

Міністерство освіти та науки України
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

ХУДОЛЄЄВА ЛІДІЯ ВІКТОРІВНА

УДК 630*17:582.623.2:630*232.4

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИРОЩУВАННЯ
КОРОТКОРОТАЦІЙНИХ ПЛАНТАЦІЙ *POPULUS* ТА *SALIX* В
УКРАЇНІ**

03.00.20 - біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» Міністерства освіти і науки України та у відділі біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Дуган Олексій Мартем'янович,
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського» МОН України,
декан факультету біотехнології і біотехніки

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;

доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник **Прядкіна Галина Олексіївна,**
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу фізіології та
екології фотосинтезу.

Захист дисертації відбудеться 29 травня 2019 р о 11-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп.4, ауд. 258.

З дисертацією можна ознайомитись у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37.

Автореферат розіслано « ____ » квітня 2019 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради Д 26.002.28,
д-р. біол. н., проф.



Галкін О.Ю.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Забезпечення країни енергоресурсами є важливою умовою функціонування всіх галузей економіки та забезпечення соціальної стабільності в державі. Однак, Україна за рахунок власного видобутку покриває потреби в енергоспоживанні лише на 53%, імпортуючи при цьому 75% необхідного обсягу природного газу і 88% сирової нафти та нафтопродуктів [Кравчук, 2013]. Таким чином, питання пошуку власних енергоресурсів є актуальним.

Основною перевагою твердого біопалива над викопними енергетичними ресурсами є можливість його природного поновлення, а також значне зменшення екологічного навантаження при його використанні. Тополя та верба є цінними енергетичними культурами, а створення короткоротаційних плантацій цих дерев – важливий крок для заміщення імпортованих видів палива на поновлювані місцеві джерела енергії.

З позицій забезпечення сталого розвитку та ефективного природокористування під час вибору джерела теплової енергії важливою є комплексна оцінка енергоресурса, зокрема, необхідним є урахування його екологічної безпечності. В ході використання деревини як джерела енергії реалізується умовний нульовий баланс за вуглекислим газом: під час згоряння біомаси в атмосферу виділяється така ж кількість CO₂, яка була адсорбована у процесі фотосинтезу в період росту рослин, а у разі згоряння викопного пального, навпаки, вивільнюється вуглець, накопичений за мільйони років. Це є вкрай важливим в умовах протистояння глобальним змінам клімату. Крім того, при вирощуванні деревних рослин частина вуглецю фіксується у ґрунті завдяки опаданню листя, що робить їх більш привабливим біопаливним матеріалом порівняно з однорічними польовими культурами.

Селекцією і вирощуванням тополі та верби в Україні наприкінці 50-х років займалася команда вчених під керівництвом Н. В. Старової [Старова Н.В., 1980]. Однак ці дослідження передбачали довгоротаційний період вирощування рослин (від 20 років) та використання деревини в лісозаготівельній та паперово-целюлозній промисловостях. Технології короткоротаційного вирощування (3-5 років) тополі та верби широко використовують в країнах ЄС для забезпечення сировиною галузі відновлюваної енергетики, однак в Україні такі технології знаходяться на початкових етапах розвитку.

Однією з вагомих проблем сільського господарства є засоленість ґрунтів. Станом на 2013 рік в Україні налічувалося 4,7 млн. га солонцюватих та засолених ґрунтів, що становить 14,3% площі сільськогосподарських угідь [Макеєва, 2013]. Відбір солестійких клонів тополі та верби дозволить раціонально використати ці ґрунти для забезпечення країни енергоресурсами.

Наразі в Україні ще не достатньо впроваджено методів короткоротаційного лісівництва, не проведено оцінку сортів на придатність їх вирощування у короткоротаційних плантаціях і недостатньо опрацьовано методики, що дозволили б значно покращити генотипи вже існуючих клонів, зокрема методи генетичної інженерії. Розробка методів мікротонального

розмноження тополь та верб сприятиме збільшенню темпів розмноження рослинного матеріалу та збереженню особливо цінних генотипів, а методи оцінки солестійкості в лабораторній культурі – підвищенню продуктивності рослин при їх вирощуванні на засолених ґрунтах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» і відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії» (2013-2017 рр., проект № 13-17 «Створення генофонду високопродуктивних клонів тополь та швидкорослих плантацій біопаливного матеріалу», державний реєстраційний номер 0113U002928).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – вивчення біотехнологічних аспектів вирощування короткоротаційних плантацій тополь та верб для визначення найбільш продуктивних клонів.

Для досягнення даної мети було поставлено наступні *завдання*:

- 1) проаналізувати перспективи вирощування швидкорослих дерев тополь і верб у плантаціях з короткою ротацією з метою отримання біомаси для біопалива в Україні;
- 2) оцінити приживаність і морфометричні характеристики рослин тополь і верб на сортовипробних ділянках з 3-річним ротаційним циклом в умовах польового вирощування та поливного розсадника; оцінити теплотворну здатність деревної біомаси;
- 3) виходячи з ростових параметрів та теплотворної здатності, провести попередню оцінку продуктивності плантацій різних клонів;
- 4) оцінити екологічну складову при використанні деревини як відновлюваного джерела енергії;
- 5) розробити методику мікроклонального розмноження та провести мультиплікацію рослинного матеріалу різних клонів тополь і верб, перспективних для біопаливної галузі;
- 6) розширити колекцію *in vitro* швидкорослих клонів тополь та верб, перспективних для відновлюваної енергетики;
- 7) оцінити солестійкість рослин до дії хлориду натрію в умовах *in vitro*.
- 8) провести агробактеріальну трансформацію тополі клону 'Градиська' конструкцією pAV04 та підтвердити її інтегрування в геном рослин.

Об'єкт дослідження – клони тополі і верби в умовах вирощування в короткоротаційних плантаціях та культурі *in vitro*.

Предмет дослідження – ростові, фізіологічні та енергетичні характеристики клонів тополі та верби в умовах вирощування в короткоротаційних плантаціях та культурі *in vitro*.

Методи дослідження. Для досягнення мети роботи було використано:

- біотехнологічні методи (введення рослин в асептичну культуру *in vitro*, дослідження умов мікроклонального розмноження, регенерації та солестійкості рослин, агробактеріальна трансформація, виділення геномної ДНК, ПЛР-аналіз);
- морфометричні методи (оцінка інтенсивності росту та розвитку рослин при вирощуванні в польових умовах та лабораторній культурі при дії стресового фактору);
- фізико-хімічні методи (калориметричне визначення енергетичних показників біомаси досліджуваних клонів рослин);
- статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше оцінено продуктивність 20-ти клонів тополь та 9-ти клонів верб при вирощуванні на ділянках з короткою ротацією (3 роки) в польових умовах та при штучному зволоженні ґрунту, визначено теплотворну здатність деревини 24-х клонів тополь і 10-ти клонів верб та визначено клони, що є перспективними для закладання короткоротаційних енергетичних плантацій з 3-річним ротаційним циклом.

На основі літературних даних проведено оцінку екологічної складової при використанні деревини як джерела енергії та запропоновано напівкількісний метод візуалізації даних, що дозволяє комплексно оцінити переваги та ризики використання різних джерел енергії.

Введено в культуру *in vitro* цінні для відновлюваної енергетики клони тополь і верб та підібрано умови їх мікроклонального розмноження, меристемної регенерації і адаптації до ґрунтових умов.

Вперше оцінено стійкість клонів тополь та верб до засолення поживного середовища хлоридом натрію в культурі *in vitro* та встановлено, що солестійкість досліджених клонів збільшується наступним чином: гібридна тополя (*P. tremula* × *P. alba*) клону ‘INRA 717-1B4’ → тополя тремтяча (*P. tremula*) → верба (*Salix alba* × *Salix fragilis*) клону ‘Олімпійський вогонь’.

Вперше проведено агробактеріальну трансформацію гібридної тополі клону ‘Градиська’ конструкцією pAV04 та отримано лінію трансгенних рослин, що містять ген цинамілалкогольдегідрогенази.

Практичне значення результатів. За результатами досліджень показано, що вирощуючи тополі ‘Канадська × Бальзамічна’ і ‘Келібердинська’ та верби ‘Житомирська-1’ і ‘Житомирська-2’ в короткоротаційних плантаціях можна отримати з 1 Га від 30 до 70 ГДж теплової та від 8 до 19 МВт електричної енергії вже після першого року вирощування рослин. Розроблений спосіб отримання вихідного асептичного матеріалу для біотехнологічних досліджень та схеми мікроклонального розмноження і меристемної регенерації можуть бути застосовані для розмноження особливо цінних клонів тополь та верб. Отримані дані можуть використовуватися як науковцями-біотехнологами рослин, так і працівниками лісових, садово-паркових та фермерських господарств. Вони є важливими для розвитку галузі відновлюваної енергетики в Україні та посилення енергетичної безпеки держави через підвищення продуктивності вирощування деревних рослин в енергетичних плантаціях.

Результати роботи можуть бути використані у відповідних лекційних курсах та проведенні лабораторних занять для студентів біотехнологічних та лісівничих спеціальностей у вищих навчальних закладах.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведено інформаційний пошук, збір та аналіз джерел літератури за темою дисертації, визначено актуальність проблеми, сформульовано мету і завдання дослідження, написано усі розділи дисертації. Концепцію роботи, програму і методологію експериментальних досліджень, основні положення і висновки дисертації сформульовані та обговорені здобувачем разом з науковим керівником д.б.н., проф. Дуганом О.М. та консультантами дисертаційної роботи к.б.н., с.н.с. Куцоконь Н.К. і д.б.н. Рашидовим Н.М.

Основні результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі при виконанні експериментів, проведених в ІКБГІ. Під керівництвом та за участі с.н.с. Куцоконь Н.К., здобувачем було заплановано та виконано експерименти, здійснено статистичний аналіз одержаних даних, підготовано публікації, підібрано умови для отримання асептичного рослинного матеріалу в культурі *in vitro* та розроблено протоколи мікроклонального розмноження та меристемної регенерації клонів тополь і верб; досліджено вплив на них різних концентрацій хлориду натрію в поживному середовищі, проведено агробактеріальну трансформацію тополі клону 'Градиська' конструкцією pAV04 та підтверджено її інтегрування в геном рослин; проведено польові обміри, запропоновано метод напівкількісної візуалізації даних, що дозволяє комплексно оцінити переваги та ризики використання різних джерел енергії.

Створення та обліки випробних ділянок в м. Харкові проведено разом зі співробітниками УкрНДІЛГА чл.-кор. НААН України, проф. Ткачем В.П, зав. лабораторією селекції, к.с-г.н. Лось С.А., с.н.с., к.с-г.н. Висоцькою Н.Ю. та с.н.с., к.с-г.н. Торосовою Л.О. Дослідження пов'язані з вирощуванням рослин на сортовипробній ділянці в м. Києві проведені у співпраці зі співробітниками НБС: зав. відділу нових культур, проф. Рахметовим Д.Б. та м.н.с. Рахметовою С.А. Визначення енергетичних характеристик деревини досліджуваних клонів проводили разом з провідним інженером НБС Фіщенко В.В.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на: XV Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія. Людина. Суспільство» (Київ, 2012 р.); VIII та IX Всеукраїнських науково-практичних конференціях «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2014 та 2015 рр.); Міжнародних конференціях молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Херсон, 2016 р.; Луцьк, 2017 р.), Міжнародному симпозиумі з Євро-Азіатського біорізноманіття (Мінськ, 2017, Київ, 2018), а також на звітах та семінарах кафедри промислової біотехнології НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського» (2014-2017 рр.).

Публікації. Основні положення дисертації опубліковано у 22 працях, серед яких: 5 статей у наукових фахових виданнях (з них 2 статті у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз), 3 – у інших виданнях, та 14 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі списку умовних скорочень, анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел, що містить 177 посилань, та додатків. Дисертація викладена на 159 сторінках комп'ютерного друку і містить 22 таблиці, 19 рисунків та 2 додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури висвітлено проблему забезпечення України енергетичними ресурсами та показано перспективи створення короткоротаційних плантацій тополь і верб як ефективного та екологічно раціонального джерела відновлюваної енергії; розглянуто особливості мікроклонального розмноження тополі і верби та визначено генетичні, фізіологічні, гормональні та фізичні фактори впливу на процес культивування деревних рослин в культурі *in vitro*. Крім того, в огляді літератури розглянуто дані щодо основних напрямків генетичної трансформації тополь і солестійкості тополь та верб.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами дослідження були клони тополі (*Populus sp.*) та верби (*Salix sp.*) переважно української селекції, що раніше не були досліджені при вирощуванні в енергетичних плантаціях з 3-річним ротаційним циклом. Усього під час сортовипробування було досліджено 24 клони тополь ('Болле', 'Градиська', 'Дельтоподібна', 'Китайська × Пірамідальна', 'Робуста-16', 'Гулівер', 'Тронко', 'Мобільна', 'Лубенська', 'Слава України', 'Новоберлінська-3', 'Стрілоподібна', 'Новоберлінська-7', 'Перспективна', 'Келібердинська', 'Ноктюрн', 'Канадська × Бальзамічна', 'Івантіївська', 'Волосистоплідна', 'Константа', 'Торопогрицького', 'Львівська', 'Роганська', 'Дружба') та 10 клонів верб ('Мавка', 'Лукаш', 'Лісова пісня', 'Олімпійський вогонь', 'Печальна', 'Прибережна', 'Вінницька', 'Верба на біомасу', 'Житомирська-1', 'Житомирська-2'). Клони були отримані в УкрНДІЛГА та НБС ім. М.М. Гришка НАН України. Для порівняння ступеня солестійкості рослин в культурі *in vitro* було також досліджено клони гібридної осики 'INRA 717-1B4', котра є модельним лабораторним клоном, та осики звичайної.

Створення випробних ділянок тополь та верб в польових умовах та в умовах поливного розсадника. Навесні 2014 року на території ДП «Харківська лісова науково-дослідна станція» спільно із співробітниками УкрНДІЛГА закладено сортовипробувальну ділянку для дослідження продуктивності 10 клонів тополі та 3 клонів верби при 3-річному ротаційному циклі за 2-ма схеми посадки: одиничними (1,5 × 1,5 м) та подвійними рядками (1 × 1 м, відстань між парою рядків – 2 м). Сорти в кожній схемі було висаджено в 3-х повторностях по 14 рослин кожна. Поливу ділянки протягом весняно-літнього періоду не проводили.

Навесні 2015 року в НБС ім. М.М. Гришка НАН України. висаджено колекцію швидкорослих дерев, яка включає 20 клонів тополь та 10 клонів верб, більшість з яких були отримані в УкрНДІЛГА. Живці висаджували за схемою 0,5 м × 1,0 м. Полив ділянки протягом весняно-літнього періоду виконували щотижня.

Оцінка росту та розвитку рослин. Щорічні обліки проводили в жовтні, після завершення вегетаційного періоду. Вимірювали товщину пагонів (см), їх висоту (см) та кількість пагонів на рослину. У кожного клону відбирали по 3 рослини для оцінки приросту біомаси та енергетичних показників деревини.

Визначення біоенергетичних показників біомаси клонів дерев та розрахунок продуктивності сортовипробних ділянок. Теплотворну здатність біомаси дослідних зразків, зібраних в кінці першого вегетаційного сезону, визначали у калориметрі ІКА С200. Для аналізу брали усереднену пробу з повітряно-сухої біомаси трьох рослин одного клону. Розрахунок продуктивності плантацій після першого року вегетації проводили виходячи із середньої продуктивності однієї рослини за біомасою (г), оптимальної густоти насадження рослин (0,5×1 м), кількості рослин на 1 Га (20000) та експериментально визначеної теплотворної здатності деревини.

Оцінка екологічного навантаження на довкілля під час спалювання деревини порівняно з природним газом та вугіллям. Для проведення розрахунків за основу брали дані по викидах, що наведені в літературі [Washington State Department of Natural Resources], які перераховували з розрахунку на 1кВт год енергії та будували діаграму з логарифмічною шкалою в полярній системі координат, використовуючи програму Excel. Площі утворених фігур розраховували за формулою:

$$S_i = \frac{1}{2} \cdot \left(x_{1i} \cdot x_{mi} + \sum_{n=1}^{m-1} x_{ni} \cdot x_{(n+1)i} \right) \cdot \sin \frac{2\pi}{m}, \text{ де:}$$

S_i - загальний викид шкідливих речовин в довкілля від спалювання i -го енергоресурсу; m - кількість видів викидів шкідливих речовин у довкілля ($m=7$); x_{ni} - кількість (у мг/кВт·годину); n -го викиду шкідливої речовини від спалювання i -го енергоресурсу.

Поверхнева стерилізація вихідних експлантів та умови культивування асептичних рослин. Клони для введення в культуру *in vitro* обирали виходячи з результатів сортовипробування рослин. Для вибору оптимального режиму знезараження рослинні тканини обробляли різними дезінфікуючими розчинами за наступними схемами:

1. дистильована вода → гіпохлорит натрію, розведений дистильованою водою у співвідношенні 1 : 3 (10 хв.) → 70 %-ий розчин етанолу (1 хв.)
2. дистильована вода → гіпохлорит натрію, розведений дистильованою водою у співвідношенні 1 : 3 (10 хв.) → 70 %-ий розчин етанолу (5 хв.)
3. концентрований мильний розчин (2 хв.) → гіпохлорит натрію, розведений дистильованою водою у співвідношенні 1 : 3 (10 хв.) → 70 %-ий розчин етанолу (1 хв.)

Відбирали не менше 30 експлантів на кожен варіант знезараження.

Для визначення поживних середовищ, що будуть ефективними для вирощування рослин в культурі *in vitro*, асептичні експланти культивували на трьох варіантах поживних середовищ: середовища MS і WPM, модифіковані 0,3 мг/л БАП та 1,86 мг/л НОК, і середовище WPM, модифіковане 0,3 мг/л БАП та 0,1 мг/л ІМК.

Мікроклональне розмноження та пряма регенерація експлантів. Для оцінки регенераційної здатності двох клонів тополь ('Новоберлінська-7' та 'Лубенська') та двох клонів верб ('Житомирська-1' та 'Олімпійський вогонь') було протестовано поживні середовища з різною комбінацією фітогормонів цитокінінового та ауксинового ряду: середовища першого пасажу (MS з 0,2 мг/л БАП та 1 мг/л 2,4-Д і MS з 0,3 мг/л БАП та 1,86 мг/л НОК) та середовища другого пасажу (MS з 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л 2,4-Д і MS з 1 мг/л БАП та 0,3 мг/л НОК). Для кожної групи експлантів на етапі дослідження морфогенного потенціалу визначали: частоти брунькоутворення, пагоноутворення, ризогенезу та калюсогенезу.

Укорінення та адаптація мікропагонів до ґрунтових умов. Для укорінення рослин-регенерантів використовували гормональні (з додаванням 0,1 мг/л ІМК) та безгормональні поживні середовища з різним мінеральним складом, що залежало від особливостей певного клону. Рослини-регенеранти із добре розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов середовища у торф'яних таблетках Jiffy-7 (Данія). Для зменшення стресу від різкого перенесення рослин до середовища із меншою вологістю, ніж в лабораторній культурі, рослини адаптували до ґрунтових умов поступово.

Оцінка солестійкості клонів тополь та верб. Солестійкість тополі тремтячої (*Populus tremula*), гібридної тополі клону 'INRA 717-184' (*P. tremula* × *P. alba*) та верби клону 'Олімпійський вогонь' (*Salix alba* × *S. fragilis*) оцінювали за дії хлориду натрію (25 мМ, 50 мМ та 100 мМ) при культивуванні на модифікованому середовищі MS (Murashige & Skoog medium, Duchefa, Нідерланди) із додаванням 0,1 мг/л ІМК та вмістом сахарози 30 г/л. Стан рослин, інтенсивність їх росту (за довжиною пагона) та коренеутворення (за кількістю коренів) оцінювали на 10-й, 30-й та 60-й день культивування. Контрольні рослини вирощували на вільному від хлориду натрію середовищі. Для кожного варіанту дослідження було використано по десять експлантів.

Агробактеріальна трансформація та молекулярно-генетичний аналіз трансформованих рослин. Для генетичної трансформації гібридної тополі (*P. nigra* × *P. deltoides*) клону 'Градиська' використовували агробактерії штаму LBA4404/pAV04 з селективним геном неоміцинофосфотрансферази II *E. Coli* (*NPTII*), та геном цинамілалкоголь дегідрогенази (*CAD*), що залучений до біосинтезу лігніну (рис. 1) [Libantova et al., 2002].

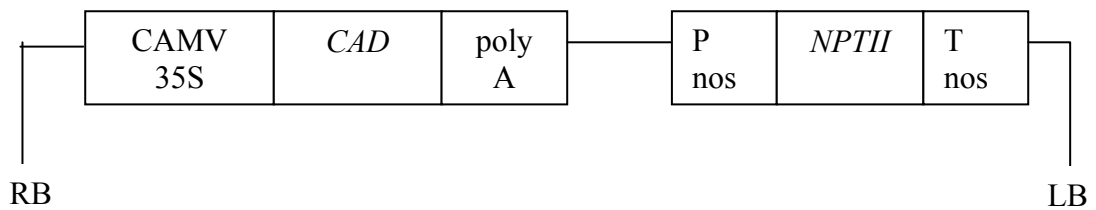


Рис 1. Схема генетичної конструкції рAV04 [Libantova et al., 2002]. Позначення: CAMV 35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *CAD* – 8-цинамілалкоголь дегідрогеназа; poly A – сигнал поліаденілування; *NPT II* – ген неоміцинфосфотрансферази II *E. coli*; P nos, T nos – промотор і термінатор гена нопалінсинтази; RB та LB – повтори, які обмежують Т-область.

Регенерацію та селекцію експлантів проводили на середовищах з канаміцином. ДНК рослин, що пройшли селективний відбір, досліджували на наявність гену *CAD* методом ПЛР. Продукти ПЛР розділяли в 0,8 %-му агарозному гелі.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ростові характеристики тополь і верб в польових умовах. Після першого року вирощування рослин було оцінено приживлюваність, загальний стан, ступінь кущіння, а також біометричні параметри (висота, діаметр, суха маса рослин) досліджуваних клонів тополь та верб. Приживлюваність живців значно відрізнялась у різних клонів і була найнижчою у тополь 'Константа' ($47,6 \pm 5,5$ %), 'Роганська' ($48,2 \pm 5,5$ %) і верби 'Прибережна' ($50,6 \pm 5,5$ %) та найвищою у тополі 'Стрілоподібна' ($84,3 \pm 4,0$ %). Досліджені клони значно відрізнялися між собою за інтенсивністю росту (рис. 2). За сукупністю проаналізованих ознак на кінець третього року вегетації до перспективних для вирощування в короткоротаційних плантаціях можна віднести тополі 'Слава України', 'Дружба', 'Новоберлінська-3' та 'Роганська'. Усі досліджувані клони верби виявили високі показники ростової активності, статистично достовірної різниці між клонами не виявлено. Найнижчі показники ростової активності продемонстрували тополі 'Константа', 'Львівська' та 'Ноктюрн'.

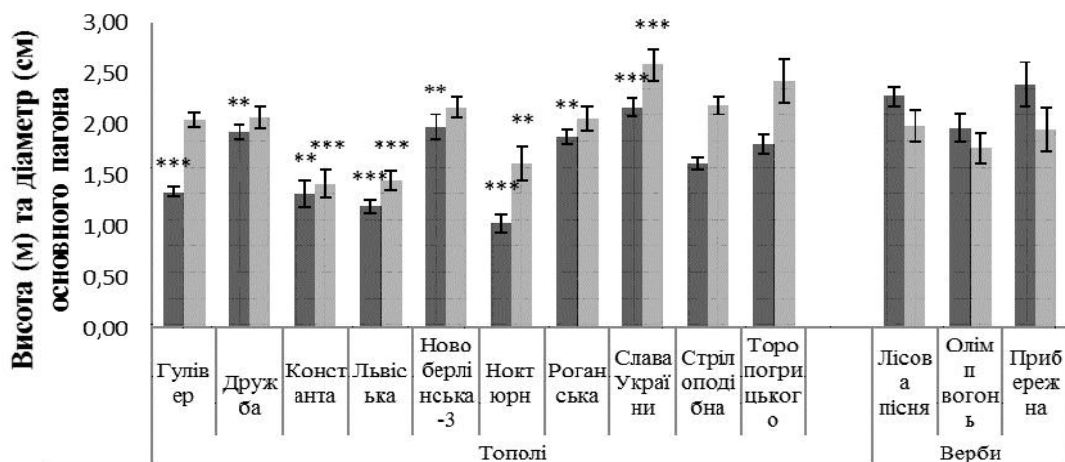


Рис. 2. Ростова активність (за висотою і діаметром стебла) клонів тополь і верб в кінці третього року вегетації за вирощування в короткоротаційній дослідній плантації. Відхилення статистично значимі порівняно із середніми рівнями: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ростові характеристики тополь і верб умовах поливного розсадника.

Дослідження, проведені на випробній ділянці в НБС, показали, що при використанні живців як садивного матеріалу для закладення плантації важливим критичним фактором першого року вегетації є вологість ґрунту, яка має вирішальний вплив на приживаність рослин. В кінці першого вегетаційного періоду висота рослин різних клонів значно варіювала і становила від $74 \pm 12,7$ см до $219 \pm 14,8$ см у тополь та від $131 \pm 7,0$ до $238 \pm 7,0$ см у верб. Діаметр пагонів тополь сягав $8 \pm 0,8$ – $19 \pm 1,0$ мм, верб – $4 \pm 0,2$ – $17 \pm 0,5$ мм. При припиненні поливу на другий рік вегетації рослини не знижували темпів росту.

Зразок верби ‘Житомирська-1’ показав найбільш інтенсивний ріст з усіх проаналізованих клонів швидкорослих дерев. До перспективних можна віднести клони тополь ‘Волосистоплідна’, ‘Келібердинська’, ‘Новоберлінська-7’, ‘Івантійська’, гібрид ‘Канадська × Бальзамічна’, ‘Ноктюрн’, ‘Перспективна’, ‘Слава України’, ‘Гулівер’, ‘Стрілоподібна’ та верб ‘Житомирська-2’, ‘Вінницька’ і ‘Печальна’.

Оцінка теплоенергетичних показників рослин, продуктивності випробних ділянок та їх енергетичні еквіваленти.

Експериментально визначені енергетичні показники зразків деревної біомаси порівнювали із стандартами ENplus (2013) для пелет, за якими їх теплотворна здатність має бути не нижче 16 МДж/кг, а зольний залишок – від 0,7 до 3 % залежно від категорії пелет. Отримані нами дані аналізу теплоенергетичних характеристик деревини після першого року вегетації рослин свідчать, що за вмістом енергії всі зразки повністю задовольняють вимоги європейських стандартів ENplus (від 17,9 до 19,4 МДж/кг). Водночас, деякі клони тополі та верби не відповідали стандартам для пелет в ЄС за вмістом золи.

За результатами аналізу показників ростової активності клонів та теплоенергетичних характеристик деревини показано, що вирощуючи тополі ‘Канадська × Бальзамічна’ і ‘Келібердинська’ та верби ‘Житомирська-1’ і ‘Житомирська-2’ за схемою посадки $0,5 \times 1$ м можна отримати після першого року вирощування з 1 Га від 30 до 70 ГДж теплової або від 8 до 19 МВт електричної енергії. Використання деревної біомаси з рослин після третього року вирощування, як рекомендовано технологіями короткоротаційного лісівництва, дозволить не лише підвищити теплотворну здатність біопалива, а й знизити зольність.

Кількісна та якісна оцінки викидів шкідливих речовин під час спалювання деревини порівняно з природним газом та вугіллям. З метою аналізу екологічної складової в дослідженні запропоновано напівкількісний метод, який дозволяє комплексно оцінити переваги та ризики використання того чи іншого джерела енергії. Розраховано, що викид шкідливих речовин у довкілля від використання різних видів палива суттєво збільшується в ланцюжку: деревина → природний газ → вугілля, в основному завдяки збільшенню викидів вуглекислого газу. Безперечно, подібні оцінки потребують більш глибоко дослідження та впровадження системи коефіцієнтів, що дозволить врахувати ступінь негативних чи позитивних наслідків від

використання енергоресурсу. Така система дозволить комплексно порівнювати економічні вигоди та екологічні небезпеки від використання енергоресурсу в одній системі координат, а запропонований нами підхід є першим кроком в розробці такої комплексної оцінки.

Введення клонів тополь та верб в культуру *in vitro*. Для введення рослин в культуру *in vitro* було підбрано умови поверхневої стерилізації та мікроклонального розмноження, ефективність яких становить 78% та 93 %, відповідно.

При введенні рослин в культуру *in vitro* вкрай важливим є ефективність етапу знезараження вихідного матеріалу, оскільки від правильного підбору комбінації дезінфікуючих розчинів та часу експозиції буде залежати виживаність експлантів та їх подальша здатність до калюсогенезу і мультиплікації. Встановлено, що оптимальною для поверхневої стерилізації експлантів тополь та верб є тріступінчата обробка розчинами мила, гіпохлориту натрію та етилового спирту за часу експозиції 2 хв, 10 хв та 1 хв., відповідно (рис.3). Результати експерименту з визначення оптимального складу поживного середовища показали, що при вирощуванні асептичних експлантів на середовищі WPM, модифікованому 0,3 мг/мл БАП та 0,1 мг/мл ІМК разом з активацією апікальних та пазушних меристем, спостерігали індукцію ризогенезу майже у всіх досліджуваних клонів.

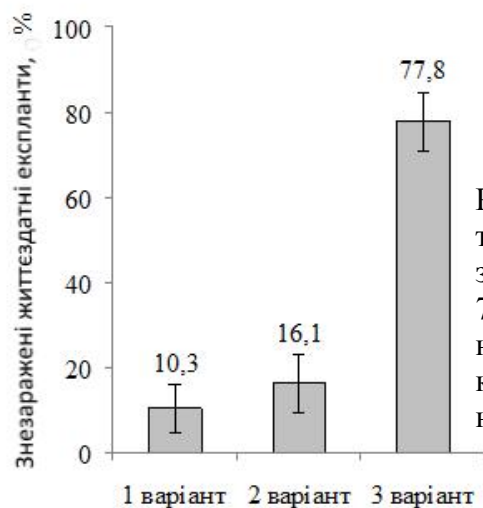


Рис 3. Вихід знезаражених життєздатних експлантів тополі та верби при використанні різних варіантів знезараження: 1 варіант - розчин гіпохлориту натрію, 70%-й етанол, 1 хв; 2 варіант - розчин гіпохлориту натрію, 70%-й етанол, 5 хв; 3 варіант – концентрований мильний розчин, розчин гіпохлориту натрію, 70%-й етанол, 1 хв.

За використання даної методики в культуру *in vitro* було введено 5 клонів тополі ('Новоберлінська-3', 'Новоберлінська-7', 'Лубенська', 'Волосистоплідна', 'Роганська') та 5 клонів верби ('Житомирська-1', 'Олімпійський вогонь', 'Лукаш', 'Печальна', 'Прибережна'), які є перспективними для відновлюваної енергетики.

Меристемна регенерація. Для проведення досліджень в культурі *in vitro* (генетичної модифікації, оцінки впливу стресових факторів) важливим є постійна мультиплікація рослинного матеріалу, регенерація та підтримання в культурі *in vitro* вже існуючих в лабораторії клонів рослин. З метою мультиплікації пагонів в культурі *in vitro* шляхом прямого морфогенезу було протестовано регенераційну здатність тополь і верб та розроблено схеми меристемної регенерації рослин з листових, стеблових та черешкових

експлантів двох клонів тополь ('Новоберлінська-7' і 'Лубенська') та двох клонів верб ('Житомирська-1' і 'Олімпійський вогонь'). Здатність до меристемної регенерації залежала від комбінації концентрацій регуляторів росту та типу експланту (рис. 4).

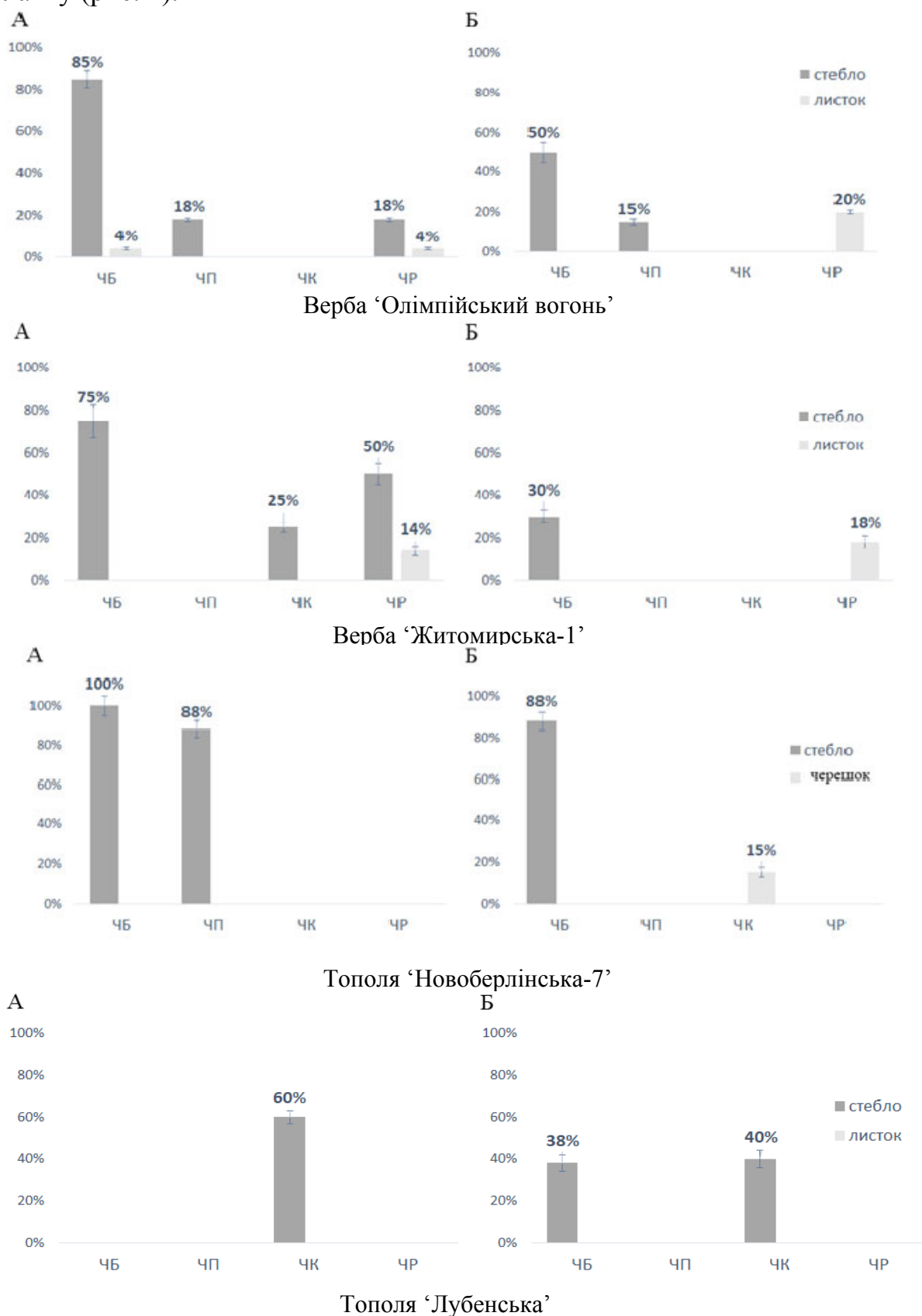


Рис. 4. Регенераційна здатність експлантів тополь та верб на поживних середовищах: А- MS 0,2 мг/л БАП+1 мг/л 2,4-Д; Б - MS 0,3 мг/л БАП+1,86 мг/л НОК. Позначення: ЧБ – частота

утворення бруньок, ЧП – частота утворення пагонів, ЧК – частота утворення калюсу, ЧР – частота ризогенезу

Найбільшу регенераційну здатність спостерігали у стеблових експлантів (38-100 %) всіх досліджуваних клонів рослин. Черешкові та листкові експланти показали нижчу здатність до регенерації (4-15 %) на досліджених поживних середовищах. Більшість листкових експлантів верб загинули, в той час як листкові експланти тополь лишались життєздатними.

Після місяця культивування на наведених вище середовищах всі життєздатні експланти переносили на середовища зі зміненим співвідношенням гормонів БАП, 2,4-Д та НОК. Зміна якісного та кількісного складу фітогормонів у поживному середовищі по різному вплинула на дедиференціацію, диференціацію та морфогенез тканин різних видів експлантів та клонів тополь і верб (рис.5). Найвищі частоти регенерації експлантів отримано за використання схем культивування, що наведені в таблиці 2.

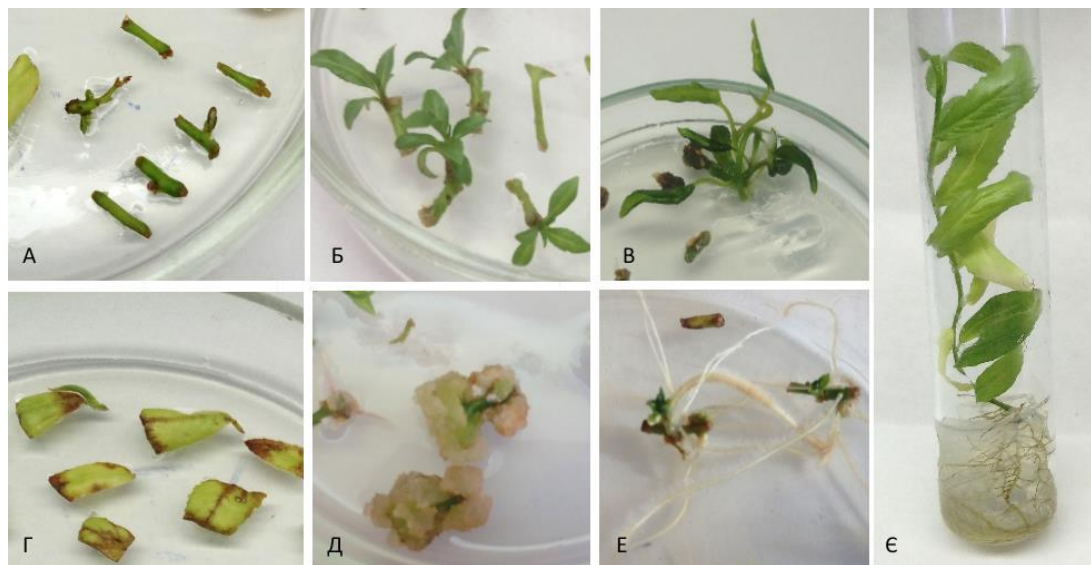


Рис. 5 Отримання рослин-регенерантів *Populus* та *Salix* з ізольованих тканин в культурі *in vitro*: А – індукція бруньок у стеблових експлантів верби ‘Олімпійський вогонь’; Б – початок утворення мікропагонів тополі ‘Новоберлінська-7’; В – сформовані мікропагони тополі ‘Роганська’; Г – початок некрозу листкових експлантів верби ‘Олімпійський вогонь’; Д – калюсогенез листкових експлантів тополі ‘Лубенська’; Е – ризогенез стеблових експлантів верби ‘Житомирська-1’; Є – вкорінена рослина-регенерант верби ‘Житомирська-1’.

Таблиця 2

Рекомендовані схеми прямої регенерації клонів тополь та верб

Клон	Етап 1	Етап 2
‘Олімпійський вогонь’	MS 0,2 мг/л БАП+1 мг/л 2,4-Д	MS 1 мг/л БАП+0,5 мг/л 2,4-Д
‘Житомирська -1’	MS 0,3 мг/л БАП+1,86 мг/л НОК	MS 1 мг/л БАП+0,5 мг/л 2,4-Д
‘Новоберлінська-7’	MS 0,2 мг/л БАП+1 мг/л 2,4-Д	
‘Лубенська’	MS 0,3 мг/л БАП+1,86 мг/л НОК	MS 1 мг/л БАП+0,3 мг/л НОК

Важливим етапом мікроклонального розмноження є вкорінення регенерованих пагонів в культурі *in vitro*. Для підтримання рослин в культурі *in vitro*, по можливості, варто застосовувати безгормональні поживні середовища для зниження рівня генетичної мінливості. Однак, деякі клони погано вкорінюються на таких середовищах. Додавання до складу поживного середовища невеликих кількостей ІМК стимулює утворення коренів мікропагонами. На вкорінення рослин в культурі *in vitro* також впливає мінеральний склад поживних середовищ. Поживні середовища, рекомендовані для укорінення та підтримки деяких клонів тополь та верб в лабораторній культурі, наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Поживні середовища, рекомендовані для укорінення та підтримки *in vitro* деяких клонів тополь та верб

Клон	Живильне середовище				
	WPM	MS	PM	Безгормональне	Гормональне (0,1 мг/л ІМК)
<i>Populus nigra</i> cv. 'Традизька'	+	-	-	-	+
<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i> cv. 'INRA 717-1B4'	-	-	+	-	+
<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> cv. 'INRA 353-38'	-	+	-	-	+
<i>P. tremula</i>	+	-	+	+	-
<i>P. pyramidalis</i> × <i>P. trichocarpa</i> cv. 'Лубенська'	+	-	-	+	-
<i>P. pyramidalis</i> × <i>P. laurifolia</i> cv. 'Новоберлінська-7'	+	-	-	-	+
<i>S. alba</i> × <i>S. fragilis</i> cv. 'Олімпійський вогонь'	+	-	+	+	-
<i>Salix</i> sp. cv. 'Житомирська-1'	+	-	+	+	-

Примітка: "+" – поживне середовище рекомендоване для культивування клону *in vitro*

"-" - поживне середовище не рекомендоване для культивування клону *in vitro*

У разі одержання посадкового матеріалу деревних рослин методом мікроклонального розмноження важливим етапом є адаптація рослин регенерантів до умов *in vivo*. Рослини, вирощені *in vitro*, на відміну від рослин, одержаних у теплицях або відкритому ґрунті, мають ніжне листя з дуже тонкою кутикулою, що швидко висихає при нормальній вологості повітря. Після висаджування регенерантів з культуральних баночок у теплицю різке зниження вологості призводить до водного стресу, внаслідок чого рослини гинуть. Поступове ж зниження вологості повітря гальмує процеси випаровування й сприяє утворенню нових фотосинтезуючих листків, відмінних від сформованих *in vitro*. Застосування торф'яних таблеток Jiffy-7 та поліетиленових пакетів із застіркою показало свою ефективність для укорінення регенерантів *in vivo*.

Оцінка солестійкості клонів тополь та верб. З метою порівняння солестійкості представників *Populus* та *Salix* було досліджено рослини тополі тремтячої (*Populus tremula*), гібридної тополі клону 'INRA 717-1B4' (*P.*

tremula × *P. alba*) та верби клону ‘Олімпійський вогонь’ (*Salix alba* × *S. fragilis*) в умовах культури *in vitro* за концентрації хлориду натрію в поживному середовищі 25, 50 та 100 мМ. Отримані результати показують, що ступінь солестійкості рослин суттєво відрізняється у різних генотипів (рис. 6).

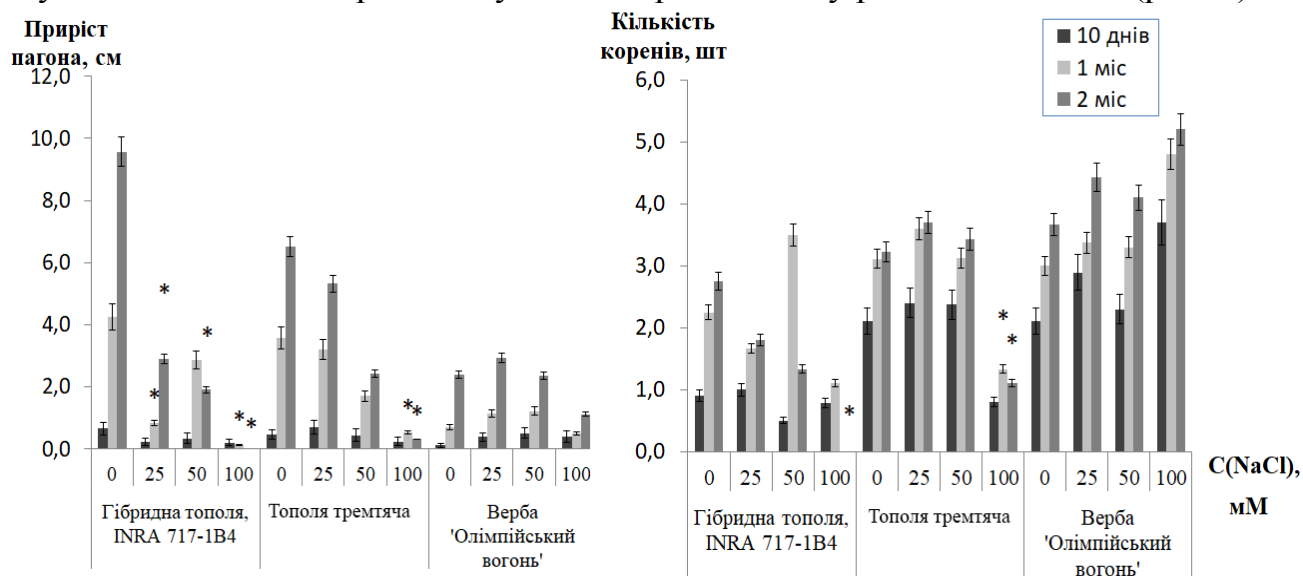


Рис. 6 Вплив хлориду натрію на приріст пагона та коренеутворення у клонів тополь та верби (* $p < 0,05$)

У рослин гібридної тополі клону ‘INRA 717-1B4’ зниження інтенсивності ростової активності спостерігали при довготривалому вирощуванні у всіх досліджуваних концентраціях хлориду натрію. Достовірне зниження приросту пагона на 94,3% у порівнянні з контролем у рослин тополі тремтячої відмічено лише на поживному середовищі за концентрації NaCl 100 мМ після двох місяців культивування. Достовірних відмінностей у прирості пагона у верби за дії різних концентрацій хлориду натрію не виявлено. Статистично достовірне зниження інтенсивності ризогенезу після 1-го та 2-ох місяців культивування показали лише клони тополі тремтячої за вмісту 100 мМ хлориду натрію в поживному середовищі. Загалом, у верби виявлена більша інтенсивність коренеутворення порівняно з клонами тополь. Встановлено, що солестійкість досліджених клонів збільшується наступним чином: гібридна тополя (*P. tremula* × *P. alba*) клону ‘INRA 717-184’ → тополя тремтяча (*P. tremula*) → верба (*Salix alba* × *Salix fragilis*) клону ‘Олімпійський вогонь’.

Генетична трансформація та молекулярно-генетичний аналіз. В результаті проведеної агробактеріальної трансформації конструкцією pAV04 гібридної тополі *P. nigra* × *P. deltoides* клону ‘Градиська’ та застосування методу ступінчастої селекції отримано лінію трансгенних рослин. За допомогою ПЛР виявлено, що ця лінія містить в геномі ген цинамілалкоголь дегідрогенази (рис. 7).

При експресії гену цинамілалкоголь дегідрогенази, такі рослини матимуть підвищений вміст лігніну, та, як наслідок - покращену механічну стійкість деревини, стійкість до фітопатогенів та підвищену теплотворну здатність деревини.

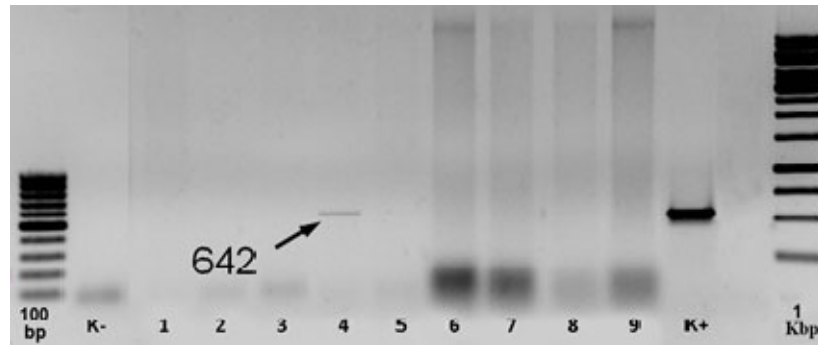


Рис. 7 ПЛР-аналіз рослин тополі, трансформованих конструкцією pAV04 з геном цинамілалкоголь дегідрогенази (*CAD*). 100 bp, 1 Kbp – маркери (Fermentas); K- - контроль, вода; K+ - позитивний контроль, плазміда AV04; 1 – контрольна рослина *P. nigra* × *P. deltoides*, клон ‘Градизька’; 2-9 – трансформовані рослини; 4 – рослина *P. nigra* × *P. deltoides* з ПЛР- продуктом 642 п.н.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.

В розділі наведено узагальнення відомостей наукової літератури і власних досліджень стосовно важливості оцінки перспективності клонів тополь та верб для вирощування в енергетичних плантаціях з 3-річним ротаційним циклом. Розроблені у дослідженні біотехнологічні методики введення клонів в культуру *in vitro*, їх мікроклонального розмноження та меристемної регенерації дають можливість прискорення накопичення високоякісного посадкового матеріалу для створення енергетичних плантацій та всебічного дослідження клонів в лабораторній культурі. Відпрацьована методика оцінки солестійкості клонів дозволяє визначити солестійкі клони для раціонального використання засоленних сільськогосподарських угідь для забезпечення країни енергоресурсами. Методика агробактеріальної трансформації та ступінчастої селекції дають можливість створення трансгенних рослин з бажаними ознаками, що має важливе наукове значення. Із застосуванням цих методик нами отримано лінію трансгенних рослин гібридної тополі *P. nigra* × *P. deltoides* клону ‘Градизька, що містить ген цинамілалкоголь дегідрогенази.

ВИСНОВКИ

1. В роботі показано перспективність вирощування швидкорослих дерев *Populus* та *Salix* в Україні з метою отримання біомаси для відновлюваної енергетики в плантаціях з короткою ротацією, що обумовлено їх високою біопродуктивністю, значною якістю енергетичних параметрів деревини та екологічними перевагами використання.

2. На сортовипробних ділянках швидкорослих дерев *Populus sp.* та *Salix sp.* з короткою ротацією оцінено продуктивність плантацій для 21 клону тополь та 9 клонів верб на основі визначення їх приживлюваності, морфометричних характеристик рослин та теплотворної здатності деревини. Встановлено, що найбільшою інтенсивністю росту в польових умовах характеризуються клони тополь ‘Слава України’, ‘Дружба’, ‘Новоберлінська-3’ та ‘Роганська’; в умовах штучного зволоження ґрунту – тополі ‘Волосистоплідна’, ‘Келібердинська’, ‘Новоберлінська-7’, ‘Канадська ×

Бальзамічна', 'Тронко' та верби 'Житомирська-1', 'Житомирська-2', 'Вінницька'.

3. Показано, що вирощуючи тополі 'Канадська × Бальзамічна' і 'Келібердинська' та верби 'Житомирська-1' і 'Житомирська-2' в короткоротаційних плантаціях, можна отримати з 1 Га від 30 до 70 ГДж теплової або від 8 до 19 МВт електричної енергії вже після першого року вирощування рослин.

4. Запропоновано напівкількісний метод візуалізації даних, який дозволяє комплексно оцінити переваги та ризики використання того чи іншого джерела енергії.

5. З метою розширення колекції *in vitro* швидкорослих клонів тополь та верб підібрано умови поверхневої стерилізації та введення рослин в культуру *in vitro*, ефективність яких становить 78 % та 93 %, відповідно. За використання розробленої методики введено в культуру *in vitro* та мультіпліковано шляхом мікроклонального розмноження 5 клонів тополі та 5 клонів верби.

6. Рекомендовано схеми прямої регенерації рослин з листкових, стеблових та черешкових експлантів двох клонів тополь ('Новоберлінська-7' і 'Лубенська') та двох клонів верб ('Житомирська-1' і 'Олімпійський вогонь').

7. В культурі *in vitro* досліджено стійкість до засолення поживного середовища хлоридом натрію двох клонів тополь та одного клону верби. Встановлено, що солестійкість досліджених клонів збільшується наступним чином: гібридна тополя (*P. tremula* × *P. alba*) клону 'INRA 717-1B4' → тополя тремтяча (*P. tremula*) → верба (*Salix alba* × *Salix fragilis*) клону 'Олімпійський вогонь'.

8. Проведено агробактеріальну трансформацію гібридної тополі (*P. nigra* × *P. deltoides*) генетичною конструкцією pAV04 та отримано лінію рослин, що містить ген 8-цинамілалкоголь дегідрогенази, експресія якого може збільшувати вміст лігніну в деревині. Наявність гена *CAD* в геномі тополі підтверджена за допомогою ПЛР аналізу.

СПИСОК РОБІТ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Худолєєва Л.В. Порівняння солестійкості представників родів *Populus* і *Salix* в умовах *in vitro* / [Худолєєва Л.В., Куцоконь Н.К.] // ScienceRise: Biological Science. – 2018. – №. 2 (11). – С. 35-38. *Особистий внесок здобувача: проведено порівняння солестійкості представників родів Populus і Salix, підготовано матеріал до друку.*
2. Оцінка ростових показників однорічних клонів тополі та верби на короткоротаційній плантації в Харківській області / [Куцоконь Н.К., Худолєєва Л.В., Лось С.А., Висоцька Н.Ю., Торосова Л.О., Ткач В.П., Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М.] // Біологічні студії. – 2018 - Т. 12, Вип 1 – С. 55-64. *Особистий внесок здобувача: визначення ростових параметрів рослин та аналіз результатів дослідження, підготовано матеріал до друку.*
3. Ростові характеристики та енергопродуктивність тополь і верб у короткоротаційній плантації за перший рік вегетації / [Куцоконь Н.К.,

- Рахметов Д.Б., Худолеєва Л.В., Рахметова С.О., Фіщенко В.В., Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М.] // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи) – 2017 - Т. 9, Вип. 2 - С. 238-246. *Особистий внесок здобувача: визначено ростові та теплоенергетичні параметри рослин, підготовано матеріал до друку.*
4. Введення в культуру *in vitro* клонів тополь та верб перспективних для відновлюваної енергетики / [Худолеєва Л.В., Куцоконь Н.К., Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М., Дуган О.М.] // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). - 2017 – Т.9, Вип.1 - С. 18-22. *Особистий внесок здобувача: визначено умови поверхневої стерилізації та культивування рослин в культурі *in vitro*, підготовано матеріал до друку.*
 5. Кількісні та якісні оцінки викидів шкідливих речовин до повітря під час спалювання деревини порівняно з природним газом і вугіллям / [Худолеєва Л.В., Куцоконь Н.К., Рашидов Н.М., Дуган О.М.] // Біологічні студії. - 2016 - Т.10, Вип 3- С. 61-70. *Особистий внесок здобувача: проведено аналіз літературних даних та запропоновано математичну модель оцінки узагальненого викиду шкідливих речовин, підготовано матеріал до друку.*
 6. Мікроклональне розмноження для створення плантацій швидкорослих тополь для потреб альтернативної енергетики / [Худолеєва Л.В., Куцоконь Н.К., Нестеренко О.Г., Рудас В.А., Рашидов Н.М., Гродзинський Д.М., Дуган О.М., Бульботка К.С.] // Вісник УТГіС. – 2014 - Т.12, Вип. 2–С.226-233. *Особистий внесок здобувача: визначено умови мікроклонального розмноження тополь, підготовано матеріал до друку.*
 7. Створення в Україні короткоротаційної дослідної плантації тополь і верб для потреб альтернативної енергетики / Куцоконь Н.К., Лось С.А., Ткач В.П., Висоцька Н.Ю., Торосова Л.О., Нестеренко О.Г., Худолеєва Л.В., Гродзинський Д.М., Рашидов Н.М. // Матеріали наукової конференції “Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив», Київ, 9-11 вересня, 2014. – С. 58 – 62. *Особистий внесок здобувача: участь у створенні короткоротаційної дослідної плантації, оцінка морфометричних характеристик рослин.*
 8. Генетична трансформація тополь для використання їх як біопалива / Куцоконь Н.К., Худолеєва Л.В., Нестеренко О.Г., Рудас В.А., Рашидов Н.М. // Матеріали наукової конференції “Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив», Київ, 9-11 вересня, 2014. – С. 54 – 58. *Особистий внесок здобувача: проведено генетичну трансформацію осокора, підготовано матеріал до друку.*
 9. Khudolieieva L. *In vitro* cultivation of *Populus* and *Salix* spp. / Khudolieieva L., Sheikina A, Kutsokon N. // The 4-rd Intern. Sympos. On EuroAsian Biodiversity, Kyiv, Ukraine, 3-6 July 2018. – P. 377. *Особистий внесок здобувача: доповнено колекцію клонів тополь та верб, підготовлено матеріал до друку.*

10. Худолєєва Л.В. Вплив сольового стресу на ростові параметри тополі та верби в культурі *in vitro* / Худолєєва Л.В., Хома Ю.А., Куцоконь Н.К. // Збірник тез міжнародної науково-практичної конференції за участю ФАО «Кліматичні зміни та сільське господарство. Виклики для аграрної науки та освіти», Київ, 13-14 березня, 2018. – С. 791. *Особистий внесок здобувача: розглянуто проблему засолення ґрунтів у контексті глобальних змін клімату, визначено вплив хлориду натрію на досліджувані рослини, підготовано матеріал до друку.*
11. Інтродукція клонів *Populus* та *Salix* в культуру *in vitro* / Худолєєва Л., Куцоконь Н., Рашидов Н., Нестеренко О., Дуган О., Сакада В. // Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Луцьк, 5 – 10 вересня, 2017. – С. 103. *Особистий внесок здобувача: визначено умови поверхневої стерилізації та культивування рослин в культурі *in vitro*, підготовано матеріал до друку.*
12. The establishment of fast-growing trees into *in vitro* collection / Kutsokon N., Khudolieieva L., Libantova J., Rashydov N. // The 3-rd Intern. Sympos. On EuroAsian Biodiversity, Minsk, Belarus, 5-8 July 2017. – P. 466. *Особистий внесок здобувача: визначено умови поверхневої стерилізації та культивування рослин в культурі *in vitro*.*
13. Оцінка солестійкості гібридної осики в умовах *in vitro* / Худолєєва Л.В., Куцоконь Н.К., Рашидов Н.М., Дуган О.М. // "Біотехнологія ХХІ століття": матеріали ХІ Всеукраїнської науково-практичної конференції., Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, Вид-во "Політехніка", 21 квітня 2017. - 188 с. *Особистий внесок здобувача: досліджено солестійкість гібридної осики в культурі *in vitro*, підготовлено матеріал до друку.*
14. Худолєєва Л.В. Короткоротаційні плантації тополь та верб: підходи до зниження впливу на глобальні зміни клімату / Худолєєва Л.В., Куцоконь Н.К. // Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», Херсон, 29 червня – 3 липня, 2016. – С. 65-66. *Особистий внесок здобувача: проведено аналіз літературних джерел та оцінено можливості зниження навантаження на довкілля при створенні короткоротаційних плантацій тополь та верб, підготовано матеріал до друку.*
15. Худолєєва Л.В. Переваги використання твердого біопалива для України / Худолєєва Л.В., Куцоконь Н.К., Рашидов Н.М. // Матеріали наукової конференції «Лісівнича наука в контексті сталого розвитку», Харків, 29–30 вересня, 2015. – С. 172-173. *Особистий внесок здобувача: проведено аналіз літературних джерел та визначено переваги використання твердого біопалива, підготовано матеріал до друку.*
16. Оцінка біопаливних характеристик клонів тополь та верб за теплою згорання / Куцоконь Н.К., Гродзинський Д.М., Рашидов Н.М., Худолєєва Л.В., Рахметов Д.Б., Фіщенко В.В. // Матеріали наукової конференції «Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах та дендропарках», Київ, 15–17 вересня, 2015. – С. 144-

145. *Особистий внесок здобувача: визначено теплотворну здатність різних клонів тополь та верб, підготовлено матеріал до друку.*
17. Худолєєва Л.В. Екологічні переваги використання деревини як альтернативного джерела енергії / Худолєєва Л.В., Куцоконь Н.К., Дуган О.М. // Біотехнологія XXI ст. Тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченій 170-й річниці від дні народження І.І. Мечникова, Київ, 24 квітня, 2015. – С.163. *Особистий внесок здобувача: проведено аналіз літературних джерел та визначено екологічні переваги використання твердого біопалива, підготовано матеріал до друку.*
 18. Енергетична цінність тополь, як альтернативного джерела теплової енергії / Бульботка К.С., Худолєєва Л.В., Куцоконь Н.К., Дуган О.М. // Біотехнологія XXI ст. Тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченій 170-й річниці від дні народження І.І. Мечникова, Київ, 24 квітня, 2015. – С.140. *Особистий внесок здобувача: підготовлено матеріал до друку*
 19. Худолєєва Л.В. Швидкорослі плантації тополь як можлива складова зеленої енергетики України / Худолєєва Л.В., Куцоконь Н.К., Нестеренко О.Г. // Актуальні проблеми ботаніки та екології. Матеріали міжнар. конф. молодих учених., Умань, 9-12 вересня, 2014. – С. 163–164. *Особистий внесок здобувача: проведено аналіз літературних джерел та підготовлено матеріал до друку.*
 20. Дев'яткіна Л.В. Генетична трансформація тополь для використання їх в альтернативній енергетиці / Дев'яткіна Л.В., Нестеренко О.Г., Куцоконь Н.К. // Біотехнологія XXI століття, Тези доп. VII Всеукраїнської наук.-практ. конф., 24 квітня, 2013 року. – С. 198. *Особистий внесок здобувача: проведено генетичну трансформацію, проведено аналіз літературних джерел та підготовлено матеріал до друку.*
 21. Дев'яткіна Л.В. Перспективність плантаційного вирощування тополь в Україні / Дев'яткіна Л.В. // Збірка тез доповідей XV Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія. Людина. Суспільство», Київ, Україна 28-30 вересня 2012 р.— с. 148. *Особистий внесок здобувача: проведено аналіз літературних джерел та підготовлено матеріал до друку.*
 22. Куцоконь Н.К. Особливості мікроклонального розмноження та перспективи використання тополь для енергетичних потреб / Куцоконь Н.К., Нестеренко О.Г., Дев'яткіна Л.В. // Матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. «Біотехнологія XXI ст.», Київ, Україна, 5 квітня 2012. – С. 65. *Особистий внесок здобувача: проведено аналіз літературних джерел.*

АНОТАЦІЯ

Худолєєва Л.В. Біотехнологічні аспекти вирощування короткоротаційних плантацій *Populus* та *Salix* в Україні. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 "Біотехнологія". – Національний технічний університет

України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, Київ, 2019.

Зміст анотації. У дисертаційній роботі в польових умовах та в умовах штучного зволоження ґрунту оцінено рости та енергетичні характеристики клонів тополь та верб і запропоновано клони, перспективні для створення короткоротаційних плантацій. Оптимізовано протоколи поверхневої стерилізації та введення швидкорослих клонів тополь і верб в культуру *in vitro* та запропоновано схеми меристемної регенерації. Досліджено стійкість клонів тополь та верб до засолення поживного середовища хлоридом натрію. Проведено агробактеріальну трансформацію гібридної тополі (*P. nigra* × *P. deltoides*) генетичною конструкцією pAV04 та отримано лінію рослин, що містить ген 8-цинамилалкоголь дегідрогенази, експресія якого може збільшувати вміст лігніну в деревині. Наявність гена *CAD* в геномі тополі підтверджена за допомогою ПЛР аналізу.

Ключові слова: *Populus sp.*, *Salix sp.*, культура *in vitro*, мікроклональне розмноження, генетична трансформація, короткоротаційні енергетичні плантації, відновлювана енергетика, біопаливо, солестійкість, хлорид натрію.

АННОТАЦИЯ

Худолеева Л.В. Биотехнологические аспекты выращивания короткоротационных плантаций *Populus* и *Salix* в Украине. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 «Биотехнология». - Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского» МОН Украины, Киев, 2019.

В диссертационной работе в полевых условиях и в условиях искусственного полива почвы проанализированы ростовые и энергетические характеристики клонов тополей и ив и предложены клоны, перспективные для создания короткоротационных плантаций. Подобраны условия поверхностной стерилизации и введения быстрорастущих клонов тополей и ив в культуру *in vitro*, а также предложены схемы меристемной регенерации. Исследована устойчивость клонов тополей и ив к засолению питательной среды хлоридом натрия. Проведена агробактериальная трансформация гибридного тополя (*P. nigra* × *P. deltoides*) генетической конструкцией pAV04 и получена линия растений, которые содержат ген 8-цинамилалкоголь дегидрогеназы, экспрессия которого может увеличивать содержание лигнина в древесине. Наличие гена *CAD* в геноме тополя подтверждено методом ПЦР анализа.

Ключевые слова: *Populus sp.*, *Salix sp.*, культура *in vitro*, микроклональное размножение, генетическая трансформация, короткоротационные энергетические плантации, возобновляемая энергетика, биотопливо, солеустойчивость, хлорид натрия.

SUMMARY

Khudolieieva L. V. Biotechnological aspects of cultivation of *Populus* and *Salix* short-rotation plantations in Ukraine. - Qualification scientific work manuscript copyright.

Dissertation for a degree of the Candidate of Biological Sciences in speciality 03.00.20 – Biotechnology – the National Technical University of Ukraine «Ihor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», the Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2019.

The dissertation contains the study on creation of poplars and willows callus cultures, and genetic, physiological, hormonal and physical factors, which influence on the process of microclonal propagation of woody plants. The analysis of salt tolerance of poplar and willow was carried out and the perspectives of growing these trees in short-rotation plantations as an effective and environmentally safe source of renewable energy are shown in the paper.

The objects of the study were poplar (*Populus sp.*) and willow (*Salix sp.*) clones, mainly of the Ukrainian breeding. In total, 24 clones of poplar and 10 clones of willow were investigated in current work.

According to the intensity of the growth characteristics, the clones, which are perspective for cultivation in short-rotation energy plantations, have been determined and the productivity of plantations for analyzed clones has been calculated. The results show that the cultivation of the poplars 'Kanadska × Balzamichna' and 'Keliberdynska' and the willows "Zhytomyrska-1" and "Zhytomyrska-2" in short-rotation plantations can produce 30-70 GJ of heat and 8-19 MWh of electrical energy from 1 ha after the first growing season.

In this dissertation study, 5 clones of poplars and 5 clones of willows, which are perspective for using as a renewable energy source, have been introduced into *in vitro* culture and multiplied by microclonal propagation. Plants for introduction into the *in vitro* culture have been selected based on the results of experiments on the test plots. The conditions for surface sterilization and introduction of plants into *in vitro* culture have been proposed and the effectiveness of the methods were 78% and 93%, respectively.

The schemes of the direct regeneration of the plants from leaf, stem and petiole segments were developed for two poplar ('Novoberlinska-7' and 'Lubenska') and two willow clones ('Zhytomyrska-1' and 'Olympiyskiy vohon'). The ability to direct regeneration depended on the combination and concentrations of growth regulators and kind of plant's segment.

In order to compare salt tolerance, aspen (*Populus tremula*), hybrid poplar clone 'INRA 717-1B4' (*P. tremula* × *P. alba*) and willow clone 'Olympiyskiy vohon' (*Salix alba* × *S. fragilis*) were analyzed under *in vitro* cultivation on the medium with sodium chloride added in concentrations 25, 50 and 100 mM. The results demonstrated that the salt tolerance significantly varied in different genotypes. In hybrid poplar clone 'INRA 717-1B4', intensity of growth activity has been decreased after long-term cultivation under all investigated concentrations of sodium chloride. In aspen plants, significant decrease of the intensity of shoot growth by 94.3% compared to the control was found only after two months of cultivation, then

concentration of NaCl in media was 100 mM. Intensity of willow growth was not affected at any experimental treatment by sodium chloride. A statistically significant decrease of the intensity of root formation after the 1-st and 2-nd months of cultivation was shown only to aspen clones planted on the culture medium with 100 mM of sodium chloride added. In general, willow clones demonstrated higher intensity of root formation than poplar clones.

As a result of the *Agrobacterial* transformation of poplar clone with the pAV04 construction, the plants with the gene of cinnamyl-alcohol dehydrogenase (*cad*) were obtained. It is expected, that the plants transformed by pAV04 will increase the content of lignin, what may improve mechanical and biotic stress resistance.

A search for ecologically convenient technologies for energy production is becoming more important due to the constant increase in anthropogenic environmental load. In the study a mathematical model has been developed to evaluate the total pollutants emission to the environment from using fossil (natural gas, coal) and renewable (wood biomass) sources of heat production. A new approach for comparative quantitative evaluation of environmental emission of hazardous substances composition has been proposed. It was shown that total pollutants emission in the environment from using different fuels significantly increased in rank: wood → natural gas → coal, mainly because of increasing carbon dioxide emission.

Key words: *Populus sp.*, *Salix sp.*, *in vitro* culture, microclonal propagation, genetic transformation, short-rotation energy plantations, renewable energy, biofuel, salt tolerance, sodium chloride.