_{13}H_{15}N_4O_5F_3$		364
45.	CNA 001	N*1*-(2-Нітрофеніл)-етилен-1,2-діамін – гідрохлорид	$C_8H_{12}ClN_3O_2$		217,66
46.	CNA 002	1-[2-(2-Нітрофеніламіно)-етил]-3-феніл-тіосечовина	$C_{15}H_{16}N_4O_2S$		316,38
47.	CNA 003	3-(2-Нітрофенілкарбамоїл)-акрилова кислота	$C_{10}H_8N_2O_5$		236,19

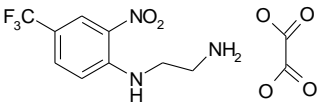
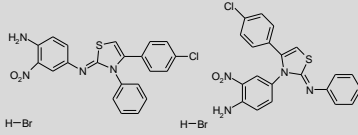
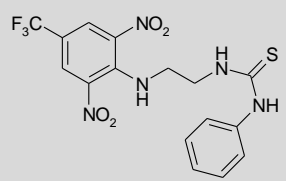
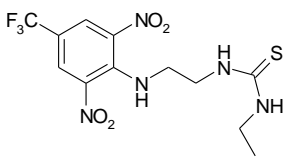
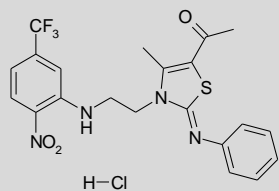
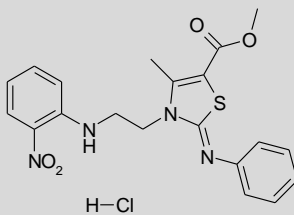
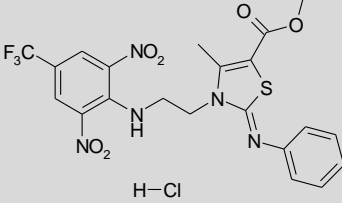
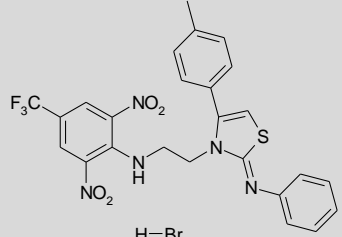
Продовження додатку А

48.	CNA 004	3-(4-Етоксигенітронірофенілкарбамоїл)-акрилова кислота	$C_{12}H_{12}N_2O_6$		280,24
49.	CNA 005	3-(4-Метилгенітронірофенілкарбамоїл)-акрилова кислота	$C_{11}H_{10}N_2O_5$		250,21
50.	CNA 006	3-(4-Аміногенітронірофенілкарбамоїл)-акрилова кислота	$C_{10}H_9N_3O_5$		251,20
51.	CNA 007	3-[2-(2-Нітрофеніламіно)етилкарбамоїл]-акрилова кислота	$C_{12}H_{13}N_3O_5$		279,25
52.	CNA 008	N,N'-Біс-(2-нітрофеніл)-гексилен-1,6-діамін	$C_{18}H_{22}N_4O_4$		358,40
53.	CNA 009	N,N'-Біс-(2-нітрофеніл)-етилен-1,2-діамін	$C_{14}H_{14}N_4O_4$		302,29
54.	CNA 010	1-(4-Аміногенітронірофеніл)-3-етилтіосечовина	$C_9H_{12}N_4O_2S$		240,29
55.	CNA 011	1-(4-Аміногенітронірофеніл)-3-аллілтіосечовина	$C_{10}H_{12}N_4O_2S$		252,30
56.	CNA 012	1-(4-Аміногенітронірофеніл)-3-фенілтіосечовина	$C_{13}H_{12}N_4O_2S$		288,33
57.	CNA 013	N,N'-Біс-(2,6-дінітро-4-трифторметилфеніл)-етилен-1,2-діамін	$C_{16}H_{10}F_6N_6O_8$		528,28
58.	CNA 014	N,N'-Біс-(2-нітро-4-трифторметилфеніл)-етилен-1,2-діамін	$C_{16}H_{12}F_6N_4O_4$		438,29
59.	CNA 015	1-[2-(2-Нітро-4-трифторметилфеніламіно)етил]-3-фенілтіосечовина	$C_{16}H_{15}F_3N_4O_2S$		384,38

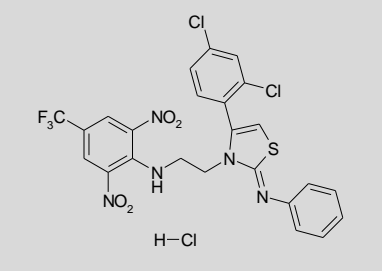
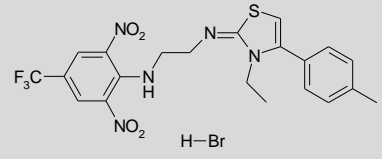
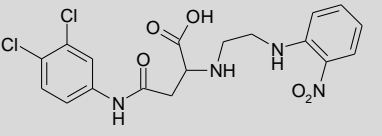
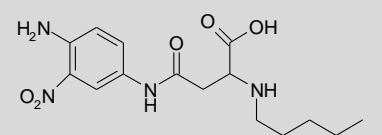
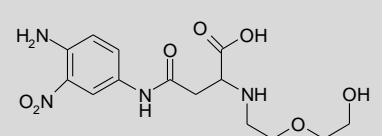
Продовження додатку А

60.	CNA 016	1-Етил-3-[2-(2-нітро-феніламіно)-етил]-тіосечовина	$C_{11}H_{16}N_4O_2S$		268,34
61.	CNA 017	N*1*-(2,6-Дінітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид	$C_9H_{10}ClF_3N_4O_4$		330,65
62.	CNA 018	N*4*-[4-(4-Хлор-феніл)-3-етил-3Н-тіазол-2-ілден]-2-нітро-феніл-1,4-діамін – гідробромід	$C_{17}H_{16}BrClN_4O_2S$		455,76
63.	CNA 019	N*4*-[3-Алліл-4-(4-хлор-феніл)-3Н-тіазол-2-ілден]-2-нітро-феніл-1,4-діамін - гідробромід	$C_{18}H_{16}BrClN_4O_2S$		467,77
64.	CNA 020	3-[2-(2-Нітро-феніламіно)-етил]-4-феніл-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол - гідробромід	$C_{23}H_{21}BrN_4O_2S$		497,42
65.	CNA 021	4-Метил-3-[2-(2-нітро-феніламіно)-етил]-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол - гідробромід	$C_{18}H_{19}BrN_4O_2S$		435,35
66.	CNA 022	3-[2-(2-Нітро-феніламіно)-етил]-2-феніліміно-4-п-толіл-2,3-дигідро-тіазол - гідробромід	$C_{24}H_{23}BrN_4O_2S$		511,44
67.	CNA 023	4-{3-[2-(2-Нітро-феніламіно)-етил]-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-4-іл}-феніл-1,2-діол гідрохлорид	$C_{23}H_{21}ClN_4O_4S$		484,97
68.	CNA 024	4-(2,4-Дихлор-феніл)-3-[2-(2-нітро-феніламіно)-етил]-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол - гідрохлорид	$C_{23}H_{19}Cl_3N_4O_2S$		521,86
69.	CNA 025	2-Бутиламіно-N-(2-нітро-феніл)-сукцинамова кислота	$C_{14}H_{19}N_3O_5$		309,32
70.	CNA 026	N-(4-Етоксид-2-нітро-феніл)-2-[[франо-2-ілметил]-аміно]-сукцинамова кислота	$C_{17}H_{19}N_3O_7$		377,36

Продовження додатку А

71.	CNA 027	N*1*-(2-Нітро-4-трифторметил-феніл)-етилен-1,2-діамін - оксалат	$C_{11}H_{12}F_3N_3O_6$		339,23
72.	CNA 028	Суміш 1:1 двох ізомерних сполук: N*4*-[4-(4-Хлорфеніл)-3-феніл-3Н-тіазол-2-іліден]-2-нітро-феніл-1,4-діамін – гідробромід + 4-[4-(4-Хлорфеніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-2-нітро-феніламін - гідробромід	$C_{42}H_{32}Br_2Cl_2N_8O_4S_2$		1007,62
73.	CNA 029	1-[2-(2,6-Дінітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-3-феніл-тіосечовина	$C_{16}H_{14}F_3N_5O_4S$		429,38
74.	CNA 030	1-[2-(2,6-Дінітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-3-етил-тіосечовина	$C_{12}H_{14}F_3N_5O_4S$		381,34
75.	CNA 031	1-{4-Метил-3-[2-(2-нітро-5-трифторметил-феніламіно)-етил]-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон - гідрохлорид	$C_{21}H_{20}ClF_3N_4O_3S$		500,93
76.	CNA 032	4-Метил-3-[2-(2-нітро-феніламіно)-етил]-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазоліл-5-карбонової кислоти метиловий естер гідрохлорид	$C_{20}H_{21}ClN_4O_4S$		448,93
77.	CNA 033	1-{3-[2-(2,6-Дінітро-4-трифторметил-феніламіно)-етил]-4-метил-2-феніліміно-2,3-дигідро-тіазол-5-іл}-етанон гідрохлорид	$C_{21}H_{19}ClF_3N_5O_5S$		545,93
78.	CNA 034	(2,6-Дінітро-4-трифторметил-феніл)-[2-(2-феніліміно-4-п-толіл-тіазол-3-іл)-етил]-амін гідробромід	$C_{25}H_{21}BrF_3N_5O_4S$		624,44

Продовження додатку А

79.	CNA 035	{2-[4-(2,4-Дихлор- феніл)-2-феніліміно- тіазол-3-іл]-етил}- (2,6-дінітро-4- трифторметил- феніл)-амін гідрохлорид	$C_{24}H_{17}Cl_3F_3N_5O_4S$		634,85
80.	CNA 036	N-(2,6-Дінітро-4- трифторметил- феніл)-N'-(3-етил-4- п-толіл-3Н-тіазол-2- іліден)-етилен-1,2- діамін гідробромід	$C_{21}H_{21}BrF_3N_5O_4S$		576,40
81.	CNA 037	N-(2,3-Дихлор- феніл)-2-[2-(2-нітро- феніламіно)- етиламіно]- сукцинамова кислота	$C_{18}H_{18}Cl_2N_4O_5$		441,27
82.	CNA 038	N-(4-Аміно-3-нітро- феніл)-2- пентіламіно- сукцинамова кислота	$C_{15}H_{22}N_4O_5$		338,37
83.	CNA 039	N-(4-Аміно-3-нітро- феніл)-2-[2-(2- гідрокси-етокси)- етиламіно]- сукцинамова кислота	$C_{14}H_{20}N_4O_7$		356,34

Додаток Б

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Мельничук О.В., Ожередов С.П., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Баєр О.О., Шиша О.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Поліплоїдизація *Miscanthus sinensis* за допомогою динітроанілінів з низькою фітотоксичністю. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 228–233. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1271> (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

2. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Rakhmetov D.B., Rakhmetova S.O., Yemets A.I., Blume Ya.B. The technology used for synthetic polyploid production of *Miscanthus* as cellulosic biofuel feedstock. *The Open Agriculture Journal*. 2020. V. 14. №1. P. 3–12. DOI: 10.2174/1874331502014010164. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

3. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Rakhmetov D.B., Shysha O.M., Rakhmetova S.O., Yemets A.I., Blume Ya.B. Induction of polyploidy in giant miscanthus (*Miscanthus* × *Giganteus* Greef Et Deu.). *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. 2020. V.74. № 3. P. 206–214. DOI: 10.2478/prolas-2020-0032. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті). **Q3**

4. Мельничук О.В., Ожередов С.П., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Баєр О.О., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Біометричні та біохімічні особливості нових ліній *M. × giganteus* з підвищеним рівнем плоїдності. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 281–286. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

5. Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Рахметов Д.Б., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Скринінг нітроанілінів на спорідненість до α -тубуліну міскантусу для їх використання у поліплоїдизації рослин цього роду. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Т. 18. С. 212–216. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

6. Мельничук О.В., Ожерєдов 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*. 2015. Т. 17. С. 209–212. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

7. Мельничук О.В., Ожерєдов 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 НУБіП України*. 2015. № 8. С. 57. http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/8.pdf. (Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів та підготовці статті).

8. Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Одержання поліплоїдних рослин міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антимітотичних сполук динітроанілінового ряду. *Сучасні проблеми біології, екології та хімії*: матеріали V-ї міжнар. наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 26 квітня 2017 р. З., 2017. С. 231.

9. Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Поліплоїдизація міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антимітотичних сполук динітроанілінового ряду. *Біологія рослин та біотехнологія*: матеріали III-ї конф. молодих учених., м. Київ, 16-18 травня 2017р. К., 2017. С. 41.

10. Мельничук О.В., Ожерєдов С.П., Ємець А.І., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б. Поліплоїдизація міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) із використанням нових антимітотичних сполук динітроанілінового ряду. *Молодь і*

поступ біології: матеріали XIV-ї міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів., м. Львів, 10–12 квітня 2018 р. Л., 2018. С. 59.

11. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Shysha O. O., Rakhmetov D. B., Rakhmetova S. O., Yemets A.I., Blume Ya.B. Induction of polyploidy in giant miscanthus (*Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu.) as a raw material for biofuel. *VII Baltic genetics congress*, Riga, Latvia, October 24–27, 2018. P. 37.

12. Melnychuk O.V., Ozheredov S.P., Bayer O.O., Shisha O.M., Rakhmetov D.B., Rakhmetova S.O., Yemets A.I., Blume Ya.B. Polyploidy induction in giant miscanthus (*Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu.). *Agrobiodiversity for improve the nutrition, health and quality of human and bees life: IV International Scientific Conference*, Nitra, Slovakia, September 11–13, 2019. P. 46.