

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* КЛОНІВ ТОПОЛЬ ТА ВЕРБ ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ ВІДНОВЛЮВАНОЇ ЕНЕРГЕТИКИ

Л. В. ХУДОЛЄЄВА¹, Н. К. КУЦОКОНЬ^{2*}, О. Г. НЕСТЕРЕНКО²,
Н. М. РАШИДОВ², О. М. ДУГАН¹

¹Національний технічний університет «Київський політехнічний інститут ім. І. Сікорського», факультет біотехнології і біотехніки, кафедра промислової біотехнології, просп. Перемоги, 37, корпус 4, Київ, 03056

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, відділ біофізики та радіобіології, лабораторія сигнальних систем рослин, вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143

*e-mail: kutsokon@gmail.com

Важливим біотехнологічним підходом для розмноження деревних рослин є їх культивування в культурі *in vitro*. Це дає змогу отримати якісний клонований посадковий матеріал, і як наслідок - підвищити продуктивність плантацій. З метою успішного введення в культуру *in vitro* швидкорослих гібридів тополь та верб нами було оцінено ефективність знезараження та приживлюваність рослин за використання різних дезінфікуючих розчинів та живильних середовищ. Бруньки із швидкорослих гібридів верб сортів: «Житомирська-1», «Лукаш», «Олімпійський вогонь», «Печальна» та тополь: «Лубенська» і «Келібердинська» обробляли різними розчинами – концентрований мильний розчин, гіпохлорит натрію та 70%-ий розчин етанолу (за відмінної тривалості експозиції) та висаджували на живильні середовища на основі солей MS та WPM з різною комбінацією фітогормонів. Високу ефективність знезараження (78%) було досягнуто при використанні тріступінчатої обробки розчинами мила, гіпохлориту натрію та етилового спирту за часу експозиції 2, 10 та 1 хв. відповідно. Вирощування рослин на середовищі WPM, модифікованому бензиламінопурином (0,3 мг/л) та індолілмасляною кислотою (0,1 мг/л) разом з активацією апікальних та пазушних меристем, стимулювало індукцію ризогенезу. Загальна приживлюваність рослин в досліді склала 93%. Всі досліджувані в роботі клони були успішно введені в культуру *in vitro*, окрім тополі клону «Келібердинська», який потребує іншого протоколу культивування. Рослини, введені в культуру *in vitro*, в подальшому будуть використані для генно-інженерних досліджень.

Ключові слова: Populus, Salix, культура *in vitro*, короткоротаційні енергетичні плантації.

Вступ. Культивування деревних рослин *in vitro* є важливим біотехнологічним підходом для їх розмноження та отримання якісного клонованого посадкового матеріалу, що дає змогу підвищити продуктивність плантацій. В умовах економічної кризи актуальним для України стає питання забезпечення енергетичної незалежності від країн, що імпортують викопні види палива, шляхом переходу на наявні в країні місцеві джерела енергії. Одним з таких джерел для нашої країни може бути біомаса швидкорослих порід дерев. Енергетичні плантації вже давно вирощують в різних країнах Європи та світу, проте в Україні використання відновлюваних джерел енергії та, зокрема, вирощування енергетичних плантацій швидкорослих порід дерев знаходиться лише на початкових етапах розвитку.

Для створення лісових біоенергетичних плантацій доцільно використовувати тополі та верби, перевагами яких є здатність продукувати значну кількість біомаси за короткий період часу, високий гетерозисний ефект гібридних рослин, спроможність до вегетативного розмноження (Висоцька, 2014), а також оптимальні показники

енергії згорання з невисокими викидами забрудників у довкілля (Худолєєва та ін, 2016). Тополям та вербам притаманне широке сортове різноманіття, що обумовлює їх використання в різних галузях господарської діяльності: деревообробній та целюлозо-паперовій промисловості, для отримання твердого та рідкого біопалива, створення захисних лісосмуг та фітореMediaції забруднених ґрунтів, озеленення міст та ландшафтного дизайну. Для отримання максимального економічного ефекту від вирощування деревини в енергетичних плантаціях, важливим є правильний вибір клонів для закладання плантації. Відомо, що деякі види і клони характеризуються повільним, проте сталим ростом протягом всього терміну вирощування, що є важливою ознакою для довгоротаційних плантацій. Інші, навпаки, здатні швидко набирати біомасу протягом перших років, а надалі темпи росту знижуються. Саме такий тип росту буде більш ефективним для вирощування короткоротаційних плантацій (Bartko, 2011).

Тополі є не лише важливими культурами для лісівництва, але й практично єдиним модельним

деревним видом в біологічних дослідженнях (Taylor, 2002). Так, тополя волосистоплідна *Populus trichocarpa* стала першим деревним видом, геном якого було секвеновано (Tuskan et al, 2006). У селекційній практиці все частіше використовують біотехнологічні методи. Застосування культури *in vitro* дозволяє моделювати силу тиску стресового агента на організм, тотально дослідити його вплив на біооб'єкт, контролювати фізичні та хімічні показники вирощування рослинного матеріалу, проводити роботу незалежно від погодних умов та пори року (Любченко та ін., 2016). Метод мікротклонального розмноження дозволяє: значно підвищити коефіцієнти розмноження; мініатюризувати процес, що економить площі, зайняті маточними і розмножуваними рослинами; оздоровити вихідний садивний матеріал від нематод, бактерій, вірусів; ефективно мультиплікувати клони, що погано розмножуються або зовсім не розмножуються традиційними методами (Худолєєва та ін., 2014).

Метою роботи було введення перспективних для закладання енергетичних плантацій гібридів тополь та верб в культуру *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження.

Ефективність знезараження рослинного матеріалу оцінювали за трьома схемами із застосуванням різних живильних середовищ. Бруньки з молодих нездерев'янілих пагонів швидкорослих гібридів верб сортів: «Житомирська-1», «Лукаш», «Олімпійський вогонь», «Печальна» та тополь: «Лубенська» і «Келібердинська» відбирали на початку вегетаційного сезону з рослин віком від одного до трьох років, які зберігаються в колекції в умовах закритого ґрунту. Живці для створення колекції у закритому ґрунті були надані Українським науково-дослідним інститутом лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г. М. Висоцького. Сорти для введення в культуру *in*

vitro обирали виходячи з результатів випробувань рослин на придатність до вирощування на енергетичних плантаціях в польових умовах.

Оскільки знезараження бруньок деревних рослин є більш складним процесом, ніж знезараження, наприклад, насіння, для вибору оптимального режиму рослинні тканини обробляли різними розчинами – концентрований мильний розчин, гіпохлорит натрію («Білізна») та 70%-ий розчин етанолу – за відмінної тривалості експозиції. Відбирали не менше 30 експлантів на кожен варіант знезараження.

Після знезараження експлантів, для введення їх в культуру *in vitro* були використані живильні середовища на основі солей MS (Murasige & Skoog medium; Duchefa, Netherlands) та WPM (Woody Plant Medium; Duchefa, Netherlands) (Meilan R et al., 2006; Yevtushenko, 2010), які раніше застосовувалися нами для мікротклонального розмноження тополь (Kutsokon N. et al, 2013; Худолєєва та ін., 2014) із модифікованим вмістом фітогорманів (таблиця 2). Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами (Лакін Г. Ф., 1990).

Результати та їх обговорення. Для введення рослин в культуру *in vitro* важливою є ефективність етапу знезараження вихідного матеріалу, оскільки від правильного підбору дезинфікуючих розчинів та часу експозиції буде залежати виживаність експлантів та їх подальша мультиплікація.

Як видно з таблиці 1, із застосованих трьох варіантів режимів знезараження рослинного матеріалу, 1-й варіант знезараження (дистильована вода, розчин гіпохлориту натрію, 70%-ий етанол, 1 хв.) був малоефективним, оскільки лише 10 % експлантів не були уражені мікроскопічними грибами.

Таблиця 1.
Варіанти режимів знезараження бруньок тополь та верб

Table 1.
Variants of sterilization of poplars and willows buds

Варіант* знезараження	Дезинфікуючий засіб та час експозиції		
	I етап	II етап	III етап
1	Дистильована вода	Гіпохлорит натрію, розведений дистильованою водою у співвідношенні 1 : 3; 10 хвилин	70%-ий розчин етанолу; 1 хв
2	Дистильована вода		70%-ий розчин етанолу; 5 хв
3	Концентрований мильний розчин; 2 хв		70%-ий розчин етанолу; 1 хв

*Для всіх варіантів, після кожного етапу знезараження експланти промивали стерильною дистильованою водою.

* For all variants, after each sterilization step, explants were washed three times with sterile distilled water.

У 2-му варіанті (при збільшенні часу експозиції в 70%-вому розчині етанолу до 5 хв.) – 84% експлантів буріли та гинули. При застосуванні 3-го варіанту знезараження, де живці спочатку промивали мильним розчином, життєздатними та позбавленими епіфітної мікрофлори виявилися 28 з 36 експлантів (78%) (рис. 1).

Для оцінки приживлюваності рослин в культурі *in vitro* знезаражені експланти

висаджували на три варіанти живильних середовищ (таблиця 2).

На 14-й день культивування на середовищі I (MS+BAР+NAA) у тополі клону «Лубенська» спостерігали слабку проліферацію клітин та утворення калюсу. На середовищах II (WPM+BAР+NAA) та III (WPM+BAР+IBA) утворення калюсної маси було виявлено на 18-й день вирощування.

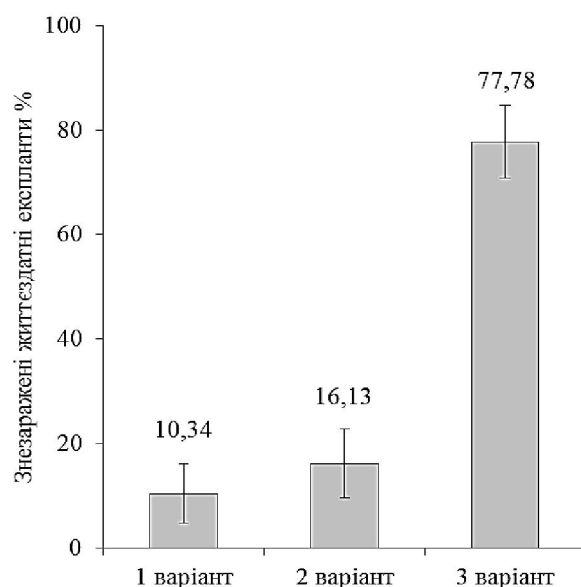


Рис. 1. Вихід знезаражених життєздатних експлантів тополі та верби при використанні різних варіантів знезараження: 1 варіант - розчин гіпохлориту натрію, 70%-й етанол, 1 хв; 2 варіант - розчин гіпохлориту натрію, 70%-й етанол, 5 хв; 3 варіант – концентрований мильний розчин, розчин гіпохлориту натрію,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

Fig. 1. Percentage of poplar and willows explants survived under different sterilization treatments: 1 variant – solution of sodium hypochlorite, 70% ethanol, 1 min; 2 variant – solution of sodium hypochlorite, 70% ethanol, 5 min; 3 variant – concentrated soap solution, solution of sodium hypochlorite, 70% ethanol, 1 min.

Таблиця 2.
Склад живильних середовищ на основі (Meilan et al, 2006; Yevtushenko, 2010) із власними модифікаціями

Table 2.
The composition of growth media (Meilan et al, 2006; Yevtushenko, 2010) with own modifications

Компоненти	Живильне середовище, 1 л		
	I	II	III
Макро- та мікро-елементи	MS (2,18 г)	WPM (1,15 г)	WPM (1,15г)
FV вітаміни	2 мл	2 мл	2 мл
Міо-інозитол	0,1 г	-	-
Сахароза	30 г	20 г	20 г
MES	0,26 г	-	-
L-глутамін	0,2 г	-	-
Агар	7,5 г	7,5 г	7,5 г
6-бензиламінопурин	0,3 мг	0,3 мг	0,3 мг
α-нафтилоцтова кислота	1,86 мг	1,86 мг	-
Індолілмасляна кислота	-	-	0,1 мг
pH	5,8	5,8	5,8

Також на 18-й день вирощування на середовищах I та III у верби клону «Житомирська-1» спостерігали початок ризогенезу. На 38-й день культивування утворення потужних коренів спостерігалось переважно у експлантів, які вирощували на середовищі III, при цьому у клонів верб виявлено більш інтенсивний ризогенез у порівнянні з клонами тополь. Активація апікальних та пазушних меристем спостерігалася за культивування експлантів на всіх варіантах середовищ для всіх клонів, крім тополі «Келібердинської».

Після 1,5 місяців вирощування рослини, що не утворили коренів протягом цього часу (переважно експланти з середовища I) пересаджували на середовище WPM із вмістом індолілмасляної кислоти 0,1 мг/л. При цьому корені утворили всі пересаджені клони, крім тополі клону «Келібердинська». Очевидно, даний клон потребує використання іншої методики для його культивування. Таким чином застосування розроблених методик дозволило ввести в культуру *in vitro* 26 експлантів з 28 незаражених, а загальна приживаність склала 93%.

Висновки. В результаті проведеної роботи в культуру *in vitro* введено 4 клони верб («Житомирська-1», «Олімпійський вогонь», «Печальна», «Лукаш») та клон тополі («Лубенська»). Для цього оптимізували режими незараження рослинного матеріалу та випробували різні варіанти живильних середовищ. Високу ефективність незараження (78%) було досягнуто при використанні триступінчатої обробки розчинами мила, гіпохлориту натрію та етилового спирту за часу експозиції 2, 10 та 1 хв. відповідно.

Культивування експлантів на всіх варіантах живильних середовищ показало різну ефективність, однак при вирощуванні рослин на середовищі WPM, модифікованому бензиламінопурином (0,3 мг/л) та індолілмасляною кислотою (0,1 мг/л) разом з активацією апікальних та пазушних меристем, спостерігали індукцію ризогенезу. Таким чином, приживлюваність рослин на цьому середовищі відбувається за один пасаж, що дозволяє зменшити затрати часу та реактивів. Загальна приживлюваність рослин в досліді склала 93%.

Подяка. Роботу проведено за підтримки проекту «Створення генофонду високопродуктивних клонів тополь та швидкорослих плантацій біопаливного матеріалу» в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і

новітні технології біоенергоконверсії» (2013-2017 рр., проект №13-17).

Список літератури:

1. Bartko M. Analyza biologických, produkčných a ekonomických aspektov pestovania rychlorastúcich drevin na Slovensku / PhD thesis, Zvolen. 2011.– 200 p.
2. Kutsokon N. Advancing protocols for poplar *in vitro* propagation, regeneration and selection of transformants / N. Kutsokon, J. Libantova, V. Rudas, N. Rashydov, D. Grodzinsky, D. Ďurechová // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – V.2 – 2013. – p. 1447-1454.
3. Meilan R. Poplar (*Populus* spp.) / R. Meilan, C. Ma // Methods in molecular biology. – 2006. – V. 344. – p. 143 – 151.
4. Taylor G. *Populus - Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree // Annals of botany. – 2002. – V. 90. – p. 681 – 689.
5. Tuskan G. A. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) // Science. – 2006. – V. 313. – p. 1596–1604.
6. Yevtushenko D.P. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra* L. x *P. maximowiczii* A. Henry // Plant Cell Rep. – 2010. – p. 211-221.
7. Висоцька Н. Ю. Технології та агротехніка створення біоенергетичних плантацій тополь та верб в Україні. Досвід та напрацювання українського НДІ Лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г.М.Висоцького / Вісник Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. П.Василенка. – 2014. – Вип. 155 – с. 122-126.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.: ил.
9. Любченко І.О. Використання культури *in vitro* в адаптивній селекції рослин (огляд літератури) / І.О. Любченко, Л.О. Рябовол, А.І. Любченко // Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва України. – 2016. – Вип.88. – с. 126-136
10. Худолєєва Л. В. Кількісні та якісні оцінки викидів шкідливих речовин у довкіллі під час спалювання деревини порівняно з природним газом і вугіллям / Л.В. Худолєєва, Н.К. Куцоконь, Н.М. Рашидов, О.М. Дуган // Біологічні студії. – 2016. – Т. 10 - № 3-4 – с. 61-70.
11. Худолєєва Л.В. Мікроклональне розмноження для створення плантацій швидкорослих тополь для потреб альтернативної енергетики / Л.В. Худолєєва, Н.К. Куцоконь, О.Г. Нестеренко, В.А. Рудас, Н.М. Рашидов, Д.М. Гродзинський, К.С. Бульботка // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів - Т.12. - №2 – 2014. – с. 226-233.

References:

1. Bartko M. Analyza biologických, produkčných a ekonomických aspektov pestovania rychlorastúcich

- drevin na Slovensku / PhD thesis, Zvolen. 2011.– 200 p.
- Kutsokon N. Advancing protocols for poplar *in vitro* propagation, regeneration and selection of transformants / N. Kutsokon, J. Ljantova, V. Rudas, N. Rashydov, D. Grodzinsky, D. Ďurechová // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – V.2 – 2013. – p. 1447-1454.
 - Meilan R. Poplar (*Populus* spp.) / R. Meilan, C. Ma // Methods in molecular biology. – 2006. – V. 344. – p. 143 – 151.
 - Taylor G. *Populus - Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree // Annals of botany. – 2002. – V. 90. – p. 681 – 689.
 - Tuskan G. A. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) // Science. – 2006. – V. 313. – p. 1596–1604.
 - Yevtushenko D.P. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra* L. x *P. maximowiczii* A. Henry // Plant Cell Rep. - 2010. – p. 211-221.
 - Vysotska N. Yu. Tekhnolohiyi ta ahrotekhnika stvorenniya bioenerhetychnykh plantatsiy topol ta verb v Ukrayini. Dosvid ta napratsyuvannya ukrayinskoho NDI Lisovoho hospodarstva ta ahrolisomelioratsiyi im. H.M.Vysotskoho / Visnyk Kharkivskoho natsionalnogo tekhnichnogo universytetu silskoho hospodarstva im. P.Vasylenka. – 2014. – Vyp. 155 – s. 122-126. (In Ukrainian).
 - Lakin G. F. Biometriya: Uchebnoe posobie dlya biol. spets. vuzov — 4-e izd., pererab. i dop. — M.: Vyssh. shk., 1990. — 352 s.: il. (In Russian).
 - Lyubchenko I.O. Vykorystannya kultury *in vitro* v adaptivnyy selektsiyi roslyn (ohlyad literatury) / I.O Lyubchenko, L.O. Ryabovol, A.I. Lyubchenko // Zbirnyk naukovykh prats Umanskoho natsionalnogo universytetu sadivnytstva Ukrayiny. – 2016. –Vyp.88. - c. 126-136 (In Ukrainian).
 - Khudolieieva L. V. Kilkisni ta yakisni otsinky vykydiv shkidlyvykh rehovyn u dovkilli pid chas spalyuvannya derevyny porivnyano z pryrodnyim hazom i vuhillyam / L.V. Khudolieieva, N.K. Kutsokon, N.M. Rashydov, O.M. Dugan // Biologichni studiyi. – 2016. – T. 10 - № 3-4 – s. 61-70. (In Ukrainian).
 - Khudolieieva L.V. Mikroklonalne rozmnozheniya dlya stvorenniya plantatsiy shvydkoroslykh topol dlya potreb alternatyvnoyi enerhetyky / L.V. Khudolieieva, N.K. Kutsokon, O.H. Nesterenko, V.A. Rudas, N.M. Rashydov, D.M. Hrodzynskyy, K.S. Bulbotka // Visnyk ukrayinskoho tovarystva henetykiv i selektsioneriv - T.12. - №2 – 2014. – s. 226-233. (In Ukrainian).

IN VITRO ESTABLISHING OF POPLAR AND WILLOW CLONES PERSPECTIVE FOR RENEWABLE ENERGETICS

**L. V. Khudolieieva, N. K. Kutsokon, O. G. Nesterenko,
N. M. Rashydov, O. M. Dugan**

In vitro microclonal propagation of woody plants is an important biotechnological approach for their propagation. It allows to produce the clonal material of high quality and consequently to increase the productivity of plantations. For successful in vitro culture initiation of fast growing poplars and willow hybrids, the effectiveness of plants sterilization and survival were evaluated with the using various sterilization treatments and nutrient media. The buds from fast growing hybrids of willow clones: “Zhytomyrska-1”, “Lukash”, “Olimpiysky vohon”, “Pechalna” and poplars clones: “Lubenska” and “Kelibirdynska” were washed with different solutions – concentrated soap solution, sodium hypochlorite and 70% ethanol during different exposure time and then planted on nutrient MS and WPM media supplemented with different combinations of phytohormones. Highly efficient sterilization (78%) was achieved with the using three-step treatment of soap solution, sodium hypochlorite and 70% ethanol with exposure time of 2, 10 and 1 min respectively. When plants were cultivated on WPM media supplemented with 0.3 mg/l BAP and 0.1 mg/l IBA, high rate of rhizogenesis and induction of meristems were determined. Average rooting rate obtained in the research was 93%. All studied clones have been successfully established into in vitro culture, except poplar clone “Kelibirdynska”, what probably needs another protocol for cultivation. In vitro established plants will be later used for genetic engineering studies.

Key words: Populus, Salix, in vitro culture, short-rotation energy plantations.

Отримано редколегією 17.05.2017