

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

МЕЛЬНИЧУК ОЛЕКСАНДР ВАСИЛЬОВИЧ



УДК 58.085

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

03.00.20 — біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі клітинної біології та біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України

Блюм Ярослав Борисович

ДУ «Інститут харчової біотехнології і
геноміки НАН України»,
директор, завідувач відділу геноміки
та молекулярної біотехнології.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

Кунах Віктор Анатолійович,

Інститут молекулярної біології і
генетики НАН України, завідувач
відділу генетики клітинних популяцій

кандидат біологічних наук, доцент

Стефановська Тетяна Робертівна,

Національний університет біоресурсів і
природокористування України,
доцент кафедри ентомології ім. проф.

М.П. Дядечка

Захист відбудеться «29» квітня 2021 р. об 11.00 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, тел. (044) 463-05-32, e-mail: d26.254.01@ukr.net.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «27» березня 2021 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., доц.

Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 до 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 трифлюралін, 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 фіто токсичності. 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 антими́тотичних 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 трифлуралін) 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 антими́тотичною 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 біоетанолу з них.

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

Предмет дослідження - біотехнологічні основи поліплоїдизації *M. x giganteus* з використанням високоефективних речовин з антими́тотичною 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 антими́тотичних

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 мати 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., Ожередовим 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

У **першому розділі (огляд літератури)** висвітлено загальні відомості про рослини роду міскантусу, розглянута його таксономія, філогенез та географічне поширення, описана варіабельність хромосомних наборів та розмірів геномів серед перспективних представників цього роду. Також акцентовано увагу на походженні *Miscanthus* × *giganteus* та поліплоїдних *M. sacchariflorus*, наведено відомості щодо анеуплоїдів та наявності В-хромосом. Розглянуто результати досліджень з генотипування представників цього роду, проаналізовано відомості щодо популяційної генетики та генетичного різноманіття роду. Висвітлено питання зв'язку генотипу з фенотипом, QTL картування та порівняльної геноміки для роду міскантус. Описано основні особливості міскантусу як перспективної енергетичної культури, вплив різних фракцій лігніну на ефективність оцукрювання у різних видів міскантусу, стабільність складу клітинної стінки та

ефективність сахарифікації міскантусу за різних умов середовища та вплив посухи на ріст та якість міскантусу для виробництва біопалива. Проведено оцінку якості біомаси міскантусу як вихідної сировини для перетворення у різні біоенергетичні продукти. Також представлено сучасні досягнення та ключові проблеми у створенні поліплоїдних форм роду міскантус, висвітлено питання методів поліплоїдизації рослин, антимітотичних речовин для штучної індукції поліплоїдії та результати з отримання штучних поліплоїдів міскантусу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Структурно-біоінформатичний відбір перспективних сполук динітроанілінового ряду. Відбір ефективних сполук нітро- та динітроанілінового ряду для отримання поліплоїдних рослин *M. × giganteus* здійснювали з використанням методів *in silico*. Для цього було реконструйовано тривимірну модель молекули α -тубуліну з *M. × giganteus* як мішені для взаємодії досліджуваних сполук, оцінки здатності нових сполук динітроанілінового ряду утворювати ліганд-білкові комплекси шляхом докінгу лігандів у раніше описаний сайт їх зв'язування з α -тубуліном та порівняння ефективності їх докінгу та стабільності отриманих комплексів з відповідними показниками для вже відомих речовин даного класу. Для реконструкції просторової структури молекули α -тубуліну міскантусу було проскановано базу даних UniProt на наявність відомих амінокислотних послідовностей α -тубуліну з *Miscanthus*. Докінг динітроанілінових сполук у задану область поверхні молекули α -тубуліну *M. sinensis* з радіусом 20 Å навколо атому N залишку Arg2 проводили за допомогою програми CCDC GOLD. Для визначення стабільності ліганд-білкових комплексів обраховували їх тривалу молекулярну динаміку. Отримані результати аналізували за такими показниками, як зміна рівнів конформаційної енергії ліганду у вільному стані та у складі комплексу з білком (ΔG_{bind}) і кількості утворених водневих зв'язків між лігандом та білком в середньому протягом проведення обрахунку. Як контрольні речовини використовували трифлюоралін та оризалін.

Введення міскантусу гігантського в культуру *in vitro*. Поверхневу стерилізацію рослинного матеріалу проводили в асептичних умовах. Як експланти використовували кореневі придаткові бруньки *M. × giganteus* з невеликими фрагментами ризом. З метою підбору найбільш ефективного методу стерилізації ризом використовували різні комбінації стерилізаторів. Досліджували 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.

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.

Визначення плоідності отриманих ліній. Визначення рівня плоідності отриманих ліній проводили шляхом підрахунку кількості хромосом у клітинах апікальної меристеми коренів міскантусу. Дослідження проводили з використанням мікроскопу Zeiss, Axioscop 40. Результати документували за допомогою цифрової камери Zeiss, AxioCam MRC 5 та програмного забезпечення Axivision Rel. 4.7.

Аналіз морфометричних та біохімічних показників. Для оцінки морфометричних та біохімічних показників використовували загальноприйняті методики проведення досліджень. Визначали такі показники, як: висота поліплоїдних рослин, кількісь пагонів на рослині, кількість листків на стеблах поліплоїдних рослин, кількість ризом на їх кореневищах, структура поліплоїдних рослин, надземна маса поліплоїдних ліній, вміст сухої речовини і золи в поліплоїдних рослинах, енергетична цінність біомаси отриманих ліній, вміст цукрів в поліплоїдних рослинах та розраховували теоретичний вихід біоетанолу з біомаси поліплоїдних ліній міскантусу гігантського.

Статистичний аналіз даних. Всі досліди проводили в 3-кратній повторюваності. Обробку результатів експериментальних досліджень здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel 12,0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Побудова просторової моделі 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 *M. 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*.

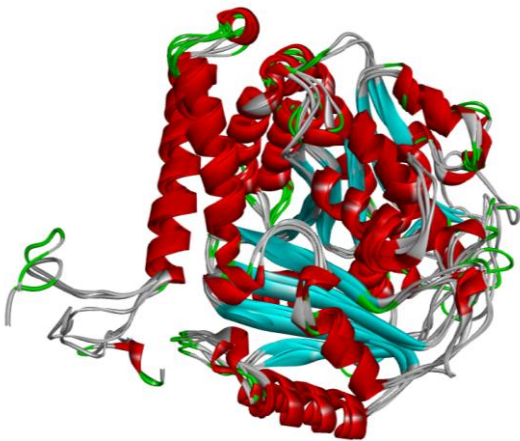


Рис. 1. Промоделі просторової структури молекули α -тубуліну *M. sinensis* (Q70ZL7).

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. 1). Відбір промоделей для подальшої роботи здійснювали за допомогою оціночних функцій сервісу I-TASSER, а саме C-score, TM-Score та щільністю кластерів (Рис. 1).

Докінг похідних динітроаніліну з молекулою α -тубуліну міскантусу у потенційний сайт їх зв'язування. Як свідчать результати молекулярного докінгу, всі досліджувані ліганди здатні утворювати комплекси з α -тубуліном міскантусу, а потенційний сайт їх зв'язування знаходиться на поверхні білкової глобули (Рис. 2).

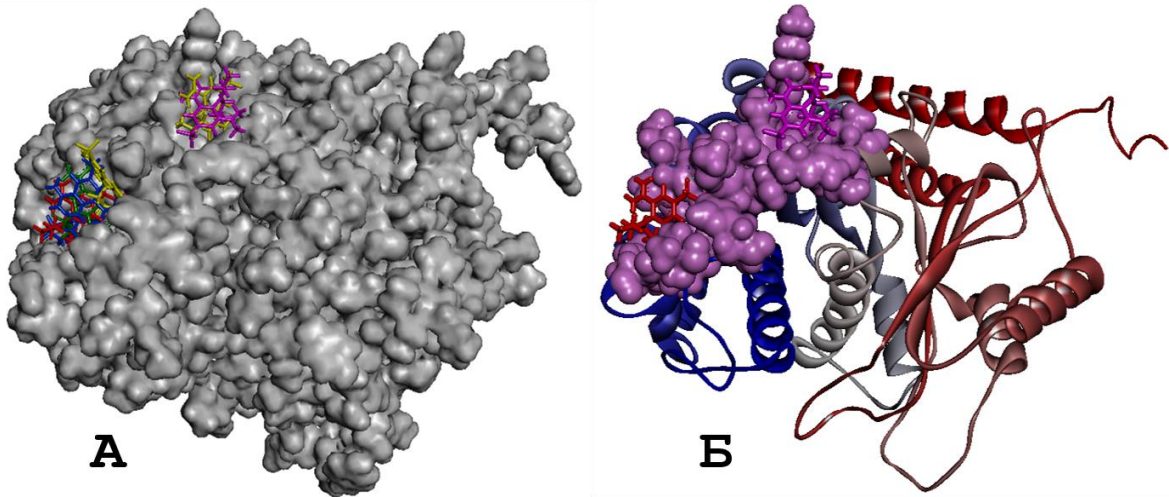


Рис. 2. Результати докінгу динітроанілінових сполук на поверхню α -тубуліну *M. sinensis* за допомогою програми CCDC GOLD: **А** – білок показано у вигляді його поверхні Ван-дер-Ваальса, ліганди – у вигляді паличкових моделей; **Б** – стрічкова модель білку з амінокислотними залишками сайту зв'язування (відображено сферами) та паличковими моделями лігандів.

Також за допомогою оціночних функцій CCDC GOLD нами було проведено порівняння якості отриманих комплексів за такими показниками, як GoldScore та ChemScore. Результати аналізу сайту зв'язування референтної сполуки з α -тубуліном з *M. sinensis* (Рис.3), визначеного за результатами докінгу ліганд-білкового комплексу, виявили його ідентичність до описаного раніше (Blume *et al.*, 2003, Нипорко *та ін.*, 2009, Ожередов *та ін.*, 2019).

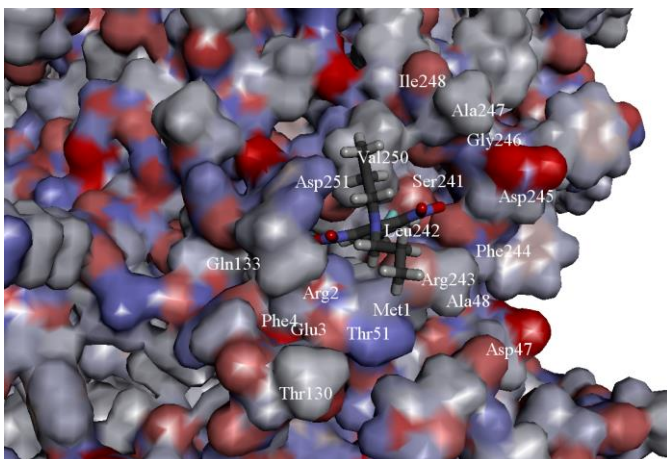


Рис. 3. Положення трифлураліну на поверхні α -тубуліну з *Miscanthus sinensis* у потенційному сайті зв'язування за результатами докінгу з використанням CCDC GOLD.

Оцінка рівня спорідненості досліджуваних сполук до α -тубуліну *Miscanthus*. Серед 83-х досліджених новосинтезованих динітроанілінів за критерієм стабільності комплексів з α -тубуліном та рівнем фітотоксичності відібрано 6-ть 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-трифторметилфеніл)-етилен-1,2-діамін гідрохлорид; 1-{3-[2-(2,6-динітро-4-трифторметилфеніламіно)-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 дві найбільш перспективні сполуки динітроанілінового ряду, що мали кращі показники за контрольну сполуку трифлуралін 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 у порівнянні з трифлураліном за значенням енергії зв'язування з α -тубуліном *M. sinensis*, але завдяки низькому рівню фітотоксичності можуть бути використані для проведення поліплоїдизації рослин родини *Miscanthus*.

Введення міскантусу гігантського в культуру *in vitro*. З метою розробки ефективної методики поверхневої стерилізації експлантів з підземної частини рослин міскантусу для введення в культуру *in vitro* було проведено порівняння різних схем стерилізації. За результатами проведеного дослідження найбільш ефективним методом поверхневої стерилізації виявилась багатокрокова поверхнева стерилізація з використанням розчину «Білизна» та розчину нітрату срібла. Цей метод включав попередню обробку експлантів 50%-им розчином комерційного препарату «Білизна» (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. Варіанти які передбачали обробку експлантів газом Cl₂ та бордоською сумішшю

виявилися неефективними. Ефективність поверхневої стерилізації за даними варіантами знаходилась в межах 5,2–16,5 %, що було значно нижчим у порівнянні з варіантами з використанням нітрату срібла та гіпохлориду натрію

Розробка технології поліплоїдизації міскантусу гігантського з використанням динітроанілінів. З метою підбору оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції калусогенезу *M. x giganteus* сорту 'Гулівер' проведено дослідження з використанням 6-ти різних комбінацій ауксинів та цитокінінів. За результатами дослідження підібрано оптимальні умови індукції калусогенезу з використанням різних експлантів *M. x giganteus* та наступної регенерації з них рослин. Встановлено, що найбільшу кількість ембріогенного та пагоноутворюючого калусу можливо отримати на середовищі доповненому 5,0 мг/л 2,4Д та 0,1 мг/л БАП. Схожі результати були отримані при використанні як експлантів як асептичних бруньок ризом (Рис. 4), так і пагонів, що були отримані шляхом мікроклонального розмноження (Рис. 5).



Рис. 4. Індукція калусогенезу на бруньках ризом *M. x giganteus*.

Через 16–18 днів після початку культивування на експлантах з'являлась перша дедиференційована тканина та після двох місяців культивування експланти повністю покривалися калусом з великою кількістю ембріоподібних структур (Рис. 5).



Рис. 5. Індукція калусогенезу на *in vitro* пагонах *M. x giganteus*.

Поліплоїдизація міскантусу шляхом непрямого морфогенезу. Для отримання поліплоїдних ліній *M. × giganteus* калюсну культуру переносили на середовища для регенерації, які містили антими́тотичні речовини (трифлюоралін та оризалін) протягом перших 7 діб диференціації калюсної культури. Після цього 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 складав 7 та 14 діб. Використовували тверде середовище МС, а як джерело вуглецю - 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 варіанту експерименту пагони переносили на свіже, вільне від антими́тотичних 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.

Оцінка виживання експериментальних ліній після поліплоїдизації. При культивуванні калюсної культури на середовищі з оризаліном 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 антими́тотичного агенту і коливалась в межах 16–23,3 %. Враховуючи довготривалість, складність та низьку ефективність методу, експерименти з новосинтезованими динітроанілінами не закладалися.

За результатами з культивування пагонів *in vitro* встановлено, що оризалін та трифлюоралін 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 трифлюораліном 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 трифлюораліном. Показано, що додавання оризаліну та трифлюораліну в середовище призводить до пригнічення росту рослин, викликає деформації та викликає загибель експлантів міскантусу гігантського (Рис. 6).



Рис. 6. Деформації експлантів *M. x giganteus* на середовищах з типовим динітроаніліном (трифлуралін, 10 мкМ).

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. 7).



Рис. 7. Вкорінена лінія *M. giganteus* для приготування препаратів при проведенні цитологічних досліджень методами світлової мікроскопії.

За результатами цитологічного аналізу встановлено, що всі антимітотичні речовини динітроанілінового ряду, використані в роботі, виявилися здатними індукувати поліплоїдію *M. x giganteus*. Контрольні рослини міскантусу гігантського, які належать до вихідного генотипу, використаного у дослідженні, мали стандартну кількість хромосом, характерну триплоїдній формі ($2n=57$) (Рис. 8А). 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* ($2n=114$) (Рис. 8Г, Д, Є). Крім того, у деяких випадках спостерігалась поява анеуплоїдних форм. Так, серед ліній, які культивувалися на середовищах, доповнених трифлураліном у концентрації 10 мкМ тривалістю 14 діб, виявлено лінію, яка мала збільшену кількість хромосом в результаті проведення поліплоїдизації в умовах *in vitro* ($2n=76$) (Рис. 8Б, В).

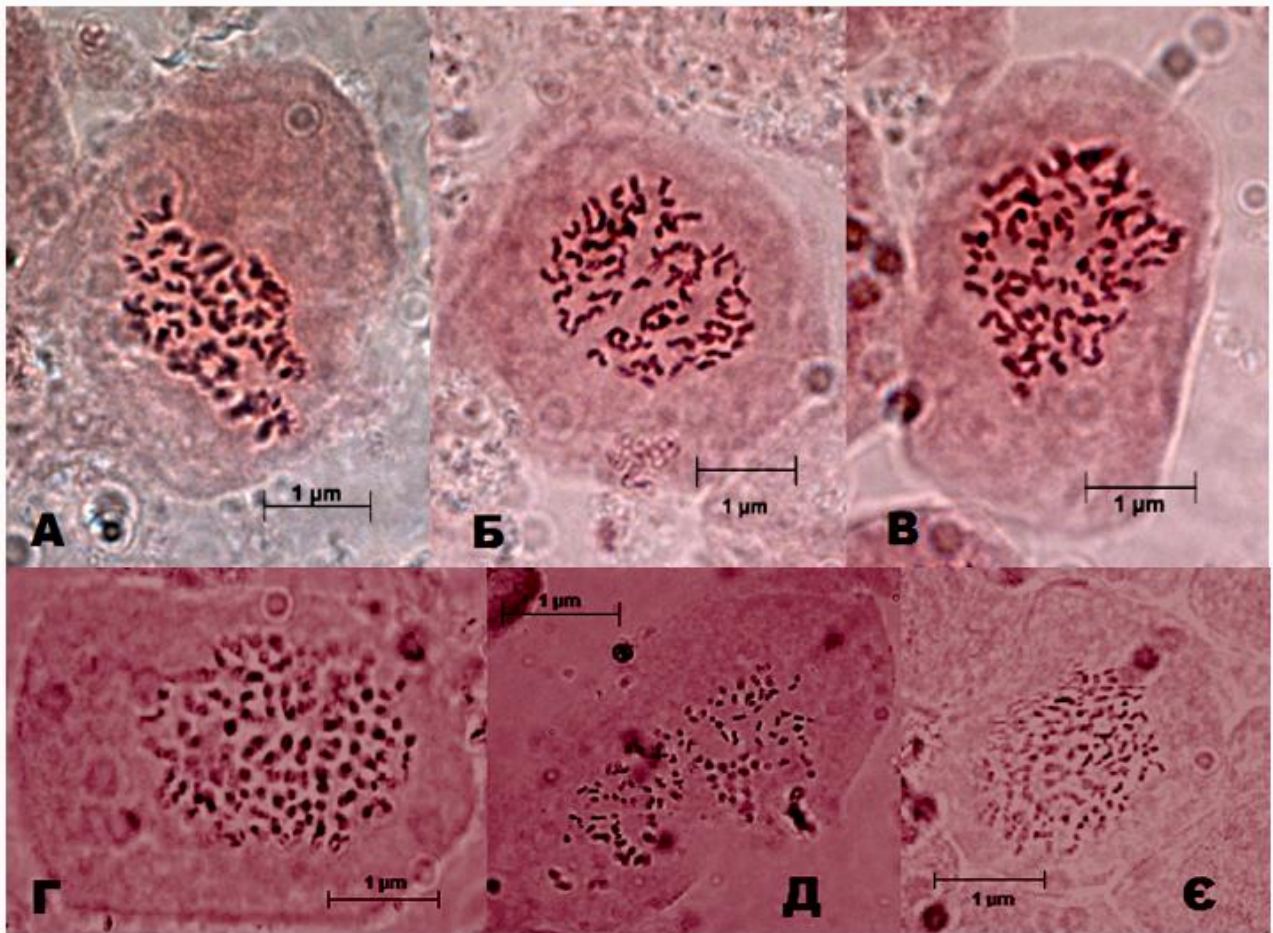


Рис. 8. Кількість хромосом у клітинах апікальної меристеми кореня *M. × giganteus*: А – контроль, 57 хромосом; Б, В – лінії, 76 хромосом; Г, Д, Є – лінії, які мають 114 хромосом.

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.

Морфометричні характеристики поліплоїдних ліній рослин. 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. × giganteus* (контроль) становила 197 см. Висота рослин для інших досліджуваних ліній знаходилася в межах від 168 см до 182 см (Рис. 9).

За таким показником, як кількість пагонів на рослину лінія 108 переважала інші. У цьому випадку кількість пагонів в середньому за 2 роки становила 24 шт., тоді як 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. Найменша

кількість пагонів була характерна для рослин лінії 109: в середньому рослини цієї групи мали по 7 пагонів (Рис. 10).

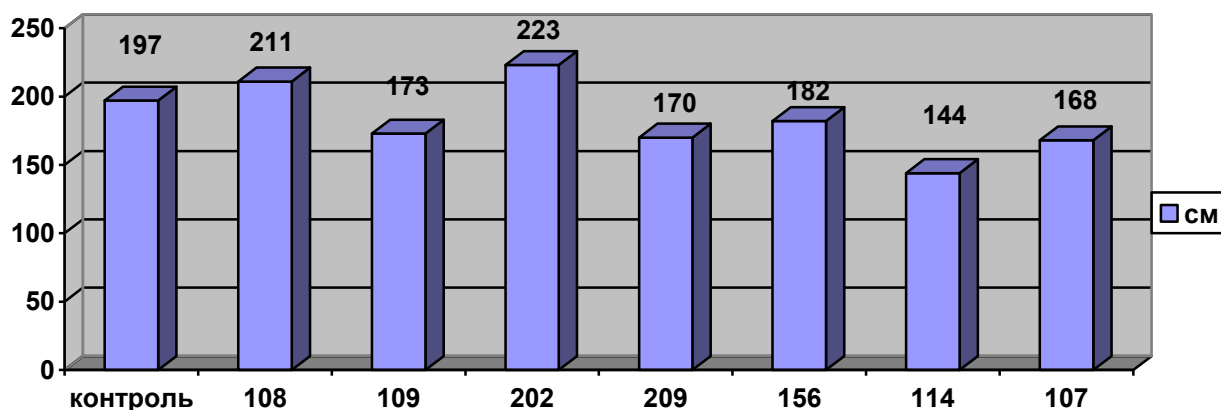


Рис. 9. Висота рослин отриманих поліплоїдних ліній міскантусу гігантського, см (середнє за 2 роки).

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.

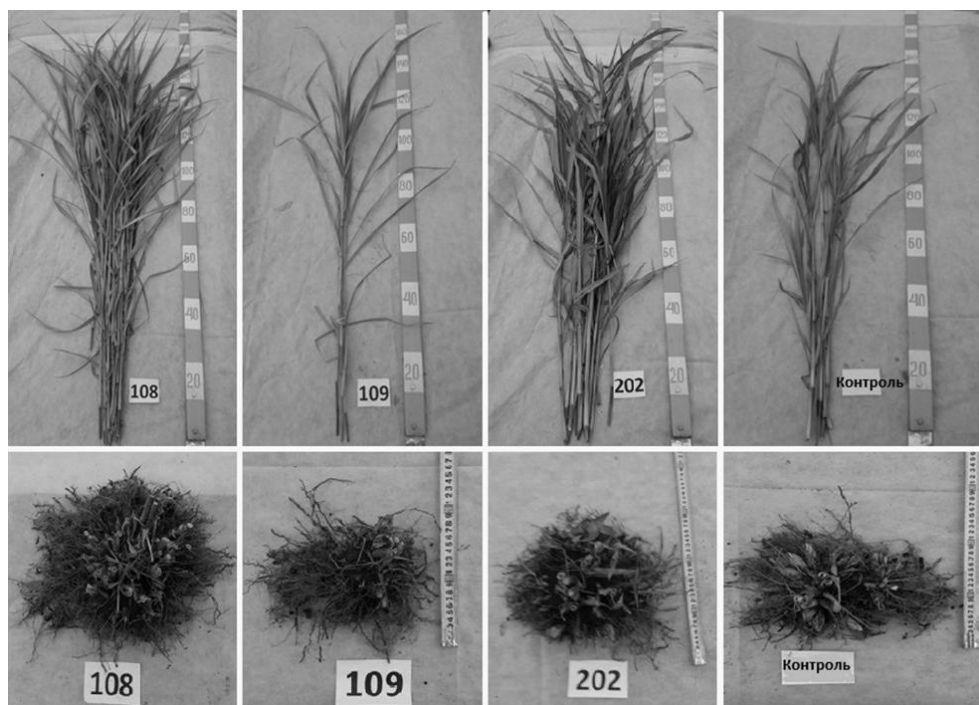


Рис. 10. Надземна частина та ризоми рослин ліній *M. × giganteus* зі зміненим рівнем плоїдності.

Згідно отриманих результатів лінія 108 мала найкращі показники за кількістю ризом на кореневищах: в середньому за два роки цей показник становив 21-ну ризому на рослину, в той час як триплоїдний *M. × giganteus* (контроль) мав лише

9-ть ризом. Найменша кількість ризом на кореневищах спостерігалась у ліній 109 та 156, по 4 та 6 ризом, відповідно.

Структура рослин та надземна маса поліплоїдних ліній рослин. 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%.

За результатами 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. Децю нижчою була біомаса наземної частини рослин лінії 202, яка становила 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 показники контролю, а саме на 378 г.

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. 11).

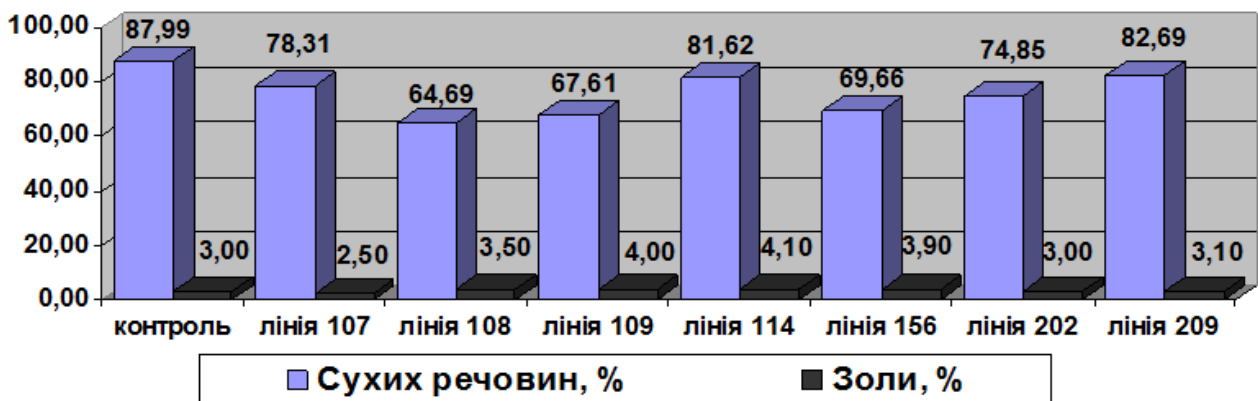


Рис. 11. Вміст сухих речовин та золи в зразках рослин поліплоїдних ліній міскантусу (середнє за 2 роки).

Одним з найважливішим показників для енергетичних культур є вміст загальних цукрів та моноцукрів в рослинному матеріалі. В Табл. 1 наведені

результати визначення вмісту загальних цукрів та моноцукрів в зразках отриманих поліплоїдних ліній міскантусу. За результатами дослідження триплоїдні форми *M. × giganteus* (контроль) мали відносно високі показники за вмістом загальних цукрів. Для контролю цей показник складав 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 %). Високим вмістом загальних цукрів характеризувались такі лінії міскантусу, як 107 (9,81 %) та 156 (9,5%). Крім того, варто зазначити, що рослини лінії 156 мали найвищі показники за вмістом моноцукрів (5,67 %). Лінія 109 також істотно вирізнялась за вмістом моноцукрів (5,25 %), перевищуючи всі інші лінії за цим показником. Як видно з Табл. 1, найнижчі показники за рівнем моноцукрів мала лінія 114, для зразків цієї лінії вони склали лише 3,21 %. Вміст моноцукрів в контролі становив 4,95 %.

Таблиця 1

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

Зразок №	Загальний вміст цукрів, %	Вміст моноцукрів, %	Енергетична цінність фітомаси, 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 енергетичною цінністю проаналізовані лінії не виявили 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. Найнижчим показником енергетичної цінності характеризувалась лінія 107, для якої цей показник був на рівні 3742 ккал, тоді як у контролі - на рівні 3906 ккал (Табл. 1).

Розрахунок виходу біоетанолу. 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 (Рис. 12) та логарифмічну (Рис. 13) моделі, які описують зміну врожайності міскантусу за часовим інтервалом з 1-го по 11-й роки вирощування.

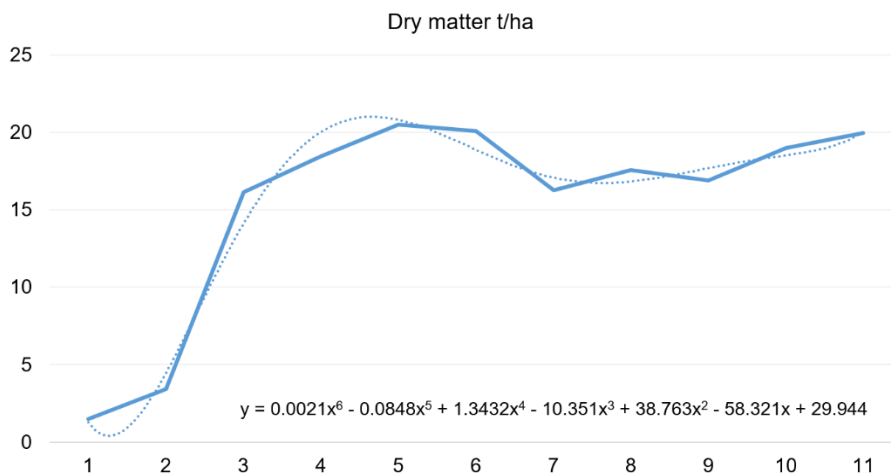


Рис. 12. Графік приросту врожайності сухої біомаси міскантусу з 1-го по 11-й рік культивування (за даними 2007-2017 рр., Dubis *et al.*, 2019) та побудована поліноміальна модель зміни врожайності.

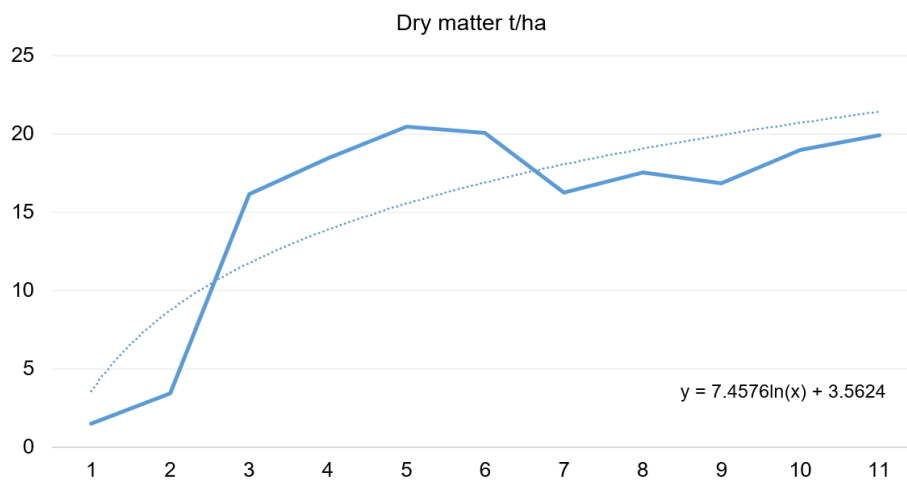


Рис. 13. Графік приросту врожайності сухої біомаси міскантусу з 1-го по 11-й рік культивування (за даними 2007-2017 рр., Dubis *et al.*, 2019) та побудована логарифмічна модель зміни врожайності.

За результатами розрахунків найбільш продуктивною за виходом етанолу виявилась поліплідна лінія 202, яка істотно перевищує показники контролю за виходом етанолу в середньому на 14,2% (Рис. 14).

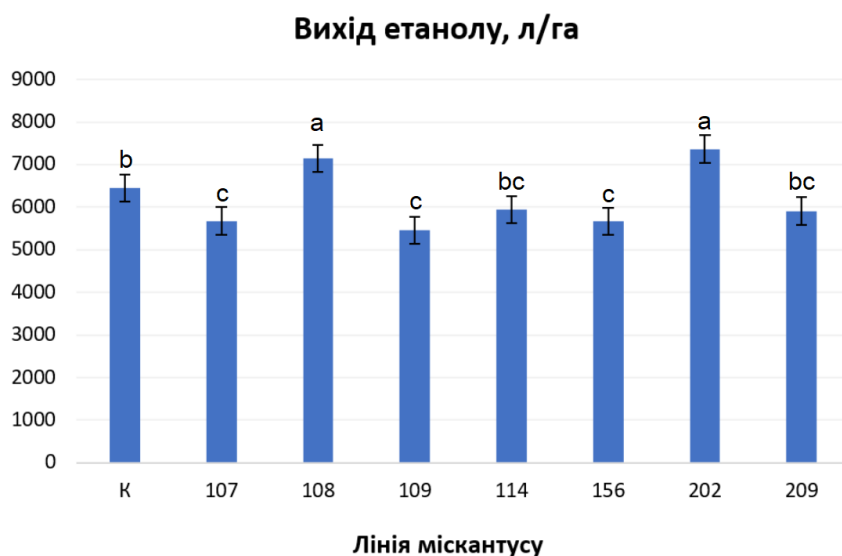


Рис. 14. Значення потенційного виходу етанолу з біомаси ліній звичайного та поліплідного міскантусу, розраховані на основі змодельованої врожайності міскантусу після третього року культивування.

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. Найнижчим показниками за виходом етанолу характеризувалась 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, відповідні показники якої істотно перевищувала показники контролю та несуттєво поступалась лінії 202 за виходом етанолу з одиниці площі.

За результатами дослідження, найкращі результати за багатьма показниками спостерігались у ліній 108 та 202, а саме за масою надземної частини рослин, висотою рослин, кількістю ризом на кореневищах рослин, кількістю листків на стеблі, вмістом сухих речовин та ін. Також значну увагу привертає 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.

Таким чином, в дисертаційні роботі представлені результати використання новосинтезованих 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.

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 дослідках 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 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.**, 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*).

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 антими́тотичних 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 антими́тотичних 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 антими́тотичних 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.

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 Національної академії наук 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 дослідах 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-дихлор-феніл)-2-феніліміно-тіазол-3-іл]-етил}-(2,6-динітро-4-трифторметил-феніл)-амін гідрохлорид. Було проведено поліплоїдизацію *M. × giganteus* шляхом культивування асептичних пагонів в умовах *in vitro* на середовищах доповнених динітроанілінами. Використовували як наведені вище сполуки, так і референтні динітроаніліни (трифлуралін та оризалін). Встановлено, що досліджувані сполуки, так само як і вже добре відомі, здатні індукувати поліплоїдію *M. × giganteus*, та не характеризуються високим фітотоксичним впливом на рослини, що істотно позначається на виживанні та мікроклональному розмноженні експлантів. За стандартними методиками проведено вивчення фенотипових особливостей поліплоїдних ліній міскантусу гігантського. 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 виходом біоетанолу завдяки високій продуктивності біомаси.

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

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 antimitotic 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 was 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-nitrophenyl)-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-trifluoromethylphenyl)-amine hydrochloride. Polyploidization of *M. × 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. It was found that newly synthesized dinitroanilines, as well as widely used are able to induce polyploidy of *M. × giganteus*. Moreover, newly synthesized compounds do not have high phytotoxicity level, which significantly affects the survival rate and micropropagation of explants. The phenotypic features of giant miscanthus polyploid lines were studied according to standard methods. 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, dry matter content and higher ethanol yield owing to increased biomass.

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

Підписано до друку 24.03.2021 р. Зам. № 130.
Формат 60x84 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 0,9.
Друк ЦП «КОМПРИНТ». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.
м. Київ, вул. Предславинська, 28
095-941-84-99, 067-209-54-30
email: komprint@ukr.net