НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

БІОТЕХНОЛОГІЯ РОЗМНОЖЕННЯ ТА ВИРОЩУВАННЯ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ ДЛЯ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ПЛАНТАЦІЙ

Наукова робота подана на здобуття премії Президента України для молодих вчених у 2015 році

Авторський колектив:

- ***КРУГЛЯК Юлія Михайлівна*** - кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу дендрології та паркознавства Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України;
- ***ЧОРНОБРОВ Оксана Юріївна*** - кандидат сільськогосподарських наук, завідувач науково-дослідної лабораторії селекції та біотехнології рослин Відокремленого підрозділу Національного університету біоресурсів природокористування України «Боярська лісова дослідна станція»;
- ***БІЛОУС Світлана Юріївна*** - кандидат біологічних наук, асистент кафедри дендрології та лісової селекції Національного університету біоресурсів і природокористування України.

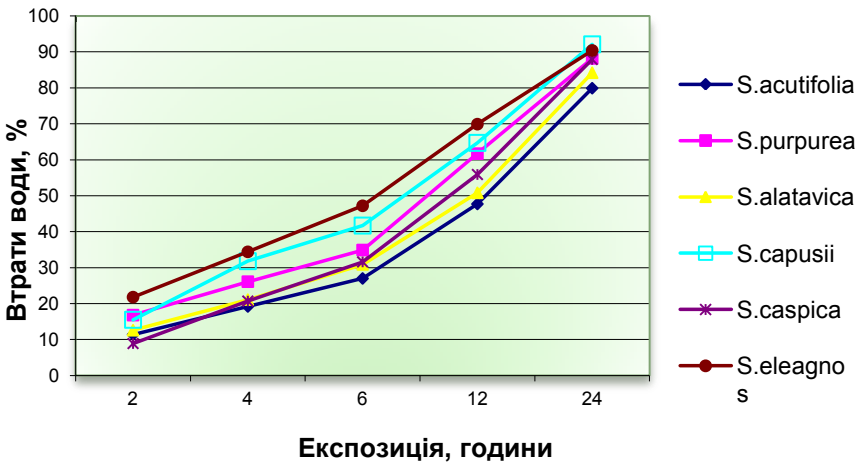
Добір морозостійких рослин родини Вербові

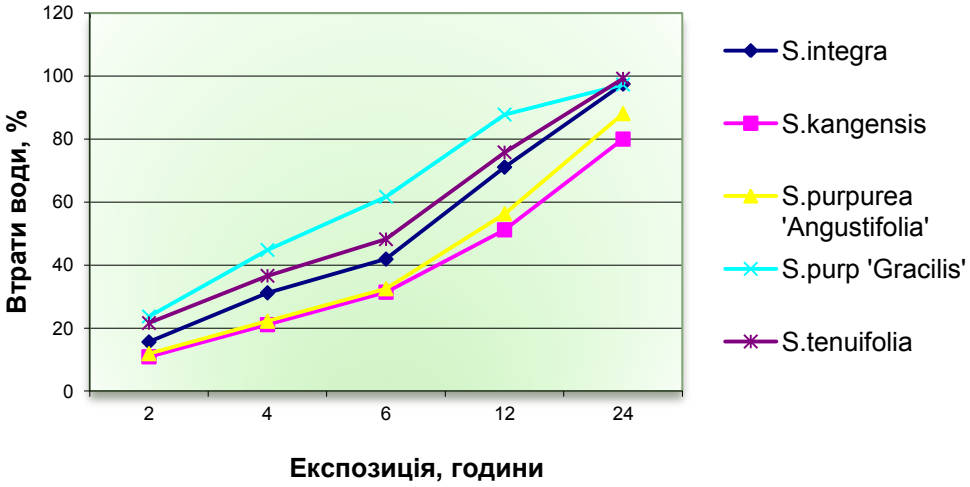
Пошкодження тканин бруньки при проморожуванні

- **у морозостійких рослин:**
  S. acutifolia, *S. capusii, S. eleagnos*,
  S. purpurea, S. purpurea 'Gracilis‘,
  S. tenuifolia, *S. kangensis*,
  S. viminalis × *S. acutifolia,*
  S. viminalis × *S. caprea,*
  S. integra × *S. acutifolia*

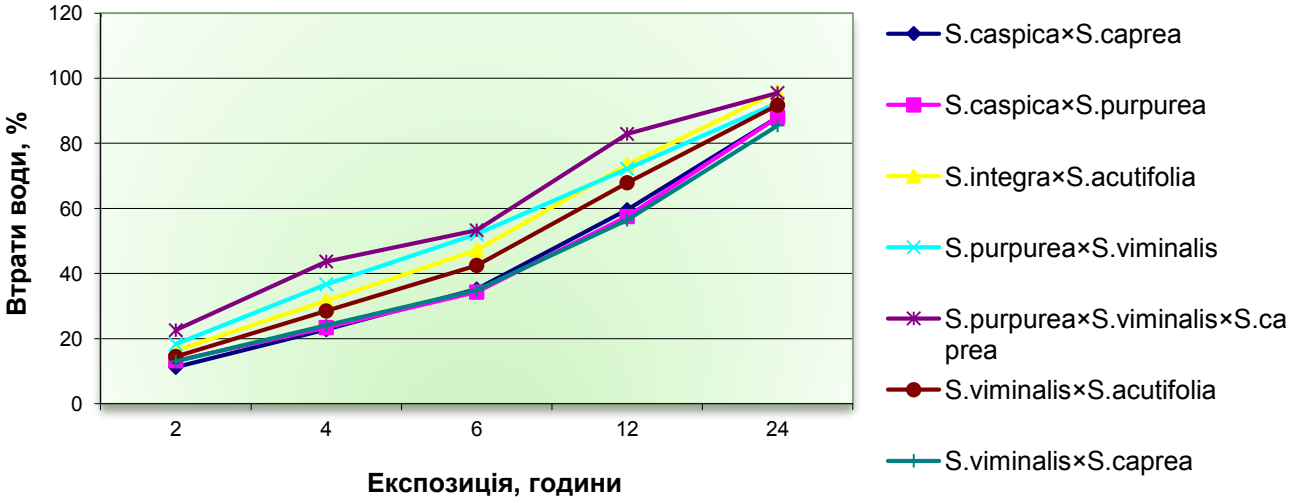
- **у нестійких до морозу рослин:**
  S. caspica,
  S. caspica × *S. caprea,*
  S. purpurea × *S. viminalis,*
  [*S. purpurea* × *S. viminalis*] × *S. caprea.*

Добір посухостійких рослин родини Вербові





Динаміка втрати води листками верб протягом доби



ВІДБІР ГІБРИДНИХ ФОРМ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ПЛАНТАЦІЙ

Гібридизація

1 – пилування; 2 – запилення квіток; 3 – ізолювання суцвіть із запиленими квітками; 4 – дозріле насіння.

Етапи селекційної роботи

1, 2 – пророщування насіння у чашках Петрі;
3, 4, 5 – пророщування шляхом висіву на ґрунтову суміш.

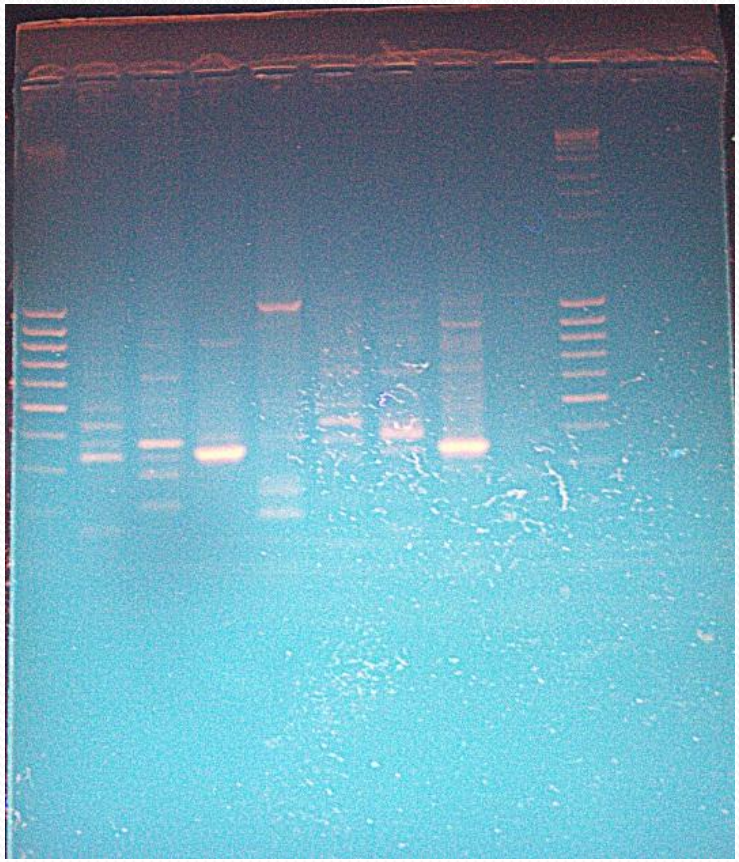
ВІДБІР ГІБРИДНИХ ФОРМ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ПЛАНТАЦІЙ

Отримано рослини у 13-ти гібридних комбінаціях:

- *S.caspica × S.caprea*
- *(S.caspica × S.caprea) × S.cinerea*
- *(S.integra × S.acutifolia) × S.caprea*
- *(S.purpurea × S.viminalis) × S.caprea*
- *[(S.purpurea × S.viminalis) × S.cinerea] × S.caprea*
- *(S.caspica × S.caprea) × S.acutifolia*
- *[(S.purpurea × S.viminalis) × S.caprea] × S.acutifolia*
- *[(S.purpurea × S.viminalis) × S.caprea] × S.caprea*
- *(S.viminalis × S.caprea) × S.acutifolia*
- *(S.viminalis × S.caprea) × S.caprea*
- *(S.caspica × S.caprea) × S.caprea*
- *S.caprea × S.acutifolia*
- *(S.purpurea × S.viminalis) × S.acutifolia*

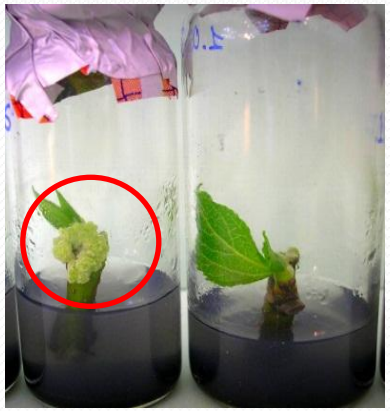
ДНК ідентифікація морфологічних форм *Populus tremula L.*

Дендрограма філогенетичних взаємозв'язків на основі 10 RAPD-маркерів чотирьох форм осики



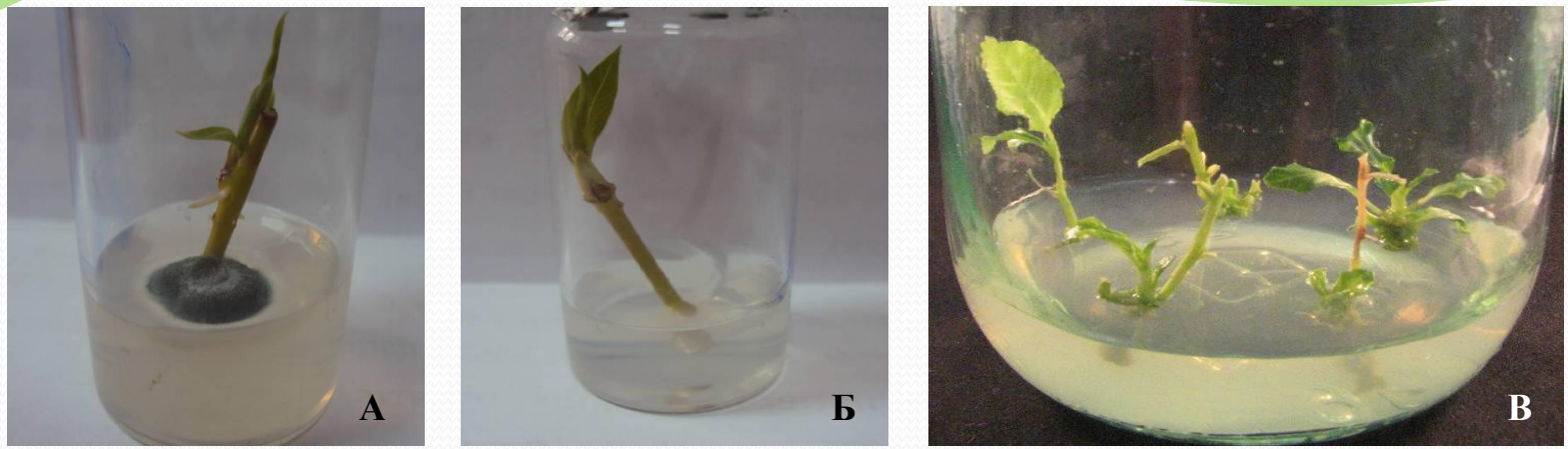
Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації RAPD-ПЦР з ДНК осики чотирьох форм (Mass Ruler SM 0403)

Субкультивування первинних мікропагони *P. tremula*

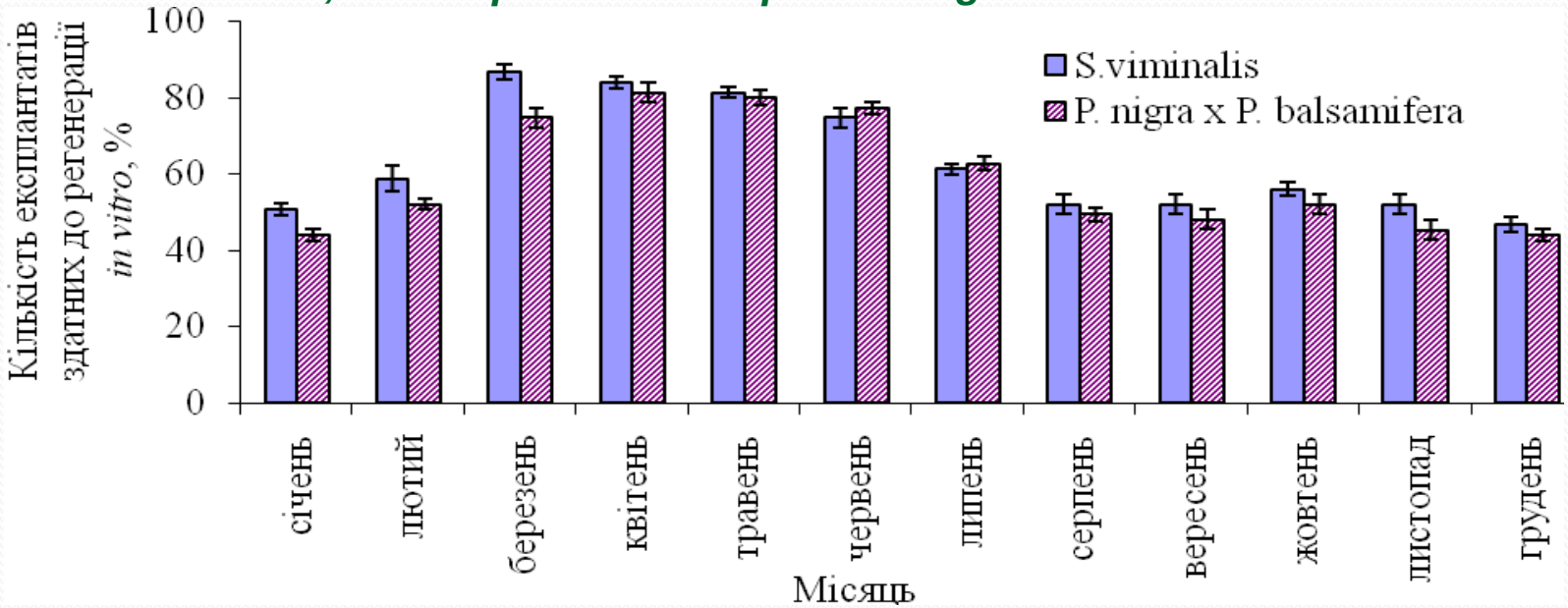


Відділення від вихідного експланта

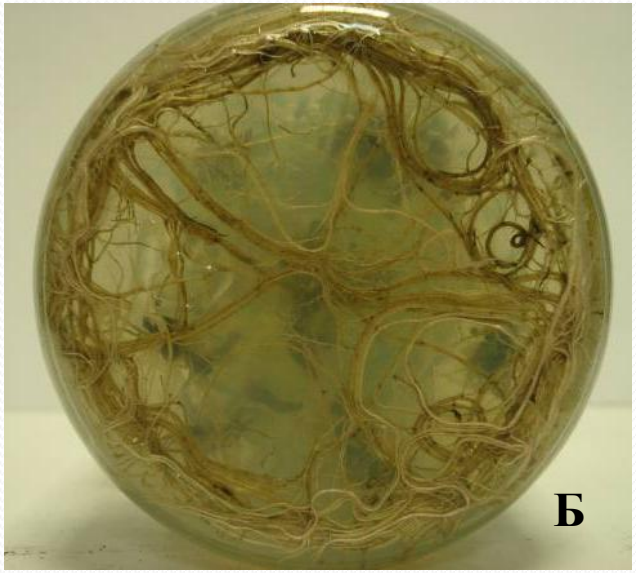
Пряма індукція мікропагонів з листкових, кореневих та стеблових експлантів *P. tremula*



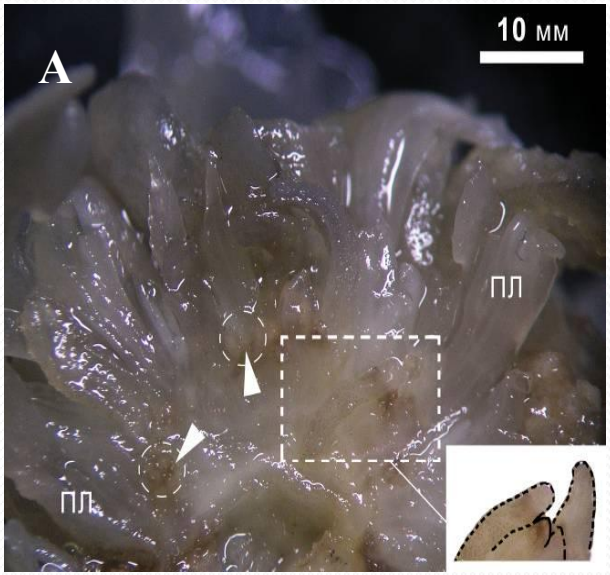
Результати стерилізації експлантатів рослин *S. viminalis*: А – інфіковані (варіант стерилізації; Б – асептичні життєздатні експлантати на 30-ту добу культивування *in vitro; В – мікропагони гібрида P. nigra × P. balsamifera in vitro.*

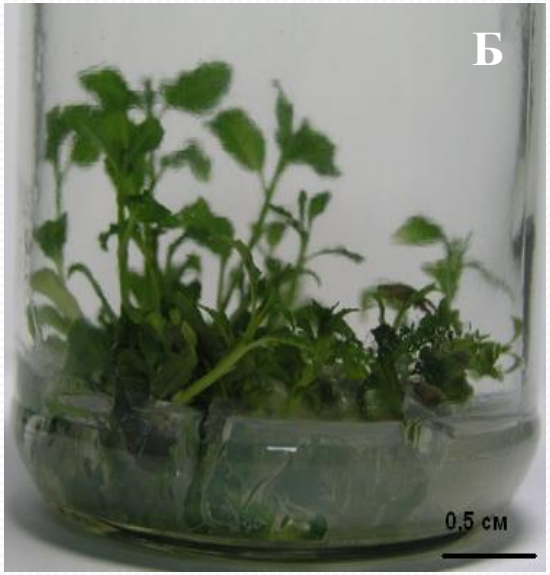


Регенераційна здатність експлантатів *S. viminalis* і *P. nigra* × *P. balsamifera*



Загальний вигляд рослин-регенерантів *S. viminalis* на живильному середовищі МС із 0,1 мг·л$^{-1}$ кінетину й БАП: А) вегетативна маса; Б) коренева система;

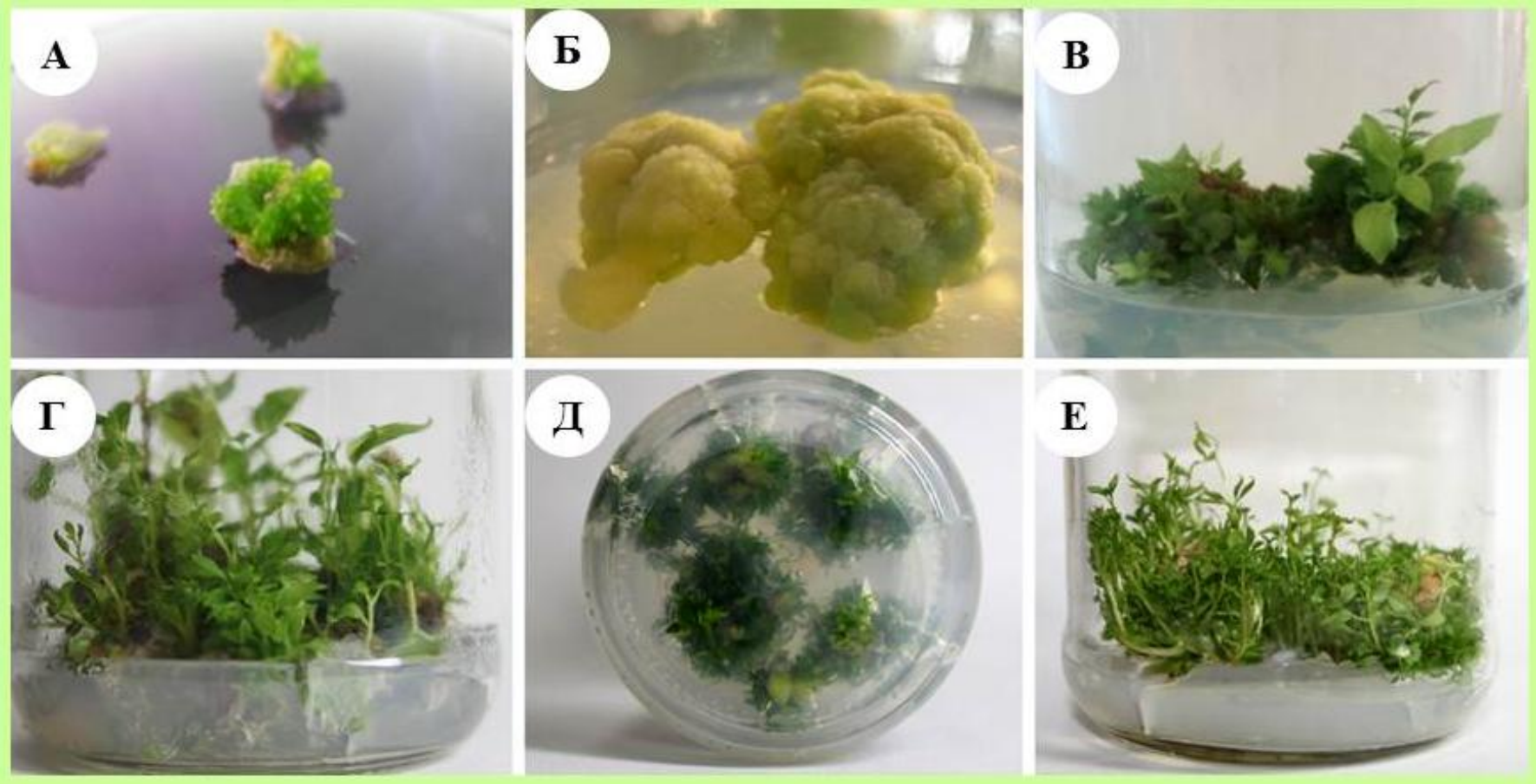




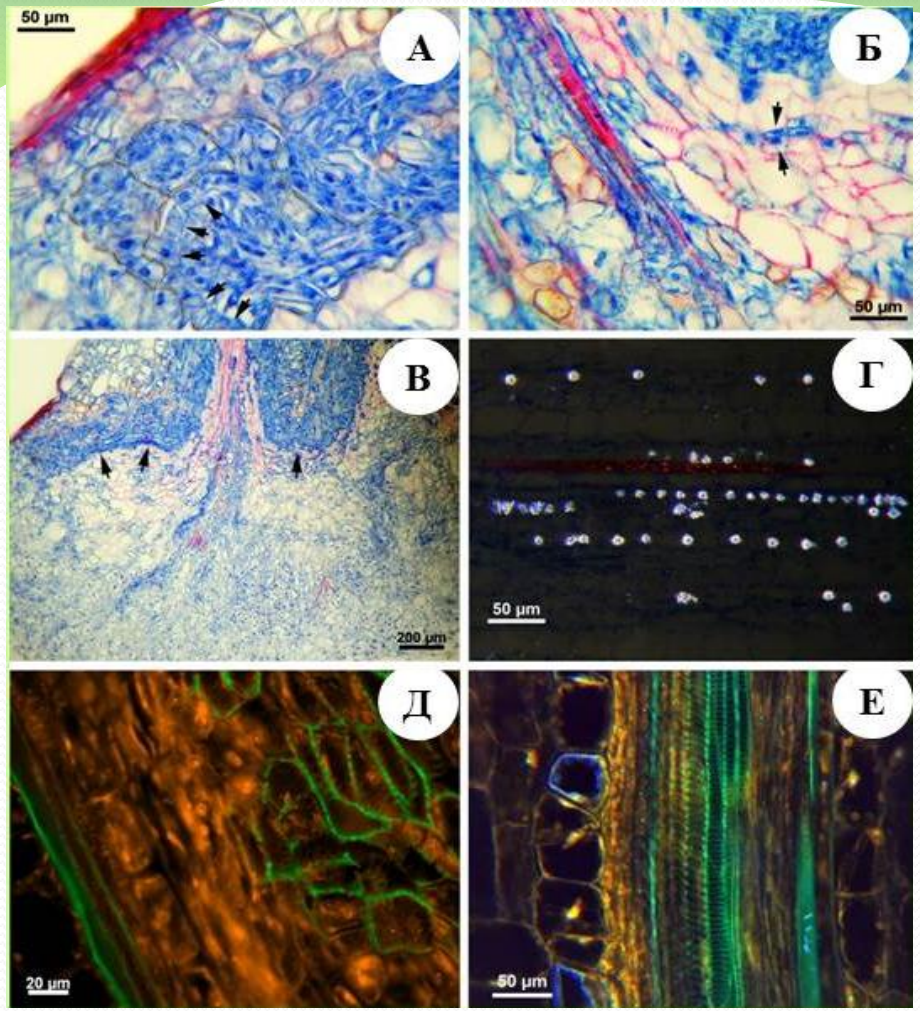
Процес формування мікропагонів гібрида *P. nigra* × *P. balsamifera in vitro* прямим і непрямим морфогенезом: А – формування адвентивних бруньок у експланті (пл – примордії листків, стрілками показані зони калюсогенезу, мікроскоп МБС-10); Б – мікропагони.

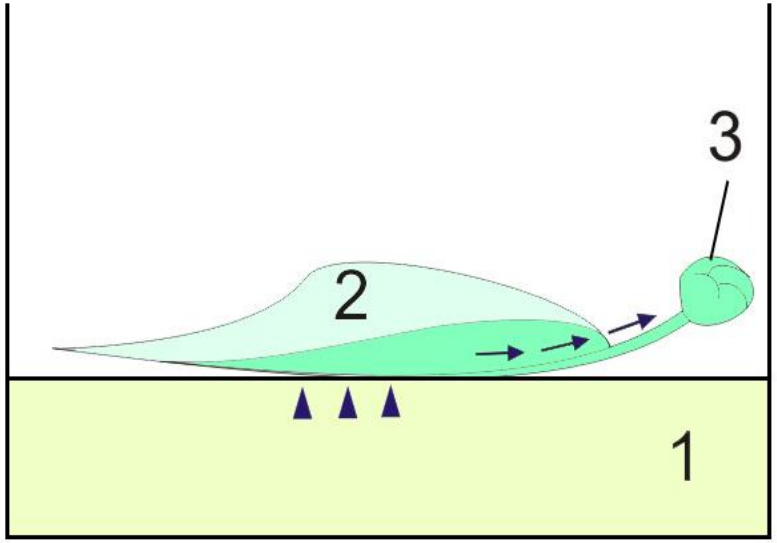
БІОТЕХНОЛОГІЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ

Масове клонування рослин-регенерантів *P. nigra* × *P. balsamifera*, *S. viminalis ma P. tremula in vitro*



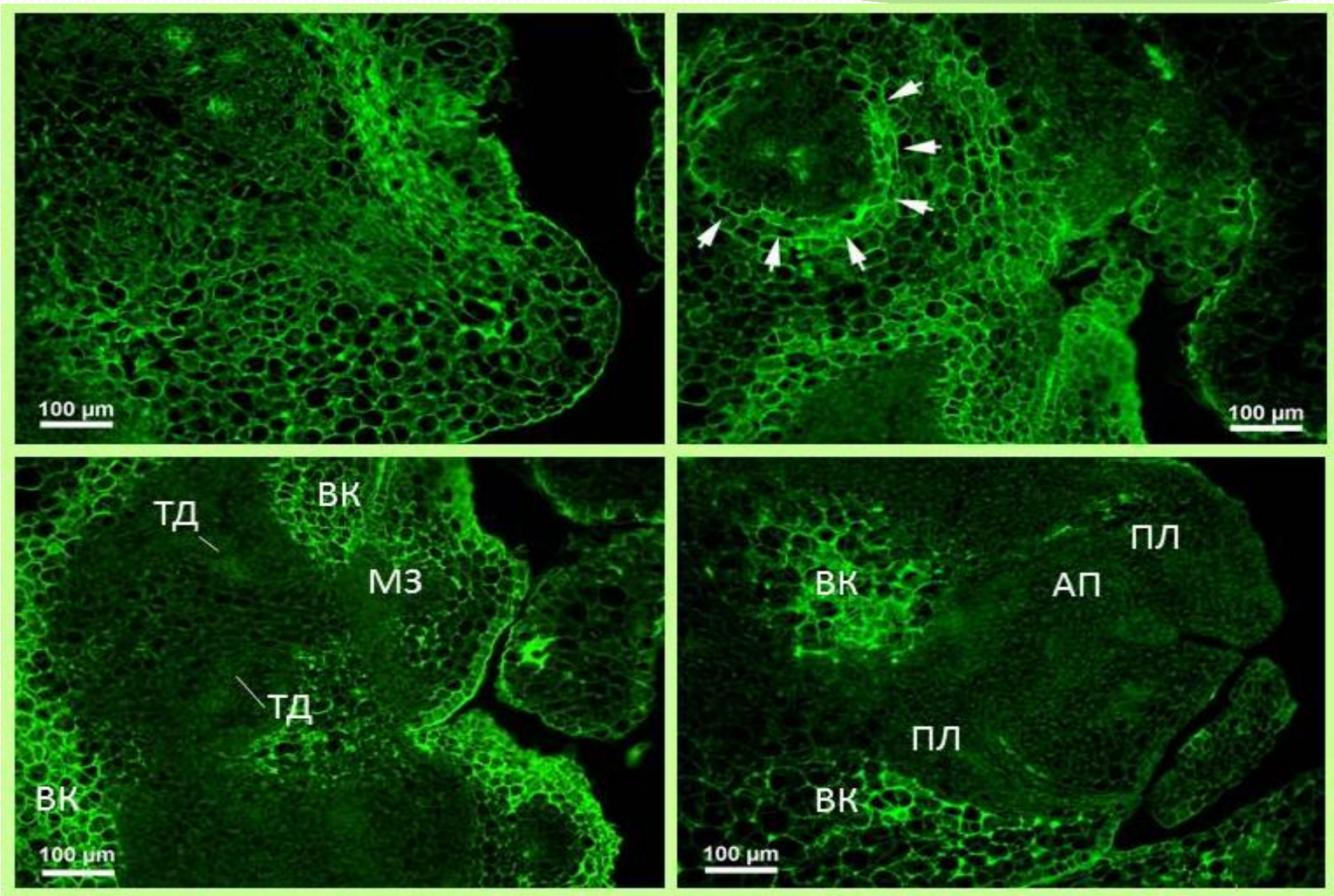
Етапи непрямого морфогенезу та утворення рослин-регенерантів осики *in vitro:* а – активація синтезу хлорофілу в морфогенних зонах в калюсних експлантів осики; б – морфогенний калюс, отриманий з листових експлантів; в – регенерація мікропагонів на калюсних тканинах осики (2 пасаж); г, д, е – утворення мікропагонів осики шляхом непрямого морфогенезу (3 пасаж).





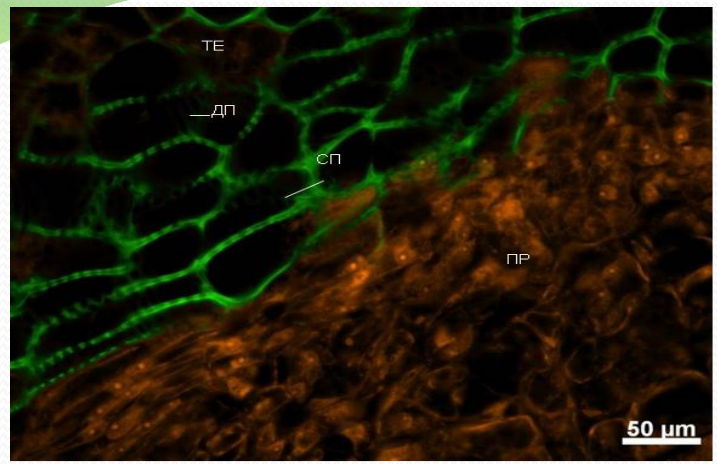
Транспорт екзо- та -ендогенних ауксинів та ініціація утворення калюсної тканини *in vitro* на базальній частині черешка листка осики зеленокорої: 1 – гормональне живильне середовище, 2 – листок; 3 – калюс (стрілками показано напрямок руху ауксинів)

Структурно-функціональна трансформація тканин черешка осики (зеленокорої морфологічної форми) в процесі калюсогенезу на гормональному живильному середовищі *in vitro*: а – диференціація зон клітин, які утворюють адвентивні корені; б – активна проліферація клітин у калюсуні; в – зони активного поділу клітин і утворення калюсу; г – локалізація друз у клітинах черешка; д – люмінесценція калози (зелений колір) і цитоплазми (червоний колір) у диференційованих клітинах калюсу; е – будова провідної системи в тканинах черешка листка.

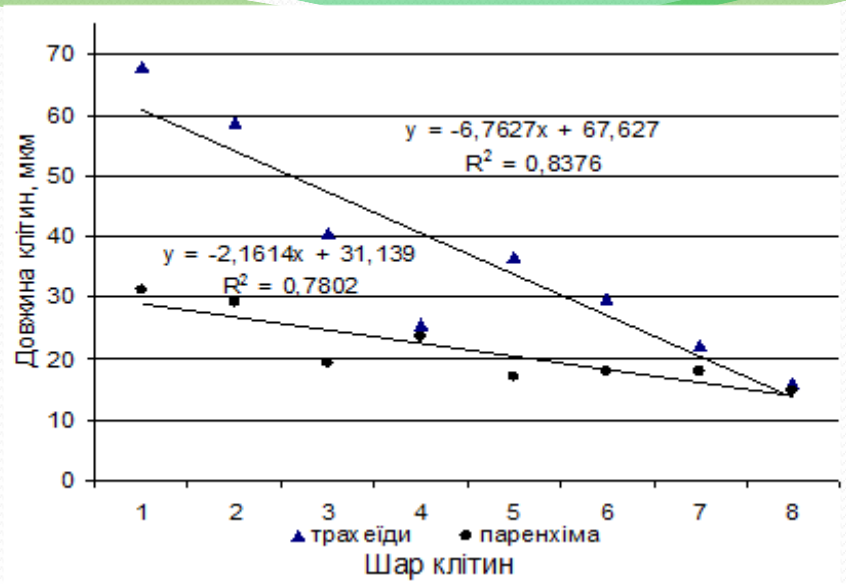


Формування промеристемоїдних зон в тканинах калюсу осики зеленокорої: ТД - трахеїди; ВК – відкладення калози та лігніну; МЗ – меристемоїдна зона; ПР – проваскулярні пучки; АП – апікальна меристема; ПЛ - примордій листочка.

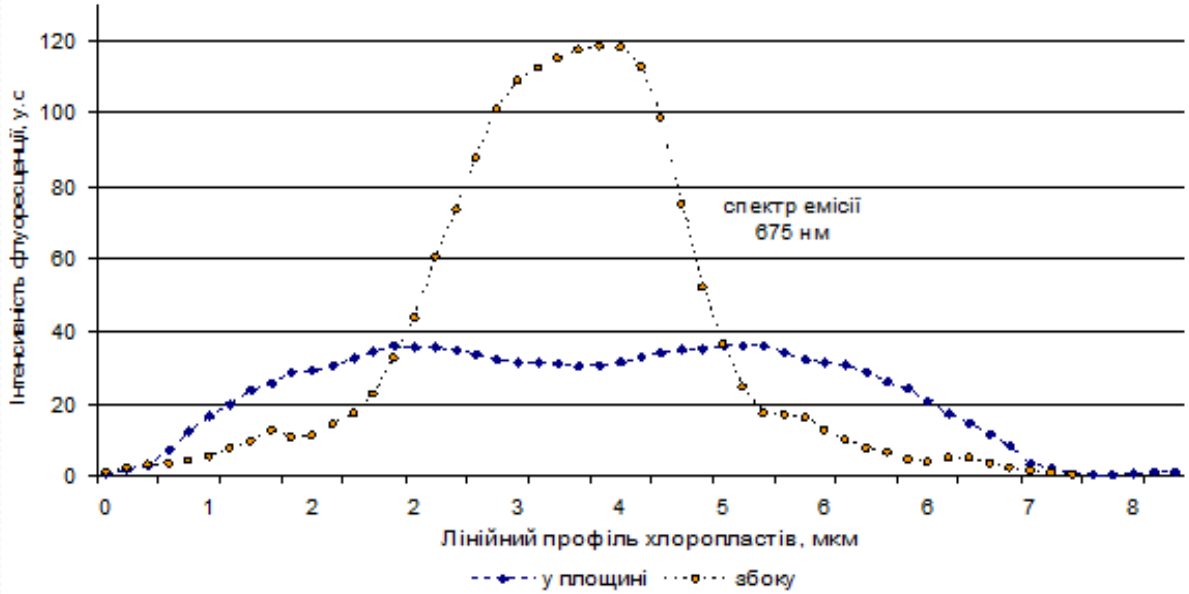
БІОТЕХНОЛОГІЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ



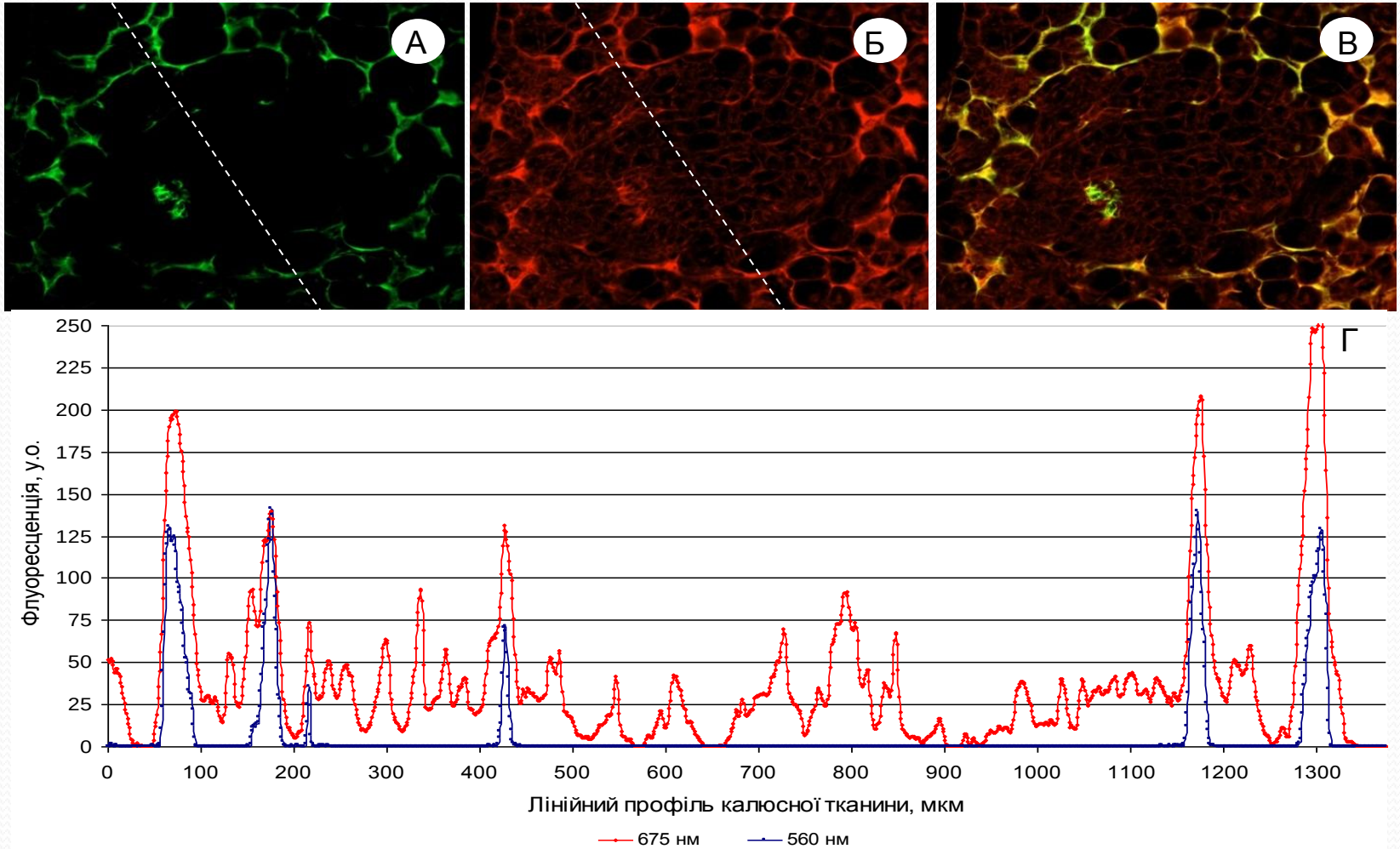
Гормональна індукція розтягнення та диференціація клітин у калюсі черешка осики зеленокорої: ТЕ – трахеальні елементи; СП – супротивні пори; ДП – дробинчасті пори; ПР – паренхіма з активною проліферацією клітин



Залежність процесу розтягнення клітин калюсогенної зони черешка осики зеленокорої від їх просторового розташування



Залежність інтенсивності флуоресценції хлоропластів осики зеленокорої від орієнтації їх повороту



Флуоресценція відкладень калози та клітин морфогенної зони калюсу осики: флуоресценція клітин в зеленому (А) і червоному (Б) спектрі; комбіноване зображення – (В); лінійний профіль флуоресценції клітин - (Г), (фарбування тканин аніліновим синім).

Шляхи морфогенезу в калюсних тканинах експлантів *P. tremula*

ризогенез

органогенез

органогенез

спонтанний ризогенез

утворення вегетативного пагона з коренів

геморизогенез

Вплив модифікованого складу живильного середовища МС на розвиток мікропагонів *P. tremula*

Концентрація цитокініну, мг·л$^{-1}$	Коефіцієнт розмноження, на 1 см^2 калюсу масою (2 г)		
	1-ий пасаж	2-ий пасаж	3-ій пасаж
0,5 ТДЗ	1:63,0	1:77,3	1:82,0
0,5 БАП	1:24,3	1:43,7	1:61,7
0,25 К	1:54,0	1:59,0	1:71,3
Б/Г	1:34,0	1:42,3	1:72,0

Мікропагони *P. tremula*, отримані шляхом непрямого морфогенезу

МС+1,5 мг·л$^{-1}$ ІМК

МС базове

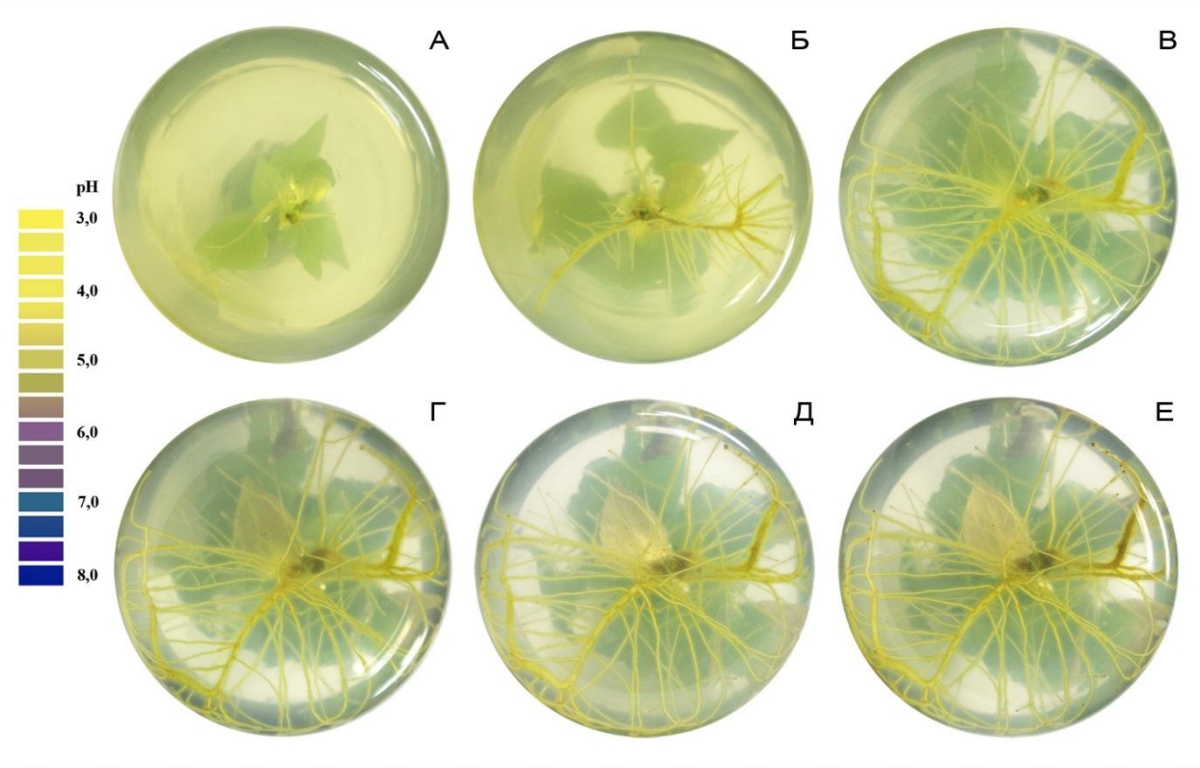
МС+0,5 мг·л$^{-1}$ ТДЗ

МС+0,25 мг·л$^{-1}$ К

½ МС базове

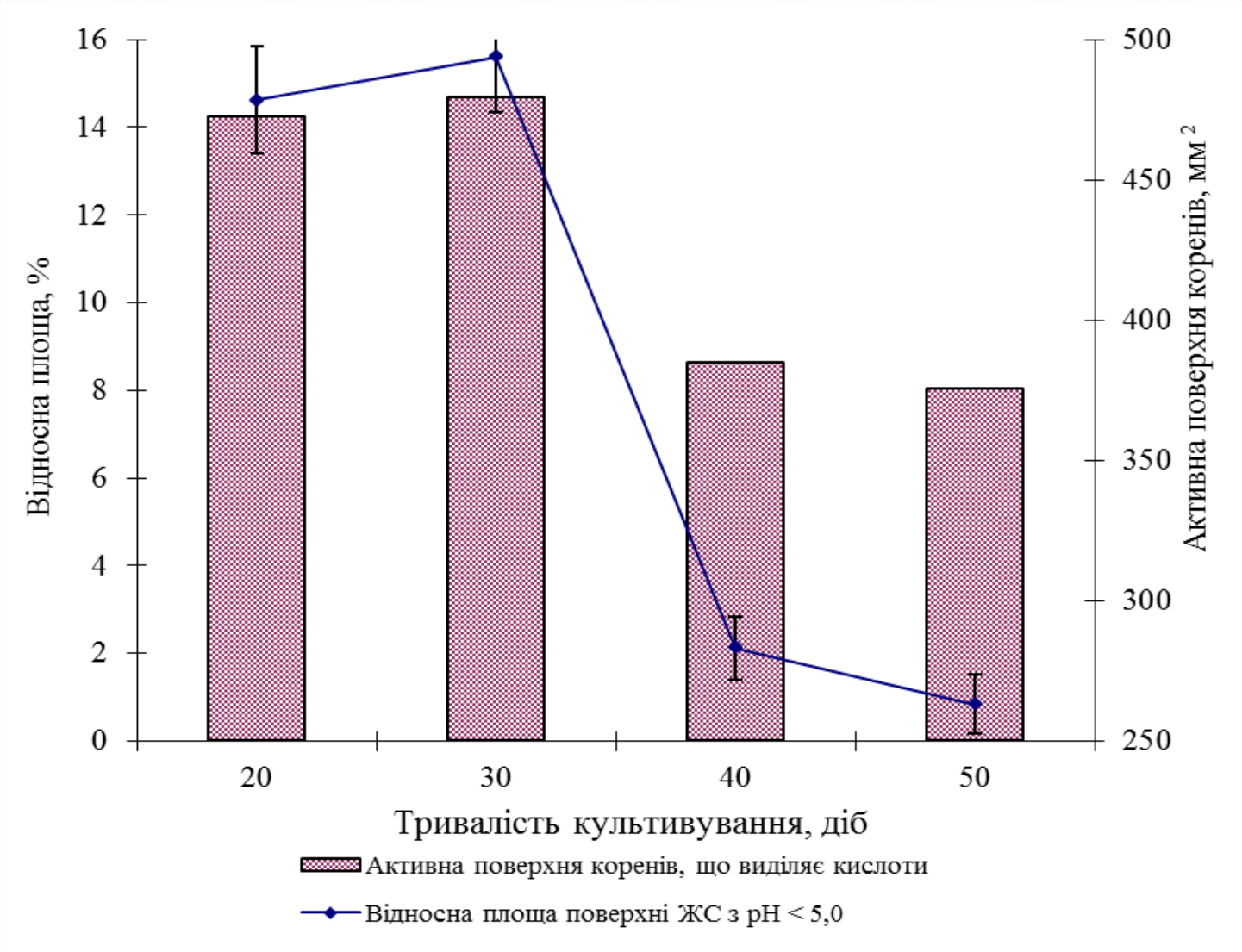
МС базове+15 г·л$^{-1}$ сахарози

Вплив складу живильного середовища на ріст та розвиток кореневої системи *P. tremula*



Візуалізація бромкреозоловим пурпуровим підкислення ЖС кореневими виділеннями рослин *P. tremula* зеленокорої форми в умовах *in vitro*: А - на 10-ту добу культивування; Б - на 20-ту добу; В - на 30-ту добу; Г - на 40-ву добу; .Д - на 50-ту добу; Е - на 60-ту добу

Кореневі виділення рослин *P. tremula* зеленокорої форми в умовах *in vitro*



Вплив кореневих виділень *P. tremula* на динаміку зміни концентрації водневих іонів в ЖС *in vitro*

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОЩУВАННЯ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ

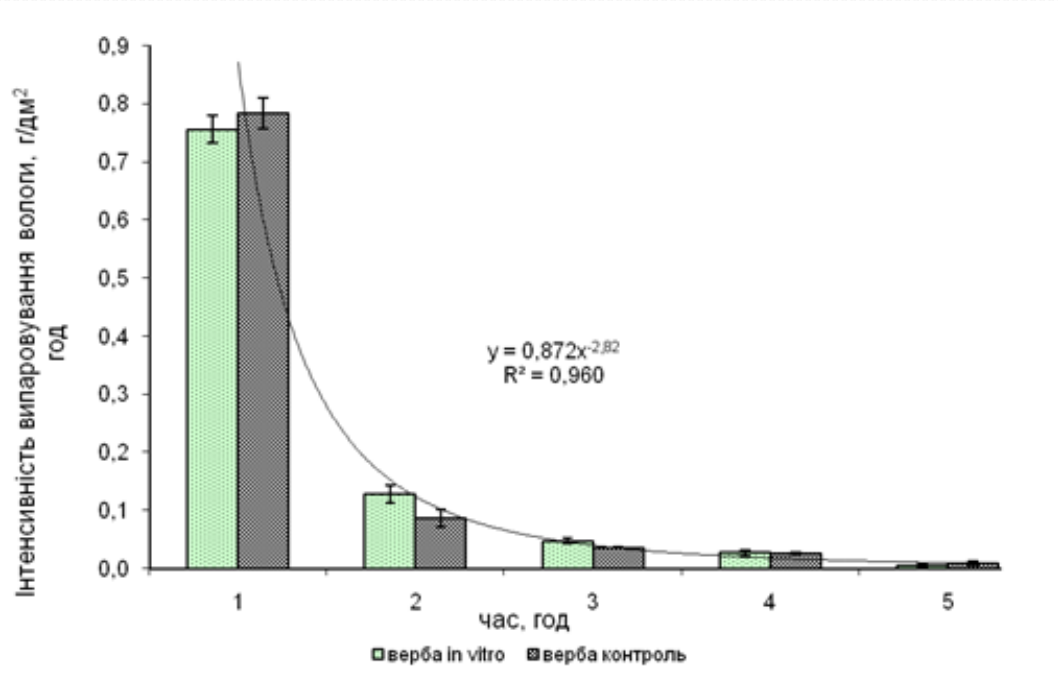
Адаптовані до умов закритого ґрунту рослини-регенеранти
S. viminalis, P. nigra × P. balsamifera, P. tremula

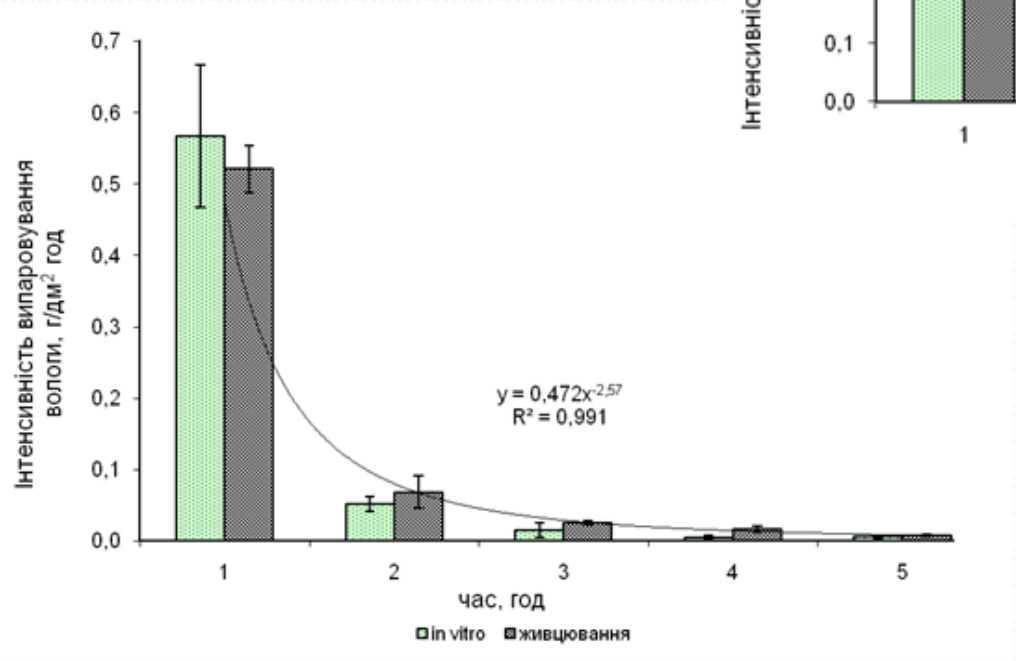
БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОЩУВАННЯ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ

Адаптовані до умов відкритого ґрунту рослини-регенеранти
S. viminalis, P. nigra × P. balsamifera, P. tremula

Екобіоморфологічні та екофізіологічні особливості рослин-регенерантів в умовах відкритого ґрунту

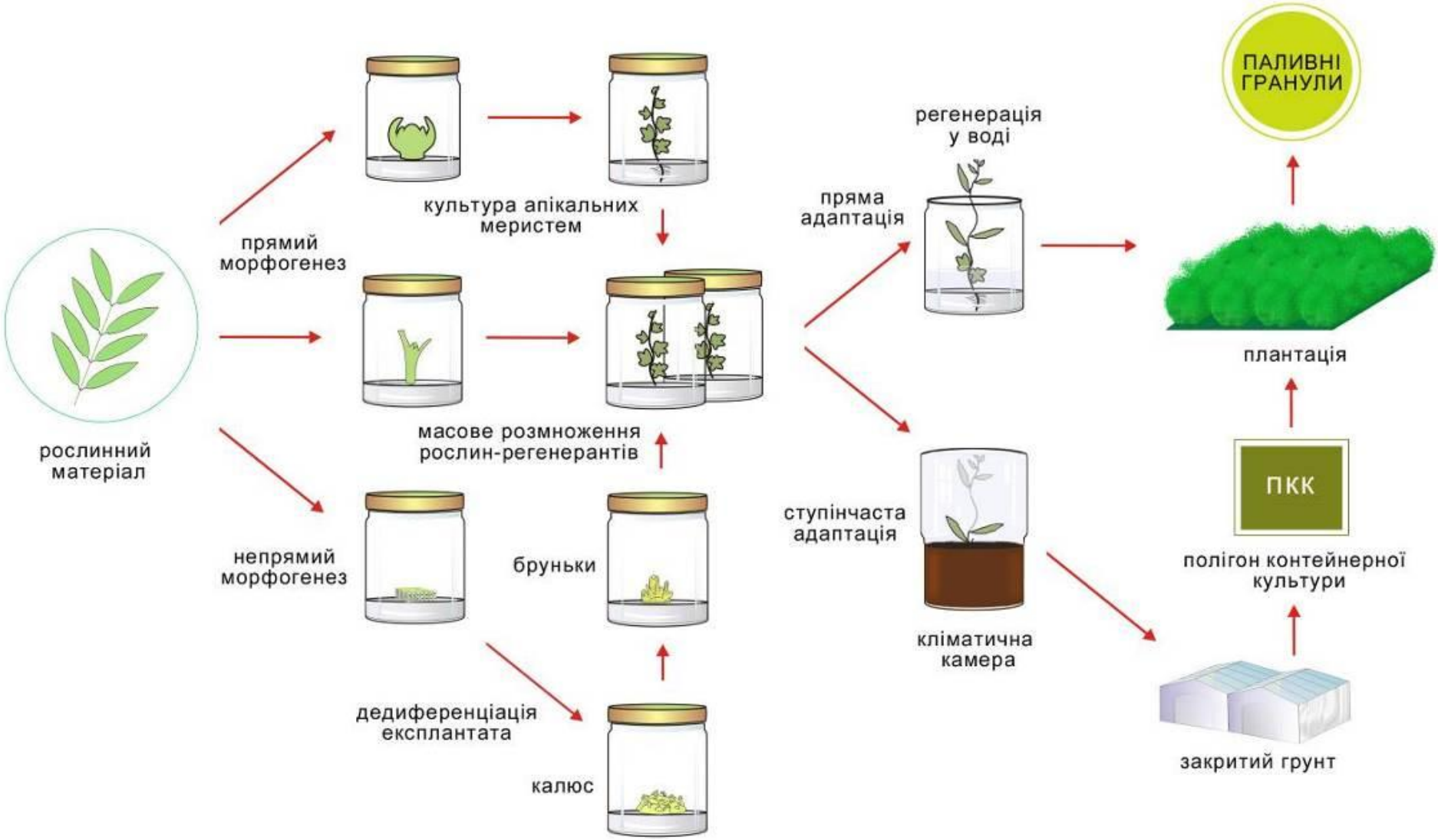
Динаміка випаровування вологи у рослин *S. viminalis*





Динаміка випаровування вологи у гібрида *P. nigra* × *P. balsamifera*

ВИКОРИСТАННЯ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ПЛАНТАЦІЙ



Біотехнологічна схема розмноження рослин родини Вербові *in vitro*

ВИКОРИСТАННЯ РОСЛИН РОДИНИ ВЕРБОВІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ПЛАНТАЦІЙ

Отримання біопалива з біомаси рослин родини Вербові