

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ХОМА ЮЛІЯ АНДРІЇВНА**

УДК 581.151; 582.623.2; 662.8.05

**ДИСЕРТАЦІЯ**

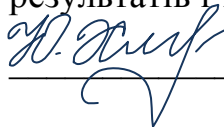
**«БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТІЙКОСТІ  
ШВИДКОРОСЛИХ ДЕРЕВ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ ДЛЯ СТАЛОГО  
ВИРОБНИЦТВА БІОПАЛИВА»**

Спеціальність 091 Біологія та біохімія

Галузь знань 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання чужих ідей,  
результатів і текстів мають посилання на відповідне джерело



Ю.А. Хома

Науковий керівник: Рашидов Намік Мамед огли  
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2024

## АНОТАЦІЯ

Хома Ю. А. Біотехнологічні підходи дослідження стійкості швидкорослих дерев до абіотичних стресів для сталого виробництва біопалива. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія та біохімія (09 «Біологія») – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2024.

Інтерес до використання альтернативних джерел енергії зростає, оскільки, на відміну від традиційних видів енергії, вони є відновлюваними і екологічно безпечними. Швидкорослі дерева тополі і верби є цінними енергетичними рослинами, адже їх біомаса широко використовується для виробництва біопалива у вигляді пелет та брикетів, а також у інших галузях промисловості. Проте в сучасних умовах глобальних змін клімату, щоб досягти високої продуктивності біомаси тополь і верб, важливим аспектом є вибір стійких до абіотичних стресів клонів цих деревних рослин. Дослідження, спрямовані на вивчення стійкості клонів тополь і верб до абіотичних стресів, дозволять уникнути значних втрат біомаси, а це, в свою чергу, сприятиме отриманню стабільної продуктивності біомаси для виробництва біопалива.

Дисертацію присвячено вирішенню важливих завдань – науковому обґрунтуванню та використанню біотехнологічних підходів щодо вивчення стійкості клонів тополь і верб до дії посухи та засолення, що складається з вивчення дії водного дефіциту *in vivo* та засолення хлоридом натрію в умовах культури *in vitro*, вибором протоколу введення в культуру *in vitro*, регенерації, мікроклонального розмноження, визначення вмісту вільного проліну та рівня експресії деяких генів залучених у відповідь на дію цих стресів, а також підбором найбільш стійких до посухи та засолення продуктивних клонів до цих видів стресів для подальшого виробництва біопалива.

У роботі використано такі методи досліджень: біотехнологічні (введення в культуру *in vitro*, дослідження умов мікроклонального розмноження, регенерації

та солестійкості рослин); морфометричні (оцінка інтенсивності росту та розвитку рослин за дії стресових факторів в умовах *in vivo* та *in vitro*); фенологічні спостереження за розкриванням бруньок тополь та верб; біохімічні (метод спектрометрії для визначення рівня вмісту вільного проліну); молекулярно-біологічні (метод ПЛР, зокрема ПЛР в реальному часі для визначення активності генів – *AQUA1* (гени синтезу білків аквапоринів) та *DREB68* (гени синтезу білків DREB – Dehydration responsive element binding), які задіяні у стійкості до абіотичних стресів); фізико-хімічні (виготовлення пелет із біомаси швидкорослих дерев та калориметричне визначення їх енергетичних показників); статистичні (програми для оброблення первинних експериментальних даних і оцінки достовірності одержаних результатів).

У дисертації за допомогою біотехнологічних методів дослідження введено в культуру *in vitro*, підібрано протокол для непрямой регенерації, тобто через стадію утворення калюсу, а також запропоновано оптимальний склад поживного середовища для культивування *in vitro* перспективних для біоенергетичної галузі клонів тополь ‘Волосистоплідна’ та ‘Новоберлінська-3’. Показано, що найбільш ефективним поживним середовищем при введенні в культуру *in vitro* клону тополі ‘Волосистоплідна’, було середовище WPM (Lloyd McCown’s Woody Plant Medium – поживне середовище для деревних рослин) з додавання регуляторів росту 0,2 мг/л БАП (6-бензиламінопурин) та 0,1 мг/л ІМК (індол-3-масляна кислота), де виживаність експлантів становила 93,3%. У клону тополі ‘Новоберлінська-3’ на середовищі MS (Murashige and Skoog medium – поживне середовище Мурасіге-Скуга) з додавання регуляторів росту 0,2 мг/л БАП та 0,1 мг/л ІМК спостерігалася вища виживаність (73,3%), порівняно з середовищем WPM з додаванням цих же регуляторів росту, але в цьому випадку різниця між показниками не була достовірною. Підібраний протокол непрямой регенерації показав вищий відсоток регенерації у тополі клону ‘Новоберлінська-3’, але також був ефективним для клону ‘Волосистоплідна’. Ефективність (%) регенерації у клону ‘Новоберлінська-3’ з листових (92,3%) та черешкових експлантів (90,0%) була значно вищою, ніж

у тополі ‘Волосистоплідна’, де відсоток регенерації від кожного типу експлантів становив 50,0%.

Вивчено вплив водного дефіциту на різні ростові показники у 9 клонів швидкорослих дерев тополі та верби. Найбільш чутливими до посушливих умов - 25% зволоження від контролю, виявилися клони верби ‘Житомирська-1’, ‘Печальна’ та клони тополі ‘Гулівер’, ‘Новоберлінська-3’. Відсоток виживаності цих клонів становив всього 17%, тобто з шести рослин виживала тільки одна. Певну толерантність до дії водного дефіциту виявили у тополь ‘Канадська × Бальзамічна’ та ‘Стрілоподібна’, оскільки їх виживаність на 25%-му поливі від контролю на кінець другого вегетаційного сезону складала 50%. Тополі ‘Волосистоплідна’ і ‘Слава України’ проявили найбільшу стійкість до дії водного дефіциту, і їх виживаність на поливі 25% від контролю на кінець другого вегетаційного сезону досягала 67%.

Представлено експериментальні спостереження фенології розкривання бруньок у тополь і верб в умовах відкритого та закритого ґрунту, а також за дії водного дефіциту. Показано, що на дослідній ділянці розкривання бруньок у верб відбувалося швидше ніж у тополь. Проте в умовах закритого ґрунту спостерігали відмінні результати, де розкривання бруньок швидше відбувалося у клонів тополь. Зокрема, найшвидше розкривання бруньок як за нормальних умов, так і за дії водного дефіциту спостерігали у клонів тополь ‘Гулівер’ та ‘Новоберлінська-3’. Найбільше дефіцит води пригнічував розкривання як апікальних, так і бічних бруньок, у клонів тополь ‘Волосистоплідна’, ‘Канадська × Бальзамічна’, і ‘Стрілоподібна’. Найменший вплив водного дефіциту на розкривання як апікальних, так і бічних бруньок спостерігали у клонів тополь ‘Гулівер’, ‘Слава України’ та ‘Новоберлінська-3’.

Проаналізовано чутливість до засолення хлоридом натрію в умовах культивування *in vitro* тополь клонів ‘Новоберлінська-7’, ‘INRA 353-38’ та у верби клону ‘Житомирська-1’ і виявлено, що у тополь клонів ‘INRA 353-38’ та ‘Новоберлінська-7’ вищий рівень солестійкості до хлориду натрію в

живильному середовищі при культивуванні *in vitro* порівняно з вербою 'Житомирська-1'. Засолення середовища найменше впливало на ріст рослин гібридної осики *P. tremula* × *P. tremuloides* клону 'INRA 353-38'. Водночас, за відсутності засолення цей клон характеризувався найслабшим ростом. Натомість, найбільше пригнічення росту під дією засолення виявлено у верби клону 'Житомирська-1'.

Досліджено вміст вільного проліну за дії довготривалого впливу водного дефіциту у тополь клонів 'Гулівер' (1-го та 2-го років вегетації), 'Слава України' та верби клону 'Печальна' і показано, що значних відмінностей у вмісті проліну між різними варіантами поливу не виявлено. Проте загальний вміст проліну відрізнявся серед клонів тополь та верби, а також у зразках дерев тополі першого та другого року вегетації.

За дії короточасного впливу водного дефіциту, на 10-й день відсутності поливу, у листках тополь клонів 'Гулівер', 'Стрілоподібна' та у верби 'Печальна' виявлено статистично достовірне збільшення вмісту вільного проліну. Верба 'Печальна' виявилася найчутливішим клоном до короткотермінового дефіциту зволоження. У цього клону виявлено найвищий вміст вільного проліну, як за дії водного дефіциту, так і в контрольних рослин. В той же час, тополя клону 'Гулівер' проявила толерантність до дії водного дефіциту за 50% поливу протягом усього терміну дослідження, оскільки вміст проліну в її листках не відрізнявся від контролю. А клон тополі 'Стрілоподібна' можна вважати найбільш стійким, оскільки вміст вільного проліну за 10 днів експерименту був найнижчим серед інших клонів дерев, особливо враховуючи те, що на 5-ий день експерименту не спостерігали значних змін навіть при відсутності поливу.

За дії засолення поживного середовища хлоридом натрію найвищої концентрації 100 мМ в умовах *in vitro* у листках тополі 'Новоберлінська-7' та верби 'Житомирська-1' на 10 день експерименту спостерігали найвищий вміст вільного проліну. Загалом, засолення хлоридом натрію навіть за найменшої

концентрації (25 мМ) призводило до збільшення вмісту вільного проліну у обох клонів швидкорослих дерев, і цей вміст зростав в залежності від збільшення засоленості середовища.

Встановлено відмінності у зміні профілів експресії генів аквапорину *AQUA1* та *DREB68* за дії водного дефіциту у тополь клонів ‘Гулівер’, ‘Слава України’ та верби ‘Печальна’. За даними аналізу відносної експресії виявлено, що у клону ‘Гулівер’ ген *AQUA1* за всіх режимів зволоження мав тенденцію до підвищення активності. В той же час, ген *DREB68* виявляв різку зміну тренду зі зменшення активності при 25% та 75% зволоження до стрімкого підвищення за 50% зволоження порівняно з контролем. Схожа тенденція спостерігалася і у клону верби ‘Печальна’. Для клону тополі ‘Слава України’ навпаки, характерно зниження експресії гена *DREB68* за дії посухи: і тільки за 75% поливу цей ген показав підвищену активність. В даному дослідженні ми спостерігали відмінність у відповіді різних клонів на однакові стресові фактори, що означає наявність відмінностей у відповіді на стрес у різних генотипів рослин.

Для визначення перспективності виробництва твердого біопалива із біомаси швидкорослих дерев, нами було виготовлено пелети із деревини осики звичайної та тополі клону ‘Стрілоподібна’, а також вперше розроблено методику підвищення якості фізичних властивостей пелет за допомогою додавання 5%-го водного розчину гліцерину до подрібненої фракції деревини перед пелетуванням, після чого було досліджено основні фізичні властивості біопаливних пелет. Отримані результати дослідження показали значне збільшення теплотворної здатності, насипної та питомої щільності пелет в обох видів деревини, а також не високий вміст золи, що свідчить про доцільність використання біомаси швидкорослих дерев для отримання біопалива високої якості.

*Наукова новизна отриманих результатів* полягає у вивченні впливу засолення та посухи на різні клони швидкорослих дерев тополь і верб переважно української селекції, а саме *уперше*:

- здійснено введення в культуру *in vitro*, підбрано протокол регенерації та оптимальний склад живильних середовищ для подальшого культивування та мікроклонального розмноження високопродуктивних клонів тополь ‘Новоберлінська-3’ та ‘Волосистоплідна’, які є цінними для виробництва біомаси для біоенергетичної галузі;
- досліджено ростові параметри, вміст вільного проліну та визначено рівні експресії генів (*AQUA1* та *DREB68*) у клонів тополь і верб переважно української селекції за дії водного дефіциту;
- проаналізовано фенологію розкривання бруньок швидкорослих дерев тополь і верб в умовах відкритого та закритого ґрунту, а також за дії водного дефіциту;
- досліджено вплив засолення поживного середовища хлоридом натрію в культурі *in vitro* на ростові параметри, фізіологічний стан та вміст вільного проліну у клонів тополь та верби;
- розроблено спосіб для покращення фізичних властивостей пелет із деревини осики звичайної та клону тополі ‘Стрілоподібна’ за допомогою додавання водного розчину гліцерину перед пелетуванням.

*Практичне значення отриманих результатів.* Впровадження отриманих результатів та застосування біотехнологічних підходів, таких як введення в культуру *in vitro*, регенерації, мікроклонального розмноження та виготовлення твердого біопалива (пелет), дозволить одержувати стабільну продуктивність біомаси для потреб відновлюваної енергетики, за різних впливів абіотичних стресових факторів, в тому числі й обумовлених глобальними змінами клімату. Завдяки використанню методу мікроклонального розмноження можна отримати за короткий термін велику кількість швидкорослих дерев, стерильні генотипи, подолати період спокою рослин і проводити розмноження в контрольованих умовах протягом року. Вирощування деревної біомаси та виробництво твердого біопалива (пелет) допоможе знизити використання та залежність від традиційних джерел енергії, що сприятиме покращенню як економічної, так і екологічної

ситуації в країні. Отримані результати досліджень також можуть представляти інтерес для навчальних та наукових закладів, зокрема під час викладання біотехнології, біохімії, фізіології та генетики рослин.

**Ключові слова:** тополі (*Populus*), верби (*Salix*), наземні рослини, фенологія розкривання бруньок, біотехнологія, культура рослин *in vitro*, регенерація рослин *in vitro*, абіотичні стреси, ґрунти, посуха (водний дефіцит), засолення, пролін, експресія генів, відповідь на стресовий фактор, адаптація, стійкість, біомаса, продуктивність, біопаливо.



## ANNOTATION

*Y. Khoma*. Biotechnological approaches to investigating the resistance of fast-growing trees to abiotic stresses for sustainable biofuel production. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 Biology and Biochemistry (09 "Biology") – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The interest in the use of alternative energy sources is increasing, unlike traditional energy sources, since they are renewable and environmentally friendly. Fast-growing poplar and willow trees are valuable energy plants, as their biomass is widely used for the production of biofuels in the form of pellets and briquettes, as well as in other industries. However, in the current conditions of global climate change, in order to achieve high biomass productivity of poplars and willows, an important aspect is the selection of clones of these woody plants resistant to abiotic stresses. Studies targeting examination of the resistance of poplar and willow clones to abiotic stresses will allow avoiding significant biomass losses, which in turn will promote the stable biomass productivity necessary for biofuel production.

The dissertation is devoted to the solution of important tasks – scientific substantiation and the application of biotechnological approaches for the studies of the resistance of poplar and willow clones to the effects of drought and salinity, which consists of the study of the effect of water deficit *in vivo* and salinity with sodium chloride *in vitro*, selection a protocol for *in vitro* culture introduction, regeneration, and micropropagation, determination of free proline content and levels of genes expression involved in the response to these stresses, as well as selection of the most to drought and salinity resistant productive clones for further biofuel production.

The following research methods were implemented: biotechnological (introduction into *in vitro* culture, micropropagation, regeneration, and salt tolerance studies); morphometric (assessment of plant growth and development under stress

factors *in vivo* and *in vitro*); bud burst phenological observations for poplar and willow; biochemical (spectrometry for the free proline determination); molecular biological (PCR method, in particular real-time PCR for determination of the activity of genes *AQUA1* (aquaporin protein synthesis genes) and *DREB68* (DREB – Dehydration responsive element binding protein synthesis genes) which are involved in the resistance to abiotic stresses); physicochemical (pellet production from fast-growing tree biomass, calorimetric determination of energetic characteristics); statistical (data processing and result reliability assessment using specific programs).

Using biotechnological research methods in the dissertation, we introduced poplar clones ‘Volosystoplidna’ and ‘Novoberlinska-3’ into *in vitro* culture, selected a protocol for the indirect regeneration, *i.e.* through the callus formation stage, and proposed the optimal composition of the culture nutrient medium for *in vitro* cultivation of these poplar clones, which are promising for the bioenergy industry. It was shown that the most effective nutrient medium for the introduction of the poplar clone ‘Volosystoplidna’ into *in vitro* culture was WPM medium (Lloyd McCown's Woody Plant Medium – nutrient medium for woody plants) with the addition of growth regulators 0.2 mg/l BAP (6-benzylaminopurine) and 0.1 mg/l IBA (indole-3-butyric acid), where the survival rate of explants was 93.3%. The poplar clone ‘Novoberlinska-3’, demonstrated a higher survival rate (73.3%) in MS medium (Murashige and Skoog medium – Murashige-Skoog nutrient medium) with growth regulators 0.2 mg/l BAP and 0.1 mg/l IBA, compared to WPM medium containing the same growth regulators, however in this case the difference between the indicators was not significant. The selected protocol of indirect regeneration demonstrated a higher percentage of regeneration in poplar clone ‘Novoberlinska-3’, and was also effective for clone ‘Volosystoplidna’. The efficiency (%) of regeneration for ‘Novoberlinska-3’ clone from leaf (92.3%) and petiole explants (90.0%) was significantly higher than in poplar ‘Volosystoplidna’, where the percentage of regeneration from each type of explants was 50.0%.

The influence of water deficit on various growth parameters in 9 clones of fast-growing poplar and willow trees was studied. Willow clones 'Zhytomyrska-1' and 'Pechalna' and poplar clones 'Guliver' and 'Novoberlinska-3' were the most sensitive to drought conditions - 25% moisture content compared to the control. The survival percentage of these clones was only 17%, thus only one of the six plants survived. A certain tolerance to the effect of water deficit was found in poplars 'Kanadska × balsamichna' and 'Strilopodibna' as their survival at 25% irrigation of the control at the end of the second growing season was 50%. The poplars 'Volosystoplidna' and 'Slava Ukrainy' showed the greatest resistance to water deficit, and their survival at 25% irrigation of the control at the end of the second growing season reached 67%.

Experimental observations of the bud burst phenology in poplars and willows in open and closed soil conditions, as well as under the effects of water deficit, are presented. It was shown that in the experimental area bud burst occurred faster in willows than in poplars. However, divergent results were observed in the closed ground conditions, where bud burst was faster in poplar clones. In particular, the fastest bud burst, both under normal conditions and under water deficit, was observed in poplar clones 'Guliver' and 'Novoberlinska-3'. Water deficit inhibited the bud burst of both apical and lateral buds for poplar clones 'Volosystoplidna', 'Kanadska × balsamichna' and 'Strilopodibna'. The lowest effect of water deficit on the burst of both apical and lateral buds was observed in poplar clones and 'Guliver' 'Slava Ukrainy' and 'Novoberlinska-3'.

The sensitivity to sodium chloride salinity during *in vitro* cultivation was analyzed in poplar clones 'Novoberlinska-7' and 'INRA 353-38', as well as in willow clone 'Zhytomyrska-1'. It was found that poplar clones 'INRA 353-38' and 'Novoberlinska-7' exhibited a higher level of salt resistance to sodium chloride in the culture medium compared to willow clone 'Zhytomyrska-1'. The salinity of the culture medium had the least effect on the growth of hybrid aspen plants *P. tremula* × *P. tremuloides* clone 'INRA 353-38'. At the same time, in the absence of salinity, this clone was characterized by the weakest growth. On the other hand, the greatest

suppression of growth under the influence of salinity was found in the willow clone 'Zhytomyrska-1'.

The content of free proline was studied under the influence of long-term water deficit in poplar clones 'Guliver' (1st and 2nd years of vegetation), 'Slava Ukrainy', and willow clone 'Pechalna'. It was shown that no significant differences in proline content were found between different irrigation options. However, the total proline content differed among poplar and willow clones, as well as in samples of poplar trees from the first and second years of vegetation.

A statistically significant increase in the free proline content was found in the leaves of poplar clones 'Guliver', 'Strilopodibna' and willow 'Pechalna' on the 10th day of the absence of water under the effects of short-term water deficit. Willow 'Pechalna' was the most sensitive clone to short-term moisture deficit. The highest content of free proline was found in this clone, both under the influence of water deficit and in control plants. At the same time, the poplar clone 'Guliver' showed tolerance to the effect of water deficit at 50% irrigation during the entire period of the experiment, as the proline content in its leaves did not differ from the control. Poplar clone 'Strilopodibna' can be considered the most resistant, since the content of free proline during the 10 days of the experiment was the lowest among other tree clones, especially considering that on the 5th day of the experiment, no significant changes were observed even in the absence of watering.

A highest content of free proline was found in both clones of fast-growing poplar, 'Novoberlinska-7' and willow 'Zhytomyrska-1' under the influence of 100 mM sodium chloride salinity in the culture medium during *in vitro* cultivation on day 10 of the experiment. In general, even low salinity with sodium chloride (25 mM) led to an increase in the content of free proline in both clones of fast-growing trees, and its content increased depending on the increase in sodium chloride concentration in the medium.

The difference of changes in the expression of aquaporin genes *AQUA1* and *DREB68* under the water deficit in poplar clones 'Guliver', 'Slava Ukrainy' and willow

‘Pechalna’ was shown. The relative expression analysis revealed that in the ‘Guliver’ clone, the activity of the *AQUA1* gene slightly increased compared to the control under all moisture regimes. At the same time the trend of *DREB68* gene expression changed dramatically: from a decrease at 25% and 75% moisture to a sharp rapid increase at 50% moisture. A similar tendency was observed in the ‘Pechalna’ clone. The poplar clone ‘Slava Ukrainy’, on the contrary, was characterized by a decrease in the *DREB68* gene expression under drought, and only at 75% of watering caused the increase of its activity. In this study, we observed a difference in the response of different clones to the same stress factors, which means the presence of differences in the response to stress in different genotypes of plants.

To assess the prospects of the solid biofuel production from fast-growing tree biomass, we produced pellets from aspen and poplar clone ‘Strilopodibna’ wood. For the first time, we developed a method to enhance the physical properties of pellets by adding a 5% aqueous solution of glycerin to the chopped wood fraction before pelletizing. Subsequently, we investigated the main physical properties of the biofuel pellets. The study results revealed a significant increase in the calorific value, bulk, and specific density of pellets in both wood types, along with the low ash content. These findings suggest the viability of utilizing biomass from fast-growing trees for the high-quality biofuel production.

*The scientific novelty of the results obtained* is to study the effect of salinity and drought on different clones of fast-growing poplar and willow trees, mainly of Ukrainian selection, namely for the first time:

- were introduced into *in vitro* culture, a regeneration protocol and optimal composition of culture media were selected for further cultivation and micropropagation of high-yield poplar clones ‘Novoberlinska-3’ and ‘Volosystoplidna’, which are valuable for the production of biomass for bioenergy;

- the growth parameters, free proline content, and gene expression levels (*AQUA1* and *DREB68*) in poplar and willow clones mainly of Ukrainian selection were investigated under water deficit conditions;

- the bud burst phenology in fast-growing poplar and willow trees was analyzed in open and closed ground, as well as under water deficit conditions;
- the effect of sodium chloride salinization of the culture medium on growth parameters, physiological state, and free proline content in poplar and willow clones was investigated;
- the method was developed to improve the physical properties of pellets made from aspen wood and poplar clone 'Strilopodibna' by adding an aqueous solution of glycerin before pelletizing.

*Practical significance of the results.* The implementation of the obtained results and the use of biotechnological approaches, such as *in vitro* culture, regeneration, micropropagation and production of solid biofuels (pellets), will allow obtaining stable biomass productivity for renewable energy needs, under various effects of abiotic stress factors, including those caused by global climate change. By employing micropropagation, it is possible to obtain a large number of fast-growing trees, sterile genotypes in a short time, overcome the dormant period of plants and carry out reproduction under controlled conditions throughout the year. The cultivation of woody biomass and the production of solid biofuels (pellets) will help reduce the use of and dependence on traditional energy sources, which will improve both the economic and environmental situation in the country. The obtained research results may also be of interest to educational and scientific institutions, in particular when teaching biotechnology, biochemistry, plant physiology and genetics.

**Keywords:** poplars (*Populus*), willows (*Salix*), land plants, bud burst phenology, biotechnology, *in vitro* plant culture, *in vitro* plant regeneration, abiotic stresses, soils, drought (water deficiency), salinity, proline, gene expression, stress response, adaptation, resistance, biomass, productivity, biofuel.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Хома Ю. А., Куцоконь Н.К., Рашидов Н. М., Павліський В. М., Нестеренко О. В. (2018). Вплив додавання розчину гліцерину на щільність пелет із соломи пшениці та деревини осики. *Наукові доповіді НУБіП України*, 5 (75): 1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.31548/dopovidi2018.05.007>

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

2. Хома Ю. А., Куцоконь Н. К. (2019). Фенологія розкривання бруньок у різних клонів тополь та верб. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 79: 86-94. DOI: 10.17721/1728\_2748.2019.79.79-84

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

3. Хома Ю. А., Худолєєва Л. В., Куцоконь Н. К. (2020). Вплив сольового стресу на рослини тополі клону 'INRA 353-38' та верби клону 'Житомирська – 1' в умовах культури *in vitro*. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 4(83): 43-49. DOI:10.17721/1728\_2748.2020.83.43-49

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

4. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rashydov N. (2021). Proline content in the plants of poplar and willow at the water deficit. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(3): 519-522. DOI:10.15421/022171.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

5. Khoma Y., Khudolieieva L., Rashydov N., Kutsokon N. (2022). *In vitro* culture initiation and regeneration of two highly productive clones of poplar. *Nova Biotechnologica Et Chimica*, e1089: 1-8. DOI.org/10.36547/nbc.1089

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

#### **які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

6. Худолєєва Л.В., Хома Ю.А., Куцоконь Н.К. (2018). Вплив сольового стресу на ростові параметри тополі та верби в культурі *in vitro*. *Міжнародна науково-практична конференція «Кліматичні зміни та сільське господарство. Виклики для аграрної освіти та науки»*, Київ, «Агроосвіта», С. 569 – 572.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

7. Khoma Y., Kutsokon N., Rashydov N. (2018). Peculiarities of producing pellets from wheat straw and aspen wood. *The 4-rd International Symposium On EuroAsian Biodiversity*, P. 387.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

8. Хома Ю., Куцоконь Н., Нестеренко О., Худолєєва Л., Шейкіна А., Рашидов Н.М. (2018). Вплив водного дефіциту на ростові параметри різних клонів тополь та верб. *Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»*, С. 90.



*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

9. Хома Ю.А., Худолєєва Л.В., Куцоконь Н.К., Шейкіна А., Володарський Є.В. (2019). Чутливість верби до сольового стресу в умовах культури *in vitro*. *Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів*: Матеріали XIV конференції молодих вчених. С. 107-108.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

10. Хома Ю.А., Куцоконь Н.К., Шейкіна А., Володарський Є.В. (2019). Фенологія розкриття бруньок у різних клонів швидкорослих дерев тополі та верби за дії водного дефіциту. *Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів*: Матеріали XIV конференції молодих вчених. С. 105-107.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

11. Хома Ю.А., Куцоконь Н.К., Рашидов Н.М., Нестеренко О.В., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Фіщенко В.В. (2020). Порівняння фізичних властивостей пелет із біомаси швидкорослих дерев. *Відновлювана енергетика та енергоефективність у XXI столітті*: матеріали XXI міжнародної науково-практичної конференції. С. 567–571.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

12. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rashydov N. (2021). Influence of water deficit on proline content in Salicaceae trees. *The 5<sup>th</sup> Symposium on EuroAsian Biodiversity*. P. 277.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

13. Літвінов С.В., Хома Ю.А., Худолієва Л.В., Музя М.П. (2021). Співвідношення бета-структурних та альфа-спіральних доменів у протеомі як маркер чутливості рослин до абіотичного стресу та появи білків з пріоноподібними властивостями. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції. С. 150.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

14. Litvinov S., Rashydov N., Kutsokon N., Rakhmetov D., Nesterenko O., Krivohizha M., Khudolieieva L., Khoma Y., Kozikova D. (2021). Screening markers of prion-like proteins formation in plants under environmental stress. *The 5<sup>th</sup> Symposium on EuroAsian Biodiversity*. P. 221.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

15. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rashydov N. (2021). Effect of salt stress on proline content in willow clone 'Zhytomyrska-1' in *in vitro* culture. *The 1<sup>st</sup> International Conference on Experimental Sciences and Biotechnology*. P. 64.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

16. Khoma Y.A., Kutsokon N.K., Rashydov N.M. (2021). Effect of water deficit on bud break in different clones of poplar and willow. *26th Session of The International Commission on Poplars and Other Fast-Growing Trees Sustaining People and the*

*Environment (IPC) “The role of Salicaceae and other fast-growing trees in economic recovery, sustainable wood supplies and climate change mitigation”.*

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

17. Rashydov N., Kutsokon N., Khoma Y., Kozikova D., Khudolieieva L., Kryvokhyzha M., Litvinov S., Rakhmetov D. (2022). Evaluation of prion-like proteins synthesis of the plant under influence stress factors. *6th edition of Global Congress on Plant Biology and Biotechnology*, 650p.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

18. Litvinov S., Khoma Y., Kutsokon N., Khudolieieva L., Kryvokhyzha M., Nesterenko O., Rashydov N. (2023). Drought stress increases the rate of beta sheets in poplar leaves. *Abstract book of FEBS Advanced Course 2023: Protein Folding, Aggregation and Compartmentalization*. P. 52.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

**які додатково відображають наукові результати дисертації:**

19. Спосіб підвищення якості пелет з біомаси. Патент № 135501 Україна. Хома Ю., Куцоконь Н., Рашидов Н., Павліський В., Нестеренко О. Зареєстровано 07.10.2019. Бюл. № 13, 2019. 2с.

*Особистий внесок:* здобувачка прийняла участь у патентному пошуку, проведенні випробувань, написанні та оформленні патенту.

20. Спосіб виготовлення пелет з біомаси однорічних пагонів павловнії. Патент № 144268 Україна. Хома Ю., Рахметов Д., Рахметова С., Фіщенко В.,

Нестеренко В., Куцоконь Н., Рашидов Н. Зареєстровано 25.09. 2020. Бюл. № 18, 2020. 2с.

*Особистий внесок:* здобувачка прийняла участь у патентному пошуку, проведенні випробувань, написанні та оформленні патенту.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	24
ВСТУП.....	25
РОЗДІЛ 1 .....	32
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	32
1.1. Стан альтернативної енергетики та перспективи її розвитку в Україні .....	32
1.1.1. Біомаса швидкорослих дерев тополь і верб як важливий потенціал для виробництва біопалива та розвитку відновлюваної енергетики .....	34
1.2. Мікроклональне розмноження швидкорослих дерев .....	36
1.3. Сезонна фенологія розкривання бруньок – вагомий фактор для визначення вегетативного періоду у дерев .....	38
1.4. Абіотичні стреси та механізми стійкості до дії цих факторів у швидкорослих дерев.....	41
1.4.1. Основні механізми відповіді швидкорослих дерев до дії посухи та засолення.....	43
Висновки до розділу 1 .....	50
РОЗДІЛ 2 .....	51
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	51
2.1. Матеріали дослідження .....	51
2.1.1. Рослинний матеріал .....	51
2.1.2. Реактиви та середовища .....	52
2.2. Методи дослідження .....	53
2.2.1. Протокол регенерації, мікроклонального розмноження та введення клонів швидкорослих дерев у культуру <i>in vitro</i> .....	53
2.2.1.1. Поверхнева стерилізація рослинного матеріалу.....	53
2.2.1.2. Введення стеблових експлантів тополь у культуру <i>in vitro</i> .....	53
2.2.1.3. Непряма регенерація та умови вирощування в культурі <i>in vitro</i> .....	54
2.2.2. Вивчення впливу водного дефіциту на клони швидкорослих дерев тополь і верб .....	55

2.2.2.1. Експериментальні умови та етапи проведення дослідження для вивчення дії водного дефіциту.....	55
2.2.3. Методика вивчення фенології розкривання бруньок у швидкорослих дерев тополь і верб .....	59
2.2.3.1. Дослідження впливу водного дефіциту на фенологію розкривання бруньок у швидкорослих дерев тополь і верб.....	61
2.2.4. Визначення чутливості тополь і верб до засолення хлоридом натрію в умовах культури <i>in vitro</i> .....	61
2.2.5. Визначення вмісту вільного проліну у клонів тополь і верб в залежності від дії водного дефіциту та засолення.....	62
2.2.5.1. Визначення вмісту вільного проліну у клонів тополь і верби за дії довготривалого впливу водного дефіциту .....	62
2.2.5.2. Визначення вмісту вільного проліну у клонів тополь і верби за дії короткотривалого впливу водного дефіциту.....	64
2.2.5.3. Визначення вмісту вільного проліну у клонів тополі і верби за дії сольового стресу.....	65
2.2.6. Визначення змін експресії генів залучених у відповідь на дію водного дефіциту у клонів тополь і верб.....	65
2.2.7. Методика виготовлення пелет для покращення їх якості.....	71
2.2.8. Статистична обробка результатів .....	73
Висновки до розділу 2 .....	74
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	75
3.1. Введення в культуру <i>in vitro</i> та регенерація клонів швидкорослих дерев .....	75
3.1.1. Ініціація клонів тополь в культурі <i>in vitro</i> .....	75
3.1.2. Непряма регенерація з експлантів листків та черешків.....	76
3.2. Вплив водного дефіциту на клони тополі та верби, перспективні для альтернативної енергетики.....	81
3.2.1. Виживаність рослин тополі та верби залежно від режиму зволоження протягом першого- та другого років вегетації .....	81

3.2.2. Динаміка ростових параметрів у рослин тополі та верби залежно від режиму зволоження протягом першого та другого років вегетації .....	82
3.2.3. Клонові особливості ростових параметрів тополі та верби залежно від режиму зволоження .....	86
3.3. Фенологія розкривання бруньок у клонів швидкорослих дерев тополь і верб	94
3.3.1. Фенологія розкривання бруньок за дії водного дефіциту.....	98
3.4. Чутливість швидкорослих дерев до засолення хлоридом натрію в умовах культури <i>in vitro</i> .....	102
3.5. Вміст вільного проліну у листках деяких клонів тополь і верб за дії водного дефіциту та засолення.....	107
3.5.1. Вміст вільного проліну у тополь і верби за дії довготривалого впливу водного дефіциту.....	107
3.5.2. Вмісту вільного проліну у тополь і верби за дії короткотривалого впливу водного дефіциту.....	110
3.5.3. Вміст вільного проліну у клонів тополі та верби за дії сольового стресу .....	112
3.6. Експресія деяких генів, що беруть участь у формуванні відповіді на стрес у рослин.....	114
3.7. Фізичні властивості пелет, виготовлених із біомаси швидкорослих дерев з додаванням розчину гліцерину.....	119
Висновки до розділу 3 .....	121
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	123
ВИСНОВКИ.....	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128
ДОДАТКИ.....	149

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

ВДЕ – відновлювані джерела енергії

АФК – активні форми кисню

СОД – супероксиддисмутаза

КАТ – каталаза

ПОД – пероксидаза

АПО – аскорбатпероксидаза

АБК – абсцизова кислота

П5КС –  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилатсинтетаза

П5КР –  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилатредуктаза

ПДГ – проліндегідрогеназа

П5К – піролін-5-карбоксилат

ПКДГ – піролін-5-карбоксилатдегідрогеназа

MS – (Murashige and Skoog medium) поживне середовище Мурасіге-Скуга

WPM – (Lloyd McCown's Woody Plant Medium) поживне середовище для деревних

ІМК – індол-3-масляна кислота

БАП – 6-бензиламінопурин

2-іП – N6 - (2-ізопентеніл) – аденін

НОК –  $\alpha$ -нафталіноцтова кислота

ТДЗ – тидіазурон

СІМ – (*callus induction medium*) поживне середовище для індукції калюсогенезу

ШІМ – (*shoot induction medium*) поживне середовище для індукції пагоноутворення

ШЕМ – (*shoot elongation medium*) поживне середовище для подовження пагонів



## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** У багатьох країнах розробляються і реалізуються проекти для вирішення енергетичних потреб за рахунок використання відновлюваних джерел енергії, зокрема біомаси.

Швидкорослі дерева тополі (*Populus*) та верби (*Salix*) належать до широко розповсюдженої в Північній півкулі родини Salicaceae, яка надзвичайно активно використовується людиною у різних сферах діяльності. Оскільки ці дерева можуть інтенсивно нарощувати велику кількість біомаси на одиницю площі [Aylott et al., 2008; Karp and Shield, 2008], їх активно застосовують для виробництва біопалива у короткоротаційних плантаціях. При цьому створюється потенціал для зниження кількості вуглекислого газу в навколишньому середовищі [Curtis et al., 2000]. Деревина та біомаса цих швидкорослих дерев використовується для виробництва паперу, будівельних матеріалів, біополімерів тощо [Peng et al., 2017]. Крім того, ці дерева відіграють важливу роль в охороні навколишнього середовища та лісорозведенні на деградованих ґрунтах.

Окрім економічної та екологічної значущості, тополі також є деревами, що мають суттєве наукове значення, завдяки легкості вегетативного розмноження, короткому циклу ротації обертання, малому розміру геному та здатності до регенерації *in vitro*. Ці важливі особливості в поєднанні з повним секвенуванням геному *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) ще у 2006 році зробили тополю модельною деревною рослиною для вивчення молекулярно-генетичних, фізіологічних та біохімічних процесів у дерев [Han et al., 2000; Tuskan et al., 2006].

Враховуючи занепокоєння громадськості з приводу використання орних земель для виробництва біоенергії, існує можливість реалізувати економічні та екологічні вигоди шляхом вирощування нехарчових деревних культур, таких як тополя і верба, на маргінальних землях, що є непридатними для вирощування сільськогосподарських культур [Rees, 2008]. Тополі і верби, завдяки своїй видовій різноманітності виявляють різний ступінь адаптації до різноманітних середовищ

існування [Barcala et al., 2019; Chen and Polle, 2010; Hasegawa et al., 2000]. Зокрема, деякі з них є толерантними до посухи та сольового стресу [Fisher and Polle 2010; Jansson and Douglas, 2007]. У зв'язку із сучасними глобальними змінами клімату, вивчення стійкості рослин до абіотичних стресів є дуже актуальним [IPPC, 2019]. Тому важливим аспектом при створенні короткоротаційних плантацій є вивчення стійкості цих деревних рослин до впливу різних типів стресів, зокрема абіотичних.

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

Дисертаційна робота виконувалася з 2017 по 2021 роки у відділі біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України під керівництвом професора, доктора біологічних наук Н.М. Рашидова в рамках бюджетних тем та проектів за програмою «Біопаливні ресурси та біоенергетика» (2018-2019 та 2020-2021 роки), державні реєстраційні номери 0118U005379 та 0120U000278), «Вплив стресових чинників на синтез білків з пріонними властивостями у рослин» (державний реєстраційний номер 0120U104870), де дисертантка була виконавицею окремих розділів за планом науково-дослідних робіт.

### **Мета і завдання дослідження:**

Мета роботи полягала у дослідженні стійкості швидкорослих дерев тополь та верб до абіотичних факторів посухи та засолення, що є важливим підходом для сталого виробництва біомаси та виготовлення твердого біопалива. Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

1) підібрати протокол введення в культуру, регенерації, мікроклонального розмноження, а також провести мультиплікацію перспективних для біоенергетики клонів швидкорослих дерев в культурі *in vitro*;

2) дослідити вплив водного дефіциту на ростові параметри клонів швидкорослих дерев тополі та верби;

3) дослідити фенологію розкривання бруньок у різних клонів швидкорослих дерев тополь і верб за нормальних умов та за дії водного дефіциту;

4) проаналізувати чутливість тополь і верб до засолення поживного середовища хлоридом натрію в умовах культури *in vitro*;

5) визначити вміст проліну у клонів тополь і верб за дії водного дефіциту та засолення;

6) визначити рівні експресії генів у клонів тополь і верб, які залучені у відповідь на дію водного дефіциту;

7) виготовити пелети із деревини швидкорослих дерев та розробити спосіб покращення фізичних властивостей цього біопалива.

*Об'єкт дослідження* – клони швидкорослих дерев тополь і верб;

*Предмет дослідження* – стійкість швидкорослих дерев тополь і верб до посухи та засолення.

#### **Методи дослідження.**

Для досягнення визначеної мети та виконання поставлених завдань використано теоретичні й експериментальні методи. Серед *теоретичних методів* використовували методи аналізу і синтезу для узагальнення літературних джерел та виявлення основних напрямів досліджень. Серед *експериментальних методів* застосовували: біотехнологічні (введення в культуру *in vitro*, дослідження умов мікроклонального розмноження, регенерації та солестійкості рослин); морфометричні (оцінка інтенсивності росту та розвитку рослин за дії стресових факторів в умовах *in vivo* та *in vitro*); фенологічні спостереження за розкриванням бруньок тополь та верб; біохімічні (метод спектрометрії для визначення рівня вмісту вільного проліну); молекулярно-біологічні (метод ПЛР, зокрема ПЛР в реальному часі для визначення активності генів, які залучені у стійкості до абіотичних стресів); фізико-хімічні (виготовлення пелет із біомаси швидкорослих дерев та визначення їх основних фізичних властивостей);

статистичні (програми для оброблення первинних експериментальних даних і оцінки достовірності одержаних результатів).

**Наукова новизна отриманих результатів** полягає у вивченні впливу засолення та посухи на різні клони швидкорослих дерев тополь і верб переважно української селекції, а саме *уперше*:

- здійснено введення в культуру *in vitro*, підбрано протокол регенерації та оптимальний склад живильних середовищ для подальшого культивування та мікроклонального розмноження високопродуктивних клонів тополь 'Новоберлінська-3' та 'Волосистоплідна', які є цінними для виробництва біомаси для біоенергетичної галузі;
- досліджено ростові параметри, вміст вільного проліну та визначено рівні експресії генів (*AQUA1* та *DREB68*) у клонів тополь і верб переважно української селекції за дії водного дефіциту;
- проаналізовано фенологію розкривання бруньок швидкорослих дерев тополь і верб в умовах відкритого та закритого ґрунту, а також за дії водного дефіциту;
- досліджено вплив засолення поживного середовища хлоридом натрію в культурі *in vitro* на ростові параметри, фізіологічний стан та вміст вільного проліну у клонів тополь та верби;
- розроблено спосіб для покращення фізичних властивостей пелет із деревини осики звичайної та клону тополі 'Стрілоподібна' за допомогою додавання водного розчину гліцерину перед пелетуванням.

**Практичне значення отриманих результатів.** Впровадження отриманих результатів дозволить одержувати стабільну продуктивність біомаси для потреб альтернативної енергетики за різних впливів абіотичних стресових факторів, в тому числі й обумовлених глобальними змінами клімату. За результатами досліджень було отримано 2 патенти України на корисну модель.

Також, отримані результати досліджень можуть мати інтерес у наукових та навчальних закладах освіти, зокрема під час викладання біотехнології, біохімії, фізіології та генетики рослин.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота підготовлена особисто здобувачкою під керівництвом проф., д.б.н. Рашидова Наміка Мамед огли. Аналіз наукової літератури, інформативно-патентний пошук за темою дослідження, підготовка огляду літератури, аналіз та узагальнення отриманих даних, формулювання висновків, написання всіх розділів дисертації та анотації проведено особисто здобувачем. Формування мети, наукових завдань дослідження, планування та проведення експериментальної роботи, аналізу та опрацювання експериментальних результатів, написання та підготовка до друку наукових праць, обговорення змісту та висновків дисертації проводилися спільно з науковим керівником проф., д.б.н. Рашидовим Н.М. та консультантом дисертаційної роботи к.б.н., пров. н.с. Куцоконь Н.К.

**Апробація матеріалів дисертації.** Окремі розділи дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на звітах і семінарах Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України та були представлені і схвалені на 13 наукових конференціях різних рівнів, а також опубліковані у відповідних наукових виданнях, серед яких: Міжнародна науково-практична конференція «Кліматичні зміни та сільське господарство. Виклики для аграрної освіти та науки» (Київ, 2018); The 4-rd International Symposium On EuroAsian Biodiversity (Kyiv, 2018); Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Кирилівка, 2018); XIV конференція молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (Київ, 2019); міжнародна науково-практична конференція «Відновлювана енергетика та енергоефективність у XXI столітті» (Київ, 2020); The 5<sup>th</sup> Symposium on EuroAsian Biodiversity (Kazakhstan-Turkey, 2021); «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 2021); The 1<sup>st</sup> International Conference on Experimental Sciences

and Biotechnology (Mugla, 2021); The 26<sup>th</sup> Session of International Poplar Commission FAO (Rome, 2021); *6th edition of Global Congress on Plant Biology and Biotechnology* (Singapore, 2022); *Abstract book of FEBS Advanced Course: Protein Folding, Aggregation and Compartmentalization* (Greece, 2023).

**Публікації.** Результати дисертаційних досліджень представлені у 20 наукових працях: 5 статей (у тому числі дві статті у виданнях, які індексуються у наукометричних базах даних «Scopus» та «Web of Science» та три статті у виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України): 13 тез міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференцій; 2 патенти України на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. У дисертації міститься 11 таблиць, 30 рисунків та 3 додатки. Загальний обсяг роботи складає 156 сторінок.

**Подяка.** Авторка щиро вдячна науковому керівникові, д.б.н., професору, завідувачу лабораторії біофізики сигнальних систем рослини, відділу біофізики і радіобіології, Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України — Рашидову Н. М. за підтримку, активне сприяння проведенню наукових досліджень, цінні консультації та плідне обговорення результатів роботи на всіх етапах її виконання. Авторка також висловлює подяку за надані консультації та безпосередню участь у проведенні досліджень, обробці і обговоренні результатів підготовці публікацій к. б. н., пров. н.с. лабораторії біофізики сигнальних систем рослин, відділу біофізики і радіобіології, Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України — Куцоконь Н. К.

Також авторка, висловлює вдячність, заступнику директора з наукової роботи Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України, професору, д. с.-г. н. Рахметову Д. Б. за сприяння при проведенні спільних досліджень для визначення теплотворної здатності пелет, а також зав. відділу

селекції, генетики та біотехнології Українського науково-дослідного Інституту лісового господарства та агролісомеліорації (УкрНДІЛГА) к.с.-г.н. Лось С.А. за надання первинного посадкового матеріалу швидкорослих дерев тополі і верби. Слова подяки авторка висловлює с.н.с. Інституту фізіології рослин і генетики Національної академії наук України д.б.н.— Шевченку В. В. за сприяння у проведенні спектрометричних досліджень для визначення вмісту проліну у тополь і верб за дії стресових чинників.

Окремі слова подяки авторка висловлює д. т. н., професору, заслуженому машинобудівнику України, директору (2000-2017 рр.), відокремленого підрозділу Національного університету біоресурсів та природокористування «Бережанський агротехнічний інститут» — Павліському В. М. та старшому викладачу ВП НУБіП «Бережанський агротехнічний інститут» — Нестеренку О. В., за консультації та надану допомогу у виготовленні пелет із біомаси швидкорослих дерев.

Також здобувачка висловлює слова подяки усім співробітникам Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, зокрема фахівцям відділу біофізики і радіобіології за допомогу в проведенні певних експериментальних досліджень — к.б.н. О.Г. Нестеренко, к.б.н. Л.В. Худолєсвій, к.б.н. М.В. Кривохижій та к.б.н. Літвінову С.В.

## РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Стан альтернативної енергетики та перспективи її розвитку в Україні

У сучасному світі є підвищена увага суспільства до проблем раціонального та ефективного використання енергоресурсів, а також до пошуку альтернативних джерел енергії. Загалом, альтернативні джерела енергії або ВДЕ (відновлювані джерела енергії) – це поновлювані джерела енергії, які постійно присутні, або ж утворюються періодично у довкіллі. До таких видів енергії відносять біомасу, енергію вітру, річок, а також сонячного випромінювання [Лось, 2013].

Зростання кількості населення, глобалізація, загальне підвищення якості життя – все це істотно збільшує попит на енергопостачання. У зв'язку з цим, у світі зменшується кількість викопних джерел енергії (вугілля, нафта, газ), зростає їх вартість, а також відбувається забруднення довкілля та збільшуються викиди парникових газів.

Враховуючи ці чинники, директива ЄС з відновлюваної енергетики стимулює запровадження стратегії, де щонайменше 32% всієї енергії в Євросоюзі до 2030 року має вироблятися із відновлюваних джерел. Україна як член Енергетичного співтовариства підтримала Директиву ЄС 2009/28/ЕС щодо розвитку відновлюваної енергетики, згідно з якою частка відновлюваних джерел енергії в структурі загального споживання у 2020 році мала досягнути 11%, а відповідно до Нової Енергетичної стратегії України до 2035 року цей показник у загальному енергоспоживанні країни повинен становити 25% [Нова стратегія України, 2017].

Крім цього, у відповідь на сучасні проблеми і труднощі світового енергетичного ринку, спричинені повномасштабним вторгненням 24.02.2022 року Росії в Україну, в травні 2022 року Європейська Комісія затвердила план



REPowerEU щодо відмови від російських енергоносіїв. Цей план має за мету до 2030 року припинити залежність ЄС від російських викопних видів палива, які використовуються як економічна і політична зброя. Тому для досягнення цілей плану REPowerEU передбачені заходи щодо підвищення енергоефективності, диверсифікації енергопостачання та прискореного впровадження ВДЕ для заміщення викопного палива, що також допоможе розв'язувати проблему кліматичної кризи [Постанова Кабінету Міністрів, 2022].

На сьогоднішній день в Україні частка «зеленої» енергії в кінцевому енергоспоживанні за останні роки збільшилася і має такі показники: частка ВДЕ – 7,3%, частка великої гідроенергетики – 5,1%, що разом становить 12,4% енергетики в загальному балансі виробництва електричної енергії. Це значний прогрес для нашої держави, оскільки за останні 7 років Україні вдалось виконати взяті на себе зобов'язання в Національному плані дій з відновлюваної енергетики на період до 2020 року, досягши понад 11% частки ВДЕ в кінцевому енергоспоживанні. Тепер Україна прямує до нових завдань, що затвержені в Новій Енергетичній стратегії до 2035 року. Незважаючи на те, що виробництво енергії з ВДЕ в Україні збільшилося, на жаль, темпи розвитку біоенергетики в нашій державі досі істотно відстають від європейських [Карамушка, 2021].

Збільшення використання енергії з відновлюваних джерел вважається важливою частиною стратегії України щодо збереження традиційних паливно-енергетичних ресурсів. Україна має всі передумови для використання енергії на основі відновлюваних джерел. Перш за все, це наявність великого енергетичного потенціалу на основі вітрової, сонячної енергії, енергії малих річок, а також біомаси [Савенко, 2017].

Враховуючи сучасний стан енергетичної залежності нашої держави від імпорتنих енергоносіїв, є велика необхідність для гарантування енергетичної безпеки України через можливість використання альтернативних видів палива.

Оскільки рівень забезпеченості енергетичними ресурсами виступає як один із основних факторів соціально-економічного розвитку країни, збільшення виробництва енергії з відновлюваних джерел, дозволить скоротити сукупні витрати енергетичної системи України та має вагомі перспективи для подальшого успішного розвитку держави [Хома та ін., 2018].

### ***1.1.1. Біомаса швидкорослих дерев тополь і верб як важливий потенціал для виробництва біопалива та розвитку відновлюваної енергетики***

Застосування відновлюваних джерел енергії, зокрема біомаси – це важливий пріоритет для економіки країни та один із стратегічних напрямків її розвитку. Використання біомаси для анаеробного розкладання та виготовлення твердого біопалива (пелети, брикети) складають альтернативу нафті та газу.

Наразі наша держава використовує незначну кількість біомаси для потреб відновлюваної енергетики, хоча і має для цього значний потенціал, а саме: різноманітні джерела біомаси, включаючи сільськогосподарські відходи, деревину та відходи деревообробного виробництва, а також цільове вирощування енергетичних культур. На сьогоднішній день в Україні частка біомаси у валовому кінцевому енергоспоживанні становить 1,78%, і її використання має великі перспективи [Лутковська та Зеленчук, 2021]. Незважаючи на те, що Україна має значний потенціал біомаси із відходів багатьох видів сільськогосподарських культур, велику увагу потрібно приділити деревині. Однак часто через низьку об'ємну щільність, неправильність форми і розміру, така біомаса в своїй первісній формі дуже проблематична для зберігання і транспортування, що збільшує витрати з її реалізації. Тому, одним із ефективних видів виробництва біопалива з біомаси дерев є пелети, отримані із заздалегідь заготовленої сировини шляхом пресування.

За своїми характеристиками паливні пелети є реальною альтернативою кам'яному вугіллю та нафті, так як майже не поступаються їм за своєю теплотворною здатністю, а за екологічними показниками вони випереджають

інші види палив, оскільки деревина спричиняє менший негативний вплив на довкілля [Худолєєва та ін., 2016].

Про актуальність застосування паливних пелет свідчить збільшення частки використання деревних в індустріальному виробництві теплової енергії в Європі, Азії та Північній Америці. Ринок деревних пелет суттєво збільшився з 2011 року, середній темп його приросту – до 14 % за рік [Thran et al., 2017]. Європа є основним виробником і споживачем пелет, за нею йдуть США, а потім решта країн світу. Європа також є глобальним імпортером деревних пелет [Mani et al., 2013; EN Plus, 2022]; найбільше споживання пелет зафіксовано у Великобританії, Фінляндії та Швеції, де вони в основному використовуються для виробництва електроенергії та опалення. Іншими важливими споживачами пелет в ЄС є Бельгія, Нідерланди, Данія та Італія [Сокольський, 2012].

Деревні пелети мають широкий спектр застосування як у промисловому, так і в приватному секторі опалення, де вони використовуються як зручне тверде біопаливо в автоматичних печах та котлах. Його суттєва перевага є екологічна чистота – вони не містять сірки, хлору та інших шкідливих для атмосфери елементів. Крім цього, біопаливо з біомаси деревини вважається паливом із нейтральним вуглецевим слідом, оскільки при спалюванні виділяється така ж кількість вуглекислого газу, яку споживають рослини під час росту [Мірошник та Засядько, 2011]. Щоб забезпечити якість пелет, наразі існує кілька стандартів, залежно від країни, в якій тверде паливо виробляється. У багатьох європейських країнах є актуальним стандарт ENplus, який визначає діаметр, довжину, щільність, вміст води, вміст золи, теплотворну здатність та ін. [Verma et al., 2012; EN Plus, 2022].

В останні десятиліття у всьому світі актуальним є вирощування короткоротаційних плантацій швидкорослих дерев тополі та верби. Тополі (*Populus*) та верби (*Salix*) належать до рослин родини Salicaceae. Ці дерева поширенні переважно в помірних та арктичних регіонах і пристосовані до широкого кола ареалів [Kuzovkina et al., 2008]. Тополя та верба мають відносно

невеликий геном. Основне число хромосом у тополь і верб становить 19, і рослини переважно диплоїди, проте спостерігаються і поліплоїди, зокрема їх багато у верб. Визначення послідовності геному тополі *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [Tuskan et al., 2006] та верби *Salix suchowensis* L. [Dai et al., 2014] відкрило великі можливості для проведення різноманітних досліджень. Високий рівень генетичної різноманітності [Berlin, 2011] та широке фенотипове різноманіття дозволяє застосовувати їх як модельні деревні рослини, в тому числі й для вивчення адаптаційних та еволюційних процесів.

Біомаса цих швидкорослих дерев активно використовується в різних галузях промисловості. Крім цього, ці дерева відіграють суттєву роль у покращенні навколишнього середовища. Зокрема, вирощування їх на деградованих ґрунтах дозволяє не використовувати землі, які застосовуються в сільському господарстві. Тополі та верби мають швидкий ріст, значні прирости біомаси та легко розмножуються вегетативно, що робить їх економічно привабливими біоенергетичними культурами [Куцоконь, 2014].

У досягненні високої продуктивності швидкорослих дерев важливу роль відіграють відповідний посадковий матеріал, інтенсивна агротехніка, водний режим та особливості ґрунту. Для цього необхідне проведення досліджень для визначення найбільш продуктивних видів дерев за різних кліматичних умов та стану навколишнього середовища.

## **1.2. Мікроклональне розмноження швидкорослих дерев**

Деякі важливі гібриди тополь і верб не розмножуються або погано розмножуються вегетативним розмноженням. Метод мікроклонального розмноження може подолати цю проблему. Мікроклональне розмноження – це безстатеве вегетативне розмноження в культурі *in vitro*, в результаті якого отримують рослини, генетично ідентичні вихідній батьківській формі, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. Завдяки використанню біотехнологічних методів культури *in vitro* можна швидко і у великих кількостях отримати якісний посадковий матеріал, що дуже важливо для

створення короткоротаційних плантацій. Крім цього, наявність деревних рослин у культурі *in vitro* дозволить у контрольованих лабораторних умовах моделювати дію абіотичних стресів та визначати їх вплив на різні параметри дерев, а також зберегти генотип вихідної рослини, контролювати фізико-хімічні показники посадкового матеріалу, та проводити роботу незалежно від погодних умов та пори року [Giri et al., 2004].

Мікроклональне розмноження дерев набагато складніше, ніж трав'янистих рослин і вимагає розробки специфічних технологій вирощування різних видів. Крім підбору складу живильного середовища за вмістом макро- і мікроелементів, необхідно також додавати різні вітаміни, фітогормони або регулятори росту [Khoma et al., 2022]. Також може знадобитися додавання абсорбентів та антиоксидантів, оскільки дерева можуть виділяти фенольні сполуки в середовище росту. Ці сполуки здатні швидко окислюватися і можуть призвести до загибелі рослин [Shahzad et al., 2017; Abiri et al., 2020].

Регенерація пагонів *in vitro* є не тільки швидким і надійним методом для розмноження цінних генотипів, але й необхідною передумовою для деяких біотехнологічних методів, таких як генетична трансформація та редагування генів. Генетичні маніпуляції здатні підвищити ріст рослин і стійкість до біотичних та абіотичних стресів, змінити якість деревини (наприклад, зменшити або змінити вміст лігніну) та покращити характеристики фіторемедіації [Confalonieri et al., 2003; Kutsokon, 2011; Song et al., 2019]. Однак не всі види дерев можуть регенерувати *in vitro*. Їх здатність до морфогенезу залежить від генотипу, типів тканин або експлантів, середовища культивування, компонентів живлення у середовищі та регуляторів росту [Giri et al., 2004; Мусієнко та Панюта, 2005; Ferreira et al., 2009]. Співвідношення ауксинів до цитокінінів відіграє вирішальну роль в успіху регенерації рослин. Деякі автори в своїх дослідженнях показали, що ефективні методи регенерації рослин слід оптимізувати для кожного клону окремо [Hill and Schaller, 2013; Bidabadi and Jain, 2020]. Незважаючи на те, що проведено багато досліджень з використанням експлантів (переважно листків і

черешків) дерев *Populus* для розмноження методом культури тканин, вони обмежуються невеликою кількістю видів, а проведення таких досліджень є важливим кроком у генетичних маніпуляціях [Noël et al., 2002; Thakur et al., 2012; Kutsokon et al., 2013; Kwon et al., 2015; Pokorná et al., 2017].

### **1.3. Сезонна фенологія розкривання бруньок – вагомий фактор для визначення вегетативного періоду у дерев**

В умовах глобальних змін клімату дослідження фенології розкривання та закривання бруньок у дерев необхідні для визначення тривалості вегетаційного сезону рослин, оптимального періоду посадки та проведення сезонних робіт для досягнення високої продуктивності [Хома та Куцоконь, 2019].

В Україні такі дослідження проводяться, головним чином, на плодкових деревах, зокрема персику [Голубкова, 2016], хоча подібні роботи є важливими і для лісових культур [Іщук, 2019]. Фенологія розкривання бруньок – вагомий фактор у рості та розвитку дерев [Chuine, 2010; Dijkstra, 2011]. Утворення бруньок є передумовою виживання та росту дерев, що синхронізуються щороку із щорічними змінами температури [Hanninen et al., 2007]. Температура, фотоперіод та інші кліматичні фактори спричиняють у рослин ряд гормональних реакцій, які призводять до розкривання бруньок навесні, а також їх закривання восени [Hannah, 2015; Rohde, 2011]. Щоб уникнути несприятливих умов під час зими, які пов'язані із сезонними змінами фотоперіоду та температури, дерева переходять у стан спокою. Цей період у листяних дерев супроводжується опаданням листків та утворенням нових навесні, а не утриманням їх протягом всієї зими [Aroga et al., 2003]. Зимовий спокій є необхідною умовою розвитку акліматизації та толерантності рослин до заморожування [Schoot, 2011].

Розкривання бруньок та відновлення росту регулюються температурою, світлом і фотоперіодом. Гормональні сигнали та вміст цукрів індукують камбіальний ріст стебла та розвиток меристем всередині бруньки навіть ще до видимої появи видовження бруньок [Pletsers et al., 2015]. Відновлення росту та розкривання бруньок залежать від накопичення температурних одиниць [Perry,

1971]. Температура є важливим фактором, що регулює розкривання бруньок у деревних рослин помірних широт [Polgar and Primack, 2011; Sivadasan et al., 2015], проте довжина світлового дня (фотоперіод) також відіграє важливу роль [Sanz-Perez et al., 2009]. Зменшення фотоперіоду восени є основним екологічним критерієм, що сприяє припиненню росту, а його зростання навесні сприяє розкриванню бруньок у багаторічних рослин [Lagercrantz, 2009]. Реакція на фотоперіод знаходиться під сильним генетичним контролем [Keller, 2011] і зберігається, коли дерева розповсюджуються на різних широтах. Найкращим температурним діапазоном для розкривання бруньок багатьох дерев у помірних широтах зазвичай вважається температура від + 3° C до + 7° C, тоді як нижчі, так і вищі температури є менш ефективними [Saure, 1985]. Вагоме значення має й баланс між денними та нічними температурами [Way, 2011].

Кліматичні умови, температура та терміни розкривання бруньок є дуже важливими для багаторічних рослин та їх продуктивності. З одного боку, генотипи з південних регіонів можуть мати перевагу у продуктивності за рахунок тривалішого вегетаційного сезону, зумовленого раннім розкриванням бруньок навесні та їх пізнім закриванням восени [Rohde, 2011]. Прогнозований більш тривалий вегетаційний період у майбутньому може бути краще використаний генотипами з півдня, оскільки вони припинять ріст пізніше, ніж місцеві дерева [Rohde, 2011]. З іншого боку, внаслідок занадто раннього розкривання бруньок навесні, дерева можуть зазнавати пошкодження приморозками, що може призвести до втрати ресурсів та навіть загибелі [Pellis et al., 2004]. В той же час гібриди тополь *Aigeiros* × *Tacamahaca* з північних регіонів, висаджені в більш південних широтах, демонстрували затримку в розкриванні бруньок навесні та ранню зупинку росту восени [Zalesny, 2009], що спричиняло зниження продуктивності.

У зв'язку з глобальними змінами клімату терміни фенологічних подій зміщуються [Parmesan and Yohe, 2003]. У Європі, особливо під час настання ранньої весни, глобальне потепління змінює фенологію дерев [Cleland, 2007], що

може призвести до різних реакцій як у окремих рослин, так і на рівні популяцій. Глобальні кліматичні зміни призводять до підвищення температури, зміни режимів опадів, збільшення частоти, тривалості та інтенсивності періодів посухи [Shukla et al., 2019; Spinoni et al., 2018]. З нестачею води рослини можуть зіткнутися на будь-якій стадії онтогенезу, і сила негативного впливу залежить від фази онтогенезу рослин. Періоди формування та росту органів під час весняної фенології є найбільш чутливими до дефіциту води, та найменш чутливими під час спокою [Bray, 2007]. Вода відіграє важливу роль у розкриванні бруньок у рослин, і її недолік може призвести до змін у цьому процесі [Ghelardini et al., 2014; Orlandi et al., 2020]. Зокрема, дослідження Ennajah et al. [2013], показали, що через дефіцит води у пробкових дубів відбувалася затримка розкривання бруньок. Також у цих рослин під час водного дефіциту спостерігали зниження вмісту соку у верхівкових бруньках. Це може бути пов'язано зі зменшенням розмірів судин ксилеми, флоєми та кортикальної паренхіми [Chen et al., 2017]. Крім того, молоді листки мають вищий фотосинтетичний потенціал, ніж старі [Niinemets et al., 2005], а дефіцит води затримує дату розкривання бруньок і, таким чином, зменшує цей потенціал.

Ефективність розкривання бруньок також може залежати від екологічних умов попереднього року. Зокрема, у дослідженнях [Šehulić et al., 2019] рослини *Quercus robur* L., які експериментально зазнали посухи під час вегетаційного періоду, наступної весни показали затримку розкривання бруньок. Також у дослідженні Sanz-Pérez & Castro-Díez [2010], було показано, що у трьох середземноморських видів *Quercus* нестача води в літній період змінює відсоток, розмір бруньок і дату їх розкривання.

Загалом, такі дослідження мало проводяться для швидкорослих дерев, але враховуючи, важливість отримання високої продуктивності цих дерев в біоенергетичних короткоротаційних плантаціях, дослідження фенології розкривання бруньок стають все більше необхідними в наш час [Хома та ін., 2019].



#### **1.4. Абіотичні стреси та механізми стійкості до дії цих факторів у швидкорослих деревах**

Зміни клімату характеризуються підвищенням температури та зміною схеми опадів, що часто має негативний вплив на наземні екосистеми в усьому світі [IPCC, 2014, 2019; Cavin et al., 2013].

Абіотичні стреси визначають як неживі фактори навколишнього середовища, які мають шкідливий вплив на організми. Зазвичай вони класифікуються на дві категорії залежно від їх походження: едафічні стреси, такі як дефіцит води (посуха), засолення, нестача поживних речовин або забруднення ґрунту, та атмосферні стреси, такі як підвищений вміст вуглекислого газу (CO<sub>2</sub>), підвищення температури, мороз або висока освітленість. Посуха та засолення є одними з найбільш руйнівних абіотичних стресів.

Посуха призводить до зниження вологості ґрунту, зменшення запасів поверхневих і підземних вод [Kumar, 2021], обмежуючи ріст, розвиток і продуктивність рослин [Trenberth et al., 2014]. За оцінками [IPCC, 2019], до 47% поверхні Землі підпадає під посушливий або напівпосушливий клімат, який отримує лише 50–150 мм опадів на рік, а на решті території періодично спостерігаються сезонні посухи [IPCC, 2019].

В Україні посушливі землі займають 17,6 тис. га (0,03% від загальної площі) і характерні для п'яти областей. Найбільша площа земель цієї категорії розташована у Херсонській області – 15,7 тис. га, а решта земель – у Донецькій, Запорізькій, Луганській та Сумській областях. Кількість цих площ локально може змінюватися, особливо при нестачі опадів в літній період [Мартин та ін., 2015].

Засолення ґрунтів, як і посуха, є загрозою продуктивності рослин. Згідно з даними ФАО, у світі близько 1 млрд га земель є засоленими [FAO, 2015]. В Україні, за даними Державного земельного кадастру, засолені ґрунти займають 1,92 млн га [Балюк та ін., 2012]. Існує первинне (природне) і вторинне (антропогенне) засолення. Якщо первинне засолення є природним явищем, то

вторинне засолення відбувається через нераціональний вплив людини на ґрунти. Накопичення солі в орних ґрунтах відбувається переважно із зрошувальної води, що містить незначну кількість хлориду натрію (NaCl), а також внаслідок використання неорганічних добрив [Tester and Davenport, 2003]. Серед зрошувальних земель в Україні налічується близько 350 тис. га засолених, з них 70-100 тис. га – вторинно засолених ґрунтів, і їхня площа невпинно зростає [Балюк та ін., 2012]. Крім цього, значного засолення зазнають ґрунти в мегаполісах внаслідок використання хлориду натрію в зимовий період для зменшення ожеледиці на дорогах [Urbanska et al., 2016].

Засолення ґрунтів відбувається переважно катіонами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  та аніонами  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  та  $\text{S}^{2-}$ . Серед різних типів засолення найбільш негативний вплив на ґрунти та рослини здійснюється хлоридами, зокрема хлоридом натрію (NaCl) [Худолєєва та Куцоконь, 2018]. Як і за посушливих умов, внаслідок збільшення солоності знижується доступність води в ґрунті для рослин [Hasegawa et al., 2000].

Особливість впливу хлориду натрію порівняно з іншими абіотичними стресами полягає у його подвійній дії на рослини. По-перше, іони  $\text{Na}^+$ , та  $\text{Cl}^-$  створюють високий осмотичний тиск в ґрунтовому розчині, в результаті чого відбувається зв'язування води та ускладнюється її поглинання коренем, що призводить до осмотичного стресу. По-друге, поглинені разом із водою  $\text{Na}^+$ , та  $\text{Cl}^-$  іони викликають порушення у функціонуванні мембран, негативно впливають на метаболічні процеси рослин, та призводять до зменшення ефективності фотосинтезу [Hussain et al., 2020].

Рослини, які можуть адаптуватися до впливу стресу, демонструють зміни на морфологічному, фізіологічному, біохімічному та молекулярному рівнях. Абіотичні стреси спричиняють значні втрати сільськогосподарського виробництва у всьому світі. Багато досліджень спрямовано на вивчення дії цих стресових факторів на сільськогосподарські рослини, щоб уникнути втрат урожаю.

Крім того, вивчення впливу та основних механізмів стійкості до таких стресових умов, як посуха та засолення є важливими і для деревних рослин. Адже при створенні біоенергетичних плантацій швидкорослих дерев важливим етапом є вибір не тільки найбільш продуктивних клонів, а й таких, які можуть бути толерантними до умов середовища [Хома та ін., 2020]. Вивчення впливу абіотичних стресів на швидкорослі дерева дозволить попередити зниження продуктивності біомаси та запобігти значним економічним витратам в подальшому, особливо, враховуючи те, що для уникнення конкуренції за сільськогосподарські угіддя, плантації закладаються на малородючих або відчужених землях [Oliveira et al., 2020].

#### ***1.4.1. Основні механізми відповіді швидкорослих дерев до дії посухи та засолення***

Посуха та засолення негативно впливають на фізіологічні особливості, блокують метаболізм, ріст, розвиток та продуктивність дерев, а також можуть призвести до їх загибелі.

Відомо, що представники родини Salicaceae чутливі до абіотичних стресів, особливо до посухи. У швидкорослих дерев, що ростуть в таких умовах можуть знижуватися ріст та продуктивність [Choat et al., 2018]. Щоб впоратися із негативними факторами, дерева покладаються на різні механізми запобігання та стійкості до абіотичних стресів, які варіюються залежно від генотипу [Estravis-Barcala et al., 2019].

Відмінності в адаптації до посухи серед тополь виявляються на найрізноманітніших рівнях організації, включаючи генетичні, морфологічні, фізіологічні та біохімічні відповіді рослинного організму [Guo et al., 2010]. Тополі та верби активують захисні механізми проти дефіциту води, включаючи закриття продихів, в результаті чого зменшується швидкість транспірації та фотосинтезу, а також відбувається синтез нових білків та накопичення осмолітів [Cvikrová et al., 2013]. Посуха та засолення впливає на затримку води в рослинах на клітинному,

тканинному та органному рівнях, викликаючи, схожі як специфічні, так і неспецифічні реакції [Beck et al., 2007].

Продихи у листках тополь і верб чутливі до змін водного потенціалу ґрунту, тому вони зазвичай закриваються під час посухи та сольового стресу. Зниження провідності продихів зменшує кількість вхідного CO<sub>2</sub>, що призводить до послаблення фотосинтезу. Ріст клітин в основному залежить від тургору клітини, двома основними компонентами якого є водний і осмотичний потенціали. В умовах посухи транспірація призводить до зниження водного та осмотичного потенціалів, викликаного втратою води. У рослин обмежується здатність проводити воду, що веде до зменшення площі листків та зниження росту дерев [Rice et al., 2004]. Однак такі коригування росту, фізіологічних параметрів та біохімічних механізмів залежать від тривалості стресу та виду рослин [Sabir et al., 2020].

Можливість уникнути стресових навантажень залежить від здатності дерева мінімізувати втрати і максимізувати поглинання води [Chaves et al., 2003]. Наприклад, деякі дерева збільшують поглинання води через поглиблення та розширення кореневі системи, зміни морфології листків (наприклад, утворюючи кутикулярний віск) та зменшення площі листків. Активне накопичення розчинених речовин у вакуолях (тобто, осмотичне регулювання) є загальною фізіологічною реакцією на посуху і засоленість ґрунту.

Основними механізмами толерантності до засолення, які, наприклад, спостерігаються в найбільш солестійкого виду тополі *Populus euphratica* Oliv. [Gu et al., 2004], є розподіл іонів Cl<sup>-</sup> у вакуолях клітин кореня, активація розподілу Na<sup>+</sup> в ґрунтовому розчині, а також зменшення надмірних втрат K<sup>+</sup> шляхом регуляції каналів, що активуються деполяризацією. Це призводить до підтримки балансу K<sup>+</sup> / Na<sup>+</sup>, що є важливою передумовою виживання в умовах сольового стресу [Chen and Polle, 2010]. Після тривалого засолення *Populus euphratica* Oliv., розвиває соковитість листків як пластичну морфологічну адаптацію, що призводить до розрідження солі [Chen and Polle, 2010]. Абсцизова кислота, Ca<sup>2+</sup>, активні форми

кисню та накопичення різноманітних первинних і вторинних метаболітів беруть участь у сприйнятті стресу.

Крім того, рослини мають механізми антиоксидантного захисту від абіотичних стресів. Відомо, що посуха та засолення спричиняє утворення активних форм кисню (АФК). АФК, такі як супероксидний радикал ( $O_2^-$ ), перекис водню ( $H_2O_2$ ) і гідроксирадикал (ОН), можуть атакувати мембранні ліпіди, інактивувати метаболічні ферменти та пошкоджувати нуклеїнові кислоти, що призводить до загибелі клітин [Mittler, 2006]. Антиоксидантні ферменти, серед яких найважливішими є супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), пероксидаза (ПОД) та аскорбатпероксидаза (АПО), є основною системою захисту будь-якого організму від пошкодження АФК [Laha et al., 2019]. СОД перетворює  $O_2^-$  в  $H_2O_2$  і  $O_2$ , а КАТ і ПОД перетворюють  $H_2O_2$  в  $H_2O$  [Centritto et al., 2011]. Активація цих антиоксидантних ферментів посилює стійкість до стресу у тополь і верб, які зазнають тривалого стресу від посухи чи засолення. Зокрема, здатність підтримувати активність антиоксидантних ферментів може бути важливою характеристикою для зменшення пошкодження клітин під час посухи у *Populus davidiana* [Yang et al., 2023].

Для зменшення негативного впливу водного дефіциту та засолення багато видів рослин накопичують розчинні органічні сполуки – осморегулятори. Цей процес відомий як осмотичне коригування і розглядається як важливий механізм толерантності, що дозволяє підтримувати клітинний тургор [Chaves et al., 2003]. На клітинному рівні заходи біохімічного захисту активуються у відповідь на посуху та засолення, щоб уникнути негативних наслідків стрес-індукованих АФК та пережити дефіцит води [Wang et al., 2010]. Помірний водний стрес призводить до підвищення концентрації розчинних вуглеводів (включаючи глюкозу, фруктозу і сахарозу), органічних кислот і поліолів, які потенційно сприяють підтримці тургору клітин, зокрема, як це і відбувається у листках *Populus euphratica* Oliv., через підвищення осмотичного тиску [Bogeat-Triboulot et al., 2007]. Також відбувається біосинтез і накопичення у вакуолі та цитозолі

неорганічних іонів, амінокислот (гліцинбетаїн, пролін та інші), фітогормонів, різноманітних вторинних метаболітів та білків, необхідних для метаболічної діяльності, що сприяють збереженню та цілісності клітинних мембран. Зміни вмісту цих речовин використовуються як фізіологічні індикатори при оцінці посухостійкості та солестійкості у рослин [Sami et al., 2016].

Накопичення вільного проліну в тканинах рослин відбувається як загальна реакція на дефіцит води, солоність та інші види стресу [Nasrin et al., 2016]. Окрім осмопротекторної функції пролін виконує також шаперонну, антиоксидантну, сигнал-регуляторну та інші функції [Sharma et al., 2019]. Пролін — амінокислота, яка поєднує функції метаболіту під час стресу, а також сполуки, що бере участь у регуляції клітинних процесів. У рослин, уражених різними стресорами, спостерігається підвищення концентрації вільного проліну до 80% [Shahbaz et al., 2013]. Сигнальні механізми, що індують синтез проліну в результаті абіотичного стресу в рослинах, насамперед зневоднення та засолення, включають АБК, іони кальцію, АФК і, можливо, інші сигнальні та гормональні медіатори [Parkash and Singh., 2020].

Пролін синтезується в рослинах двома біохімічними шляхами – з глутамату та орнітину, з регуляцією на двох рівнях: активності ферменту та експресії генів. Вважається, що синтез проліну, індукований стресом, відбувається переважно глутаматом [Liang et al., 2013]. Синтез проліну з глутамату відбувається в цитозолі і, швидше за все, в хлоропластах, завдяки дії біфункціонального ферменту  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилатсинтетази (П5КС) і  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилатредуктази (П5КР), тоді як синтез орнітиновим шляхом відбувається в мітохондріях. Для достатнього накопичення проліну у відповідь на стрес необхідна активація біосинтезу глутамату та фіксації азоту [Diaz et al., 2005]. Деградація проліну відбувається в мітохондріях шляхом послідовного окислення проліндегідрогеназою (ПДГ) до П5К (піролін-5-карбоксилат), а потім піролін-5-карбоксилатдегідрогенази (ПКДГ) до глутамату. Рівень деградації проліну визначається активністю ПДГ [Liang et al., 2013]. Через існування щонайменше

двох біохімічних шляхів контроль синтезу проліну є досить складним. Є багато досліджень, які показали зворотний зв'язок біосинтезу проліну з кінцевим продуктом, який діє як інгібітор реакції. Однак в умовах стресу ця регуляція порушується, і, незважаючи на високий рівень проліну, його синтез триває і може відрізнятися за інтенсивністю у різних видів рослин [Székely et al., 2008].

У процесах відповіді та адаптації рослин до дії стресів важливу роль відіграє пригнічення експресії генів та призупинення синтезу білків, характерних для життєдіяльності клітини за звичайних умов, а також активування генів, що кодують білки, які беруть участь в адаптивних реакціях [Колупаєв, 2010; Титов та ін., 2006]. Під час стрес-реакції та адаптації до різноманітних абіотичних стресів активуються гени, пов'язані зі стресом. Зокрема, важливу роль у цих процесах відіграють гени синтезу білків аквапоринів (*AQUA1*, *AQUA2*) та гени синтезу білків DREB (Dehydration responsive element binding), що мають вирішальну роль у реакції рослин на абіотичні стреси [Argiani et al., 2019; Konzen et al., 2019].

Аквапорини приймають участь у контролі передачі води в клітини рослин і з них, що має важливе значення для транспортування води всередині рослин та навколо них, а також для підтримки життєздатності клітин [Leng et al., 2021]. Активність генів *AQUA1* та *AQUA2* тісно пов'язана з вираженням толерантності рослин до абіотичних стресів, зокрема посухи та засолення [Li et al., 2015]. Аквапорини рослин зазвичай класифікують на чотири підродини на основі гомології послідовностей та субклітинної локалізації. Ці підродини являють собою: внутрішні білки плазматичної мембрани (PIP) з двома групами (PIP1 та PIP2); тонопластичні внутрішні білки (TIP); нодулін 26-подібні внутрішні білки (NIPs) та малі внутрішні білки (SIPs) [Li et al., 2014]. Аквапорини присутні як у плазматичній мембрані рослинних клітин, так і в мембранах тонопластів, що охоплюють вакуолі, на які часто припадає більшість об'єму рослинної клітини. Отже, аквапорини відіграють важливу роль у загальному визначенні водного балансу рослин, включаючи осморегуляцію, транспортування на великі відстані та ефективне використання води рослинами [Moshelion et al., 2015]. Аквапорини,

переважно PIP1, важливі для заповнення емболізованих судин і тим самим сприяють відновленню деревних рослин під час та після посухи. Зокрема, члени родини PIP1 аквапоринів відіграють важливу роль для відновлення ксилеми після емболії у *Populus trichocarpa* [Secchi and Zwieniecki, 2010].

У тополі білої ідентифікували п'ять транскриптів, що кодують мембранні білки аквапорину, які активувалися після поновлення поливу у дерев, що зазнали стресу від посухи [Berta et al., 2010]. Накопичення аквапоринів після поновлення поливу може бути невід'ємною частиною відновлення водного транспорту рослин в умовах нормального поливу [Hamanishi and Campbell, 2011]. Wildhagen et al. [2018] повідомили про значні зміни в регуляції генів, необхідних для ферментів клітинної стінки. В цій же роботі спостерігали зменшення вмісту лігніну та підвищення потенціалу оцукрювання деревини під впливом посухи, що може мати сприятливі наслідки для біотехнологічного використання деревини [Wildhagen et al., 2018].

Гени *DREB* (dehydration responsive element binding - зв'язування елементів, що реагують на зневоднення) вважаються одним з найкраще вивчених родин генів, залучених до пом'якшення впливів абіотичних стресів, зокрема, посухи та засолення [Du et al., 2018; Huang et al., 2020]. Попередні дослідження показали, що надмірна експресія *DREB* посилює експресію ряду цільових генів, особливо тих, які кодують білки LEA (late embryogenesis abundant proteins – білки пізнього ембріогенезу), дегідрини та ін., а це, в свою чергу, призводить до збільшення стійкості до абіотичних стресів [Lata and Prasad, 2011]. Накопичення гідрофобних білків пізнього ембріогенезу є важливим аспектом екологічного стресу в рослинах, який зазвичай асоціюється з толерантністю до умов дефіциту води. Останні дані свідчать про те, що білки LEA можуть відігравати важливу роль у стабілізації інших білків і мембран, а також у запобіганні агрегації білків у періоди дефіциту води [Goyal et al., 2005]. Наприклад, у відповідь на осмотичний стрес у тополі спостерігалася швидка активація синтезу дегідринів та білків родини LEA [Caruso et al., 2002].



Гени *DREB* належать до великої родини специфічних для рослин факторів транскрипції AP2/ERF (APETALA 2/ethylene-responsive element binding factor), [Dietz et al., 2010]. Ця родина факторів транскрипції, має спільний добре збережений ДНК-зв'язуючий домен, що включає DRE-зв'язувальні білки (DREBs), які активують експресію генів, що відповідають за абіотичних стрес, через специфічне зв'язування з С-повтором, утворюючи елемент (DRE/CRT), що реагує на зневоднення [Mizoi et al., 2012]. Дослідження активності генів *DREB* були проведені лише на обмеженій кількості видів багаторічних деревних рослин, включаючи тополю. Зокрема, дослідження [Yang et al., 2020] показали, що експресія генів *DREB*, значно підвищує стійкість до посухи у тополі *Populus ussurensis* L., впливаючи як на фізіологічні так на біохімічні механізми захисту. Загалом, у відповіді та у стійкості до впливу абіотичних стресів, таких як посуха і засолення, залучена значна кількість генів.

Родина Salicaceae має велику різноманітність серед видів та гібридів щодо відповіді та стійкості на дію посухи, що по-різному впливає на продуктивність рослин. Зокрема, дослідження [Larchevêque et al., 2011] показали, що у тополі *Populus balsamifera* × *Populus maximowiczii* A. Henry, при максимальному стресі від посухи дерева скидали листки, що означало більшу втрату продуктивності. Проте, після відновлення поливу з'являлися нові листки, пришвидшувався ріст і загальна продукція біомаси істотно не зменшилася через посуху, тоді як у тополі *Populus balsamifera* × *Populus trichocarpa* Torr. & Gray спостерігали більший негативний вплив водного дефіциту, і навіть після відновлення поливу спостерігали втрати біомаси [Larchevêque et al., 2011; Rasheed et al., 2021].

Високою стійкістю до впливу посухи, характеризується клон тополі 'Veronese' (*Populus deltoides* × *P.nigra*), який незважаючи на посушливі умови, може давати високі прирости біомаси [McIvor and Jones, 2015]. Серед верб - *Salix psammophila* характеризується високою стійкістю та адаптацією до посушливих та напівпосушливих регіонів. Вона може добре адаптуватися до багатьох абіотичних стресів, включаючи посуху, екстремальні температури, піщані бурі тощо [Li et al.,

2016]. *Salix psammophila* часто використовується для запобігання вітрової ерозії та контролю опустелювання, відіграючи життєво важливу роль у відновленні місцевої рослинності [Huang et al., 2015]. Інші види верб, *Salix matsudana* та *Salix gordejevii*, стійкі до засолення ґрунту, стабільно ростуть протягом довгого періоду на ґрунтах з високим вмістом солі. Такі дерева висаджують на березі моря з метою покращення екологічної ситуації та використання маргінальних земель [Zhang et al., 2017; Ran X et al., 2022].

### **Висновки до розділу 1**

Проведений аналіз літератури стосовно стану та розвитку альтернативної енергетики, зокрема використання біомаси швидкорослих дерев тополь і верб для виробництва біопалива, а також дані попередніх експериментальних досліджень, щодо стійкості цих швидкорослих дерев до дії абіотичних стресів, дозволяють зробити висновок про те, що поставлені нами завдання є актуальними як для фундаментальних біологічних наук, так і для біоенергетичної галузі.

На основі проведеного аналізу нами були поставлені завдання та сплановані дослідження по оптимізації методик регенерації та мікроклонального розмноження клонів швидкорослих дерев тополь і верб, аналізу впливу засолення та водного дефіциту на вміст проліну та на рівень експресії генів у клонів тополь і верб, визначення фенології розкривання бруньок у тополь і верб та виготовлення пелет із біомаси швидкорослих дерев.

Основні положення цього розділу викладено в публікаціях автора: [19],[34],[43],[64],[96].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Матеріали дослідження

##### 2.1.1. Рослинний матеріал

Для визначення впливу водного дефіциту та засолення в умовах *in vivo* та *in vitro*, посадковий матеріал швидкорослих дерев тополі і верби було відібрано в Національному ботанічному саду імені М.М. Гришка НАН України (м. Київ). Досліджувані рослини в більшості є клонами української селекції, отриманими в середині 20 ст.

В дисертаційній роботі були досліджені представники рослин родини Salicaceae, серед яких три клони верби та шість клонів тополь (в дужках наведено джерела інформації щодо походження клонів):

- верба (*S. alba* × *S. fragilis*) – клон ‘Печальна’ [Патлай, Руденко, 1990]
- верба (*Salix sp.*) – клон ‘Житомирська-1’ [Рахметов та ін., 2015]
- верба (*S. alba* × *S. fragilis*) – клон ‘Лісова пісня’ [Патлай, Руденко, 1990]
- тополя (*P. deltoides* × *P. pyramidalis* Roz.) – клон ‘Стрілоподібна’ [Провести изучение., 1975]
- тополя (*P. deltoides* Marsh. × *P. balsamifera* L.) – клон ‘Канадська × Бальзамічна’ [Торосова та ін., 2015]
- тополя (*Populus pyramidalis* Roz × *Populus laurifolia* L.) – клони ‘Новоберлінська-3’ та ‘Новоберлінська-7’ [Торосова та ін., 2015]
- тополя (*Populus trichocarpa* Torr. Et Gray) – клон ‘Волосистоплідна’ [Торосова та ін., 2015]
- тополя (*Populus nigra* cv. “Pyramidalis”) – клон ‘Слава України’ [Збереження генетичних., 2013]
- тополя (*Populus deltoides* Marsh.) (вільне схрещування) – клон ‘Гулівер’ [Патлай, Руденко, 1990]
- осика звичайна – (*Populus tremula sp.*)

- тополя (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*) – клон ‘INRA 353-38’ – модельний клон

### **2.1.2. Реактиви та середовища**

При проведенні досліджень використовували наступні хімічні реактиви та готові поживні середовища:

- WPM солі (Woody Plant Media, Duchefa, Нідерланди);
- MS солі (Murashige & Skoog medium, Duchefa, Нідерланди);
- WPM вітаміни (Duchefa, Нідерланди);
- міо-інозитол (Duchefa, Нідерланди);
- сахароза;
- L- глутамін (Duchefa, Нідерланди);
- L- пролін;
- агар;
- 6-бензиламінопуридин (БАП) (Duchefa, Нідерланди);
- індол-3-масляна кислота (ІМК) (Duchefa, Нідерланди);
- MES (Duchefa, Нідерланди);
- N6 - (2-ізопентеніл)– аденін, (2-ІП) (Duchefa, Нідерланди);
- α-нафталіноцтова кислота (НОК) (Duchefa, Нідерланди);
- тидіазурон (Duchefa, Нідерланди);
- нінгідрин;
- крижана оцтова кислота;
- гіпохлорид натрію;
- дистильована вода;
- 96% етанол;
- 70%-ий розчин етанолу;
- хлорид натрію;
- набір реагентів RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, Scientific, США);
- набір реагентів PCR Biosystems SyGreen (UK).

## **2.2. Методи дослідження**

### **2.2.1. Протокол регенерації, мікроклонального розмноження та введення клонів швидкорослих дерев у культуру *in vitro***

Для введення рослин в культуру *in vitro* та проведення непрямой регенерації необхідно провести підбір та поверхневу стерилізацію рослинного матеріалу, а також підібрати склад поживного середовища.

#### **2.2.1.1. Поверхнева стерилізація рослинного матеріалу**

При проведенні експерименту з регенерації та для введення в культуру *in vitro* клонів тополь використовували бруньки та молоді не здерев'янілі пагони рослин. Експланти клонів тополь - 'Новоберлінська-3', та 'Волосистоплідна', відбирали на початку вегетаційного сезону. Джерелом пагонів були рослини на ювенільній стадії розвитку, які утримуються в горщиках в колекції швидкорослих дерев, що знаходиться в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Знезараження вихідного рослинного матеріалу від бактерій та мікроскопічних грибів проводили за протестованою у попередніх дослідженнях методикою, шляхом обробки експлантів різними розчинами в три стадії: 1) концентрований мильний розчин; 2) гіпохлорит натрію, розведений дистильованою водою (1:3) (час експозиції 10 хв.); та 3) 70%-ий розчин етанолу (час експозиції 1 хв.). Після кожного етапу рослини ретельно промивали стерильною дистильованою водою тричі [Худолеєва та ін., 2017].

#### **2.2.1.2. Введення стеблових експлантів тополь у культуру *in vitro***

Для введення в культуру *in vitro*, оброблені асептичні експланти клонів тополь 'Новоберлінська-3' та 'Волосистоплідна' висаджували на два типи поживних середовищ із різним вмістом макро- і мікроелементів (табл. 1). Стеблові експланти (по 15 штук кожного варіанту) висаджували в пробірки на поживні середовища на основі солей MS (Murashige & Skoog medium; Duchefa, Netherlands) і WPM (Woody Plant Medium; Duchefa, Netherlands), доповнених регуляторами росту 6-бензиламінопурином (БАП, 0,2 мг/л) та індолілмасляною

кислотою (ІМК, 0,1 мг/л). Всього було висаджено по 30 експлантів кожного клону. Рослинні експланти культивували в термальній кімнаті при температурі 24°C і 16-годинним фотоперіодом. Відсоток введених в культуру *in vitro* стеблових експлантів визначали після 30 днів культивування.

Таблиця 1.

**Склад поживних середовищ для введення в культуру *in vitro*, мікроклонального розмноження та регенерації експлантів тополь**

Компоненти	Поживне середовище (1 л) призначене для:						
	Введення в культуру <i>in vitro</i>		Індукції калюсогенезу (СІМ)	Індукції пагоноутворення (SІМ)	Видовження пагонів (SЕМ)	Культивування рослин-регенерантів в культурі <i>in vitro</i>	
Макро- та мікроелементи	WPM 1,15г	MS 2,18г	MS 2,18 г	MS 2,18 г	MS 2,18 г	MS 2,18г	WPM 1,15 г
WPM вітаміни	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл
Міо-інозитол	-	0,1 г	0,1 г	0,1 г	0,1 г	0,1 г	-
Сахароза	20 г	30 г	30 г	30 г	30 г	30 г	20 г
MES	-	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	-
L-глутамін	-	0,2 г	0,2 г	0,2 г	0,2 г	0,2 г	-
Агар	7,5 г	7,5 г	7,5 г	7,5 г	7,5 г	7,5 г	7,5 г
БАП	0,2 мг	0,2 мг	-	-	0,2 мг	-	-
ІМК	0,1 мг	0,1 мг	-	-	-	-	-
НОК	-	-	1,86 мг	-	-	-	-
2-ІІІ	-	-	1,02 мг	-	-	-	-
ТДЗ	-	-	-	0,04 мг	-	-	-
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

**2.2.1.3. Непряма регенерація та умови вирощування в культурі *in vitro***

Регенерацію пагонів проводили щонайменше на 30 експлантатах листків і черешків кожного клону тополь 'Новоберлінська-3' та 'Волосистоплідна', застосовуючи протокол Meilan and Ma [2006]. Для індукції калюсогенезу застосовували середовище (табл.1) - *callus induction medium* (СІМ) на основі 2,18 г/л солей MS, 2 мл/л вітамінів WPM, 0,1 г/л міо-інозитоли, 30 г/л сахарози, 0,26 г/л MES, 0,2 г/л L-глутаміну та 7,5 г/л рослинного агару, з додаванням регуляторів

росту №6 - (2-ізопентеніл) - аденін (2-ІІ, 1,02 мг/л) та  $\alpha$ -нафталіноцтовою кислотою (НОК, 1,86 мг/л). Експланти культивували на чашках Петрі в темряві при 21°C протягом 3 тижнів.

Експланти, які утворили калюс, переносили на середовище для індукції пагонів (табл. 1) – *shoot induction medium* (SIM) на основі 2,18 г/л солей MS з 2 мл/л вітамінів WPM, 0,1 г/л міо-інозитулу, 30 г/л сахарози, 0,26 г/л MES, 0,2 г/л L-глутаміну та 7,5 г/л рослинного агару, доповненого регулятором росту тидіазурону (ТДЗ, 0,04 мг/л). Рослини вирощували на чашках Петрі в культуральній кімнаті при температурі 24°C та 16-годинному фотоперіоді протягом 2 тижнів.

Потім експлантати з мікропагонами (1-1,5 см) переносили в середовище для видовження пагонів (табл.1) – *shoot elongation medium* (SEM) на основі 2,18 г/л солей MS з 2 мл/л вітамінів WPM, 0,1 г/л міо-інозитулу, 30 г/л сахарози, 0,26 г/л MES, 0,2 г/л L-глутаміну та 7,5 г/л рослинного агару з додаванням БАП (0,2 мг/л). Відсоток експлантів, що утворюють пагони, та кількість регенерованих пагонів на експлантат реєстрували через шість тижнів. Отримані рослини-регенеранти культивували в культуральній кімнаті при температурі 24°C та 16-годинному фотоперіоді на різних поживних середовищах (табл.1) [Khoma et al., 2022].

## **2.2.2. Вивчення впливу водного дефіциту на клони швидкорослих дерев тополь і верб**

### **2.2.2.1. Експериментальні умови та етапи проведення дослідження для вивчення дії водного дефіциту**

Посадковий матеріал відбирали на дослідній ділянці Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України в лютому 2018 року. За результатами попередніх досліджень [Куцоконь та ін., 2017] було визначено клони з найбільш активним ростом рослин. Для проведення дослідження було відібрано 9 клонів швидкорослих дерев тополь і верб (рис. 2). Живці цих клонів тополь і верб висаджували в горщики об'ємом 1 л з ґрунтовою сумішшю (рис. 1А) яка складалася із чорнозему, торфу та вермикуліту у співвідношенні (10:10:1,5).

Перед посадкою їх в ґрунтову суміш, визначали масу та заміряли довжину кожного живця 9-ти клонів верб і тополь. Кожен варіант висаджували в 6-ти повторах. Протягом усього вегетаційного сезону рослини утримували на відкритому повітрі, забезпечуючи захист від дощу за допомогою укриття поліетиленовою плівкою. Під час укорінення живців протягом 30 днів всі рослини поливали однаковою кількістю води (рис. 1Б).



Рисунок 1. Клони швидкорослих дерев тополь і верб, висаджені в горщики:  
А - посаджені живці; Б - рослини, вирощені протягом 30 днів, перед диференційованим поливом.

Через 30 днів було розпочато диференційований полив, що включав 4 варіанти зволоження: нормальний полив (контроль 100%) та полив з водним дефіцитом - 75%, 50% та 25% зволоження за об'ємом від контролю. Контрольні рослини (100%) поливали 100 мл води через день або при необхідності. Експериментальні рослини, зі зменшенням об'єму поливу поливали одночасно тоді коли і контрольні. Вологість ґрунту постійно контролювали за допомогою вологоміра.

Заміри ростових параметрів рослин робили щомісячно, протягом травня-жовтня. Проводили обліки висоти пагона (см), кількості пагонів та листків, ширини і довжини листків (см) за найбільшим листком, приросту листків та діаметра пагона (мм), в кінці вегетаційного сезону.



В квітні 2019 року ті самі рослини виносили на відкрите повітря. Крім цього додатково провели посадку ще трьох клонів швидкорослих дерев (рис.2), забезпечуючи такі ж умови захисту від дощу, як у попередній рік, та відповідний диференційований полив. Протягом вегетаційного періоду було проведено 4 щомісячні обліки ростових параметрів за тими ж критеріями як і в попередньому році (з червня – вересень). Оскільки, такий диференційований полив здійснювався протягом усього вегетаційного періоду, він вважався як довготривалий вплив водного дефіциту (рис.2) [Хома та ін., 2018].

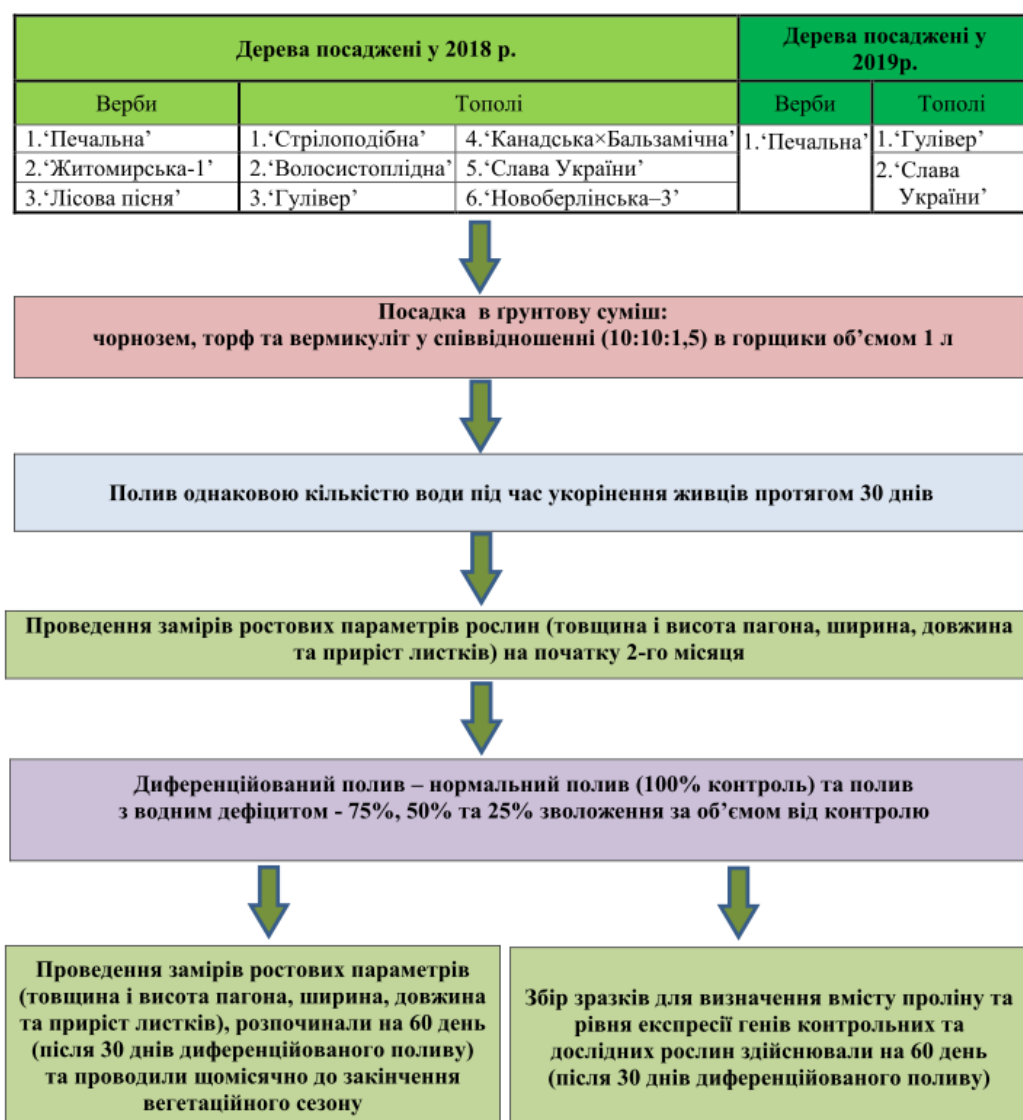


Рисунок 2. Схема проведення експерименту з визначення довготривалого впливу водного дефіциту у різних клонів швидкорослих дерев тополь і верб.

У 2019 році також було проведено експеримент для вивчення короткотривалого впливу дії водного дефіциту на клони швидкорослих дерев тополь 'Стрілоподібна', 'Гулівер' та верби 'Печальна' (рис. 3). Для цього на 60 – ий день після вкорінення проводили диференційований полив, що включав лише 2 варіанти зволоження: нормальний полив - 100% (контроль), полив з водним дефіцитом - 50% зволоження за об'ємом від контролю та 0 % відсутність поливу (посуха). Контролем служив достатній полив. Контрольні рослини (100%) поливали по 100 мл води через день або за необхідності. Експериментальні рослини поливали одночасно з контрольними. Рослини, що піддавали впливу посухи, протягом експерименту не поливали. Експеримент тривав протягом 10 днів. Для кожної обробки використовували три горщики, і кожен горщик містив дві рослини. Вологість ґрунту контролювали за допомогою вологоміра. Заміри ростових параметрів рослин протягом даного періоду не проводили.

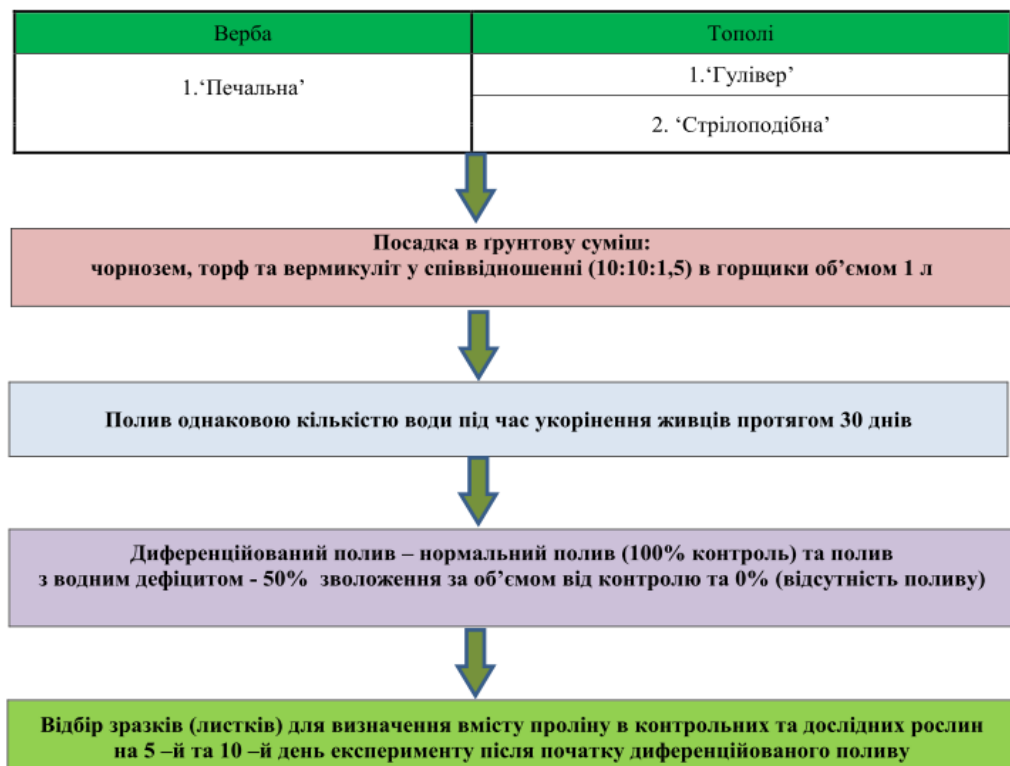




Рисунок 3. Схема експерименту з вивчення короткотривалого впливу водного дефіциту у різних клонів швидкорослих дерев тополь і верб.





### 2.2.3. Методика вивчення фенології розкривання бруньок у швидкорослих дерев тополь і верб

Спостереження за фенологією розкривання бруньок у тополь і верб проводили на рослинах в ювенільній стадії розвитку, що ростуть як у відкритому, так і закритому ґрунті. У квітні 2018 року проводили спостереження за деревами, висадженими на випробній дослідній ділянці швидкорослих біоенергетичних дерев, закладеній в 2015 р. у Національному Ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України, яка включає 19 клонів тополь та 10 клонів верб [Куцоконь та ін., 2017; Kutsokon et al., 2022]. Більшість клонів для закладення ділянки були надані Українським науково-дослідним Інститутом лісового господарства та агролісомеліорації (УкрНДЛГА), і є переважно клонами української селекції [Торосова та ін., 2015; Патлай та Руденко, 1990; Провести изучение., 1975; Збереження генетичних., 2013]. Аналіз фенології розкривання бруньок на цій дослідній ділянці проводили протягом 12 днів, з 12 по 23 квітня 2018 року. Всього було проведено 5 обліків. Стадії розкривання бруньок (РБ) характеризували згідно шестибальної “Шкали розкривання бруньок” за методикою [Weih, 2009] (з модифікацією Альміра Карачича (Almir Karacic) та Анн Крістін Роннберг-Вестлюнг (Ann Christin Rönnerberg-Wästljung), яка застосовується в Шведському аграрному університеті (Швеція, Уппсала) (табл. 2).

Таблиця 2.

#### Шкала розкривання бруньок

	<b>Оцінка 1.</b> Бруньки потовщені, але ініціалей не видно. <b>Оцінка 1,5,</b> якщо початкову верхівку видно приблизно на 1мм, але покривні луски закриті.
	<b>Оцінка 2.</b> Бруньки розкриваються, ініціалі видимо видаються аж до однієї довжини покривних лусок.

	<b>Оцінка 3.</b> Бруньки все ще відкриваються, листові примордії витягнуті, скручені та довші, ніж покривні луски.
	<b>Оцінка 4.</b> Листки напіврозкриті, покривні луски опадають. <b>Оцінка 4,5,</b> якщо більшість листків, але не всі, розкриті.
	<b>Оцінка 5.</b> Листки повністю розкриті.
	<b>Оцінка 6.</b> Листки повністю розкриті та пагін сформований більше ніж на 1 см.

Аналіз фенології розкривання бруньок у закритому ґрунті, проводили на трьох клонах верби ('Лісова пісня', 'Печальна', 'Житомирська-1') та шести клонах тополь ('Стрілоподібна', 'Канадська×Бальзамічна', 'Слава України', 'Гулівер', 'Волосистоплідна' та 'Новоберлінська-3'), які були висаджені у 2018 р. у горщики об'ємом 1 л. Протягом всього вегетаційного сезону рослини утримували в горщиках на відкритому повітрі, забезпечуючи достатній полив (рис 2.). Після настання сезонного листопаду рослини переносили в неопалюване приміщення із обмеженим світловим режимом. Середня температура під час зберігання становила 5–7°C, у період розкривання бруньок – 7–12°C.

У період спокою та під час розкривання бруньок рослини утримували в приміщенні без штучного освітлення. Починаючи з 6-го лютого 2019 року, після виходу із стану спокою, щотижня проводили аналіз фенології розкривання бруньок протягом 45 днів. Стадії розкривання бруньок (РБ) характеризували згідно шестибальної "Шкали розкривання бруньок" (табл. 2) за представленою раніше методикою [Weih, 2009]. Окремо оцінювали динаміку розкривання апікальних та бічних бруньок [Хома та Куцоконь, 2019; Khoma et al., 2021].

### **2.2.3.1. Дослідження впливу водного дефіциту на фенологію розкривання бруньок у швидкорослих дерев тополь і верб**

Аналіз фенології розкривання бруньок за дії водного дефіциту проводили у закритому ґрунті, на 9-ти клонах швидкорослих дерев які були висаджені у горщики в 2018 році та протягом вегетаційного сезону піддавали дії водного дефіциту згідно схеми, представленої на рис.2

В період спокою та під час розкривання бруньок рослини утримували в приміщенні без штучного освітлення, забезпечуючи достатній полив усіх варіантів. Починаючи з 6-го лютого 2019 року, після виходу із стану спокою, щотижня проводили аналіз фенології розкривання бруньок протягом 45 днів і характеризували згідно шестибальної “Шкали розкривання бруньок” (табл. 2). за представленою раніше методикою [Weih, 2009] (табл. 2). Стан бруньок оцінювали вісім разів (6, 13, 18, 26 лютого та 4, 12, 19, 23 березня). Визначали окремо динаміку розкривання як апікальних так і бічних бруньок [Хома та ін., 2021].

### **2.2.4. Визначення чутливості тополь і верб до засолення хлоридом натрію в умовах культури *in vitro***

Чутливість до засолення у тополь клонів ‘INRA 353-38’ і ‘Новоберлінська-7’ та верби клону ‘Житомирська - 1’ оцінювали за дії хлориду натрію в культурі *in vitro*. Для цього рослини мультиплікували шляхом мікроклонального розмноження та вирощували в пробірках на модифікованому середовищі MS. Експериментальні рослини культивували на аналогічному середовищі, з додаванням хлориду натрію у концентраціях 25 мМ, 50 мМ та 100 мМ. Контрольні рослини вирощували на вільному від хлориду натрію середовищі. На кожен варіант висаджували по 10 рослин. Рослини культивували протягом 30 днів при температурі 24°C і 16-годинному фотоперіоді. Стан рослин, інтенсивність їх росту (за довжиною пагона) та коренеутворення (за кількістю коренів) оцінювали на 10-й та 30-й день культивування. Стан рослин оцінювали за розробленою нами 4-бальною шкалою, де «0» балів – рослина повністю загинула; «1» бал – більшість листків та/або стебла засохли, проте частина рослини залишається живою, ріст

значно пригнічений; «2» бали – невелика частина листків має слабкі ознаки в’янення чи підсихання, ріст дещо пригнічений; «3» бали – рослина без ознак в’янення чи підсихання, перебуває в найбільш активній ростовій стадії [Хома та ін. 2019].

### **2.2.5. Визначення вмісту вільного проліну у клонів тополь і верб в залежності від дії водного дефіциту та засолення**

Вміст вільного проліну у клонів тополь і верб визначали за дії довготривалого та короткотривалого впливу водного дефіциту, а також за дії сольового стресу. Вимірювання проводили за модифікованим методом Бейтса за допомогою колориметричного аналізу нінгідрину [Carillo & Gibon, 2011]. Для цього 200 мг зразків листків тополі та верби гомогенізували у 70% розчині етанолу. Після додавання реакційної суміші (1% нінгідрину в оцтовій кислоті з етанолом) розчин інкубували на киплячій водяній бані при 95°C протягом 30 хвилин, потім швидко охолоджували, щоб зупинити реакцію, центрифугували, і визначали оптичну щільність розчину нінгідрину-проліну на спектрофотометрі (Specord 200, Analitik Jena, Німеччина) за довжини хвилі 520 нм.

#### ***2.2.5.1. Визначення вмісту вільного проліну у клонів тополь і верби за дії довготривалого впливу водного дефіциту***

Для визначення вмісту вільного проліну за дії довготривалого впливу водного дефіциту, відбирали зразки листків клонів тополь ‘Слава України’, ‘Гулівер’ та верби ‘Печальна’, які були висаджені в лютому 2019 року, тобто, це були однорічні рослини. Дію водного дефіциту досліджували в трьох режимах, згідно зі схемою, представленою на рис. 2.

Для вимірювання вмісту проліну на 30-й день після початку диференційованого поливу з кожної з шести рослин збирали по 200 мг листків (приблизно 3 листки). Зразки заморожували в рідкому азоті, зберігали при -40°C для біохімічного аналізу.

Одночасно було відібрано зразки у дворічних рослин тополі - клону ‘Гулівер’ (які були висаджені у 2018 році) та проведено аналогічний експеримент,

де диференційований полив проводився не лише в поточному сезоні, але й протягом усього попереднього вегетаційного періоду (див. рис. 2). Таким чином, в обох випадках рослинний матеріал збирали одночасно - на 30-й день після початку диференціального поливу в поточному сезоні.

Вміст вільного проліну визначали згідно з представленою методикою [Carillo & Gibon, 2011]. Кількість проліну визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів L-проліну з концентрацією 1–80 мкг/мл в тій самій реакційній суміші нінгідрину, оцтової кислоти та етанолу (рис. 4) [Khoma et al., 2021].

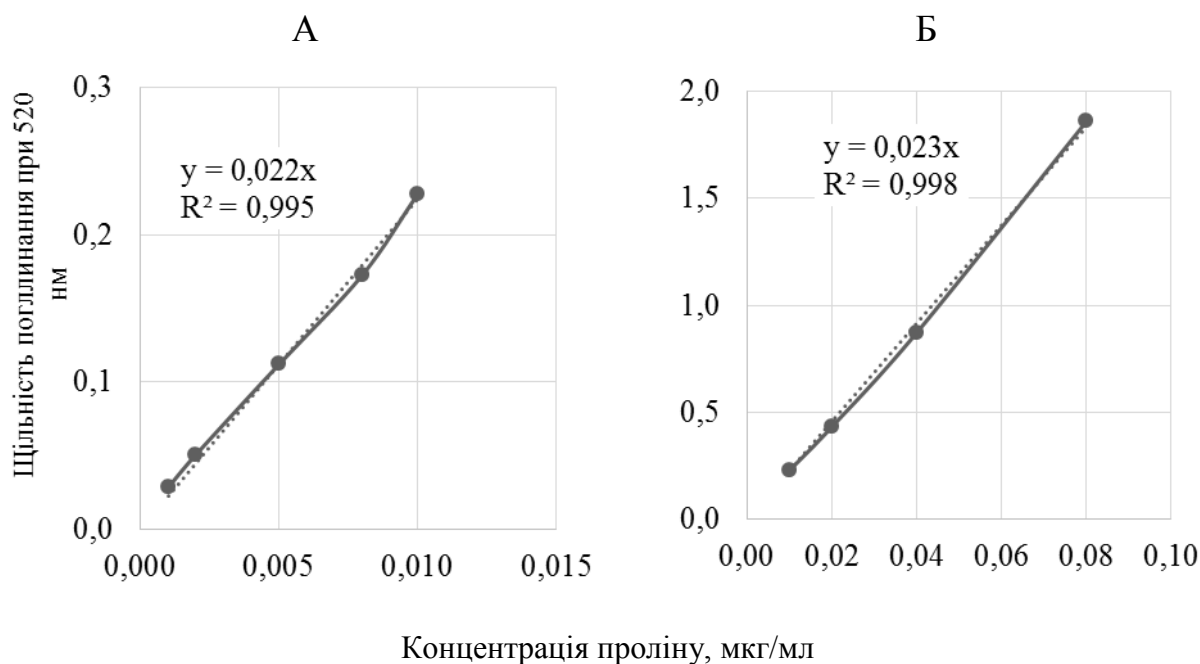


Рисунок 4. Калібрувальна крива розчинів вільного L-проліну: за діапазону концентрацій 1–10 мкг/мл (А) та 10–80 мкг/мл (Б). Емпіричні криві апроксимовані лінійним трендом ( $P < 0,01$ ).

### 2.2.5.2. Визначення вмісту вільного проліну у клонів тополь і верби за дії короткотривалого впливу водного дефіциту

Для визначення вмісту вільного проліну за дії короткотривалого впливу водного дефіциту, відбирали зразки листків клонів тополь ‘Слава України’, ‘Гулівер’ та верби ‘Печальна’. Дію водного дефіциту на дані клони швидкокорослих дерев здійснювали в трьох режимах, згідно зі схемою, представленою на рис. 3.

Збір рослинної сировини для визначення вмісту проліну проводили на 5-й і 10-й день після початку диференційованого поливу. Як і в попередньому досліді, відбирали по 200 мг листків, які заморозували в рідкому азоті та зберігали при  $-40^{\circ}\text{C}$  для біохімічного аналізу [Carillo & Gibon, 2011].

Кількість проліну визначали за калібрувальною кривою (рис.5), побудованою з використанням стандартних розчинів L-проліну з концентрацією від 1 до 10 мкг/мл, в такому ж розчині з етанолом і водою, що і для екстракції.

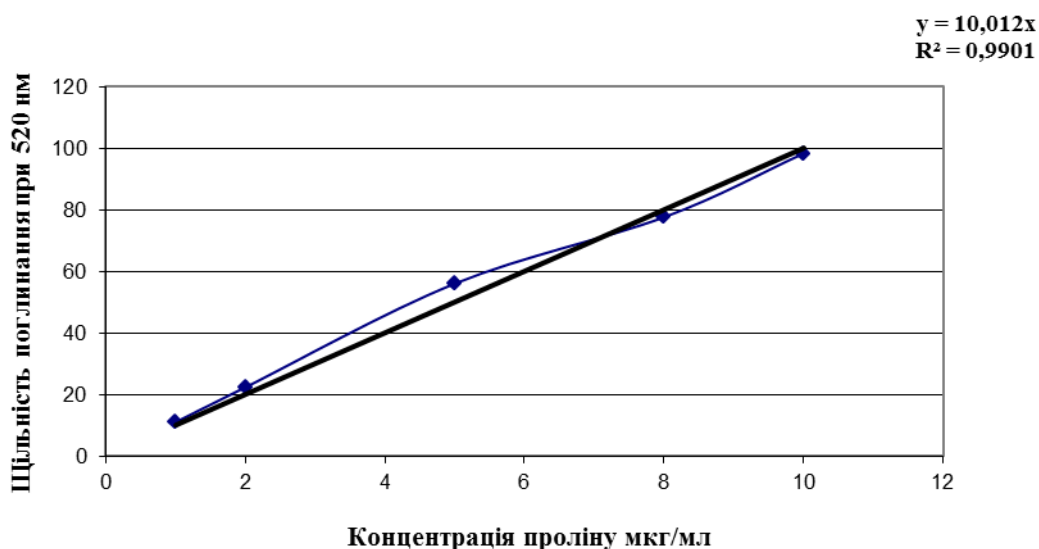


Рисунок 5. Калібрувальна крива, встановлена в діапазонах концентрацій проліну 1-10 мкг/мл. Емпірична крива були апроксимована лінійним трендом ( $P < 0,01$ ).



### **2.2.5.3. Визначення вмісту вільного проліну у клонів тополі і верби за дії сольового стресу**

Вміст вільного проліну визначали у рослин верби клону ‘Житомирська - 1’ та ‘Новоберлінська-7’, які вирощували в умовах культури *in vitro* при засоленні поживного середовища хлоридом натрію у концентраціях 25 мМ, 50 мМ та 100 мМ, а також без додавання хлориду натрію (контроль). Рослинний матеріал відбирали на 10-й та 20-й день експерименту. Було відібрано по 200 мг листків і пагонів з кожної групи рослин. Відібраний матеріал зберігався при - 80°C для подальшого аналізу за методикою [Carillo & Gibon, 2011]. Кількість вільного проліну визначали за калібрувальною кривою (рис. 5), побудованою з використанням стандартних розчинів L-проліну в концентрації від 0,001 до 0,4 мг/мл, в такому ж розчині з етанолом і водою, що і для екстракції [Khoma et al. 2021].

### **2.2.6. Визначення змін експресії генів залучених у відповідь на дію водного дефіциту у клонів тополь і верб**

Вимірювання параметрів росту та збір рослинної сировини для визначення активності генів у тополь ‘Слава України’, ‘Гулівер’ і верби ‘Печальна’ за дії трьох режимів водного дефіциту – 75%, 50% та 25% і контролю (100%) (див. рис. 2) проводили на 30-й день після початку диференційного поливу. Для визначення активності генів з кожної з шести рослин відбирали по 100 мг сировини. Зразки заморожували в рідкому азоті та зберігали у морозильній камері при -40°C до проведення аналізу.

Визначення аналізу рівня експресії генів (*AQUA1*, *DREB68*), залучених у відповідь рослин на дію стресу, проводили за допомогою методу полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) із зворотною транскрипцією. Для цього з тканин рослин виділяли тотальну РНК та проводили реакцію зворотної транскрипції. Для виділення РНК листки рослин тополь ‘Слава України’, ‘Гулівер’ і верби

‘Печальна’ гомогенізували у рідкому азоті. Рівень експресії генів визначали за концентрацією фрагменту матричної РНК досліджуваного гена в зразку.

Виділення і очищення нуклеїнових кислот є дуже важливим для молекулярно-біологічних експериментів. З метою отримання добре очищеної та недеградованої РНК, виділення та очищення проводили на мембрані на основі кремнезему – високосольової буферної системи, що має селективне зв'язування. Така система дозволяє зв'язувати з кремнієвою оболонкою до 100 мкг РНК довше 200 основ.

Спочатку проводили лізис рослинних зразків та гомогенізували їх у присутності денатуруючого буферу, після чого додавали етанол для зв'язування та наносили зразок на колонку, де РНК зв'язується з мембраною. Потім за допомогою очищувальних буферів вимивали забруднювачі, після чого РНК переходить в розчин у деіонізованій воді з мембрани. Для запобігання потрапляння геномної ДНК у зразки, після виділення РНК зразки обробляли ферментом ДНК-азою.

На наступному етапі було проведено синтез кДНК за допомогою ферменту ревертази. Під час проведення ПЛР-аналізу потрібно провести синтез ДНК на матриці РНК. Для проведення реакції було використано 1 мкг РНК. Реакцію зворотної транскрипції проводили згідно з протоколом виробника. Використовували набір реагентів RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit виробництва Thermo Scientific, США. Набір для синтезу кДНК RevertAid - це повна система для синтезу кДНК з матричної РНК. У наборі використовується RevertAid Reverse Transcriptase (RT), рекомбінантна M-MuLV RT, яка підтримує активність при 42-50°C і підходить для синтезу кДНК розміром до 13 кб. Інгібітор РНКаз РибоLock, що поставляється в комплекті, ефективно захищає матричну РНК від деградації.

Полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) — метод, що базується на детекції специфічної ділянки гену після багаторазового копіювання певної ділянки та накопичення її в ході реакції ампліфікації. В основі цього методу лежить процес

реплікації ДНК, який включає три етапи: денатурація, розплітання подвійної спіралі та розходження ниток; утворення коротких дволанцюгових ділянок ДНК, які служать затравками для синтезу нових ланцюгів та третій етап – подовження обох ланцюгів, в результаті комплементарного добудовування в напрямку від 5' до 3' кінця молекули ДНК [Лопатина, 2016]. При кожному циклі ампліфікації синтезовані раніше фрагменти знову копіюються ДНК полімеразою. При цьому відбувається експоненціальне збільшення кількості копій фрагмента вихідної ДНК.

Найбільш сучасною серед методик ПЛР є технологія детекції нуклеїнових кислот шляхом використання інтеркалюючих барвників [Сверстюк та ін., 2014]. Використання флуоресцентних барвників дозволяє відстежувати накопичення рівня сигналу. Методика ПЛР в реальному часі дає можливість отримання інформації про наявність, кількість і можливі зміни в послідовності нуклеїнових кислот безпосередньо під час реакції, що істотно спрощує, вкорочує і здешевлює ПЛР-аналіз.

В ході реакції ДНК зразки змішуються з реакційною сумішшю, до складу якої входять штучно синтезовані олігонуклеотиди – праймери, що відпалюють комплементарні ділянки ДНК аналізованого зразка та забезпечують специфічність реакції. ПЛР проводилася на базі набору реагентів PCR Biosystems SyGreen (UK), в який включено інтеркалюючий барвник SyGreen, який не інгібує ПЛР. Майстер-мікс qPCRBIO SyGreen 1-Step Mix використовує технологію гарячого запуску, опосередковану антитілами, яка запобігає утворення праймерів-димерів для поліпшення чутливості і специфічності реакції. Стандартний протокол, наведений в інструкції використання до набору реагентів qPCRBIO SyGreen 1-Step Mix, було адаптовано в ході досліджень (табл. 3).

**Адаптований протокол приготування ПЛР-суміші для зворотної транскрипції**

Компонент суміші/Реагент	Стандартні дані	Адаптовані дані
2x qPCRBIO SyGreen 1-Step Mix	10 µl	10 µl
Прямий праймер (10µM)	0,8 µl	1 µl
Зворотній праймер (10µM)	0,8 µl	1 µl
Зразок	Від 10pg до 100ng тотальної кДНК	2 µl
Вода деіонізована	Довести до 20 µl	6 µl

Проводили двоступеневу ПЛР на планшетному ампліфікаторі з детекцією флуоресцентного сигналу (QuantStudio 5, Applied Biosystems, США). Даний прилад характеризується покращеною ефективністю посилення сигналу, нормалізацією профілів, 6 каналів детекції та програмним забезпеченням для первинного аналізу та інтерпретації даних. Ці характеристики дозволяють проводити кількісний ПЛР аналіз з високою точністю та чутливістю, що, в свою чергу, є важливим для визначення навіть найменших змін експресії генів за дії стресових факторів. Двоступеневу програму ампліфікації наведено у табл. 4.

**Двоступенева програма ампліфікації**

Цикли	Температура	Час	Етап
1	95°C	2 хв	Активація полімерази методом “гарячий старт”
40	95°C	5 сек	Денатурація
	60°C	20 сек — з детекцією флуоресцентного сигналу по каналу Green	Відпалювання праймерів та елонгація
1	Плавлення		

Для ПЛР в реальному часі використовувалися одноразові мікропробірки з оптично прозорого пластику та інші витратні матеріали, вільні від ДНК-аз та РНК-аз, що запобігало контамінації та руйнуванню нуклеїнових кислот під час аналізу.

Завданням даної роботи було відпрацювання методики визначення змін генів стресового впливу, в даній частині дослідження — водного дефіциту, та визначення експресії стрес-залежних генів *AQUA1* та *DREB68* методом кількісної ПЛР у листках верби та тополь. Ген *UBI* використовували як референтний [Volkov et al., 2003].

Ефективність ПЛР оцінювали за показником *St value* – кількість циклів, під час яких відбувається перетин підняття кривої рівня флуоресценції порогового значення. В процесі ПЛР відбувається експоненціальне збільшення кількості копій фрагмента вихідної ДНК, яка поступово призводить до активації світіння флуоресцентного барвника. Прилад реєструє сигнал, підвищення рівня якого ми бачимо на логарифмічній кривій ампліфікації. В разі відсутності експресії досліджуваного гену, ми спостерігаємо горизонтальну пряму, що свідчить про відсутність накопичення продукту.

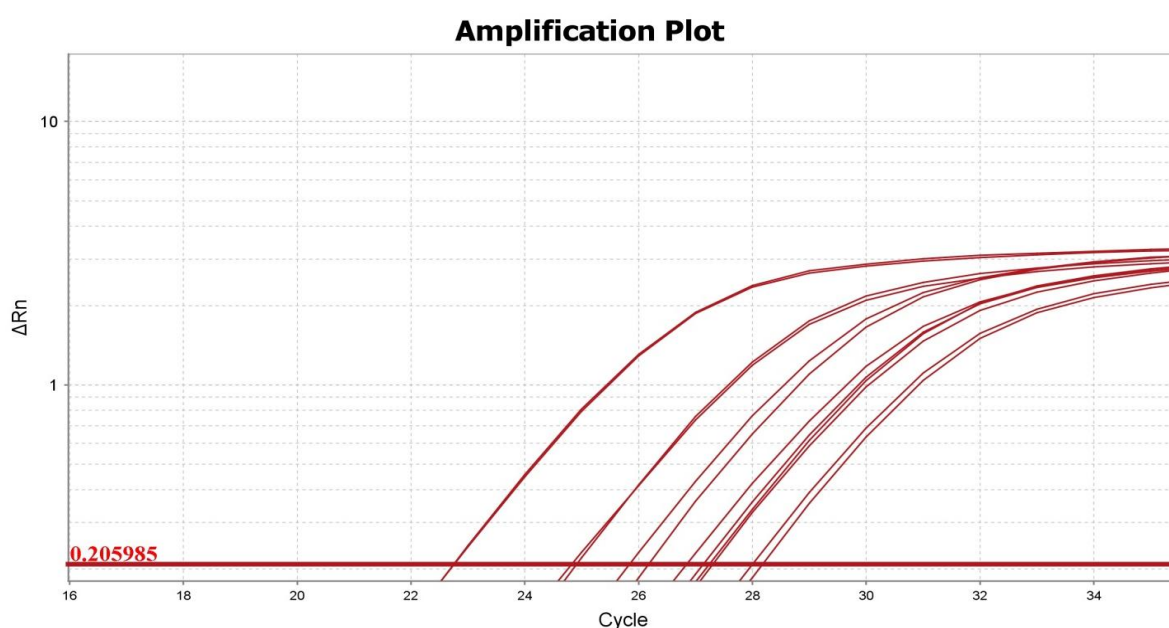


Рисунок 6. Криві флуоресцентного сигналу у ПЛР в реальному часі.

Щоб забезпечити точне визначення кількості цільової нуклеїнової кислоти в зразку, потрібно визначити показник ефективності праймера та побудувати стандартну криву. З цією метою для кожного гену (*AQUA1*, *DREB68*), включаючи референтний (*UBI* - убіквітин), було проведено ПЛР з п'ятьма 10-кратними розведеннями ДНК зразка: зразок без розведення, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 (табл. 5).

Таблиця 5.

Дані ПЛР з п'ятьма 10-кратними розведеннями ДНК зразка із типом детекції флуоресцентним барвником SYBR green.

Позиція на планшеті	Розведення зразка	Назва гену	Ct value
C2	1	<i>AQUA1</i>	23,596
C3	1	<i>AQUA1</i>	23,606
C4	1/10	<i>AQUA1</i>	26,793
C5	1/10	<i>AQUA1</i>	26,382
C6	1/100	<i>AQUA1</i>	31,043
C7	1/100	<i>AQUA1</i>	30,827
C8	1/1000	<i>AQUA1</i>	Не визначено
C9	1/1000	<i>AQUA1</i>	33,465
C10	1/10000	<i>AQUA1</i>	38,790
C11	1/10000	<i>AQUA1</i>	34,941
E2	1	<i>DREB68</i>	25,726
E3	1	<i>DREB68</i>	25,999
E4	1/10	<i>DREB68</i>	26,147
E5	1/10	<i>DREB68</i>	27,102
E6	1/100	<i>DREB68</i>	30,157
E7	1/100	<i>DREB68</i>	30,016
дE8	1/1000	<i>DREB68</i>	31,013
E9	1/1000	<i>DREB68</i>	32,010
E10	1/10000	<i>DREB68</i>	33,006
E11	1/10000	<i>DREB68</i>	34,003
G2	1	<i>UBI</i>	23,183

G3	1	UBI	23,183
G4	1/10	UBI	28,601
G5	1/10	UBI	28,495
G6	1/100	UBI	29,603
G7	1/100	UBI	30,474
G8	1/1000	UBI	33,670
G9	1/1000	UBI	33,247
G10	1/10000	UBI	36,689
G11	1/10000	UBI	36,265

За даними  $C_t$ , що наведені в таблиці вище, було розраховано ефективність праймерів  $AQUA1=0,8614$ ,  $DREB68=0,9393$ ,  $UBI$  (убіквітін) $=0,982$ . Значення рівня експресії обчислюються на основі кількісних даних ПЛР контрольної та експериментальної груп та порівнюються з експресією референтного гена = 1.

### 2.2.7. Методика виготовлення пелет для покращення їх якості

Виготовлення пелет із біомаси деревини осики звичайної та тополі клону ‘Стрілоподібна’ проводили в лабораторії ВП НУБіП «Бережанський агротехнічний інститут». Відбір матеріалу для виготовлення пелет та визначення їх теплотворної здатності було проведено у відділі нових культур Національному Ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України.

Деревну біомасу деревини осики звичайної та тополі клону ‘Стрілоподібна’ очищали, подрібнювали за допомогою подрібнювача із осьовими ножами до середнього розміру  $20,12 \times 2,52$  мм та  $24,3 \times 2,6$  мм відповідно. Після цього сировину дезінтегрували лабораторним екструдером, до отримання фракції необхідної для пелетування, а саме  $3,91 \times 1,44$  мм у деревини осики та  $3,84 \times 1,28$  мм у деревини тополі клону ‘Стрілоподібна’. Використовували метод гарячої екструзії, що дозволяє отримати масу у пластифікованому стані, яка краще піддається пелетуванню. Деревину осики та тополі клону ‘Стрілоподібна’ перед початком екструзії замочували у водопровідній воді протягом 5 хвилин при температурі  $20^\circ\text{C}$ . Екстудовану масу (екструдант) висушували до повітряно-

сухого стану. Показник вологості вимірювали за допомогою вологоміра. Для кращого пресування і міцності пелет, інколи додають різноманітні добавки, проте, їхня кількість повинна бути не велика, і не збільшувати зольність. Щоб уникнути зайвих витрат на купівлю різноманітних дороговартісних добавок для пелетування, нами було використано технічний гліцерин, який є побічним продуктом при виробництві біодизельного палива. Тому, для дослідження впливу водного розчину гліцерину на фізичні властивості пелет, перед пелетуванням, екструдовану біомасу швидкорослих дерев змочували водним розчином, в якому масова частка гліцерину становила 1% та 5%, або у водопровідній воді (контроль), у розрахунку 250 мл розчину на 500 г сировини. Пелетування проводили за допомогою лабораторної гранулярної машини з плоскою матрицею та двома пресуючими роликками. Охолоджені пелети зважували, визначали їх питому та насипну щільність. Питому щільність пелет ( $\text{кг}/\text{м}^3$ ) розраховували шляхом ділення маси окремої пелети на її об'єм, який розраховували за довжиною та діаметром пелет. Насипну щільність обраховували згідно методики «Визначення насипної густини сипких матеріалів» [Сокольський, 2012]. Для цього застосовували мірну посудину, об'єм якої відомий з високою точністю, а висота дорівнює двом її внутрішнім діаметрам. Діаметр посудини повинен не менше ніж в 10 разів перевищувати середній розмір частинок сипкого продукту. Насипна густина розраховувалася за формулою,

$$\rho = \frac{m}{V},$$

де  $m$  – маса пелет, кг; а  $V$  – об'єм пелет,  $\text{м}^3$ . Тобто, насипна щільність - це співвідношення між вагою пелет і кількістю займаного простору [Хома та ін., 2018].

Теплотворну здатність виготовлених пелет із деревини осики звичайної та із деревини тополі клону 'Стрілоподібна' вимірювали за допомогою калориметра (C200, ІКА-Werke, Staufen, Germany) – приладу для визначення кількості тепла, яке виділяється при згоранні.



### 2.2.8. Статистична обробка результатів

На всіх етапах досліджень для документування та обробки результатів користувались загальноприйнятими програмами, зокрема Microsoft Excel 2019, SPSS Statistics 23.0 (IBM, США) та OriginPro9.0 (OriginLab Corporation). Причому для кожного дослідження підбирали найбільш відповідні критерії оцінки достовірності відхилень контрольних та експериментальних варіантів, зважаючи на характер даних, розмір вибірки та параметри експерименту.

Нормальність даних та однорідність дисперсії перевіряли за допомогою тестів Шапіро-Вілька та Левена відповідно. Якщо дані показували нормальний розподіл, застосовували параметричні критерії (t-тест Стюдента, ANOVA). Якщо дані не розподілялися нормально, застосовували непараметричні тести (U-критерій Манна-Уїтні, Краскела-Уолліса). Усі відхилення були визнані значущими при  $p \leq 0,05$ . При аналізі дослідження щодо регенерації та введення в культуру *in vitro* клонів швидкорослих дерев тополь і верб дані представляли як  $\% \pm sp$  або як середнє значення  $\pm SE$ . Значимість відмінностей у приживлюваності експлантатів та кількості пагонів на регенований експлант перевіряли за допомогою непараметричних тестів  $\chi^2$  та Манна-Уїтні відповідно.

При аналізі результатів фенології розкриття бруньок у клонів тополь і верб статистичну достовірність відмінностей між варіантами оцінювали за непараметричними критеріями Манна-Уїтні та Краскела-Уолліса.

При статистичній обробці результатів оцінки ростових показників та фенології розкриття бруньок у клонів тополь і верб за дії водного дефіциту дані виражали як середнє  $\pm$  стандартна похибка середнього. Оскільки дані не були розподілені нормально, було застосовано непараметричний U-тест Манна-Уїтні. Статистичну обробку результатів вимірювань ростових показників за дії солявого стресу на клони тополь і верб проводили з використанням t-критерію Стюдента.

При статистичній обробці у отриманих результатів щодо вмісту вільного проліну за дії тривалого впливу водного дефіциту на клони тополь і верб дані

представляли як середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього значення ( $x \pm SE$ ). Оскільки в даному експерименті присутні два фактори, – клон/вік та режим поливу, для виявлення достовірних ефектів застосовували дисперсійний аналіз (двостороння ANOVA), використовуючи загальну процедуру лінійної моделі (GLM) та найменш істотну різницю (LSD) або тест Тукі як пост-хок-тести.

Статистична обробка відносної експресії генів проводилася методом нормалізації рівнів експресії досліджуваних генів в різних зразках за референтними генами за допомогою програми REST 2009. Цей метод дозволяє коригувати кількісні дані ПЛР, наприклад, для компенсації варіацій, обумовлених відмінностями завантаження зразків [REST, 2009]. Відносну експресію визначали за середнім фактором експресії, який розраховували для кожного досліджуваного гена [Pfaffl at al., 2002].

Результати фізичних властивостей пелет опрацьовували з використанням t-критерію Стьюдента.

## **Висновки до розділу 2**

Описано методики введення в культуру *in vitro* та регенерації клонів тополь. Представлено методики визначення впливу засолення та водного дефіциту на ростові параметри, вміст вільного проліну та рівень експресії генів у клонів швидкорослих дерев тополь та верб. Описано методику аналізу фенології розкриття бруньок, а також запропоновано методику виробництва та покращення якості фізичних властивостей пелет із біомаси цих швидкорослих дерев.

Основні положення цього розділу представлені у публікаціях автора: [34],[159],[43],[64],[96],[163],[165],[19].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Введення в культуру *in vitro* та регенерація клонів швидкорослих дерев

##### 3.1.1. Ініціація клонів тополь в культурі *in vitro*

У цьому дослідженні в культуру *in vitro* було введено два клони тополі ‘Новоберлінська-3’ та ‘Волосистоплідна’ (рис.7), а також підібрано оптимальний склад поживного середовища для подальшого вирощування. Як видно з рис. 8, найкращим поживним середовищем при введенні в культуру *in vitro* для клону тополі ‘Волосистоплідна’ було середовище WPM з додавання регуляторів росту 0,2 мг/л БАП та 0,1 мг/л ІМК, де виживаність експлантів становила 93,3%. У клону тополі ‘Новоберлінська-3’ на середовищі MS з додавання регуляторів росту 0,2 мг/л БАП та 0,1 мг/л ІМК спостерігалася вища виживаність (73,3%) порівняно з середовищем WPM з додаванням цих же регуляторів росту. Однак в цьому випадку різниця між показниками не була достовірною.



Рисунок 7. Введені в культуру *in vitro* із стеблових експлантів тополі: клон ‘Волосистоплідна’ на середовищі WPM+ІМК+БАП (А) та клон ‘Новоберлінська-3’ на середовищі MS+ІМК+БАП (Б).

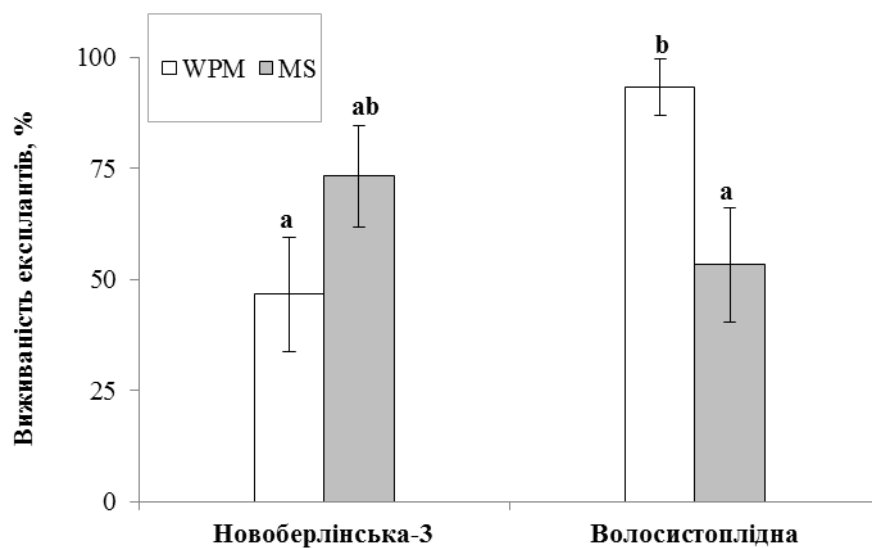


Рисунок 8. Вживаність стеблових експлантів клонів тополі ‘Новоберлінська-3’ та ‘Волосистоплідна’ під час введення в культуру *in vitro*. До поживного середовища WPM та MS додавали 0,2 мг/л БАП та 0,1 мг/л ІМК. Різні букви над смужками вказують на достовірні відмінності у вживаності між зразками (%  $\pm$  sp) в  $\chi^2$ -тесті ( $p \leq 0,05$ ),  $n = 15$  повторів для кожного генотипу.

Порівнявши показники вживаності обох клонів тополі на досліджених поживних середовищах, виявлено, що клон ‘Волосистоплідна’ має кращу вживаність, ніж клон ‘Новоберлінська-3’. Подібні дослідження, проведені Pardhi et al. [2019], показали, що додавання 0,5 мг/л БАП сприяло ініціації експлантів *Populus nigra* в культуру *in vitro* на 21-й день експерименту. В іншому дослідженні [Aggarwal et al., 2015] виявлено, що застосування 0,1  $\mu$ M ІМК сприяло високій ефективності укорінення пагонів в тополі гімалайської (*Populus ciliata* Wallich ex Royle). Таким чином, можна припустити, що ініціація в культурі *in vitro* вимагає індивідуального підходу для кожного клону окремо.

### **3.1.2. Непряма регенерація з експлантів листків та черешків**

Як свідчать результати проведених досліджень, на поживному середовищі СІМ калюс та коріння утворювалися протягом трьох тижнів в обох клонів з кожного з двох типів експлантів. Застосування поживного середовища з

регуляторами росту 1,02 мг/л 2-ІІІ та 1,86 мг/л НОК продемонструвало високоефективну ініціацію калюсів та коренів (рис. 9 А, Б).

Експланти обох клонів тополь, перенесені на середовище SIM з 0,04 мг/л ТДЗ, утворили мікропагони після двох тижнів культивування (рис. 9 В, Г), що активніше виявлялося у тополі ‘Новоберлінська-3’ порівняно з тополею ‘Волосистоплідна’.

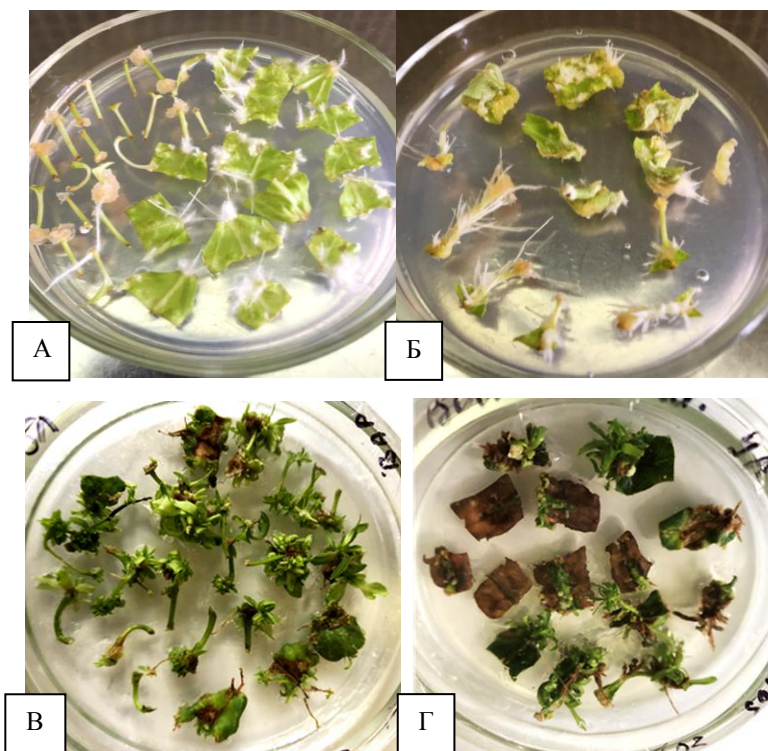


Рисунок 9. Калюсогенез та ризогенез у експлантах листків та черешків на SIM (А, Б) та утворення мікропагонів на SIM (В, Г). Клони тополі ‘Новоберлінська-3’ (А, В) та ‘Волосистоплідна’ (Б, Г).

Пізніше ці мікропагони були перенесені на поживне середовище SEM з додаванням 0,2 мг/л БАП, а рослини-регенеранти, одержані з експлантів листків і черешків, були отримані протягом двох тижнів в обох клонах тополі з різною ефективністю регенерації (рис. 10, табл. 6).

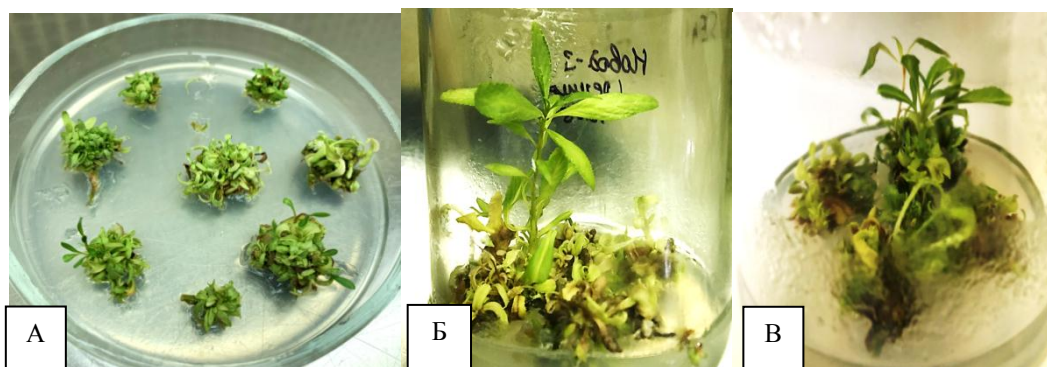


Рисунок 10. Регенеранти з листкових і черешкових експлантів клонів тополі ‘Новоберлінська-3’ (А, Б) та ‘Волосистоплідна’ (В) на середовищі SEM.

Таблиця 6.

**Ефективність регенерації рослин з листкових і черешкових експлантів клонів тополь ‘Новоберлінська-3’ та ‘Волосистоплідна’.**

Клон	Тип експланту	Посаджені експланти	Експланти з мікропагонами	Отримано пагонів
Новоберлінська-3	Листки	39	36	112
	Черешки	30	27	43
Волосистоплідна	Листки	38	19	30
	Черешки	31	18	33

Клон тополі ‘Новоберлінська-3’ продемонстрував вищу ефективність регенерації. Зокрема, відсоток регенерації в цьому клоні з листкових (92,3%) та черешкових (90,0%) експлантів був значно вищим, ніж у клону тополі ‘Волосистоплідна’, де відсоток регенерації був нижчим, і становив – 50,0% як із листкових, так із черешкових експлантів (рис.11 А). Значущість відхилень було доведено за допомогою  $\chi^2$ -тесту ( $p \leq 0,05$ ).

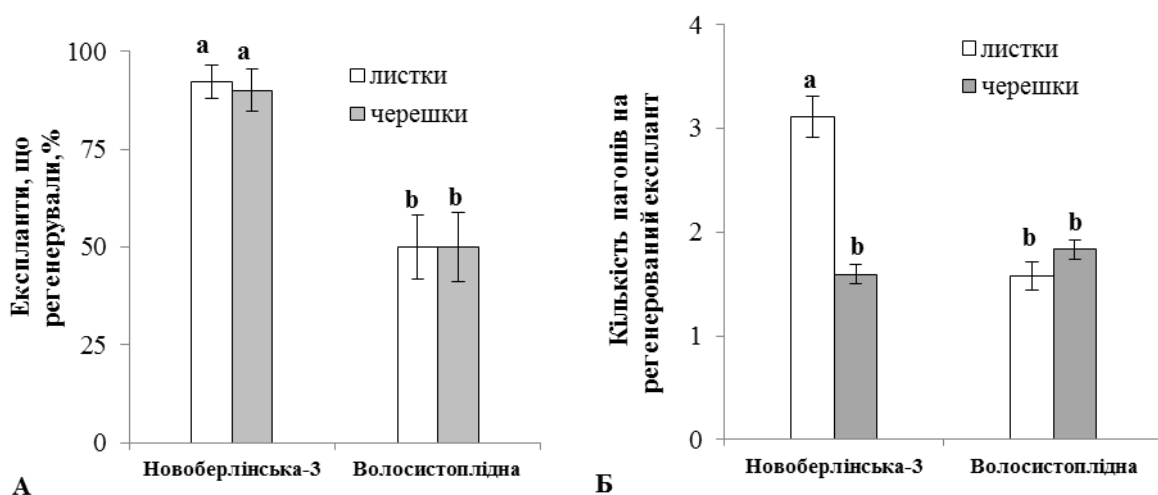


Рисунок 11. Регенерація листкових і черешкових експлантів клонів тополь ‘Новоберлінська-3’ та ‘Волосистоплідна’ в культурі *in vitro*. Наведено (А) відсоток регенерованих експлантів ( $\% \pm sp$ ), та (Б) кількість пагонів на регенерований експлант (середнє значення  $\pm SE$ ).  $n = 30$  для кожного типу експлантів. Різні букви над смужками вказують на достовірні відмінності між зразками у відсотках регенерованих експлантів та кількості пагонів на регенерований експлант в  $\chi^2$ - та U-тесті Манна-Уїтні відповідно ( $p \leq 0,05$ ).

Як видно з таблиці 6, кількість пагонів, отриманих з листкових експлантів клону тополі ‘Новоберлінська-3’, становила 112, а з черешкових експлантів - 43, тоді як у клону ‘Волосистоплідна’ кількість пагонів, отримана з листкових та з черешкових експлантів становила 30 та 33 відповідно. Кількість пагонів на регенерований експлант – 3,1 (рис. 11 Б) у клону тополі ‘Новоберлінська-3’ з листкових експлантів значно перевищувала всі інші варіанти приблизно в 1,5-2 рази. Таким чином, регенерація рослин з листкових експлантів у клону ‘Новоберлінська-3’ була найбільш ефективною, і, як свідчать результати тесту Манна-Уїтні, достовірно відрізнялася від усіх інших варіантів.

Як показали наші експерименти, склад живильного середовища і особливо використання регуляторів росту (ауксинів та цитокінінів), відіграє важливу, але неоднакову роль у регенерації пагонів у кожному клоні тополі. Багато досліджень

[Khatab, 2011; Cai et al., 2015; Kwon et al., 2015; Pardhi et al., 2019] також продемонстрували, що оптимальний склад поживного середовища і концентрацію фітогормонів (регуляторів росту) слід підбирати окремо для кожного виду і типу експлантів. Зокрема, дослідження [Цветков та ін., 2007] показали, що додавання тидіазурону до поживного середовища як у високих, так і в низьких концентраціях, по-різному впливає на регенерацію пагонів у тополі білої (*Populus alba* L.). Найбільшу ефективність регенерації спостерігали при додаванні нижчих концентрацій (0,11 – 0,56  $\mu\text{M}$ ) порівняно з вищими концентраціями (14  $\mu\text{M}$ ). Подібним чином, додавання тидіазурону у вищих концентраціях (0,1 – 0,5 мг/л), ніж ми застосовували (0,04 мг/л) в поживне середовище для регенерації стебла, листків та кореневих експлантів у *Populus berolinensis* Dipp. був неефективним для регенерації. У цих експериментах була визначена лише дуже слабка ефективність регенерації черешкових експлантів при найнижчій концентрації ТДЗ (0,1 мг/л) [Павліченко та ін., 2016].

Дослідження Garcia-Angulo et al. [2018] показали, що додавання 0,5  $\mu\text{M}$  НОК призвело до найвищої частоти регенерації пагонів у двох гібридних клонів *Populus* (*P. \times euramericana*) та (*P. \times interamericana*), але пагони краще укорінювалися в середовищі без НОК. Усі ці дослідження свідчать про те, що на кожному етапі органогенезу також необхідно підбирати відповідний склад поживного середовища.

Наші результати показали значну відмінність у регенерації пагонів і вкоріненні між двома клонами тополі та між типами експлантів (листок і черешок) на середовищах з однаковим складом середовища та концентрацією регуляторів росту. Таким чином, можна припустити, що регенерація пагонів у клонах тополі залежить від генотипу рослин, а також від тканин, що підлягають регенерації, і тому вимагає підбору оптимальних умов для кожного клону [Khoma et al., 2022].



### 3.2. Вплив водного дефіциту на клони тополі та верби, перспективні для альтернативної енергетики

#### 3.2.1. Виживаність рослин тополі та верби залежно від режиму зволоження протягом першого- та другого років вегетації

В даному дослідженні вивчали вплив водного дефіциту різних рівнів на 6 клонів тополь та 3 клони верб. Зразки рослин за експериментальних умов у першому вегетаційному сезоні представлені на рис 12.



Рисунок 12. Оцінка посухостійкості швидкорослих дерев за різних режимів зволоження (зліва направо – 100, 75, 50 та 25% від нормального поливу).

Рослини першого року вегетації: А – верба клону ‘Печальна’; Б – тополя клону ‘Слава України’; В – тополя клону ‘Волосистоплідна’.

Протягом двох вегетаційних сезонів у рослин у варіантах із режимом зволоження 75 та 50% виживаність достовірно не відрізнялася від відповідних контролів з нормальним поливом (рис. 13). У рослин з найменшим рівнем зволоження 25% близько 37% рослин загинуло протягом 1-го року вегетації, ще 26% рослин не були здатні пережити посушливі умови протягом 2-го вегетаційного сезону. Таким чином, сумарна летальність протягом 2-х років за найнижчого зволоження склала 63%. За режиму зволоження 50% сумарна дворічна летальність становила 17%, відмінності між рівнями 1-го та 2-го років виявилися статистично значимими ( $p>0,05$ ).

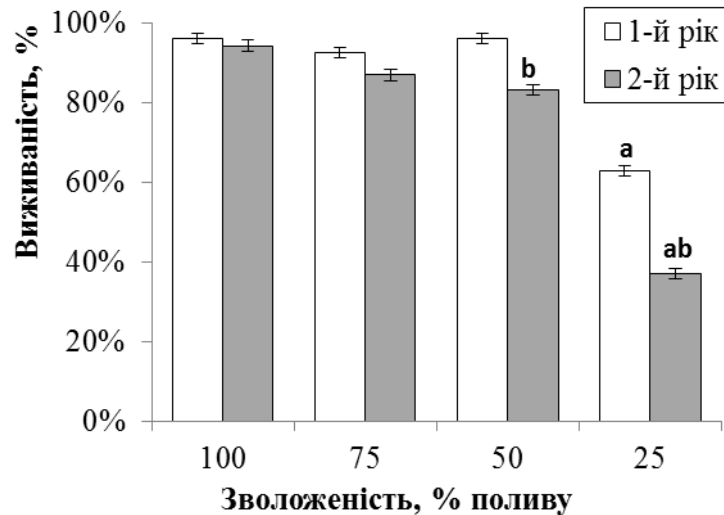


Рисунок 13. Вживаність швидкорослих дерев тополі та верби у горщиках протягом 1-го та 2-го років вегетації за диференційованого поливу ( $\pm s_p$ ). a – відхилення достовірні порівняно з відповідними контролями з достатнім поливом ( $p > 0,05$ ); b – достовірні відхилення між роками ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.2. Динаміка ростових параметрів у рослин тополі та верби залежно від режиму зволоження протягом першого та другого років вегетації

Щомісячні заміри дослідних рослин показали, що режим зволоження неоднозначно впливав на різні ростові показники у 9 клонів швидкорослих дерев тополі та верби. Крім того, вивчені ростові параметри також відрізнялися за сезонною динамікою.

Протягом обох років спостереження, найбільш чіткий достовірний пригнічуючий вплив дефіциту зволоження спостерігали на висоту рослин (за режиму поливу 50 і 25% від контролю) (рис. 14.1) та діаметр пагона (за всіх режимів дефіциту зволоження (рис. 14.2). Як видно з рисунків, висота та діаметр пагонів прямопропорційно залежали від кількості зволоження. Протягом першого року спостереження висота пагона значимо зростала вже на 2-й місяць у всіх варіантах порівняно з показниками 1-го місяця (рис. 14.1).

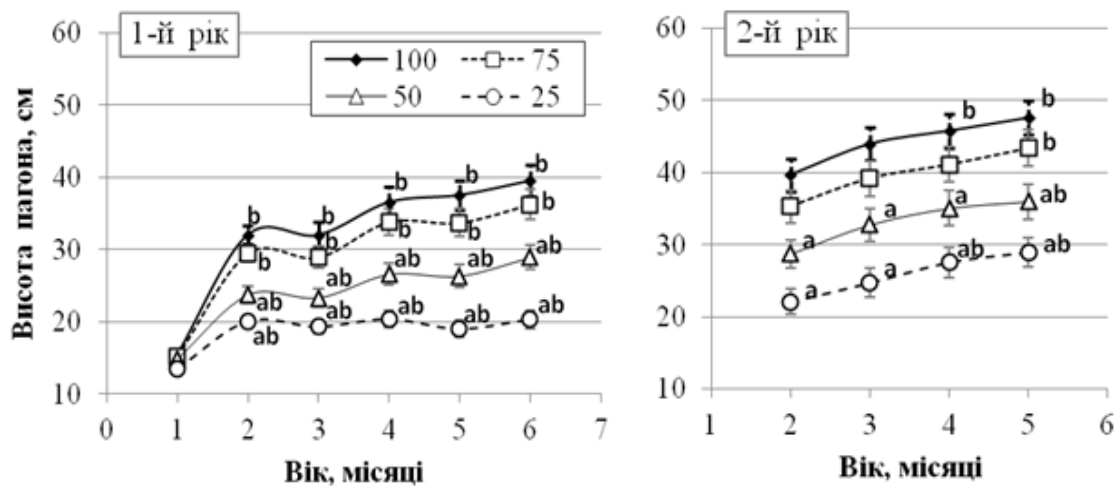


Рисунок 14.1. Вплив диференційованого поливу на висоту пагона у клонів тополі та верби протягом двох вегетаційних сезонів ( $\pm SE$ ). а – відхилення достовірні порівняно з відповідними контролями з достатнім поливом ( $p > 0,05$ ); б – відхилення достовірні в динаміці, порівняно з першим обміром сезону ( $p > 0,05$ ).

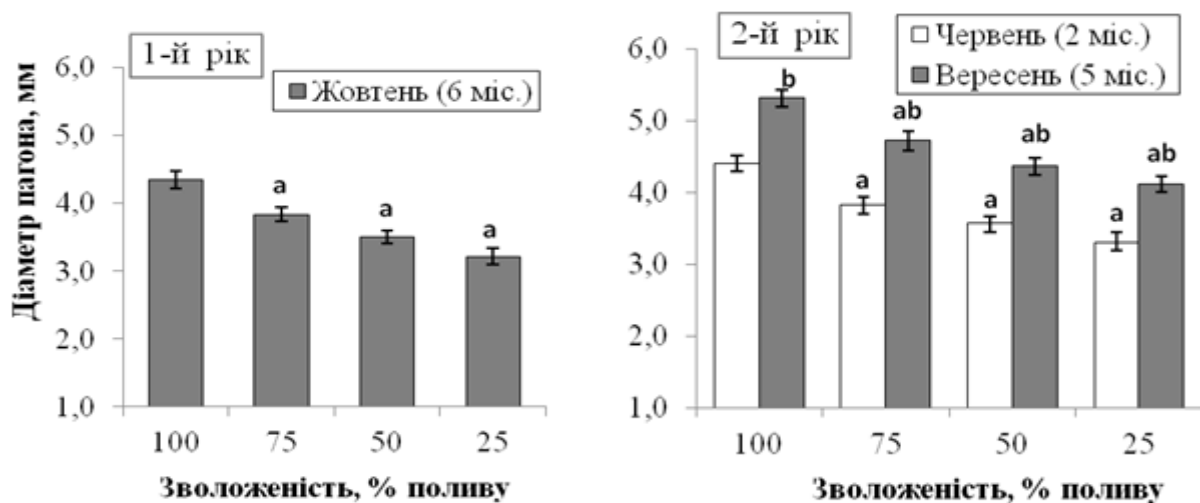


Рисунок 14.2. Вплив диференційованого поливу на діаметр пагона у клонів тополі та верби протягом двох вегетаційних сезонів ( $\pm SE$ ). а – відхилення достовірні порівняно з відповідним контролем із достатнім поливом ( $p > 0,05$ ); б – відхилення достовірні в динаміці, порівняно з першим обміром сезону ( $p > 0,05$ ).

Дефіцит зволоження негативно впливав не лише на висоту і діаметр рослин, але й на кількість листків на рослину. Так, у першому вегетаційному сезоні достовірно зменшення кількості листків (порівняно з контролем у відповідні терміни за достатнього поливу) виявляли у рослин за режимів у поливу 50 і 25 % від контролю (рис. 14.3). При дослідженні динаміки змін у кожному варіанті поливу окремо, достовірно зниження кількості листків порівняно з першим обміром спостерігали тільки у рослин за режиму поливу 25 %.

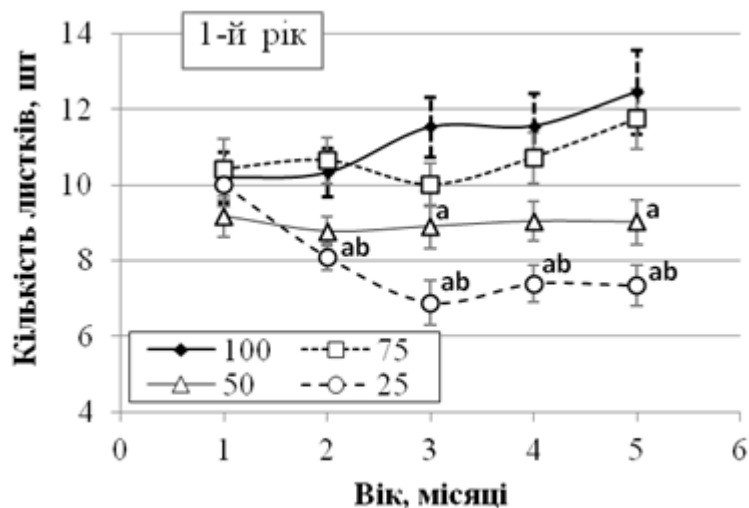


Рисунок 14.3. Вплив диференційованого поливу на кількість листків у клонів тополі та верби протягом 1-го вегетаційного сезону ( $\pm SE$ ). а – відхилення достовірно порівняно з відповідними контролями з достатнім поливом ( $p > 0,05$ ); б – відхилення достовірно в динаміці, порівняно з першим обміром ( $p > 0,05$ ).

Стрес водного дефіциту впливав не лише на кількість листків, але й на розміри листкових пластинок. Достовірно значиме зниження довжини листків виявлено за різних режимів дефіциту зволоження, яке особливо сильно виявлялося за режиму поливу 50 і 25% від контролю (рис. 14.4). Протягом обох років вегетації довжина листка у рослин в літній та ранньоосінній час (вересень) в більшості перевищувала заміри першого місяця. Однак, в перший рік вегетації під впливом посушливих умов (50 і 25%), навіть не завжди спостерігалось сезонне видовження листка, що свідчить про значне пригнічення росту. Тобто, очевидно, що за такого дефіциту вологи дерева зазнавали дуже сильного стресу,

коли рослини не здатні нарощувати листову біомасу під час найпродуктивнішого часу вегетації.

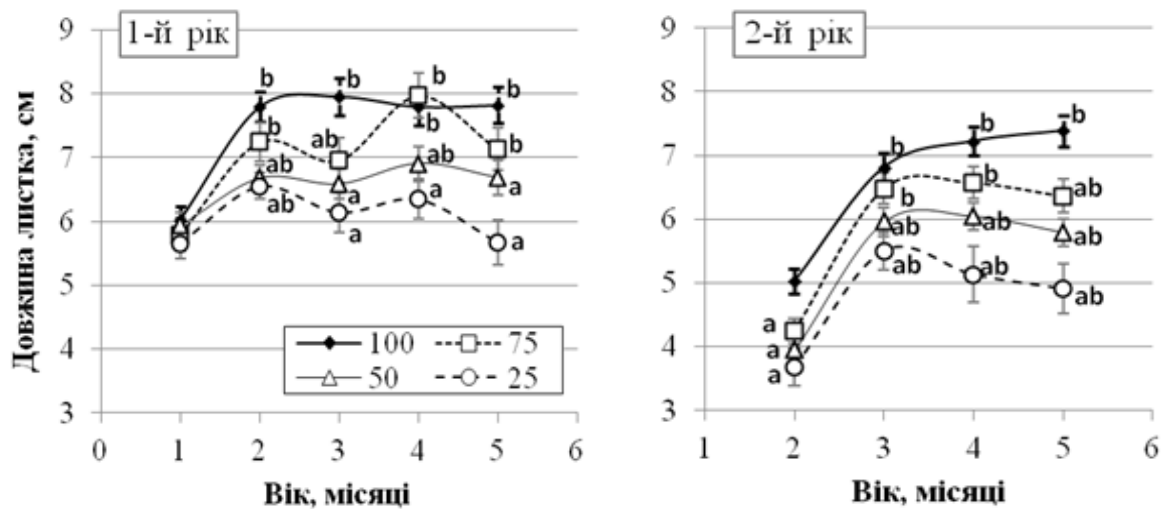


Рисунок 14.4. Вплив диференційованого поливу на довжину листків у клонів тополі та верби протягом двох вегетаційних сезонів ( $\pm SE$ ). а – відхилення достовірні порівняно з відповідними контролями з достатнім поливом ( $p > 0,05$ ); б – відхилення достовірні в динаміці, порівняно з першим обміром сезону ( $p > 0,05$ ).

У перший рік вегетації показник ширини найбільшого листка виявився менш чутливим до режиму зволоження порівняно з раніше описаними показниками. Як видно з рис. 14.5, достовірне зменшення ширини листка виявлено тільки у варіанті 25% зволоження від контролю за вимірювання рослин віком 3 місяці. В жодному з інших варіантів першого року не виявлено значимих сезонних змін ширини листка.

На другий рік вегетації в усіх варіантах поливу ширина листка у липні-вересні була більшою порівняно з такою у червні. За впливу посушливих умов в ряді варіантів спостерігалось зменшення ширини найбільшого листка, проте ефекти не були такими чіткими, як за раніше описаними показниками висоти і діаметру пагона, кількості та довжини листків.

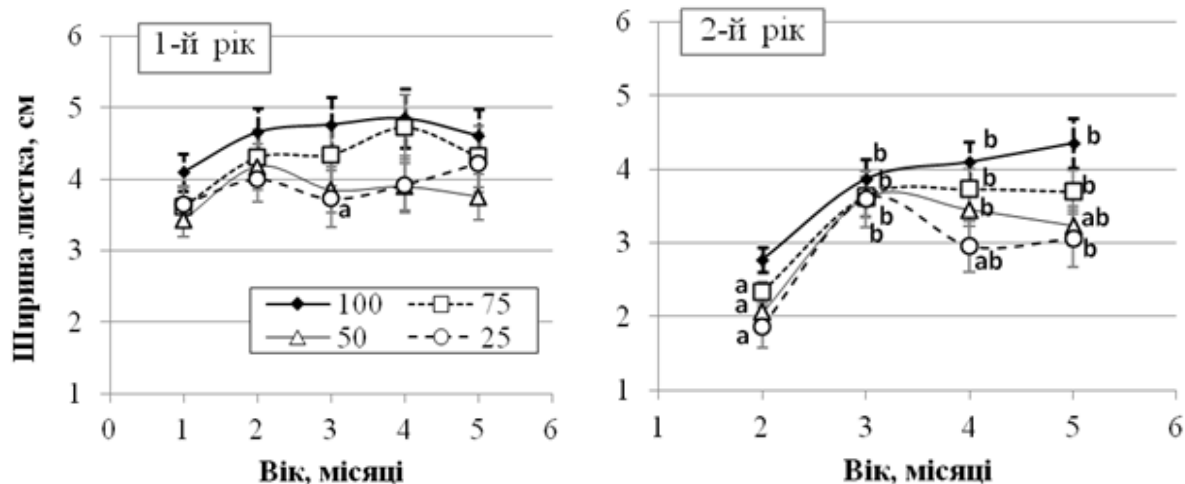


Рисунок 14.5. Вплив диференційованого поливу на ширину листків у клонів тополі та верби протягом двох вегетаційних сезонів ( $\pm SE$ ). а – відхилення достовірні порівняно з відповідними контролями з достатнім поливом ( $p > 0,05$ ); б – відхилення достовірні в динаміці, порівняно з першим обміром сезону ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3. Клонові особливості ростових параметрів тополі та верби залежно від режиму зволоження

У рослин другого року вирощування в умовах водного дефіциту 25% зволоження, виживаність значно знизилася, а у чотирьох клонів з шести рослин залишилося тільки по одній рослині (рис. 14.6). У зв'язку з такими малими вибірками проведення оцінки впливу дефіциту зволоження 25% на ростові показники окремих клонів виявилось неможливим. Тому для подальшого порівняння було вибрано режим зволоження 50% від контрольного поливу. Збереженість рослин на цьому варіанті поливу становила не менше 67% у кожного клону (тобто, не менше 4-х рослин на варіант), і, отже, була прийнятною для статистичного аналізу ростових показників.

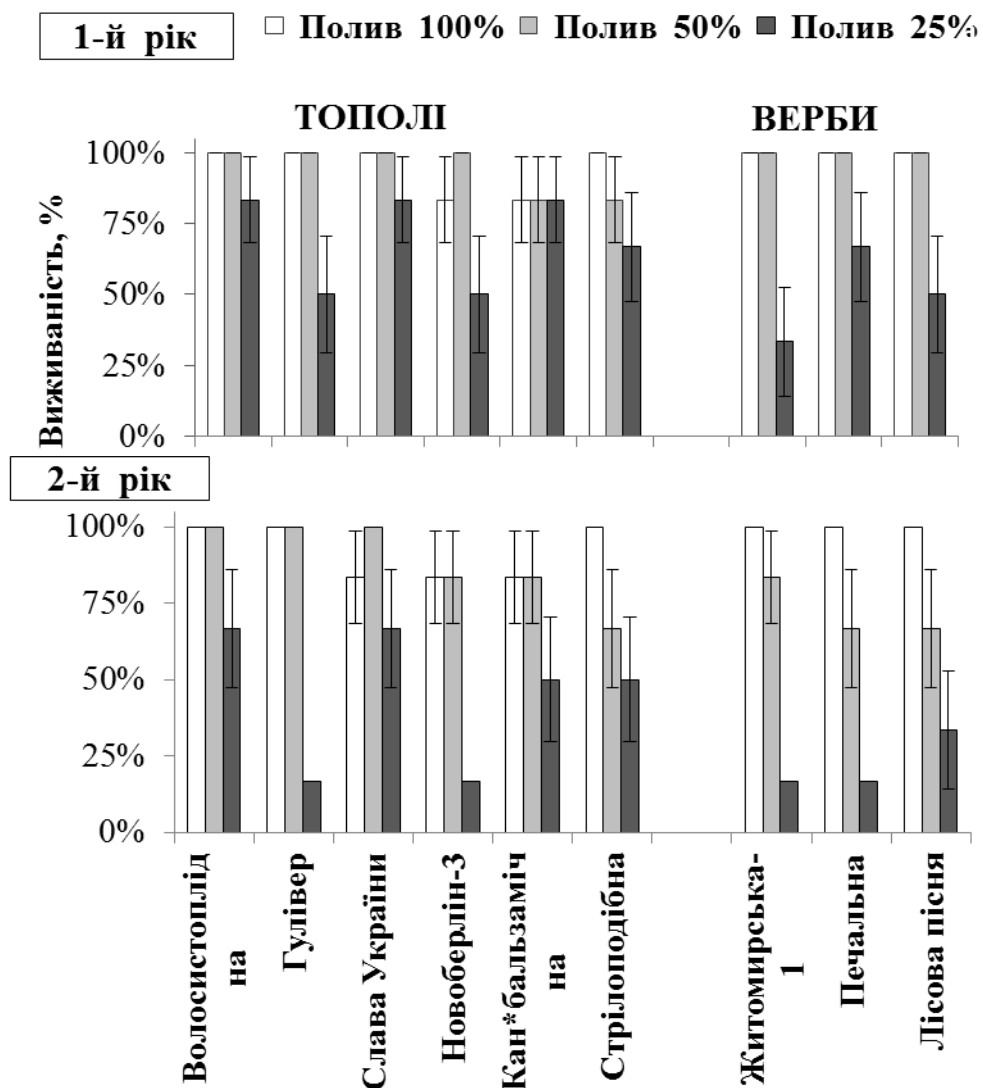


Рисунок 14.6. Виживаність ( $\% \pm sp$ ) у різних клонів тополь та верб в кінці 1-го та 2-го вегетаційних сезонів за нормального поливу (100 %) та в умовах дефіциту зволоження (50 і 25 %).

Найбільш чутливими до посушливих умов - 25% зволоження від контролю, виявилися клони верби 'Житомирська-1', 'Печальна' та клони тополі 'Гулівер', 'Новоберлінська-3'. Відсоток виживаності цих клонів становив всього 17%, тобто з шести рослин виживала тільки одна. Тополя 'Канадська × Бальзамічна' та 'Стрілоподібна' виявилися в деякій мірі толерантними до дії посухи, їх виживаність на 25%-ому поливі складала 50%. Тополі 'Волосистоплідна' і 'Слава України' були найменш уразливими, їх виживаність на поливі 25% від контролю на кінець другого вегетаційного сезону досягала 67%.

Аналізуючи міжклональні відмінності за висотою пагона, ми виявили, що верби значно переважали тополі на перший та другий рік вегетації, як за дії стресу, так і за його відсутності (рис. 14.7). Як видно з рисунка, в умовах дефіциту зволоження 50% висота пагона у верб навіть перевищувала таку у тополь, що виростили за нормального поливу.

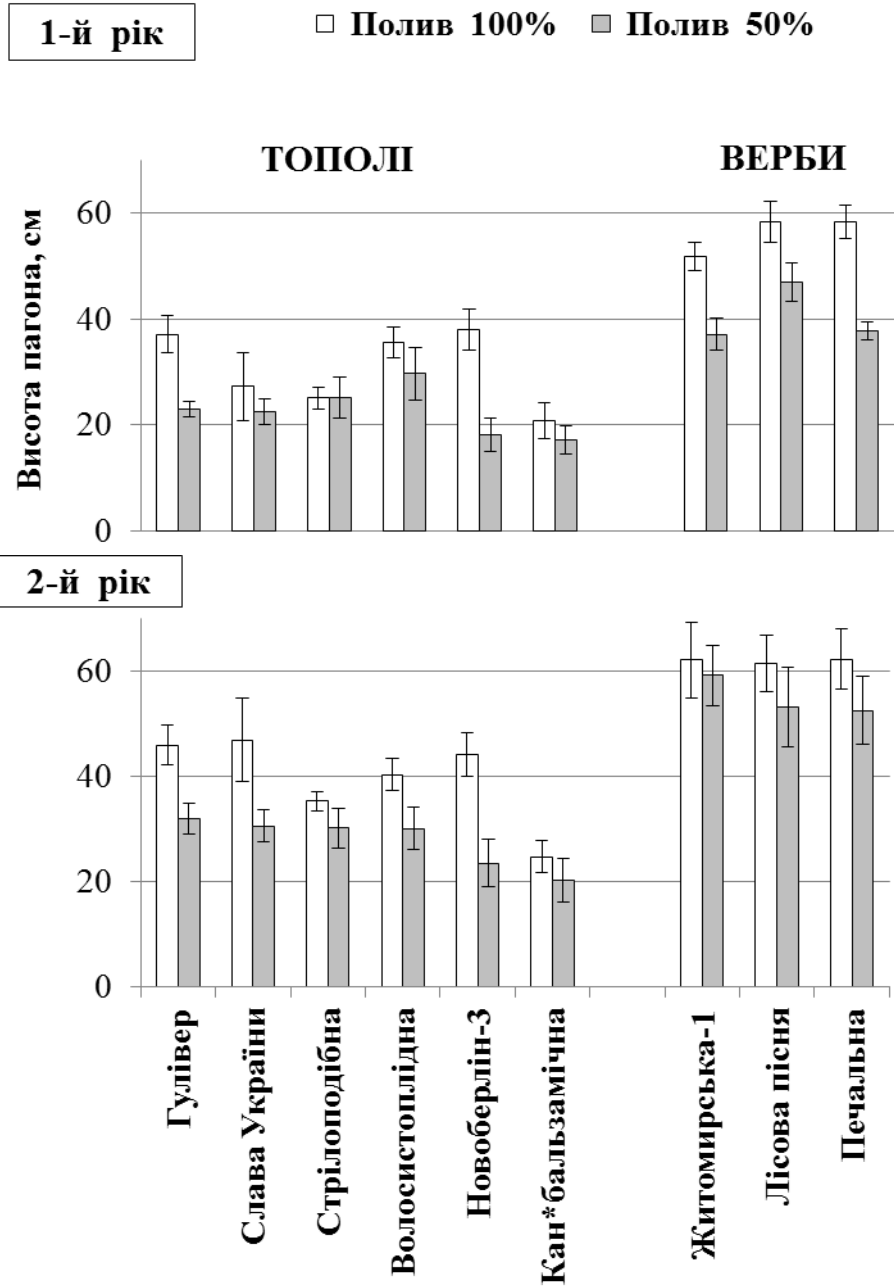


Рисунок 14.7. Висота пагона ( $\pm$ SE) у різних клонів тополь та верб в кінці 1-го та 2-го вегетаційного сезонів за нормального поливу (100%) та в умовах дефіциту зволоження (50%).



За ростом діаметра пагона у другому вегетаційному сезоні тополі, навпаки, переважали, а найкращі показники як за стресового фактору, так і його відсутності показали тополі ‘Новоберлінська-3’ та ‘Гулівер’ (рис. 14.8). Проте в кінці першого сезону за нормального зволоження діаметр пагона тополь та верб загалом був на однаковому рівні.

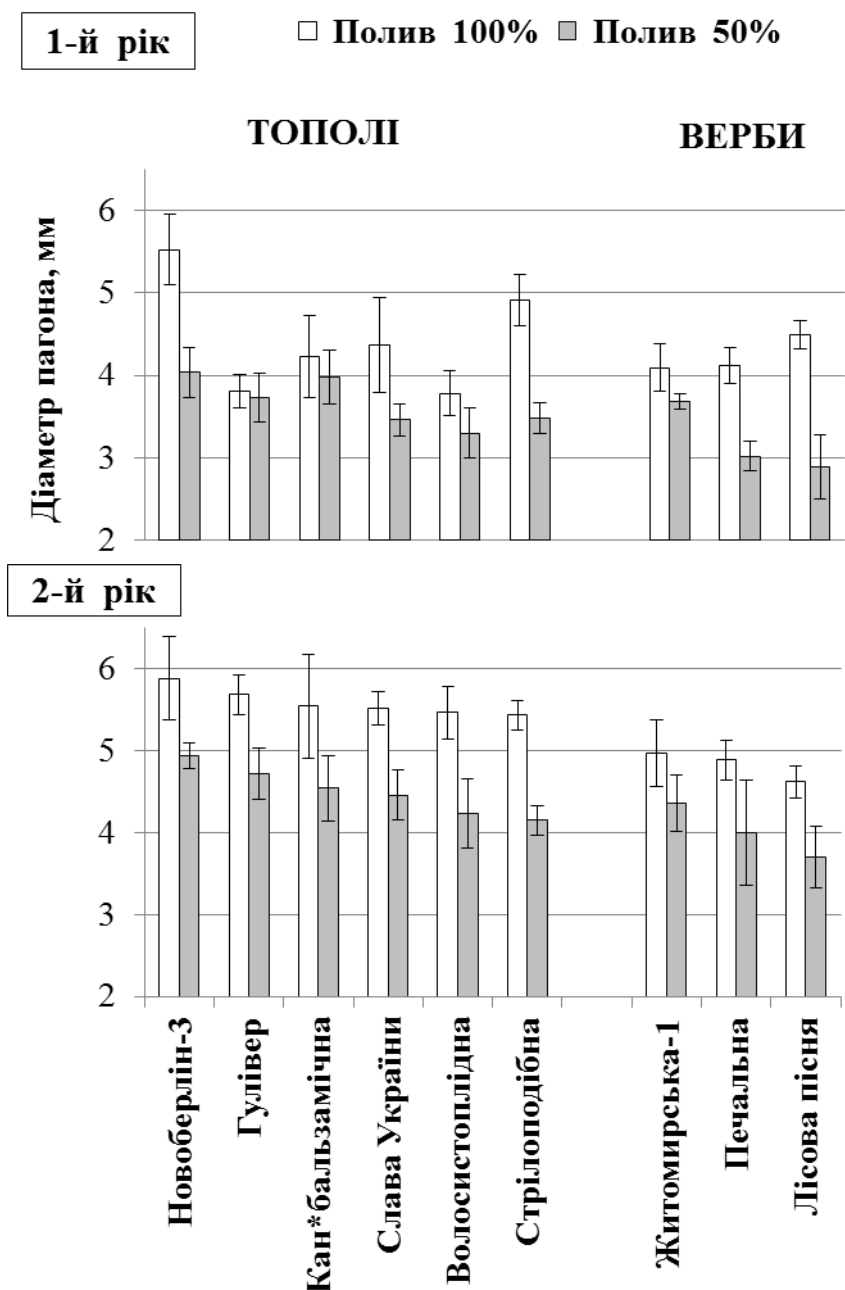


Рисунок 14.8. Діаметр стебла ( $\pm$ SE) у різних клонів тополь та верб в кінці 1-го та 2-го вегетаційного сезонів за нормального поливу (100%) та в умовах дефіциту зволоження (50%).

Під впливом посушливих умов у всіх клонів спостерігалася тенденція до зменшення листкової пластинки, як за шириною, так і за довжиною (рис. 14.9, 14.10).

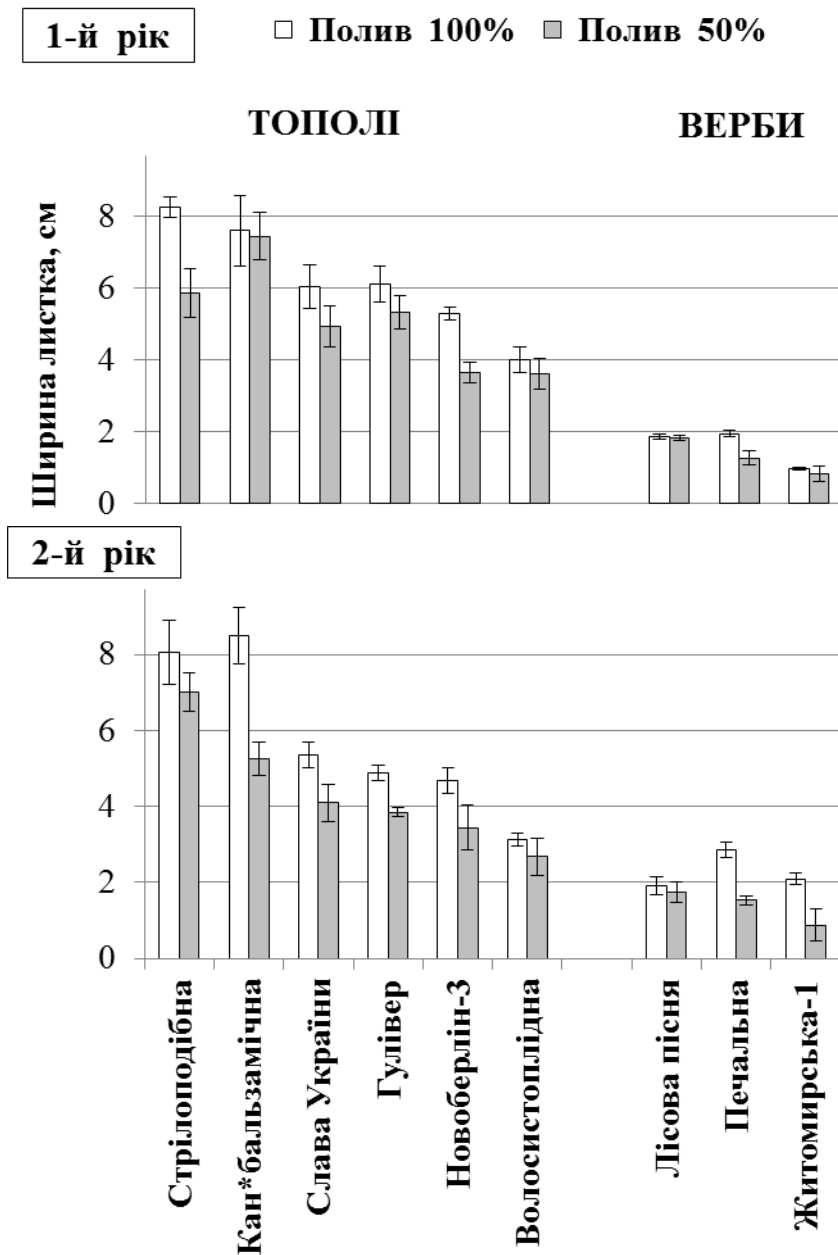


Рисунок 14.9. Ширина листка ( $\pm$ SE) у різних клонів тополь та верб в кінці 1-го та 2-го вегетаційного сезонів за нормального поливу (100 %) та в умовах дефіциту зволоження (50 %).

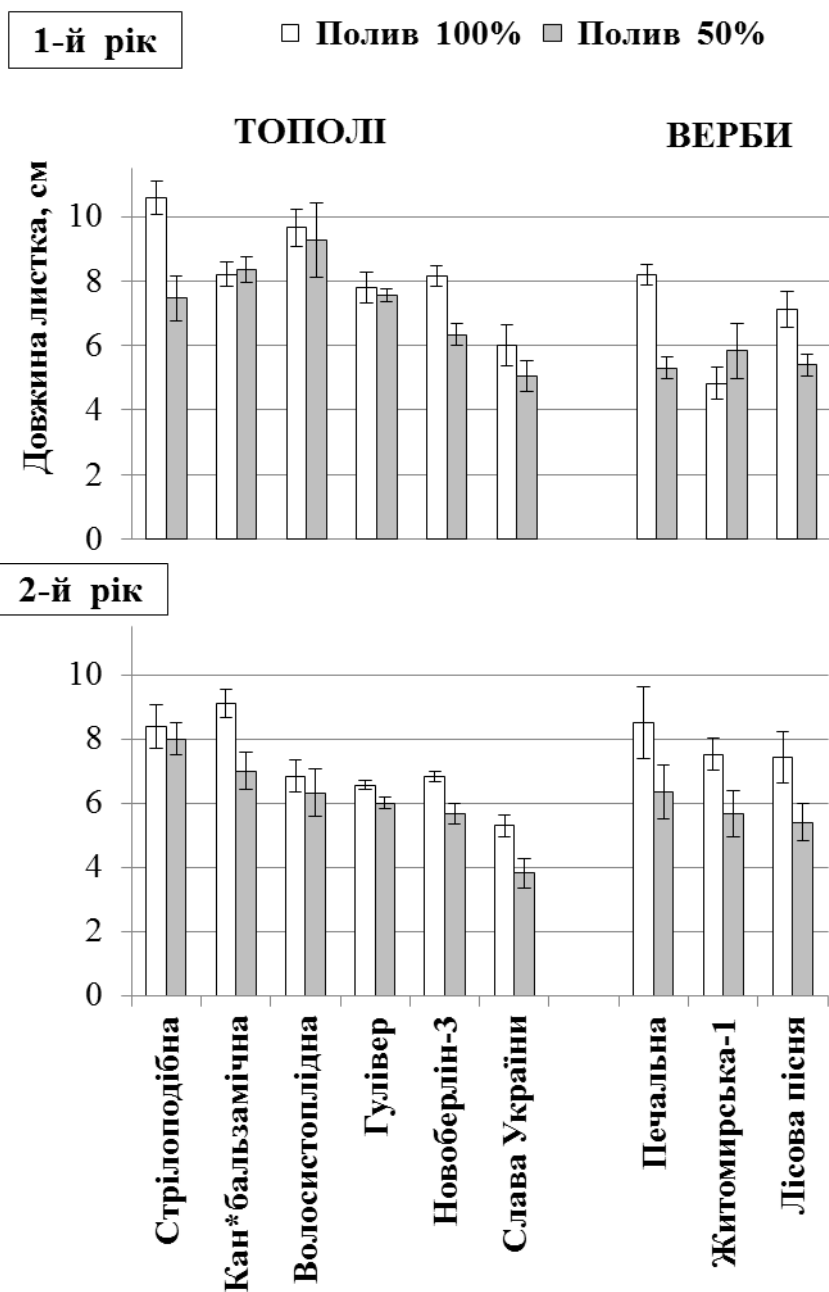


Рисунок 14.10. Довжина листка ( $\pm SE$ ) у різних клонів тополь та верб в кінці 1-го та 2-го вегетаційного сезонів за нормального поливу (100%) та в умовах дефіциту зволоження (50%).

Отже, підсумовуючи отримані результати в проведених дворічних дослідженнях, дефіцит зволоження за всіх режимів, включаючи і найменший, проявляв негативний вплив на ріст та розвиток тополь і верб. Однак, при цьому ефекти посухи на досліджені параметри відрізнялися.

Під впливом дефіциту зволоженості 75, 50 і 25% від контролю за усіх термінів обліку спостерігали достовірне зниження діаметру пагона, а у варіантах зволоження 50 і 25%, за усіх термінів обліку, знижувалася й висота рослин і довжина листка. Кількість листків знижувалася у більшості термінів обліку за варіантів режиму зволоження 50 та 25%.

Проведений статистичний аналіз динаміки ростових параметрів протягом вегетаційних сезонів (щомісячні порівняння з першим заміром) показав зростання висоти рослин за усіх термінів вимірювання. Кількість листків достовірно змінювалася (зменшувалася) починаючи з 2-го місяця тільки у рослин за режиму зволоження 25%. Довжина листка підвищувалася у дерев, починаючи з 2-го місяця спостереження, проте сильніша посуха (50 та 25% зволоженості) достовірно знижувала цей приріст. Як показав проведений аналіз, на перший рік вегетації режим зволоженості практично не впливав на ширину листка. Даний показник також не змінювався у рослин в динаміці протягом липня – вересня. Однак, протягом другого року вегетації в усіх варіантах поливу ширина листка у липні-вересні була більшою порівняно з такою у червні, а під дією посушливих умов в ряді варіантів ширина найбільшого листка зменшувалася.

Таким чином, сильну залежність від зволоження протягом обох років спостереження виявлено за діаметром пагона (за всіх режимів дефіциту зволоження), висотою рослин, кількістю та довжиною листків (за режиму поливу 50 і 25 % від контролю). Ширина листка також зменшувалася у більшості варіантів під впливом посушливих умов вирощування.

З усіх проаналізованих параметрів сумарна виживаність рослин може бути найважливішим показником у випадку вирощування тополі та верби в екстремальних умовах зволоженості, наприклад у південних регіонах України. Нами встановлено, що за зниження вдвічі режиму поливу порівняно з контролем (50%) верби і тополі здатні виживати протягом двох років вегетації в горщиках. За такого рівня зволоження виживаність була знижена, однак статистично

недостовірно (83%). Вживаність на 2-й рік вегетації достовірно знижувалася тільки за найменшого рівня зволоження (25%) і становила 37% від рівня контролю.

Необхідно зауважити, що ростові показники, оцінювані в даному експерименті протягом дворічних спостережень, не можна розцінювати як абсолютні, оскільки ріст рослин значно лімітований об'ємом ґрунту у горщику.

Оцінка клональних відмінностей у вживаності рослин показала, що для двох клонів верби ('Житомирська-1', 'Печальна') та двох клонів тополь ('Гулівер', 'Новоберлінська-3') режим сильної посухи (25%) виявився критичним у вживанні. Тополі 'Волосистоплідна' і 'Слава України' були найбільш стійкішими, а тополя 'Канадська × Бальзамічна' та 'Стрілоподібна' виявилися в певній мірі толерантними до дії посухи за вживаністю.

Зважаючи на те, що найкращі показники вживаності за сильного дефіциту вологи продемонстрували клони тополь 'Слава України' та 'Волосистоплідна', ці клони можуть бути більш адаптованими до вирощування в посушливих умовах. Особливо варто відмітити клон 'Слава України', який показав ще й задовільні ростові показники за усіх режимів дефіциту зволоження, а також у контролі.

За висотою пагона верби значно переважали тополі на перший та другий рік вегетації, як за дії стресу, так і за його відсутності. Проте за ростом діаметра пагона у другому вегетаційному сезоні тополі, навпаки, переважали. Під впливом посушливих умов у всіх вивчених клонів спостерігалася тенденція до зменшення листової пластинки, як за шириною, так і за довжиною. Відомо, що у рослин, які ростуть у посушливих умовах, зменшення листових пластинок є адаптацією до дефіциту зволоженості. Це дозволяє зменшити випаровування води, а також лімітовано використовувати водний ресурс, необхідний для побудови та функціонування рослинного організму [Wang et., 2019].

Узагальнення отриманих результатів показує, що режим зволоження 75-50% від контролю знижує ростові показники, проте в таких умовах рослини

здатні виживати. Обмеження ж поливу до 25% від контролю викликає такий сильний стрес, коли більшість рослин гине. Подібні залежності були встановлені і в дослідженні впливу посухи на клон *Populus deltoides* «Krantі», де за ростовими, фізіологічними та біохімічними параметрами виявлено, що рослини здатні підтримувати в певній мірі нормальний ріст та накопичення біомаси тільки за режимів зволоження 75-50% від природної вологості ґрунту. За більш сильної посухи головною стратегією поведінки рослинного організму є виживання, а накопичення біомаси стає другорядним завданням.

### **3.3. Фенологія розкривання бруньок у клонів швидкорослих дерев тополь і верб**

Аналіз розкривання бруньок у клонів тополь і верб, що ростуть на випробній дослідній ділянці швидкорослих біоенергетичних дерев у Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України розпочинали 12 квітня 2018 року. На час початку спостережень у трьох клонів верб, бруньки знаходилися вже на стадії повністю розкритих листків (РБ=5), тоді як у тополь різних клонів бруньки були відкриті тільки на 0,5 ('Слава України') – 4 бали ('Волосистоплідна') (табл. 2). Протягом періоду проведення обліків у шести клонів тополь спостерігали швидкий процес розкривання бруньок, і вже через 10 днів у цих клонів рівень розкривання становив 5 балів. Тобто, як бачимо, у верб стадія повністю розкритих листків наступала щонайменше на 10 днів раніше порівняно з тополями (рис.15).

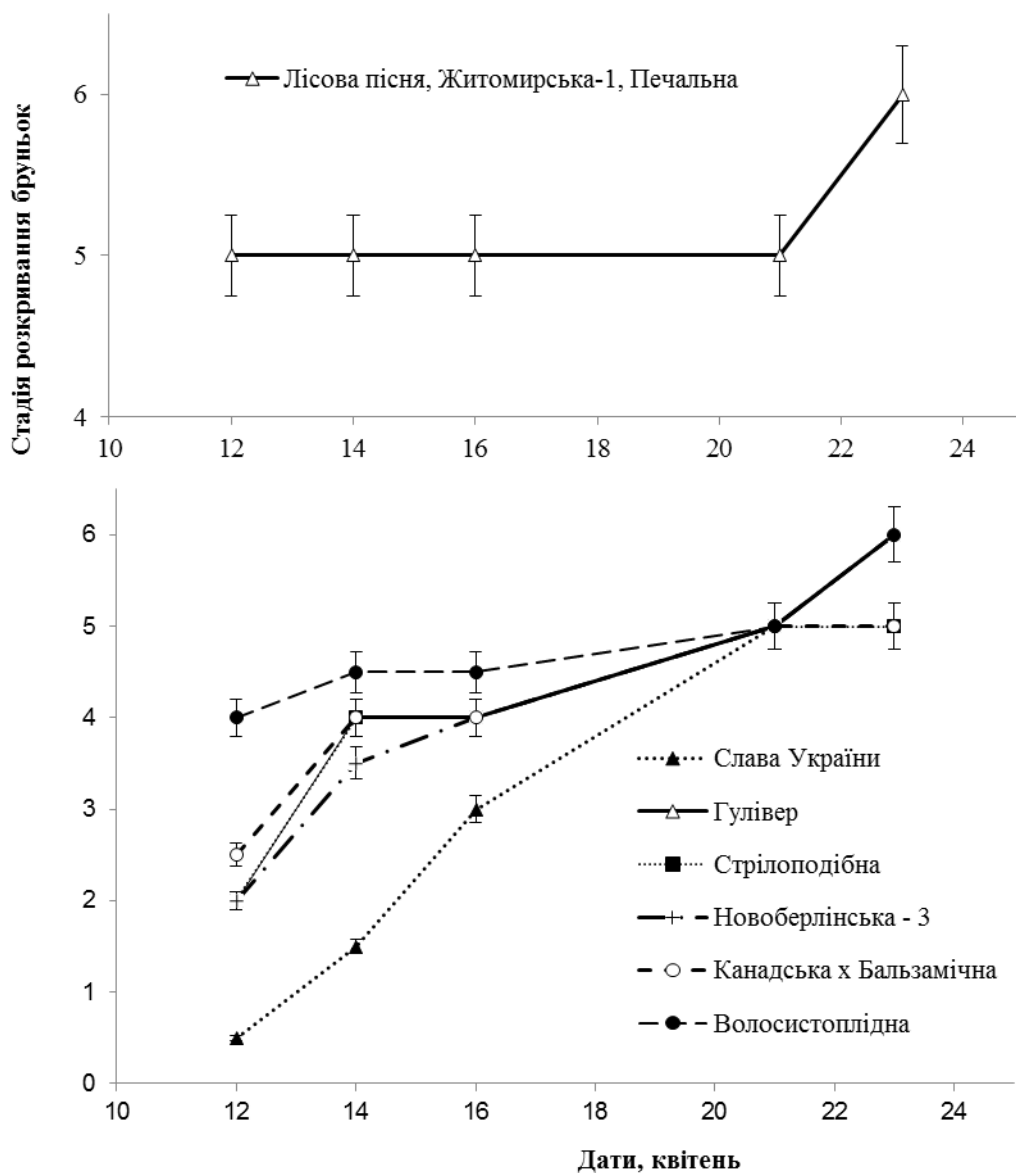


Рисунок 15. Динаміка розкриття бруньок у верб і тополь на випробній дослідній ділянці швидкорослих біоенергетичних дерев у Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України.

У рослин, вирощених у горщиках, динаміка розкриття була відмінною, оскільки основні бруньки швидше розкривалися у більшості клонів тополь порівняно з вербами. Починаючи з 6-го лютого показники згідно зі “Шкалою розкриття бруньок” (табл. 2) становили у тополь 1–1,5 бали (рис. 16). Найактивніше розкриття бруньок, як апікальних, так і бічних, спостерігали у клонів тополь ‘Гулівер’ та ‘Новоберлінська-3’ (рис. 16 і 17). У клону ‘Слава

України' бічні бруньки хоч і починали розкриватися пізніше (на 13-у добу від початку спостережень), (рис. 16), проте на 45 добу як апікальні, так і бічні бруньки досягали стадії РБ=6 (рис. 17). В інших клонів швидкорослих дерев бруньки розкривалися дещо повільніше, зокрема, у клонів верб 'Житомирська-1', де рівень розкривання як апікальних, так і бічних бруньок був найнижчим (РБ=2,3±0,4 та РБ=2,7±0,4, p<0,05), та 'Лісова пісня', де рівень розкривання апікальних бруньок також достовірно відрізнявся від такого у клонів з максимально розкритими бруньками (РБ=5,2±0,3, p<0,05) (рис. 17).

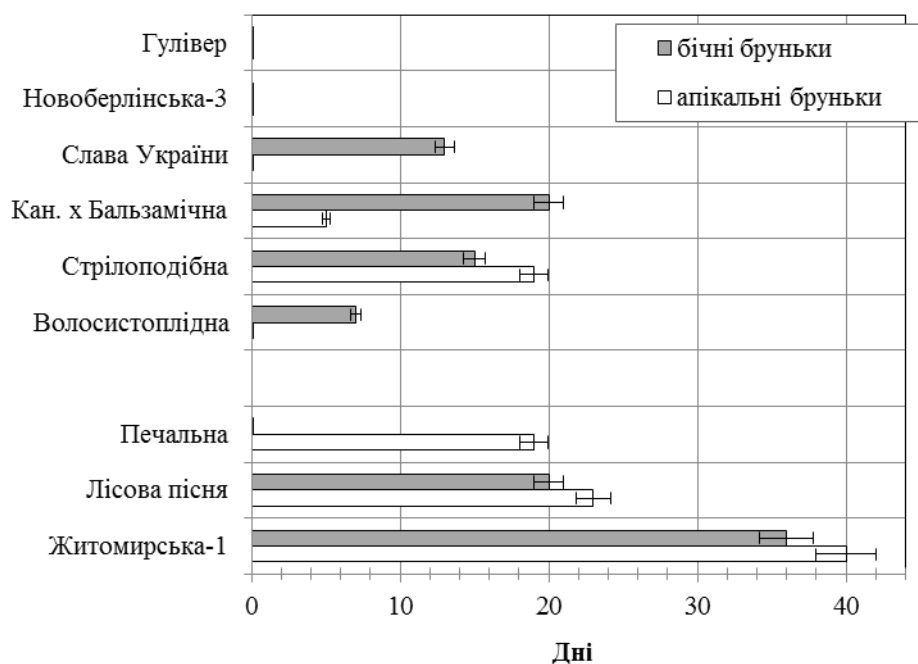


Рисунок 16. Терміни початку розкривання (РБ=1) бруньок у тополь та верб в умовах закритого ґрунту

Загалом у верб апікальні бруньки починали розкриватися пізніше, починаючи з 19–40-го дня дослідження залежно від клону. В той же час, бічні бруньки у верб починали розкриватися раніше, ніж апікальні, за винятком верби 'Житомирська-1', де бруньки були значимо менше відкриті навіть на 45 добу спостереження порівняно з максимальними показниками (РБ=2,7±0,4, p<0,05). Натомість, у бічних бруньок верби 'Печальна' стадія РБ=1 виявлялася вже на перший день спостереження (рис. 16).



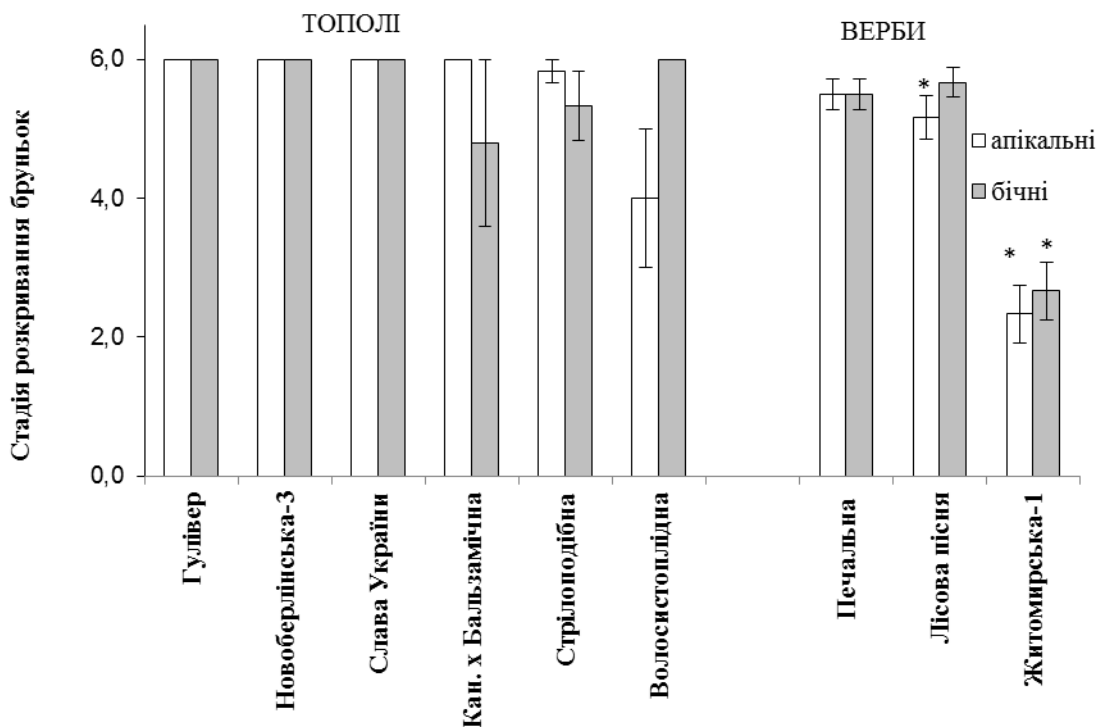


Рисунок 17. Розкривання апікальних та бічних бруньок у різних клонів тополь і верб на 45-й день експерименту в умовах закритого ґрунту.

Примітка: \* –  $p < 0,05$ , відмінності достовірні порівняно з максимальним рівнем розкриття бруньок (РБ=6).

Отже, в умовах закритого ґрунту у верб спостерігали тенденцію до швидшого розкривання бічних бруньок, а у тополь в таких умовах більшість клонів показали швидший ріст апікальних бруньок. Очевидно, це пов'язане з ростовими особливостями представників родів *Salix* та *Populus*, оскільки для багатьох верб характерне значне галуження стебла. Як свідчать отримані результати, у рослин тополі, вирощених в лабораторних умовах, спостерігали швидші темпи розкривання бруньок порівняно з вербами, в той час як у рослин на дослідній ділянці бруньки у верб, навпаки, розкривалися швидше, ніж у тополь. На нашу думку, такий ефект обумовлений обмеженням світлового режиму в приміщенні, який, вірогідно, сильніше впливає на розкривання бруньок у верб. Адже відомо, що спектр світла, разом з температурою та тривалістю дня є вагомими чинниками регуляції розвитку бруньок навесні. Зо-

крема, обмеження освітлення у блакитному спектрі (до 500 nm) спричиняло затримку розкривання бруньок на 3-6 днів у берези *Betula pendula*, вільхи *Alnus glutinosa* та дуба *Quercus robur* [Brelsford and Robson, 2018]. І, навпаки, додаткове освітлення дерев на вулицях міста в нічний час здатне пробуджувати бруньки до 7 днів раніше норми. Відмінності між розкриванням бруньок у тополь та верб, у польових та у контрольованих умовах спостерігали й у дослідженні [Ghelardini et al., 2014]. Причиною цього, автори вважають наявність в умовах відкритого ґрунту значно більшої кількості неврахованих чинників (наприклад, режим зволоження), які можуть по різному впливати на терміни розкривання бруньок. Крім цього, відомо, що для багатьох видів рослин фенологія є мінливою ознакою з високим ступенем спадковості. Вивчаючи фенологію листків 17 клонів тополі, Pellis et al. [2004] виявили, що майже щороку ті самі клони розкривали бруньки значно раніше або пізніше порівняно з іншими клонами. Очевидно, фенологія розкривання бруньок – дуже чутлива до змін довкілля ознака, тому дослідження реакцій різних видів дерев є необхідними для упередження негативного впливу кліматичних змін на їх продуктивність.

### **3.3.1. Фенологія розкривання бруньок за дії водного дефіциту**

Показники розкривання бруньок відрізнялися між тополями та вербами, як за нормального поливу, так і між різними рівнями водного дефіциту. Як видно з рис. 18, на 45-й день дослідження у тополь спостерігалось значне пригнічення розвитку бруньок під дією водного дефіциту, що залежало від його інтенсивності. Посуха середнього (50%) і особливо високого рівня значно пригнічувала розвиток бруньок. Фенологічні стадії бруньок у дерев за нормального поливу та слабкого стресу (75%) достовірно не відрізнялися.

В той же час, як видно з рисунка 18, сила посухи не мала достовірного впливу на рослини верб, оскільки варіанти з різними режимами поливів та контролю не відрізнялися між собою. За всіх режимів поливу, стадії розвитку

бруньок у верб були достовірно нижчими порівняно з контрольними рослинами тополь, а також варіантом, що зазнав найслабшого стресу посухи – 75% поливу від контролю.

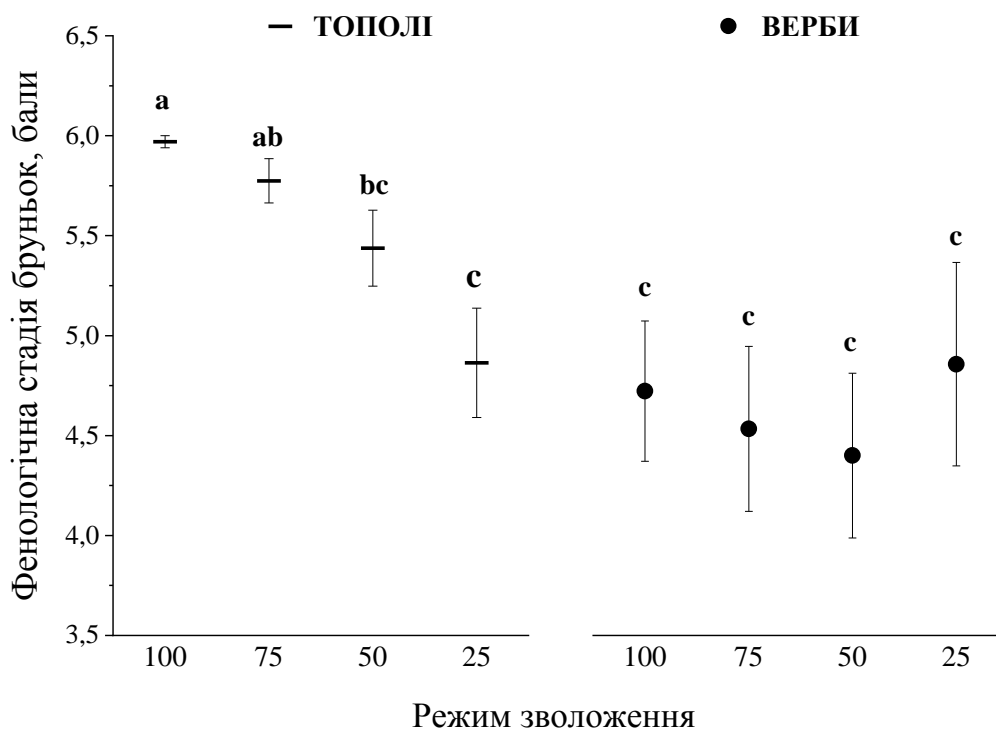


Рисунок 18. Фенологічні стадії бруньок тополь та верб на 45-й день обліку (середній бал  $\pm$  SE). Дослідження проведене після диференційованого поливу, застосованого в попередній вегетаційний період: 100% – контрольні рослини поливали нормально, 75%, 50% та 25% – % поливу від контрольного об'єму. Варіанти з однаковими літерами не відрізнялися між собою статистично за критерієм Краскела-Уолліса з пост-хок-тестом Данна-Бонферроні. Кількість зразків тополь – 22-33, верб – 7-18.

Як бачимо з одержаних результатів, бруньки у контрольних верб розвивалися значно повільніше, ніж у тополь, і, швидше за все, через це ми не змогли виявити впливу стресу на розкривання бруньок у них. Ці результати можна обґрунтувати даними, описаними в попередньому розділі [Khoma and Kutsokon, 2019], де ми порівнювали фенологію розвитку бруньок тих самих

клонів, що ростуть без посухового стресу на вулиці та в приміщенні і виявили протилежну тенденцію, коли верби на дослідній ділянці показали швидше розкривання бруньок порівняно з тополями.

Відомо, що «фактори температури та стресу можуть по-різному взаємодіяти з фотоперіодом у контролі часу фенологічних подій у деревних порід, включаючи вербу та тополя» [Orlandi et al., 2020]. Тому ми припускаємо, що світловий режим, що є важливим фактором для ініціації розкривання бруньок [Ghelardini et al., 2014; Orlandi et al., 2020], був лімітований в умовах лабораторного приміщення без застосування освітлення. Ймовірно, це мало сильніший вплив на верби, маскуючи наслідки дії посухи. Крім того, ми також повинні зазначити, що вимога до зимового охолодження може бути ще одним фактором успішної ініціації розкривання бруньок [Orlandi et al., 2020]. У нашому досліді в період спокою горшкові рослини зберігалися при середній температурі 5-7 °С, що, можливо, було недостатнім для порогу охолодження верб.

Через передбачувану «нейтралізацію» наслідків дії посухи на розкривання бруньок у верб неврахованими факторами, такими як вимоги до світла та охолодження, ми можемо оцінити посухостійкість лише для клонів тополі.

Водний дефіцит вплинув на розкривання бруньок у всіх клонів тополь. Найшвидше розкривання апікальних та бічних бруньок спостерігали у тополь клонів 'Гулівер' та 'Новоберлінська – 3'. Крім цього, наприкінці оцінювання (45 день), ці ж клони тополь 'Гулівер', 'Новоберлінська-3', а також клон тополь 'Слава України', навіть після найбільшого дефіциту води (25%-й полив) змогли досягти найвищої стадії РБ=6 балів, так як і контрольні рослини (рис. 19 А, Б).

Це свідчить про те, що за вивченими критеріями розкривання бруньок ці клони швидкорослих дерев швидше впоралися з негативними наслідками посухи порівняно з іншими клонами. Загалом, як зазначалося вище, достовірних ефектів за дії посухи не було виявлено. Два клони верби 'Печальна' і 'Житомирська-1' продемонстрували нижчу швидкість розкривання бруньок на 45-й день у всіх

варіантах, проте аналогічним чином, не було виявлено значимого впливу дефіциту води на розкривання бруньок.

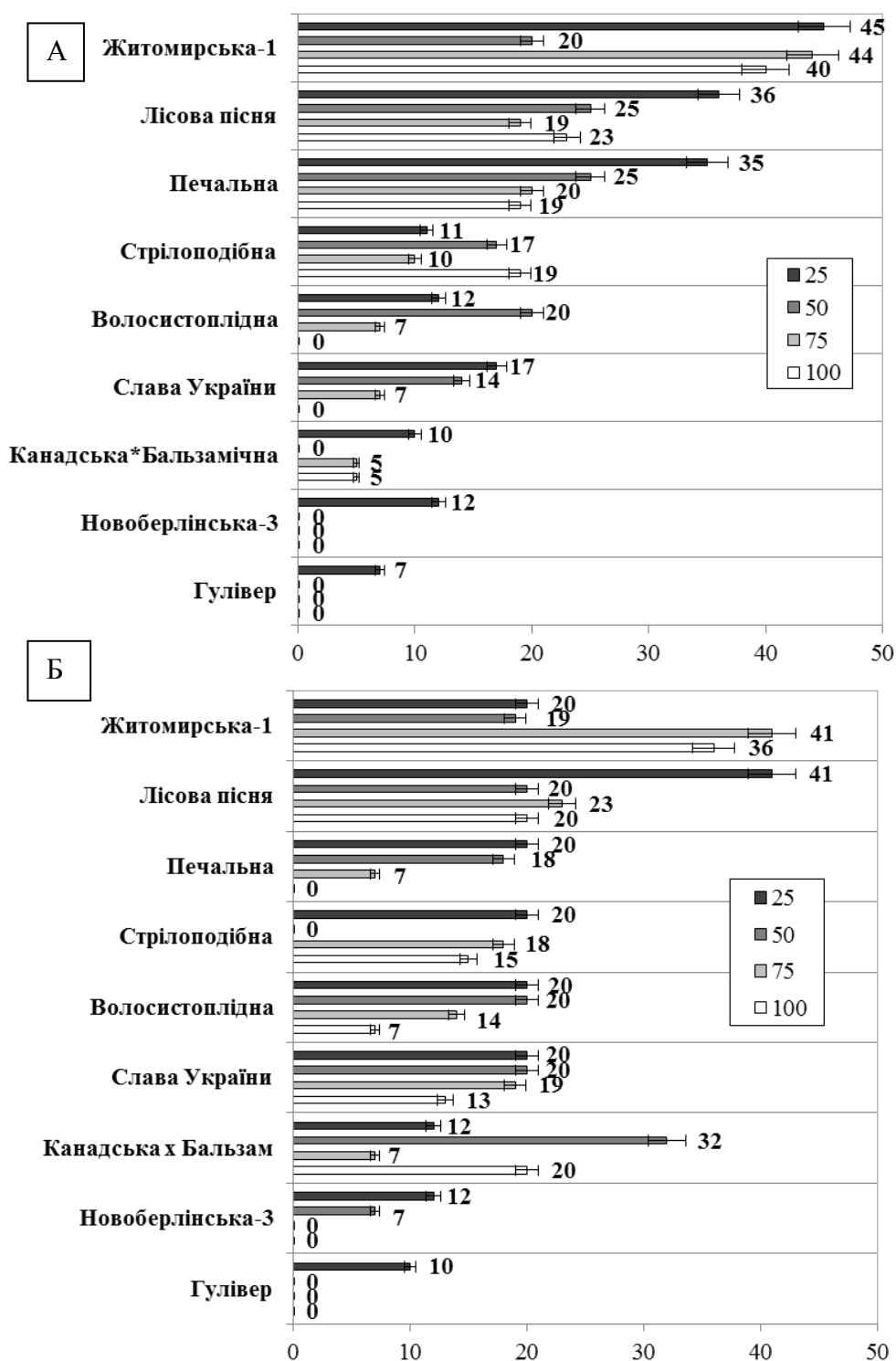


Рисунок 19. Дні розкривання апікальних (А) та бічних (Б) бруньок за дії водного дефіциту.

Як видно, з рис. 19, А, Б, найбільше дефіцит води пригнічував розкривання як апікальних, так і бічних бруньок, у клонів тополь, ‘Волосистоплідна’, ‘Канадська × Бальзамічна’, і ‘Стрілоподібна’, оскільки за найсильнішої посухи ці рослини на 45-й день обліку не досягали рівня 6 балів. Менший вплив водного дефіциту на розкривання бруньок спостерігали у клонів тополь ‘Слава України’, ‘Новоберлінська-3’, ‘Гулівер’. Помірний (50% зволоження) та сильний (25% зволоження) стрес затримував розкриття бруньок у майже всіх клонів. Слабкий посуховий стрес (75% зволоження) не був критичним для всіх клонів швидкорослих дерев. Ці результати подібні до експериментів Signorelli et al., [2022], де автори продемонстрували, що вміст води в ґрунті понад 85% не впливає на початок розкривання бруньок у виноградної лози. Проте, вони помітили, що при дуже низьких рівнях поливу розкривання бруньок взагалі не відбувається; при 35% зволоження швидкість розкривання бруньок збільшується разом із вмістом води у ґрунті; і, починаючи з 85% зволоження, швидкість розкривання бруньок стає незалежною від вмісту води [Signorelli et al., 2022].

Таким чином, в проведеному дослідженні клони розрізнялися за швидкістю розкривання бруньок, як в контрольних умовах, так і у рослин, які зазнали дефіциту води в попередній вегетаційний період.

#### **3.4. Чутливість швидкорослих дерев до засолення хлоридом натрію в умовах культури *in vitro***

Аналіз чутливості тополь і верб до засолення хлоридом натрію в умовах культури *in vitro*, показав, що засолення впливає на ріст та розвиток рослин. Результати дослідження показали, статистично достовірні відмінності від контрольних значень за змінами висоти пагона у тополь клонів ‘Новоберлінська-7’, ‘INRA 353-38’ та у верби клону ‘Житомирська-1’ вже після 10 діб вирощування за концентрації 50 мМ солі в поживному середовищі (рис. 20 А). На

30 добу дослідження у верби клону ‘Житомирська-1’ спостерігали загибель усіх рослин, вирощуваних за концентрації 100 мМ NaCl. У рослин тополь клонів ‘Новоберлінська-7’ та ‘INRA 353-38’ після місяця вирощування на поживному середовищі, що містило 100 мМ хлориду натрію, спостерігали статистично достовірне зменшення висоти пагона (рис. 20 Б), проте майже половина рослин залишались живими. Як видно з рис. 20, засолення середовища виявляло найменший вплив на висоту пагона гібридної осики клону ‘INRA 353-38’.

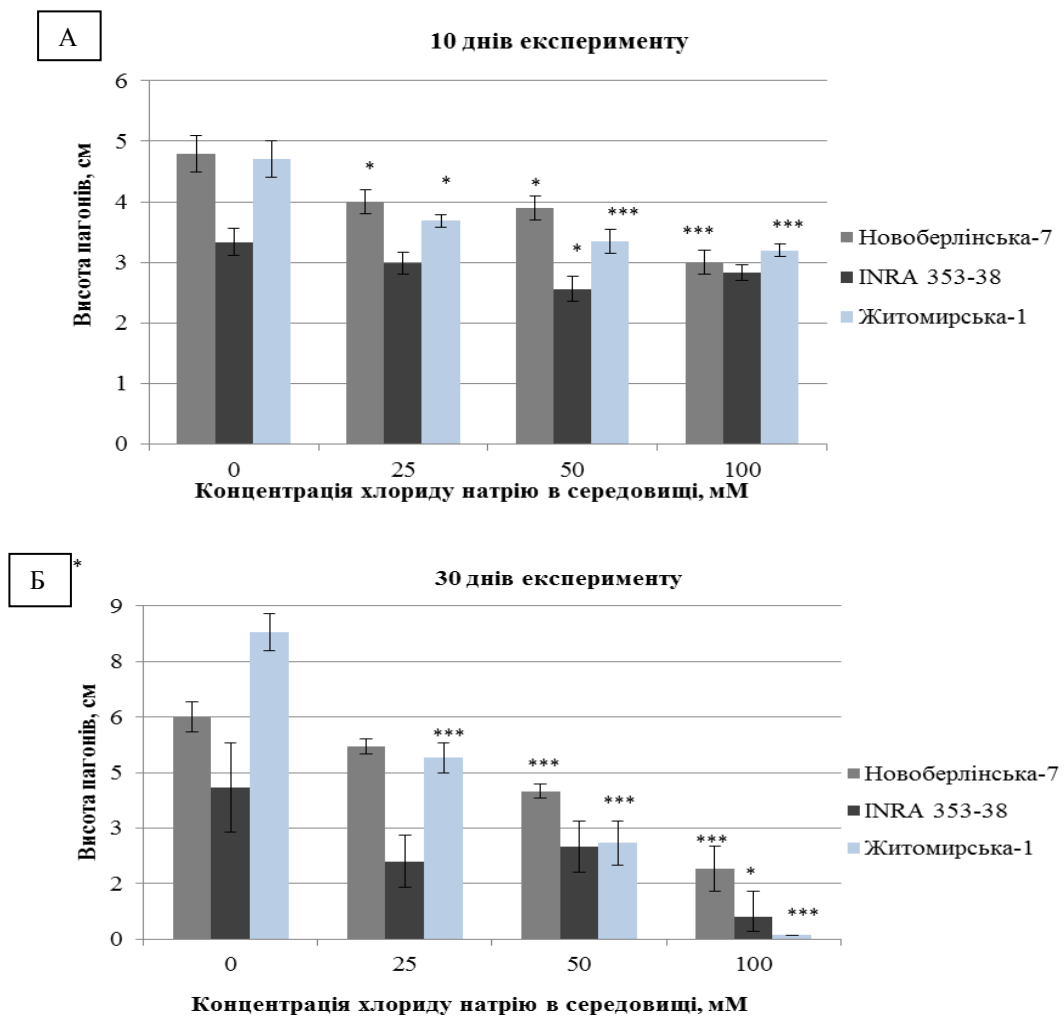


Рисунок 20. Вплив хлориду натрію на висоту пагона ( $\pm$ SE) тополь ‘INRA 353-38’, ‘Новоберлінська -7’ та верби ‘Житомирська-1’, на 10-й (А) та 30-й (Б) день експерименту в умовах культури *in vitro*: 0 мМ - контроль, та 25 мМ, 50 мМ, 100 мМ - засолення хлоридом натрію (\* –  $p < 0,05$ ).

Значні зміни у процесах ризогенезу у верби клону ‘Житомирська-1’ були помітні вже при короткотривалій дії сольового стресу. На 10 добу культивування рослин цього клону на поживному середовищі з 50 мМ хлориду натрію, спостерігали статистично достовірне зменшення кількості коренів більше ніж у 2 рази порівняно з контрольними рослинами, а у рослин, вирощених за концентрації 100 мМ NaCl, виявлено повну відсутність коренів. При цьому за нормальних умов культивування верба характеризується високим ступенем коренеутворення. У тополі клону ‘Новоберлінська-7’ на 10 день експерименту спостерігали статистично достовірне зменшення кількості коренів як за концентрації 50 мМ NaCl, так і за 100 мМ NaCl, і протягом 30 днів їх кількість взагалі не збільшувалася. Статистично достовірних відмінностей у впливі досліджених концентрацій хлориду натрію на ризогенез у рослин гібридної тополі клону ‘INRA 353-38’ не виявлено (рис. 21 А, Б).



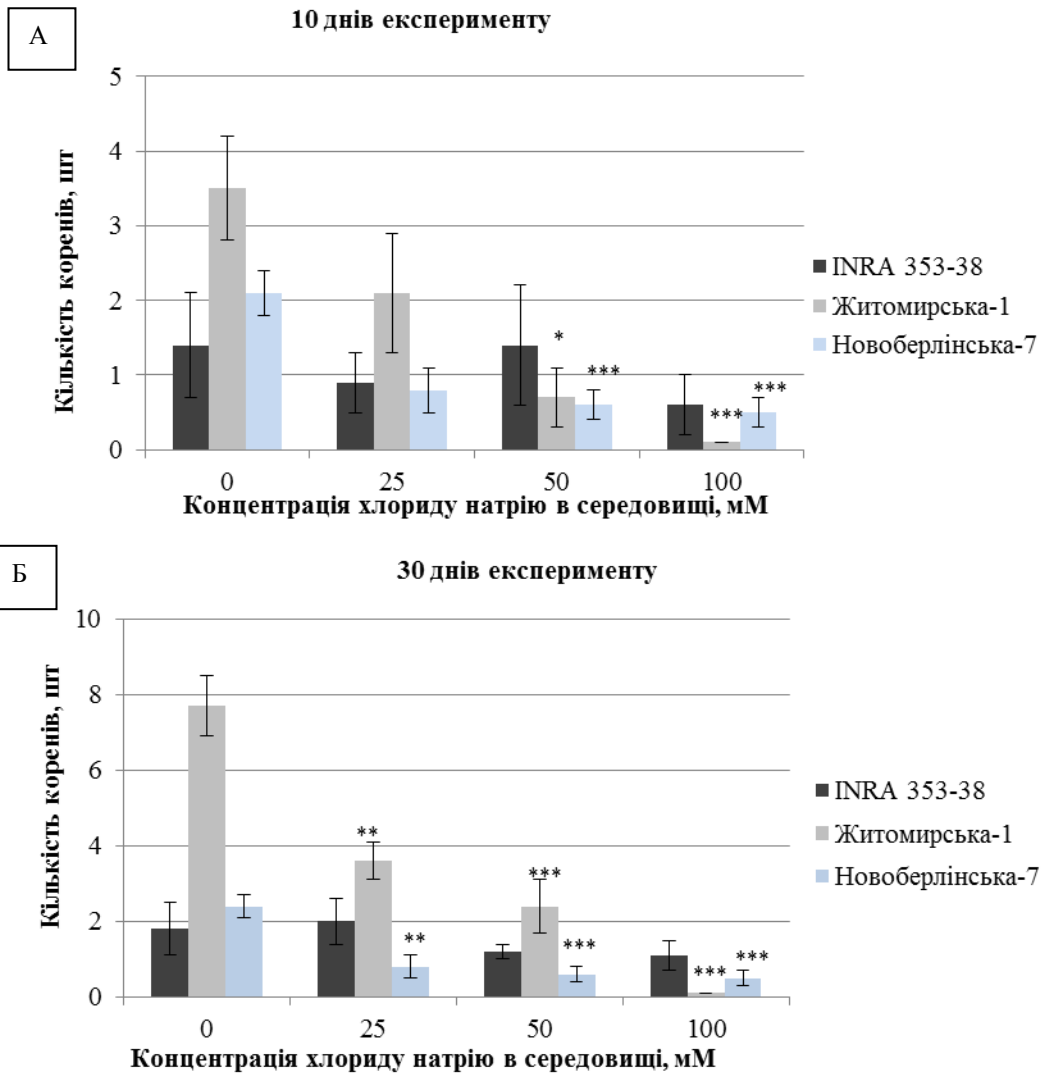


Рисунок 21. Вплив хлориду натрію на утворення коренів (кількість коренів  $\pm$ SE) у тополь 'INRA 353-38', 'Новоберлінська -7' та верби 'Житомирська-1', на 10-й (А) та 30-й (Б) день експерименту в умовах культури *in vitro* : 0 мМ - контроль, та 25 мМ, 50 мМ, 100 мМ - засолення хлоридом натрію (\* –  $p < 0,05$ ).

За критерієм загального стану рослин, після 30 днів культивування, засолення поживного середовища сильніше впливало на вербу 'Житомирська-1' порівняно з тополею 'INRA 353-38'. Як видно з рис. 22, за найвищої концентрації хлориду натрію в поживному середовищі, всі рослини верби загинули; в той час як у тополі клону 'Новоберлінська-7' та у гібридній тополі 'INRA 353-38' хоч спостерігали некроз апікальної частини пагона, і загальний стан погіршився значимо, проте частина пагонів залишалась життєздатною (рис. 22, 23).

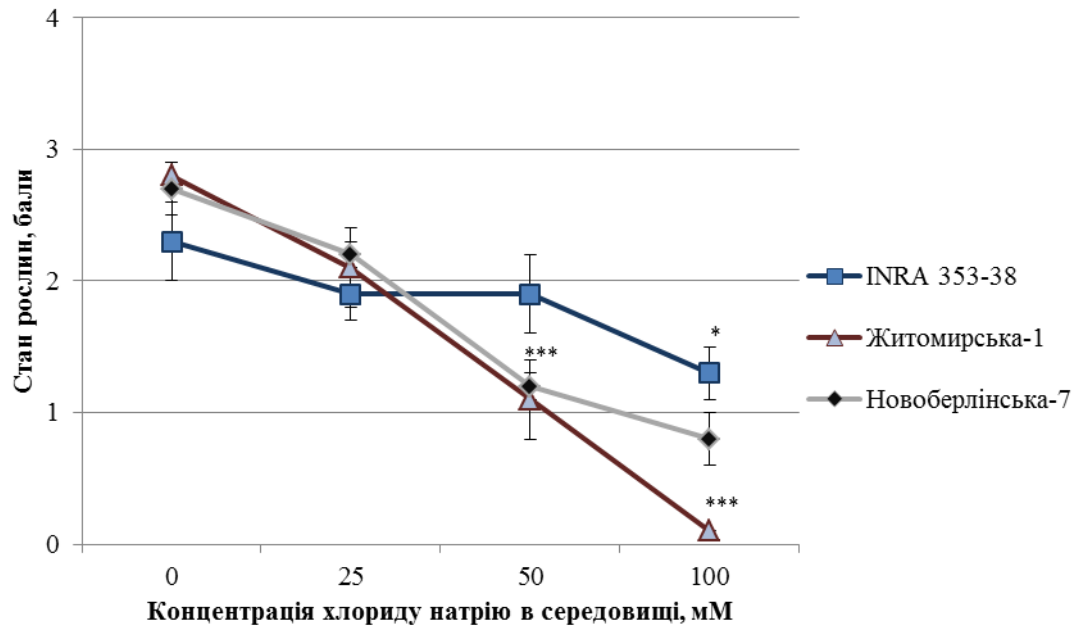


Рисунок 22. Вплив хлориду натрію на загальний стан рослин ( $\pm$ SE) тополі ‘INRA 353-38’, ‘Новоберлінська-7’ та верби ‘Житомирська-1’ після 30 діб культивування умовах культури *in vitro* : 0 мМ - контроль, та 25 мМ, 50 мМ, 100 мМ - засолення хлоридом натрію (\* –  $p < 0,05$ ).

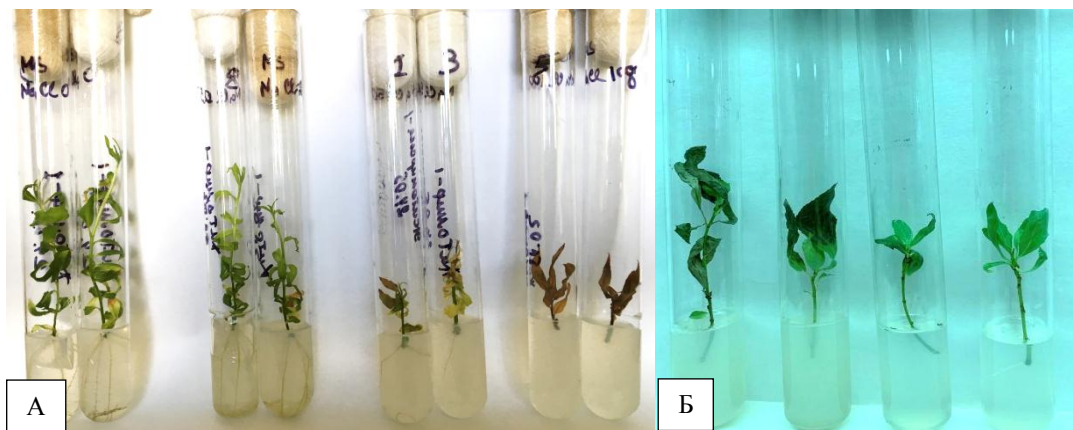


Рисунок 23. Вплив хлориду натрію на вербу клону ‘Житомирська-1’ (А) та ‘Новоберлінська-7’ (Б) на 30-й день експерименту. Зліва направо представлені варіанти засолення середовища у різних концентраціях: 0 мМ (контроль), 25 мМ, 50 мМ, 100 мМ.

Загалом, можна відзначити, що засолення середовища в культурі *in vitro* найменше впливало на ріст рослин гібридної осики *P. tremula* × *P. tremuloides* клону ‘INRA 353-38’ [Хома та ін., 2020]. Водночас, за відсутності засолення цей клон характеризувався найслабшим ростом. І навпаки, найбільше пригнічення росту під дією засолення виявлено у верби клону ‘Житомирська-1’, який за відсутності засолення показав найвищі ростові показники за висотою та коренеутворенням. Очевидно, негативні чинники, зокрема засолення, сильніше впливають на клони з активнішим ростом, тоді як клони, котрі ростуть повільніше, є менш вибагливими до умов довкілля.

### **3.5. Вміст вільного проліну у листках деяких клонів тополь і верб за дії водного дефіциту та засолення**

Експериментальні спостереження показали, що загальний вміст проліну відрізняється серед клонів тополь і верб. Крім цього, вміст проліну може варіювати, як і в залежності від дії стресового фактору так, і від тривалості дії стресового фактору. Рівень вільного проліну також відрізняється між рослинами на першому та другому роках вирощування.

#### **3.5.1. Вміст вільного проліну у тополь і верби за дії довготривалого впливу водного дефіциту**

Результати досліджень впливу водного дефіциту за різних режимів зволоження (100% – (контроль) та 75%, 50%, 25% від об’єму контролю) та віку клонів тополь ‘Слава України’ (1–го року вегетації), ‘Гулівер’ (1–го та 2–го років вегетації) та клону верби ‘Печальна’ (1–го року вегетації) щодо вмісту вільного проліну представлені у табл. 7.

Таблиця 7.

**Вміст вільного проліну (мкг/мл) у листках швидкорослих дерев (n = 16) проаналізовано за двосторонньою ANOVA з факторами: клон ( $P_{\text{клон}}$ ), водний режим ( $P_{\text{вода}}$ ) та взаємодія факторів клон і водний режим ( $P_{\text{клон} \times \text{вода}}$ ).**

Фактор	Фактор/Ефект	Вміст проліну ( $\pm$ SE, мкг/мл)
--------	--------------	-----------------------------------

Клон (вік)	Тополя 'Слава України' (1 <sup>ий</sup> рік)	18,68 ± 0,76 <sup>bc</sup>
	Верба 'Печальна' (1 <sup>ий</sup> рік)	19,95 ± 0,81 <sup>c</sup>
	Тополя 'Гулівер' (1 <sup>ий</sup> рік)	17,34 ± 0,74 <sup>b</sup>
	Тополя 'Гулівер' (2 <sup>ий</sup> рік)	13,68 ± 0,75 <sup>a</sup>
	$P_{\text{клон}}$	0,001
Водний режим	100 %	17,70 ± 1,16
	75 %	17,45 ± 0,86
	50 %	19,16 ± 0,92
	25 %	18,51 ± 0,90
	$P_{\text{вода}}$	0,576
Клон × водний режим	$P_{\text{клон} \times \text{вода}}$	0,904

Примітка: <sup>abc</sup> – різні літери вказують на значимі відмінності в межах фактора «клон», згідно тесту LSD як пост-хок тесту ( $P < 0,05$ ).

Спектрофотометричні вимірювання показали відсутність відмінностей у вмісті проліну між різними варіантами поливу (табл. 7). Але загальний вміст проліну відрізняється між клонами, а також у зразках дерев тополі першого та другого року (табл. 7). Найнижчий вміст проліну був визначений в узагальнених (за різними режимами поливу) зразках тополі 'Гулівер' у другому вегетаційному періоді, який був значимо нижчим від усіх інших зразків (13,68 мкг/мл,  $P < 0,05$ ), включаючи зразок однорічного клону 'Гулівер' (табл. 7). Ми припускаємо, що вміст проліну зменшився внаслідок тривалішого часу адаптації до водного дефіциту, застосованого ще у попередньому вегетаційному сезоні. Другий найнижчий рівень проліну був виявлений в узагальнених зразках тополі 'Гулівер' за перший вегетаційний період, який достовірно відрізнявся від вмісту у зразках тополі 'Гулівер' у другому вегетаційному сезоні та верби 'Печальна'.

Вплив варіантів зволоження також аналізували окремо для кожного клону та водного режиму. Відмінності між клонами в межах однієї групи поливу, визначені за допомогою ANOVA з пост-хок тестом найменш істотної різниці (LSD), представлені на рис. 24. Як бачимо, найбільші відмінності виявлені між різними варіантами поливу тополі 'Гулівер' у другому вегетаційному періоді та верби 'Печальна' (рис. 24).

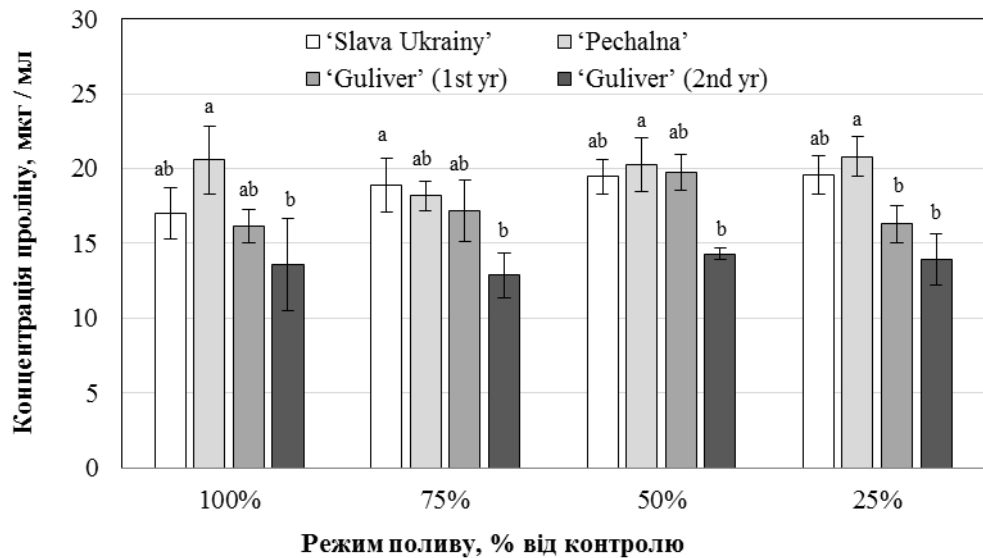


Рисунок 24. Вміст вільного проліну (мкг/мл,  $\pm$  SE,  $n = 4$ ) у листках тополь (клони 'Гулівер' та 'Слава України') та верби (клон 'Печальна') після 30 днів диференційного поливу: 100% – контрольні рослини (нормальний полив), 75%, 50% і 25% – % поливу від контрольного об'єму; різні літери над смужками позначають значущі відмінності між клонами в межах однієї групи поливу. Відмінності в групах визначали за двосторонньою ANOVA з пост-хок тестом LSD (найменш істотної різниці) ( $P < 0,05$ ).

Таким чином, «базовий» рівень проліну, був значимо нижчим у дворічних рослин клону 'Гулівер' порівняно з усіма іншими зразками, а найвищий рівень проліну було встановлено у зразках листків верби 'Печальна' (табл. 7, рис. 24). Як бачимо, за умов даного експерименту, тільки фактор клону мав очевидний вплив на вміст проліну, тоді як фактор водного дефіциту за різних режимів не впливав на рівень проліну. Виявлений ефект можна пояснити тим, що рівень проліну було виміряно на 30-й день від початку застосування водного дефіциту.

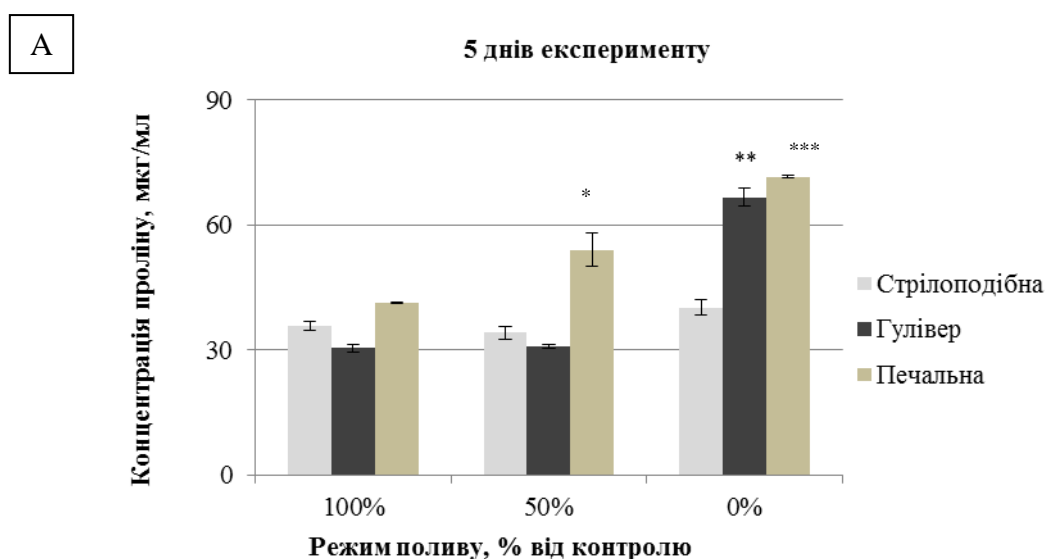
Зауважимо, що в ряді досліджень автори зазначають, що зміни концентрації вільного проліну як маркера стресу, є відносно швидкою стрес-реакцією [Shahbaz et al., 2013]. Відтак, ми припускаємо, що дефіцит води, швидше за все, змінює рівень проліну у меншому проміжку часу, ніж терміни, які ми

застосували [Khoma et al., 2021]. У зв'язку з цим, нами було проведено наступне дослідження, де вміст проліну визначали в коротші терміни від початку дії стресу.

### 3.5.2. Вмісту вільного проліну у тополь і верби за дії короткотривалого впливу водного дефіциту

Результати досліджень щодо визначення вмісту вільного проліну у клонів тополь 'Стрілоподібна', 'Гулівер' та верби 'Печальна' під час короткотривалого впливу водного дефіциту, показали значні відмінності у вмісті проліну в залежності від режиму зволоження, терміну дії стресового фактору, а також між клонами швидкорослих дерев.

Згідно з рис. 25 А, у клону верби 'Печальна' спостерігали збільшення вмісту вільного проліну при режимі зволоження 50% та 0% (без поливу) від контролю вже на п'ятий день експерименту, де його концентрація становила 54,0 мкг/мл та 71,6 мкг/мл відповідно, що статистично достовірно відрізнялося від контролю (41,4 мкг/мл). Крім того, за відсутності поливу, вміст вільного проліну достовірно збільшувався уже на п'ятий день експерименту у листках тополі клону 'Гулівер' (66,6 мкг/мл проти – 30,4 мкг/мл у контролі,  $p < 0,05$ ). Виміри вмісту вільного проліну на п'ятий день експерименту не виявили достовірних змін у листках тополі клону 'Стрілоподібна'.



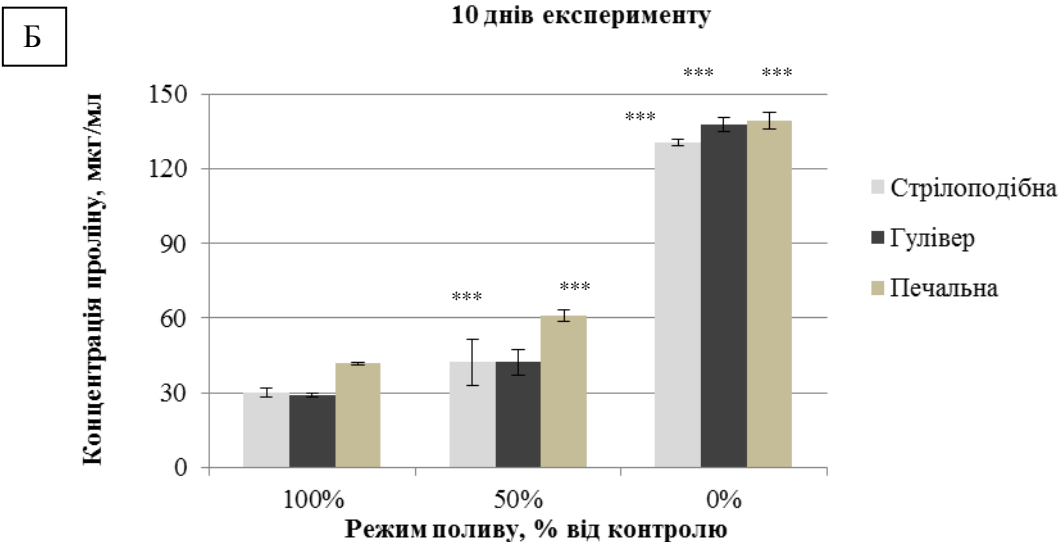


Рисунок 25. Вміст вільного проліну (мкг/мл,  $\pm$  SE,  $n = 6$ ) у листках тополь (клони ‘Гулівер’ та ‘Стрілоподібна’) та верби (клон ‘Печальна’) після 5-ти (А) та 10-ти (Б) днів диференційного поливу: 100% – контрольні рослини (нормальний полив), 50% – % поливу від контрольного об’єму, та 0% – відсутність поливу; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

За відсутності поливу протягом 10 днів, у всіх трьох клонів швидкорослих дерев спостерігали значне збільшення вмісту вільного проліну (139,2–макс мкг/мл проти 28–45 мкг/мл у контрольних варіантах,  $p < 0,05$ ) (рис. 25 Б).

Як видно з рисунка, верба ‘Печальна’ виявилася найчутливішим клоном до короткотермінового дефіциту зволоження. У цього клону виявлено найвищий вміст вільного проліну, як за дії водного дефіциту, так і в контрольних рослин. В той же час, тополя клону ‘Гулівер’ проявила толерантність до дії водного дефіциту за 50% поливу протягом усього терміну дослідження, оскільки вміст проліну в її листках не відрізнявся від контролю. А клон тополі ‘Стрілоподібна’ можна вважати найбільш стійким, оскільки вміст вільного проліну за 10 днів експерименту був найнижчим серед інших клонів дерев, особливо враховуючи те, що на 5-ий день експерименту не спостерігали значних змін навіть при відсутності поливу.

Загалом, як показали наші дослідження, зміни вмісту вільного проліну у досліджених клонів тополь та верб залежать від режиму водного дефіциту, тривалості дії стресового фактору, а також від генотипу.

### 3.5.3. Вміст вільного проліну у клонів тополі та верби за дії сольового стресу

Результати дослідження показали, що вміст вільного проліну при засоленні середовища збільшувався в обох клонів швидкорослих дерев, в залежності від дії стресового фактора (рис. 26).

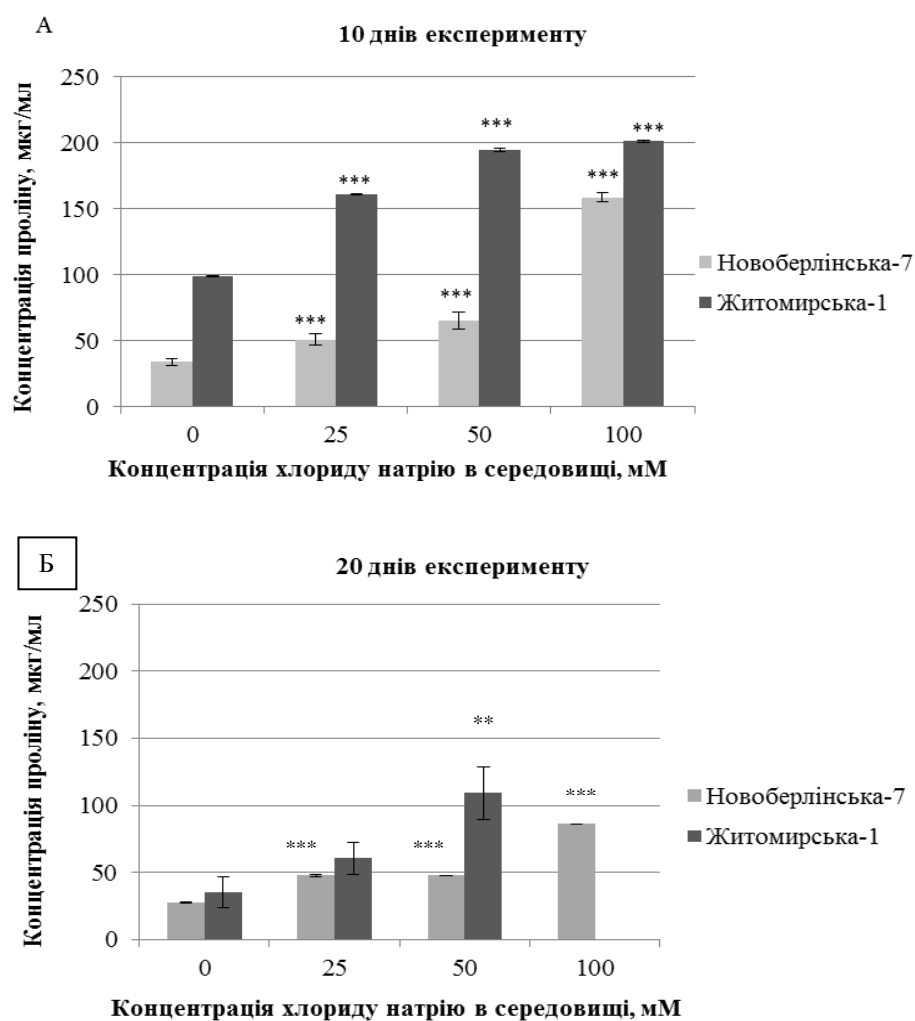


Рисунок 26. Вміст вільного проліну (мкг/мл,  $\pm$  SE, n = 5) у листках тополі ‘Новоберлінської-7’ та верби ‘Житомирської-1’ після 10-ти (А) та 20-ти (Б) днів вирощування на засоленому хлоридом натрію середовищі в культурі *in vitro*.

0 мМ – контрольні рослини, 25 мМ, 50 мМ, 100 мМ – засолення хлоридом натрію; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .



На 10-ий день експерименту у клонів тополі ‘Новоберлінська-7’ та верби ‘Житомирська-1’ спостерігали значуще збільшення вмісту вільного проліну навіть при культивуванні рослин на середовищі з мінімальною концентрацією хлориду натрію (25 мМ), порівняно з контрольними групами рослин (рис. 26 А). Найвищий вміст вільного проліну спостерігали у клону верби ‘Житомирська-1’, де на 10-й день експерименту його концентрація становила 201,0 мкг/мл, в той час як у контролі концентрація цієї амінокислоти була 98,9 мкг/мл. У клону тополі ‘Новоберлінська-7’ найбільший вміст вільного проліну (158,6 мкг/мл) виявлено при культивуванні на середовищі з концентрацією хлориду натрію 100 мМ, який перевищував контроль (33,9 мкг/мл) майже у 5 разів.

На 20-ий день експерименту при культивуванні рослин на середовищі з концентрацією хлориду натрію 100 мМ, виміряти вміст вільного проліну у листках тополі ‘Житомирська-1’ не вдалося, оскільки всі рослини загинули (рис. 26 А, Б). Загалом, у клону верби ‘Житомирська-1’ виявлено більший вміст вільного проліну, як у контрольних, так і у експериментальних рослин.

Як свідчать отримані результати, навіть найменше застосоване в дослідженні засолення хлоридом натрію (25 мМ) призводить до значного збільшення вмісту вільного проліну у листках, і його вміст зростає із підвищенням концентрації хлориду натрію в середовищі. Крім того, встановлено, що вміст проліну за вищих концентрацій засолення (50 і 100 мМ) на 10-й день кількісно перевищував вміст у пізніший термін 20 днів.

Порівняння результатів експериментів довготривалої та короткотривалої дії стресових чинників, описаних в даному та попередніх розділах (водний дефіцит і засолення), свідчить, що зростання вмісту проліну під впливом стресу є відносно короткотерміною реакцією. Його концентрація значно зростала протягом перших 1-2 тижнів. У терміни, більш віддалені від початку дії стресового фактора, рівень проліну може поступово повертатися до контрольного.

### 3.6. Експресія деяких генів, що беруть участь у формуванні відповіді на стрес у рослин

На даному етапі було відпрацьовано методику оцінки впливу стресових факторів на експресію цільових генів, залучених до відповіді на дію водного дефіциту. Результати дослідження показали наявність трендів змін експресії генів аквапорину *AQUA1* та *DREB68*. Результати наших досліджень свідчать про те, що водний дефіцит має істотний вплив на активність генів рослин. Як і раніше в наших спостереженнях, показано біологічний ефект тривалої дії стресових факторів, що викликає збільшення розбіжностей між індивідуальними рослинами. Відповідно, дія стресу збільшує різноманітність прояву ознак за рахунок збільшення диференціації та діапазону активності генів. Це явище є корисним для створення нових клонів та сортів рослин, які матимуть більший потенціал для стійкості до стресових факторів. Причому подібні механізми проявляються за дії різних абіотичних стресорів, таких як посуха, засолення, підвищення температури повітря та ін.

Завданням даної роботи було відпрацювання методики визначення змін генів стресового впливу, в даній частині дослідження — водного дефіциту, та визначення експресії стрес-залежних генів *AQUA1* та *DREB68* методом кількісної ПЛР у листках верби та тополь. Ген *UBI* використовували як референтний [Volkov et al., 2003].

За даними (табл.8) аналізу відносної експресії виявлено, що у клону ‘Гулівер’ ген *AQUA1* мав тенденцію до підвищення активності, порівняно з контролем, за всіх режимів зволоження, тоді як ген *DREB68* має різку зміну тренду зі зниження експресії при 25% та 75% зволоження до різкого стрімкого підвищення за рівня зволоженості 50% від контролю (рис. 27).

**Тренди відносної експресії генів *AQUA1* і *DREB68* у клону ‘Гулівер’ за дії водного дефіциту**

Ген	Тип гену	Відносна експресія	SE	95% C.I.	P(H1)
Клон ‘Гулівер’ 25% поливу від контролю					
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>1,92</b>	1,076 - 3,866	0,491 - 4,512	0,124
<i>DREB68</i>	TRG	<b>0,73</b>	0,112 - 3,388	0,032 - 4,224	0,803
<i>UBI</i>	REF	1			
Клон ‘Гулівер’ 50% поливу					
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>4,447</b>	0,000 - 488,025	0,000 - 3 568,338	0,742
<i>DREB68</i>	TRG	<b>3,861</b>	0,185 - 215,065	0,013 - 457,185	0,422
<i>UBI</i>	REF	1			
Клон ‘Гулівер’ 75% поливу					
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>1,948</b>	0,520 - 9,280	0,302 - 42,911	0,419
<i>DREB68</i>	TRG	<b>0,216</b>	0,039 - 1,044	0,015 - 1,390	0,058
<i>UBI</i>	REF	1			

Примітки: TRG – цільовий ген; REF – референтний ген;



Рисунок 27. Тенденції зміни рівнів експресії цільових генів *AQUA1* та *DREB68* за дії водного дефіциту у тополі клону ‘Гулівер’. Прямая лінія зображує рівень експресії референтного гену “домашнього господарства” *UBI* \*, який приймається за одиницю.

Для клону тополі ‘Слава України’, навпаки, характерно зниження експресії за дії водного дефіциту, і тільки за 75% поливу активність гена *DREB68* підвищувалася. В даному дослідженні ми спостерігаємо відмінності у відповіді різних клонів на однакові стресові фактори, що означає наявність індивідуальних відмінностей за вказаними параметрами (табл. 9).

Таблиця 9.

**Тренди відносної експресії генів *AQUA1* і *DREB68* у клону ‘Слава України’ за дії водного дефіциту**

Ген	Тип гену	Відносна експресія	SE	95% C.I.	P(H1)
Клон ‘Слава України’ 25% поливу					
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>0,41</b>	0,049 - 3,549	0,039 - 7,233	0,373
<i>DREB68</i>	TRG	<b>0,222</b>	0,049 - 0,918	0,037 - 1,166	0,026
<i>UBI</i>	REF	1			
Клон ‘Слава України’ 50% поливу					
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>0,779</b>	0,025 - 27,223	0,012 - 33,886	0,812
<i>DREB68</i>	TRG	<b>0,594</b>	0,008 - 17,693	0,006 - 24,186	0,757
<i>UBI</i>	REF	1			
Клон ‘Слава України’ 75% поливу					
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>0,843</b>	0,356 - 2,007	0,326 - 2,155	0,566
<i>DREB68</i>	TRG	<b>1,653</b>	0,786 - 3,226	0,711 - 4,124	0,358
<i>UBI</i>	REF	1			

Примітки: TRG – цільовий ген; REF – референтний ген;

Тренди активності генів *AQUA1* та *DREB68*, задіяних у відповідь на зневоднення у клону тополі ‘Слава України’ представлені на рис. 28. Пряма лінія вказує на рівень експресії гену “домашнього господарства” *UBI*, який ми приймаємо за одиницю.

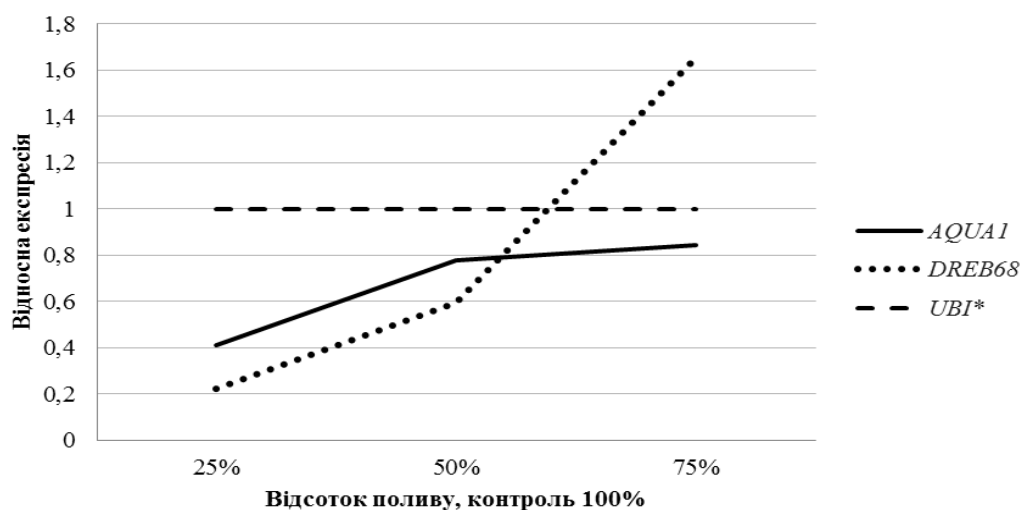


Рисунок 28. Тенденції зміни рівнів експресії цільових генів *AQUA1* та *DREB68* за дії водного дефіциту у тополі клону ‘Слава України’. Пряма лінія зображує рівень експресії референтного гену “домашнього господарства” *UBI\**, який приймається за одиницю.

В даному дослідженні також вивчали експресію цільових генів у листках верби клону ‘Печальна’, вирощених за тих же умов водного дефіциту. Результати аналізу цих даних були подібними до таких у клону тополі ‘Гулівер’, про що свідчить наявність піку підвищення активності генів на 50% поливу (рис. 29). Проте, порівняно з контролем, експресія обох досліджуваних генів *AQUA1* та *DREB68* має тенденцію до зниження за режимів 25% та 75% поливу та різку зміну тренду зі зменшення до підвищення за 50%. Результати досліджень наведені в табл. 10.

Таблиця 10.

**Тренди відносної експресії генів *AQUA1* і *DREB68* у клону ‘Печальна’ за дії водного дефіциту**

Ген	Тип гену	Відносна експресія	SE	95% C.I.	P(H1)
Клон верби ‘Печальна’ 25% поливу					
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>0,254</b>	0,026 - 1,885	0,007 - 7,180	0,16

<i>DREB68</i>	TRG	<b>0,407</b>	0,055 - 3,653	0,016 - 11,698	0,312
<i>UBI</i>	REF	1			
Клон верби 'Печальна' 50% поливу					
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>2,566</b>	0,459 - 23,301	0,065 - 37,572	0,379
<i>DREB68</i>	TRG	<b>1,961</b>	0,395 - 15,440	0,203 - 54,405	0,579
<i>UBI</i>	REF	1			
Клон верби 'Печальна' 75% поливу					
Ген	Тип гену	Відносна експресія	SE	95% C.I.	P(H1)
<i>AQUA1</i>	TRG	<b>0,355</b>	0,027 - 1,625	0,021 - 2,237	0,374
<i>DREB68</i>	TRG	<b>0,633</b>	0,158 - 6,635	0,120 - 12,193	0,693
<i>UBI</i>	REF	1			

Примітки: TRG – цільовий ген; REF – референтний ген;

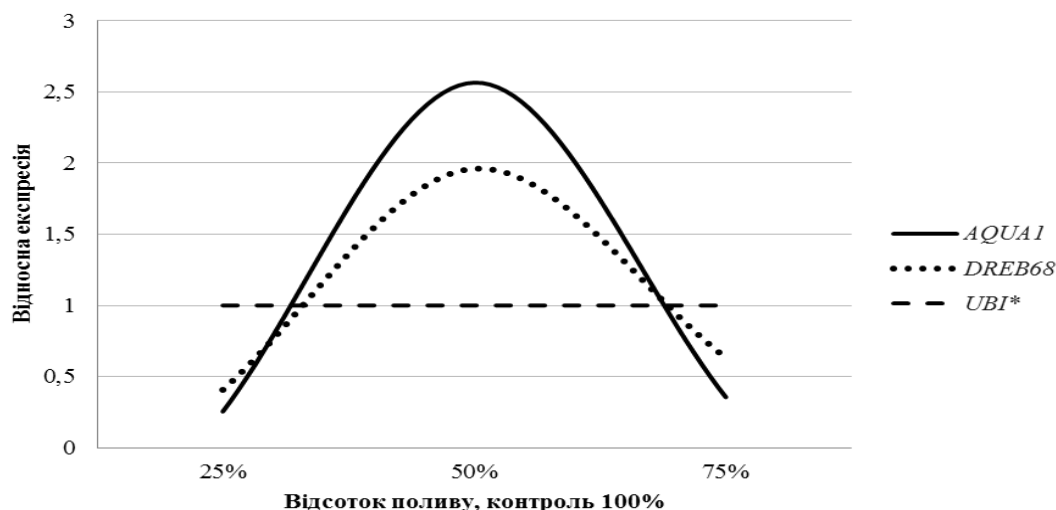


Рисунок 29. Тенденції зміни рівнів експресії цільових генів *AQUA1* та *DREB68* за дії водного дефіциту у тополі клону 'Печальна'. Прямая лінія зображує рівень експресії референтного гену "домашнього господарства" *UBI* \*, який приймається за одиницю.

Загалом, отримані результати показують неоднозначні зміни експресії даних генів за дії водного дефіциту, що свідчить про відмінності щодо відповіді на стрес у різних генотипів рослин.

### 3.7. Фізичні властивості пелет, виготовлених із біомаси швидкорослих дерев з додаванням розчину гліцерину

Отримані результати досліджень показали, що обробка водним розчином гліцерину підвищує якість пелет із деревини швидкорослих дерев (табл.11).

Таблиця 11.

#### Фізичні властивості пелет, виготовлених із деревини швидкорослих дерев із додаванням 5% розчину гліцерину

Варіанти дослідів	Середня довжина, $\pm$ SE, мм	Питома щільність, $\pm$ SE кг/м <sup>3</sup>	Насипна щільність, $\pm$ SE кг/м <sup>3</sup>	Теплотворна здатність, МДж/кг	Зольність, %
Деревина осики + вода (Контроль)	9,9 $\pm$ 0,8	1153 $\pm$ 2	615 $\pm$ 1	17,0 $\pm$ 0,4	2 $\pm$ 0,05
Деревина осики + гліцерин (5%)	17,1 $\pm$ 0,5**	1354 $\pm$ 2***	723 $\pm$ 1***	18,0 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 0,06
Деревина тополі клону 'Стрілоподібна' + вода	9,7 $\pm$ 0,6	1099 $\pm$ 53	599 $\pm$ 21	16,5 $\pm$ 0,4	2 $\pm$ 0,04
Деревина тополі клону 'Стрілоподібна' + гліцерин (5%)	17,4 $\pm$ 1,1***	1363 $\pm$ 14***	725 $\pm$ 15***	19,0 $\pm$ 0,2***	2 $\pm$ 0,04
Критерії згідно стандарту сертифікації ENplus [2022]	3,15–40,00	НВ	600–750	$\geq$ 16,5	$\leq$ 2

Примітки: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Відхилення статистично значимі порівняно із відповідними контролями, без додавання гліцерину. НВ – значення питомої щільності пелет у стандарті ENplus [2022] не визначено.

Згідно даних таблиці 11, найвищою якістю характеризувалися пелети екструдованої деревини клону тополі ‘Стрілоподібна’ (рис. 3), перед пелетуванням змочені 5 %-им водним розчином гліцерину. Їх теплотворна здатність, питома і насипна щільність були найвищими серед усіх інших видів пелет, і становили 19 МДж/кг, 1363 кг/м<sup>3</sup> та 725 кг/м<sup>3</sup>, відповідно. У пелет із деревини осики з додаванням 5%-го водного розчину гліцерину, теж спостерігали достовірне зростання усіх фізичних показників, де теплотворна здатність становила 18 МДж/кг, а питома і насипна щільність – 1354 кг/м<sup>3</sup> та 723 кг/м<sup>3</sup> в порівнянні із контролем, де дані показники становили 17 МДж/кг, 1153 кг/м<sup>3</sup> та 615 кг/м<sup>3</sup>, відповідно. Як видно з табл. 11, при додаванні 5% -го водного розчину гліцерину, вміст золи не відрізнявся від контролю, а це, в свою чергу, дозволить безпечно використовувати цю добавку при виробництві пелет, якість яких загалом відповідає загальноприйнятому стандарту сертифікації ENplus [2022].



Рисунок 30. Пелети, виготовлені з деревини тополі клону ‘Стрілоподібна’ з додаванням 5% розчину гліцерину.

Згідно вимог цього стандарту, наведених в таблиці 11, вивчені показники фізичних властивостей обох видів пелет, є високоенергетичними та з прийнятним



вмістом золи, на відміну від відходів сільськогосподарських культур [Хома та ін., 2018].

Світова потреба у пелетах із деревної біомаси є вкрай актуальною у багатьох країнах світу. Зокрема, в Європі, Китаї та США рід *Populus spp.* вважається чудовим джерелом для виробництва пелет із біомаси цих дерев [Pelosi et al., 2013; Civitarese et al., 2018]. Наприклад, в Італії дерева родини *Salicaceae* активно використовують для створення короткоротаційних плантацій, з деревини яких виробляють пелети для твердопаливних котлів [Picchio et al., 2012].

Отже, підсумовуючи отримані результати досліджень потрібно зауважити, що виробництво пелет із деревної біомаси швидкорослих дерев є перспективним альтернативним видом палива, а використання технічного гліцерину, для виробництва пелет може значно покращити їх характеристики. Враховуючи, що технічний гліцерин є побічним продуктом виробництва біодизельного палива, існує потреба в його утилізації [Ardi et al., 2015; Vignesh and Barik, 2019]. Тому, додавання його до деревини швидкорослих дерев при пелетуванні, дозволить отримати не тільки біопаливо високої якості, а також мати ще й екологічні переваги.

### **Висновки до розділу 3**

В результаті проведених досліджень було підібрано протокол непрямой регенерації для клонів тополь ‘Новоберлінська-3’ та ‘Волосистоплідна’, введено їх в культуру *in vitro*, а також підібрано оптимальний склад поживного середовища для подальшого вирощування. Проаналізовано вплив водного дефіциту на ряд ростових показників у 9 клонів швидкорослих дерев тополі та верби. Проведено фенологічні спостереження за розкриванням бруньок у швидкорослих дерев тополь і верб в умовах відкритого та закритого ґрунту, а також за дії водного

дефіциту. Досліджено вплив засолення хлоридом натрію в умовах культури *in vitro* на ростові параметри тополі клонів ‘Новоберлінська-7’, ‘INRA 353-38’ та верби клону ‘Житомирська-1’. Вивчено вплив довго- та короткотривалої дії водного дефіциту на вміст вільного проліну у клонів тополь ‘Слава України’, ‘Гулівер’, ‘Стрілоподібна’ та у верби клону ‘Печальна’. Проаналізовано вплив засолення хлоридом натрію в умовах культури *in vitro* на вміст вільного проліну в тополі ‘Новоберлінська-7’ та у верби ‘Житомирська-1’. Виявлено відмінності у змінах профілів експресії генів аквапорину *AQUA1* та *DREB68* за дії водного дефіциту в тополь клонів ‘Гулівер’, ‘Слава України’ та у верби ‘Печальна’. Виготовлено пелети із деревини швидкорослих дерев та проаналізовано їх фізичні властивості в залежності від додавання гліцерину.

Основні положення цього розділу представлені у публікаціях автора: [34],[159],[43],[64],[96],[163],[165],[19].

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Підсумовуючи отримані результати проведених досліджень щодо вивчення стійкості у швидкорослих дерев до абіотичних стресів, потрібно зауважити, що посуха та засолення негативно впливали на ріст і розвиток у всіх клонів тополь і верб. Проте, не зважаючи на це, деякі з них виявилися толерантними до цих видів стресів. Дослідивши 9 клонів тополь і верб можемо відзначити, що клони тополі ‘Слава України’, ‘Стрілоподібна’ та ‘Волосистоплідна’ є найбільш перспективними для вирощування в біоенергетичних плантаціях, які створюватимуть на непридатних для сільського господарства земель, що потерпають від посухи чи засолення.

Для отримання високої продуктивності біомаси на біоенергетичних плантаціях, важливо вибирати не лише клони з високим приростом біомаси, а також оцінити їх стійкість до дії абіотичних стресів. Зокрема, варто зазначити, що наприклад верба ‘Житомирська-1’ є високопродуктивним, перспективним клоном, придатним для вирощування в біоенергетичних плантаціях [Kutsokon et al., 2017]. Проте, як свідчать отримані результати дослідження, солестійкість та посухостійкість цього клону може бути невисокою, а це важливо і необхідно враховувати при плануванні насаджень, щоб уникнути непередбачуваних втрат біомаси, що може призвести до економічних збитків.

Отримані результати досліджень є вкрай актуальними, їх можна використовувати для оцінки потенціалу продуктивності клонів швидкорослих дерев перед закладенням енергетичних плантацій. Застосовані підходи дозволяють надавати швидко та ефективну оцінку щодо доцільності вирощування дерев за стресових умов на маргінальних територіях з метою отримання стабільної продуктивності біомаси для виробництва біопалива.

## ВИСНОВКИ

У дисертації обґрунтовано та розв'язано актуальне науково-практичне завдання: досліджено вплив абіотичних стресів, таких як посуха та засолення, на клони швидкорослих дерев тополь і верб. Виявлено зміни у ростових показниках, швидкості розкривання бруньок, вмісті вільного проліну та рівнях експресії генів залежно від дії стресових факторів. Підібрано оптимальний протокол регенерації та мікроклонального розмноження для низки клонів тополь. Розроблено методику виготовлення пелет за допомогою додавання водного розчину гліцерину до біомаси швидкорослих дерев для покращення їх якості.

На підставі результатів дослідження можна зробити такі висновки:

1) В культуру *in vitro* було введено два клони тополь: 'Новоберлінська-3' та 'Волосистоплідна'; а також підібрано оптимальний склад поживного середовища для їх подальшого вирощування. Підібрано протокол непрямой регенерації листків та черешків цих клонів. Вищу ефективність регенерації виявлено у тополі 'Новоберлінської-3' (відсоток регенерації – 92,3% з листкових і 90,0% – з черешкових експлантів) порівняно з тополею 'Волосистоплідною' (50,0% – як із листкових, так із черешкових експлантів). За кількістю пагонів на регенований експлант у тополі 'Новоберлінська-3' значно переважали листкові експланти, тоді як у тополі 'Волосистоплідна' значних відмінностей за типом експланту не спостерігали. Таким чином, регенерація пагонів тополі залежить не тільки від генотипу рослин, а також від типу тканин, що підлягають регенерації, і тому вимагає підбору оптимальних умов для кожного клону окремо.

2) Виявлено вплив водного дефіциту на ростові показники у 9 клонів швидкорослих дерев тополі та верби. Протягом обох років спостереження значимий пригнічуючий вплив дефіциту зволоження спостерігали за показниками висоти і діаметру пагона, довжини і ширини листків, а також їх кількості. Найбільш чутливими до посушливих умов –

25% зволоження від контролю, виявилися клони верби ‘Житомирська-1’ і ‘Печальна’ та клони тополі ‘Гулівер’ і ‘Новоберлінська-3’. Відсоток виживаності цих клонів становив всього 17%, тобто з шести рослин виживала тільки одна. Певну толерантність до дії водного дефіциту виявили у тополь ‘Канадська × Бальзамічна’ та ‘Стрілоподібна’, оскільки їх виживаність на 25%-му поливі від контролю на кінець другого вегетаційного сезону складала 50%. Тополі ‘Волосистоплідна’ і ‘Слава України’ проявили найбільшу стійкість до дії водного дефіциту, і їх виживаність на поливі 25% від контролю на кінець другого вегетаційного сезону досягала 67%.

3) Фенологічні спостереження за розкриванням бруньок у швидкорослих дерев тополь і верб в умовах відкритого та закритого ґрунту, а також за дії водного дефіциту показали, що на дослідній ділянці у верб розкривання бруньок відбувалося швидше ніж у тополь. Проте в умовах закритого ґрунту спостерігали протилежні результати, де розкривання бруньок швидше відбувалося у тополь. Зокрема, найшвидше розкривання бруньок як за нормальних умов, так і за дії водного дефіциту спостерігали у клонів тополь ‘Гулівер’ та ‘Новоберлінська-3’. Найбільше дефіцит води пригнічував розкривання бруньок, у клонів тополь ‘Волосистоплідна’, ‘Канадська × Бальзамічна’, і ‘Стрілоподібна’. Найменший вплив водного дефіциту на розкривання бруньок виявлено у клонів тополь ‘Гулівер’, ‘Слава України’ та ‘Новоберлінська-3’.

4) Чутливість до засолення поживного середовища хлоридом натрію в умовах культивування *in vitro* була вищою у верби клону ‘Житомирська-1’ порівняно з тополею клону ‘Новоберлінська-7’ та гібридною осикою *P. tremula* × *P. tremuloides* клону ‘INRA 353-38’. Засолення найменше впливало на ріст рослин гібридної осики, проте за відсутності засолення цей клон характеризувався найслабшим ростом. Натомість, найбільше пригнічення росту під дією засолення виявлено у

верби клону 'Житомирська-1', який за відсутності засолення показав найвищі ростові показники за висотою та коренеутворенням. Очевидно, клони з активнішим ростом є більш вибагливими до умов довкілля.

5) За довготривалого стресу водного дефіциту вміст вільного проліну у листках тополь клонів 'Гулівер' (першого- та другого років вегетації), 'Слава України' та верби клону 'Печальна' не залежав від інтенсивності дії стресу. Проте загальний вміст проліну достовірно відрізнявся у зразках листків різних клонів, а також у зразках тополі 'Гулівер' першого- та другого року вегетації. За дії короткочасного впливу водного дефіциту, на 10-й день відсутності поливу, у листках тополь клонів 'Гулівер', 'Стрілоподібна' та у верби 'Печальна' встановлено статистично достовірне збільшення вмісту вільного проліну. Верба 'Печальна' виявилася найчутливішим клоном до короткотермінового дефіциту зволоження. У цього клону спостерігали найвищий вміст вільного проліну, як за дії водного дефіциту, так і в контрольних рослин. У той же час, у тополі клону 'Гулівер' за 50% поливу вміст проліну в листках не відрізнявся від контролю протягом усього терміну досліду. А клон тополі 'Стрілоподібна' можна вважати найбільш стійким, оскільки вміст вільного проліну за 10 днів експерименту був найнижчим серед вивчених клонів, особливо враховуючи те, що на 5-ий день експерименту не спостерігали значних змін навіть при відсутності поливу. Загалом, як показали наші дослідження, зміни вмісту вільного проліну у досліджених клонів тополь та верб залежать від режиму водного дефіциту, тривалості дії стресового фактору, а також від генотипу.

6) За дії засолення поживного середовища хлоридом натрію найвищої концентрації 100 мМ в умовах *in vitro* у листках тополі 'Новоберлінська-7' та верби 'Житомирська-1' на 10-й день експерименту спостерігали найвищий вміст вільного проліну. Загалом, засолення хлоридом натрію навіть за найменшої концентрації (25 мМ) призводило до

збільшення вмісту вільного проліну у обох клонів швидкорослих дерев, і цей вміст зростає в залежності від збільшення засоленості середовища.

7) Встановлено відмінності у зміні профілів експресії генів аквапорину *AQUA1* та *DREB68* за дії водного дефіциту у тополь клонів 'Гулівер', 'Слава України' та верби 'Печальна'. За даними аналізу відносної експресії виявлено, що у клону 'Гулівер' ген *AQUA1* за всіх режимів зволоження мав тенденцію до підвищення активності. В той же час, ген *DREB68* виявляв різку зміну тренду зі зменшення при 25% та 75% зволоження до стрімкого підвищення за 50% зволоження порівняно з контролем. Схожа тенденція спостерігалася і у клону верби 'Печальна'. Для клону тополі 'Слава України' навпаки, характерно зниження експресії гена *DREB68* за дії посухи; і тільки за 75% поливу цей ген показав підвищену активність. В даному дослідженні ми спостерігали відмінність у відповіді різних клонів на однакові стресові фактори, що вказує на наявність відмінностей у відповіді на стрес у різних генотипів рослин.

8) На основі вперше розробленої методики для підвищення якості фізичних властивостей пелет за допомогою додавання водного розчину гліцерину, виготовлено пелети із деревини осики звичайної та тополі клону 'Стрілоподібна'. Дана методика ґрунтується на додаванні 5%-го водного розчину гліцерину до подрібненої фракції деревини перед пелетуванням. Результати дослідження показали значне збільшення теплотворної здатності, а також насипної та питомої щільності пелет, одержаних з обох видів деревини.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aylott M., Casella E., Tubby I., et al. (2008). Yield and spatial supply of bioenergy poplar and willow short-rotation coppice in the UK. *New Phytologist*, 178: 358-370.
2. Karp A., Shield I. (2008). Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist*, 179: 15-32. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02432.x
3. Curtis S., Gesler W., Smith G., et al. (2000). Approaches to sampling and case selection in qualitative research: examples in the geography of health. *Soc Sci Med*, 50(7-8):1001-14. doi: 10.1016/s0277-9536(99)00350-0.
4. Peng W., Li D., Zhang M., et al. (2017). Characteristics of antibacterial molecular activities in poplar wood extractives. *Saudi J Biol Sci*, 24(2): 399-404. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.10.026.
5. Han K-H., Meilan R., Ma C., et al. (2000). An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Rep*, 19: 315-320.
6. Tuskan GA., Difazio S., Jansson S., et al. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313: 1596-1604.
7. Rees V. (2008). Developing a national agroforestry and afforestation network for Canada. *Policy Options*, 29: 54-57.
8. Estravis-Barcala M., Mattera M., Soliani C., et al. (2019). Molecular bases of responses to abiotic stress in trees. *Journal of Experimental Botany*, 1-15.
9. Chen S., Polle A. (2010). Salinity tolerance of *Populus*. *Plant Biol*, 12: 317-33.
10. Hasegawa P., Bressan R., Zhu J., et al. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 51: 463-499.



11. Fischer U., Polle A. (2010). Populus responses to abiotic stress. *Genetics and genomics of Populus*. Springer, 3: 225-46.
12. Jansson S., Douglas C. (2007). Populus: a model system for plant biology. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 435-58.
13. IPCC (2019). Climate Change and Land: An IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse Gas Fluxes in Terrestrial Ecosystems. (accessed on 2 September 2020). Available online: <https://www.ipcc.ch/srccl>
14. Лось Л. Терлецький М. (2013). Перспективна альтернативна енергетика. *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету*, 1(1): 203-214.
15. Нова Енергетична стратегія України до 2035 року «Безпека, енергоефективність, конкурентоспроможність»: проект від 01.06.2017.: безпека, енергоефективність, конкурентоспроможність. URL: <http://mpe.kmu.gov.ua/minugol/control/uk/doccatalog/list?currDir=50358>. (дата звернення: 28.11.2019).
16. Постанова Кабінету Міністрів України «Про національний план дій з розвитку відновлюваної енергетики на період до 2030 року» (2022). [https://sae.gov.ua/sites/default/files/DraftNPDVE\\_2030\\_SAE\\_21\\_09\\_2022.p](https://sae.gov.ua/sites/default/files/DraftNPDVE_2030_SAE_21_09_2022.p)
17. Карамушка О. (2021). Мала гідроенергетика – основа подальшого соціально-економічного розвитку Західної України. *Гідроенергетика України*, 1(2): 13-16
18. Савенко Б. (2017). Еколого-економічна оцінка ефективності використання альтернативних джерел енергії. *Екологічна безпека*, 1: 136-142.
19. Хома Ю., Куцоконь Н., Рашидов Н., та ін. (2018). Вплив додавання розчину гліцерину на щільність пелет із соломи пшениці та деревини осики. *Наукові доповіді НУБіП України*, 5(75): 1-10.

20. Лутковська С., Зеленчук Н. (2021). Розвиток біоенергетики в Україні – енергетична та економічна безпека в умовах сталого розвитку. *Ефективна економіка*, 12: 1-7.
21. Худолєєва Л., Куцоконь Н., Рашидов Н. (2016). Кількісні та якісні оцінки викидів шкідливих речовин у довкіллі під час спалювання деревини порівняно з природним газом і вугіллям. *Біологічні Студії*, 10: 61-70.
22. Thrän D., Peetz D., Schaubach K. (2017). Global Wood Pellet Industry and Trade Study. *IEA Bioenergy*, 40: 11.
23. Mani S., Tabil L., Sokhansanj S. (2003). An overview of compaction of biomass grinds. *Powder Handling and Processing*, 15(3): 160-168.
24. ENplus (2022). Certified producers. Part 3: Pellet Quality Requirements дата звернення: 28.11.2023 Available at: <https://enplus-pellets.eu/wp-content/uploads/Documents/ENplus-ST-1001-ENplus-wood-pellets-Requirements-for-companies-5.pdf>
25. Сокольський О. Л. (2012). Пакувальне обладнання. *Методичні вказівки*, 46с.
26. Мирошник М., Засядько Я. (2011). Перспективи використання біомаси для отримання теплової енергії в Україні. *Збірник наукових праць*, 8: 78-82.
27. Verma V., Bram S., Delattin F. et al. (2012). Agro-pellets for domestic heating boilers: Standard laboratory and real life performance. *Applied Energy*, 90 (1)17-23.
28. Kuzovkina Y., Weih M., Romero A. (2008). Salix: botany and global horticulture. *Hortic Revs*, 34: 447-489.
29. Tuskan GA., Difazio S., Jansson S. et al. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313: 1596-1604.

30. Dai X., Hu Q., Cai Q. et al. (2014). The willow genome and divergent evolution from poplar after the common genome duplication. *Cell Res*, 24: 1274-1277. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.83>
31. Berlin S., Fogelqvist J., Lascoux M. et al. (2011). Polymorphism and divergence in two willow species, *Salix viminalis* L. and *Salix schwerinii* L. *Wolf. G3*, 1: 387-400.
32. Куцоконь Н. (2014). Тринадцять цікавих фактів про тополю. *Біологія і хімія в рідній школі*, 5: 45-47.
33. Giri C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C. (2004). Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18: 115-135.
34. Khoma Y., Khudolieieva L., Rashydov N., Kutsokon N. (2022). *In vitro* culture initiation and regeneration of two highly productive clones of poplar. *Nova Biotechnologica Et Chimica*, e1089: 1-8. <https://doi.org/10.36547/nbc.1089>
35. Shahzad A., Parveen S., Sharma S. et al. (2017). Plant tissue culture: Applications in plant improvement and conservation. In Abdin M, Kiran U, Kamaluddin AA (Eds.), *Plant biotechnology: principles and applications*, Springer, 37-72.
36. Abiri R., Atabaki N., Abdul-Hamid H., Sanusi R. et al. (2020). The prospect of physiological events associated with the micropropagation of *Eucalyptus* sp. *Forests*, 11: 1211.
37. Confalonieri M., Balestrazzi A., Bisoffi S., Carbonera D. (2003). *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. *J. Plant Biotechnol*, 72: 109-138.
38. Kutsokon N. (2011). Main trends in the genetic transformation of *Populus* species. *Cytol. Genet*, 45: 352-361.
39. Song C., Lu L., Guo Y., Xu H., Li R. (2019). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercial hybrid poplar *Populus alba* × *Populus glandulosa* Uyeki. *Int. J. Mol. Sci*, 20: 2594.

40. Musienko M., Panyuta O. (2005). Plant Biotechnology. Kyiv University Publishing and Printing Center, 114.
41. Ferreira S., Batista D., Serrazina S., Pais M. (2009). Morphogenesis induction and organogenic nodule differentiation in *Populus euphratica* Oliv. leaf explants. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult*, 96: 35-43.
42. Hill K., Schaller G. (2013). Enhancing plant regeneration in tissue culture. *Plant Signal. Behav*, 8: e25709.
43. Bidabadi S., Jain S. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants*, 9: 702.
44. Noël N., Leplé J-C., Pilate G. (2002). Optimization of *in vitro* micropropagation and regeneration for *Populus* × *interamericana* and *Populus* × *euramericana* hybrids (*P. deltoides*, *P. trichocarpa*, and *P. nigra*). *Plant Cell Rep*, 20: 1150-1155.
45. Thakur AK., Saraswat A., Srivastava D. (2012). *In vitro* plant regeneration through direct organogenesis in *Populus deltoides* clone G48 from petiole explants. *J. Plant Biochem. Biotechnol*, 21: 23-29.
46. Kutsokon N., Libantova J., Rudas V., Rashydov N. et al. (2013). Advancing protocols for poplar *in vitro* propagation, regeneration and selection of transformants. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci*, 2: 1447-1454.
47. Kwon A-R., Cui H-Y., Lee H., et al. (2015). Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. *Acta Physiol. Plant*, 37: 65.
48. Pokorná E., Buriánek V., Máchová P., Dostál J., Komárková M. (2017). New insight into the reproduction of grey poplar in *in vitro* conditions. *Zpravy Lesn. Vyzk*, 62: 279-287.
49. Хома Ю., Куцоконь Н. (2019). Фенологія розкривання бруньок у різних клонів тополь та верб. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*, 79: 86-94.

50. Голубкова І. М. (2016). Особливості росту та розвитку видів роду *Persica* Mill. в умовах правобережного лісостепу України. *Науковий вісник НЛТУ України*, 26 (3). 60-64.
51. Іщук Л. П. (2019). Родина Salicaceae Mirbel.: Біологія, адаптаційний потенціал, охорона та використання в Україні . *Національна академія наук України, Національний дендрологічний парк «Софіївка»*, С 159.
52. Chuine I. (2010). Why does phenology drive species distribution? *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 365: 3149-3160.5.
53. Dijkstra J., Westerman E., Harris L. (2011). The effects of climate change on species composition, succession and phenology: a case study. *Global Change Biology*, 17: 2360-2369.
54. Hänninen H., Kramer K. (2007). A Framework for modelling the annual cycle of trees in boreal and temperate regions. *Silva Fennica*, 41(1): 167-205.
55. Hannah L. (2015). Phenology. *Climate Change Biology* (Second Edition). 393p.
56. Rohde A., Bastien C., Boerjan W. (2011). Temperature signals contribute to the timing of photoperiodic growth cessation and bud set in poplar. *Tree Physiol*, 31(5):472-82.
57. Arora R., Rowland L., Tanino K. (2003). Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age. *HortScience*, 38(5): 911-921.
58. Schoot C. (2011). Dormancy cycling at the shoot apical meristem: transitioning between self-organization and self-arrest. *Plant Sci*, 180: 120-131.
59. Pletsers A., Caffarra A., Kelleher C., Donnelly A. (2015). Chilling temperature and photoperiod influence the timing of bud burst in juvenile *Betula*

*pubescens* Ehrh. and *Populus tremula* L. Trees. *Annals of Forest Science*, 72: 941-953.

60. Perry T. (1971). Dormancy of trees in winter. *Science*, 171: 29-36.

61. Polgar C., Primack R. (2011). Leaf-out phenology of temperate woody plants: from trees to ecosystems. *New Phytol*, 191: 926-941.

62. Sivadasan U., Randriamanana T., Julkunen-Tiitto R., Nybakken L. (2015). The vegetative buds of *Salix myrsinifolia* are responsive to elevated UV-B and temperature. *Plant Physiol. Biochem.*, 93: 66-73.

63. Sanz-Perez V., Castro-Diez P., Valladares F. (2009). Differential and interactive effects of temperature and photoperiod on budburst and carbon reserves in two co-occurring Mediterranean oaks. *Plant Biol*, 11: 142-151.

64. Хома Ю.А., Куцоконь Н.К. Шейкіна А., Володарський Є.В. (2019). Фенологія розкриття бруньок у різних клонів швидкорослих дерев тополі та верби за дії водного дефіциту. *Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів: Матеріали XIV конференції молодих вчених*. С. 105-107.

65. Lagercrantz U. (2009). At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants? *J Exp Bot*, 60: 2501-2515.

66. Keller S., Soolanayakanahally R., Guy R. et al. (2011). Climate driven local adaptation of ecophysiology and phenology in balsam poplar, *Populus balsamifera* L. (Salicaceae). *Am J Bot*, 98: 99-108.

67. Saure M. (1985). Dormancy release in deciduous fruit trees. *Horticultural Reviews*, 7: 239-300.

68. Way D. (2011). Tree phenology responses to warming: spring forward, fall back? *Tree Physiology*, 31: 469-471.

69. Rohde A., Bastien C., Boerjan W. (2011). Temperature signals contribute to the timing of photoperiodic growth cessation and bud set in poplar. *Tree Physiol.*, 31(5): 472-82.

70. Pellis A., Laureysens I., Ceulemans R. (2004). Genetic variation of the bud and leaf phenology of seventeen poplar clones in a short rotation coppice culture. *Plant Biology*, 6: 38-46.
71. Zalesny R., Hall R., Zalesny J. et al. (2009). Biomass and genotype × environment interactions of *Populus* energy crops in the Midwestern United States. *Bioenerg. Res.*, 2: 106.
72. Parmesan C., Yohe G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421: 37-42.
73. Cleland E. (2007). Shifting plant phenology in response to global change. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 357-365.
74. Shukla PR., Skea J., Calvo Buendia E., Masson-Delmotte V., et al. (2019). Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC): Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. 874p.
75. Spinoni J., Vogt J., Naumann G., Barbosa P., & Dosio A. (2018). Will drought events become more frequent and severe in Europe? *International Journal of Climatology*, 38: 1718-1736.
76. Bray E. (2007). Plant response to water deficit stress. Encyclopedia of life sciences. *John Wiley & Sons*. [https://doi: 10.1002/9780470015902.a0001298.pub2](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001298.pub2)
77. Ghelardini L., Berlin S., Weih M., Lagercrantz U., Gyllenstrand N. & Rönnerberg-Wästljung AC. (2014). Genetic architecture of spring and autumn phenology in *Salix*. *BMC Plant Biology*, 14: 31.
78. Orlandi F., Ruga L., & Fornaciari M. (2020). Willow phenological modelling at different altitudes in central Italy. *Environmental Monitoring and Assessment* 192: 737.

79. Ennajah A., Azri W., Sai Kachout S., et al. (2013) Drought effects on buds growth and dynamic of Tunisian cork oak populations. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4 (8): 1742-1752.
80. Chen L., Huang J-G., Alam SA., Zhai L., Dawson A., Stadt KJ., Comeau PG. (2017). Drought causes reduced growth of trembling aspen in western Canada. *Glob Chang Biol.* <https://doi.org/10.1111/gcb.13595>
81. Niinemets U., Cescatti A., Rodeghiero M., Tosens T. (2005). Leaf internal diffusion conductance limits photosynthesis more strongly in older leaves of Mediterranean evergreen broad-leaved species. *Plant Cell Environ* 28: 1552-1566.
82. Čehulić I., Sever K., Katičić Bogdan I., Jazbec A., Škvorc Ž., Bogdan S. (2019). Drought Impact on Leaf Phenology and Spring Frost Susceptibility in a *Quercus robur* L. Provenance Trial. *Forests.* <https://doi.org/10.3390/f10010050>
83. Sanz-Pérez V., Castro-Díez P. (2010). Summer water stress and shade alter bud size and budburst date in three Mediterranean *Quercus* species. *Trees-Structure and Function*, 24: 89–97.
84. IPCC (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 p.
85. Cavin, L., Mountford, E. P., Peterken, G. F., and Jump, A. S. (2013). Extreme drought alters competitive dominance within and between tree species in a mixed forest stand. *Funct. Ecol*, 27: 1424–1435. doi: 10.1111/1365-2435.12126
86. Kumar A., Rana K., Choudhary A., Bana R, Sharma V., et al. (2021). Energy budgeting and carbon footprints of zero-tilled pigeonpea-wheat



cropping system under sole or dual crop basis residue mulching and Zn-fertilization in a semi-arid agro-ecology. *Energy*, 231: 120862

87. Trenberth K., Dai A., Van der Schrier G., Jonest P., Barichivich J., Briffa K. (2014). Global warming and changes in drought. *Nat. Clim. Chang.*, 1: 17-22.

88. Мартин А., Осипчук С., Чумаченко О. (2015). Природно-сільськогосподарське районування України: монографія К.: ЦП "Компринт". 328 с.

89. FAO & IFAD. (2015). Status of the World's Soil Resources (SWSR). Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils .Rome, Italy. 648p.

90. Balyuk S., Medvedev V., Miroshnichenko V., et al. (2012). Ecological condition of soils of Ukraine. *Ukrainian Geographical Journal*, 38-42.

91. Tester M., Davenport R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann. Bot.*, 91: 503-527.

92. Urbańska S., Obrzut P., Ogiela E. (2016). Impact of salts from winter road maintenance on selected properties of roadside soils. *Infrastructure and ecology of rural areas*, 1521-1534.

93. Khudoleeva L., Kutsokon N. (2018). Comparison of salt resistance of representatives of the genera *Populus* and *Salix* *in vitro*. *Science Rise: Biological Science*, 2 (11): 35-38.

94. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., et al. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51:463-499.

95. Hussain Z., Rasheed F., Tanvir M.A., Zafar Z., et al. (2020). Increased antioxidative enzyme activity mediates the phytoaccumulation potential of Pb in four agroforestry tree species: A case study under municipal and industrial wastewater irrigation. *Int. J. Phytoremediation*, 1–11.

96. Хома Ю. А., Худолєєва Л. В., Куцоконь Н. К. (2020). Вплив сольового стресу на рослини тополі клону 'INRA 353-38' та верби клону 'Житомирська – 1' в умовах культури *in vitro*. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 4(83): 43-49. DOI:10.17721/1728\_2748.2020.83.43-49.
97. Oliveira N., Perez-Cruzado C., Canellas I., et al. (2020). Poplar short rotation coppice plantations under Mediterranean conditions: The case of Spain. *Forests*. 11, 1352. 2-43, doi: 10.3390/f11121352
98. Choat B., Timothy J.B., Craig R.B., et al. (2018). Triggers of tree mortality under drought. *Nature*, 558: 531–539.
99. Barcala M., Mattera M., Soliani C., et al. (2019). Molecular bases of responses to abiotic stress in trees. *Journal of Experimental Botany*, 1-15.
100. Guo X. Y., Zhang X. S., & Huang Z. Y. (2010). Drought tolerance in three hybrid poplar clones submitted to different watering regimes. *Journal of Plant Ecology*, 3(2), 79-87.
101. Cvikrová M., Gemperlová L., Martincová O., Vanková R. (2013). Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 73: 7-15.
102. Beck EH., Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattarai T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J Biosci*, 32: 501-510.
103. Rice K., Matzner S., Byer W., Brown J. (2004). Patterns of tree dieback in Queensland, Australia: the importance of drought stress and the role of resistance to cavitation. *Oecologia*, 139: 190-198.
104. Sabir M., Rasheed F., Zafar Z., Khan I., et al. (2020). A consistent CO<sub>2</sub> assimilation rate and an enhanced root development drives the tolerance mechanism in *Ziziphus jujuba* under soil water deficit. *Arid. Land Res. Manag.*, 34: 392-404.

105. Chaves M., Maroco J., Pereira J. (2003). Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol*, 30: 239-264.
106. Gu R., Fonseca S., Puskás L., et al. (2004). Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. *Tree Physiol.*, 24: 265-276.
107. Chen S., Polle A. (2010). Salinity tolerance of *Populus*. *Plant Biol.*, 12: 317-333.
108. Mittler R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11: 15-19.
109. Laxa M., Michael L., Wilena T., et al. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8: 94.
110. Centritto M., Brilli F., Fodale R., Loreto F. (2011). Different sensitivity of isoprene emission, respiration and photosynthesis to high growth temperature coupled with drought stress in black poplar (*Populus nigra*) saplings. *Tree Physiol.*, 31: 275-286
111. Yang J., Wang H., Zhao S., Liu X., et al. (2020). Overexpression levels of LbDREB6 differentially affect growth, drought, and disease tolerance in Poplar. *Front. Plant Sci.* 11:528550. doi: 10.3389/fpls.2020.528550
112. Chaves MM., Maroco JP., Pereira JS. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol*, 30: 239-264.
113. Wang YC., Qu GZ., Li HY., et al. (2010). Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*. *Mol Biol Rep*, 37: 1119-1124.
114. Bogeat-Triboulot M.B., Brosché M., Renaut J., et al. (2006). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar

growing in Arid Regions. *Plant Physiology*, 143(2): 876–892. doi:10.1104/pp.106.088708

115. Sami F., Yusuf M., Faizan M., Faraz A., & Hayat S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109: 54-61.

116. Nasrin S., Hossain M., Abdullah M., Alam R., et al. (2016). Salinity influence on survival, growth and nutrient distribution in different parts of *Millettia pinnata* seedlings. *Agriculture and Forestry*, 62(4):161 -173.

117. Sharma A., Shahzad B., Kumar V., Kohli S., et al. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7): 285-293. doi:10.3390/biom9070285

118. Shahbaz M., Mushtaq Z., Andaz F., & Masood A. (2013). Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Scientia Horticulturae*, 164: 507-511. doi:10.1016/j.scienta.2013.10.001

119. Parkash, V., & Singh, S. (2020). A review on potential plant-based water stress indicators for vegetable crops. *Sustainability*, 12(10), 3945-3954. doi:10.3390/su12103945

120. Liang X., Zhang L., Natarajan S. K., & Becker D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(9): 998–1011. doi:10.1089/ars.2012.5074

121. Díaz P., Monza J. & Márquez A. (2005). Drought and saline stress. In: Márquez A.J. (eds) *Lotus japonicus Handbook*. Springer, 39-50. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3735-X\\_3](https://doi.org/10.1007/1-4020-3735-X_3)

122. Szekely G., Abrahám E., Csépló A., et al. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal*, 53(1): 11-28.

123. Колупаев Ю., Карпец Ю. (2010). Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. *Основа*, 352 с.

124. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. (2006). Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. *Наука*, 143 с.
125. Ariani A., Barozzi A., Sebastiani L., Toppi L., et al. (2019). AQUA1 is a mercury sensitive poplar aquaporin regulated at transcriptional and post-translational levels by Zn stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135: 588-600.
126. Konzen E., Recchia G., Cassieri F., et al. (2019). DREB genes from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) show broad to specific abiotic stress responses and distinct levels of nucleotide diversity. *International Journal of Genomics*, 28 p. <https://doi.org/10.1155/2019/9520642>
127. Leng H., Jiang C., Song X. et al. (2021). Poplar aquaporin PIP1;1 promotes Arabidopsis growth and development. *BMC Plant Biol*, 21: 253.
128. Li J., Ban L., Wen H., Wang Z., et al. (2015). An aquaporin protein is associated with drought stress tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 459: 208-213. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.052
129. Li G., Santoni V., Maurel C. (2014). Plant aquaporins: roles in plant physiology. *Biochim. Biophys. Acta*, 1574-1582.
130. Moshelion M., Halperin F., Wallach R., Oren R., Way D.A. (2015). Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: Crop water-use efficiency, growth and yield. *Plant Cell Environ*, 38: 1785–1793. doi: 10.1111/pce.12410
131. Secchi F., Zwieniecki M.A. (2010). Patterns of PIP gene expression in *Populus trichocarpa* during recovery from xylem embolism suggest a major role for the PIP 1 aquaporin subfamily as moderators of refilling process. *Plant Cell Environ.*, 33: 1285-1297.
132. Berta M., Giovannelli A., Sebastiani F., Camussi A., and Racchi M.L. (2010). Transcriptome changes in the cambial region of poplar (*Populus*

*alba* L.) in response to water deficit. *Plant Biology*, 12: 341-354. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00320.x

133. Hamanishi E., Campbell M. (2011). Genome-wide responses to drought in forest trees. *Forestry*, 84: 273-283.

134. Wildhagen H., Paul S., Allwright M., Smith H. K., et al. (2018). Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*. *Tree Physiol.*, 38: 320-339.

135. Du X., Li W., Sheng L., Deng Y., et al. (2018). Over-expression of chrysanthemum CmDREB6 enhanced tolerance of chrysanthemum to heat stress. *BMC Plant Biol.*, 18: 178.

136. Huang X., Song X., Chen R., Zhang B., et al. (2020). Genome-wide analysis of the DREB subfamily in *Saccharum spontaneum* reveals their functional divergence during cold and drought stresses. *Front. Genet.*, 10: 1326.

137. Lata C., Prasad M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany.*, 62 (14): 4731-4748.

138. Goyal K., Walton L., Tunnacliffe A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stresses. *Biochem J.*, 388: 151-157.

139. Caruso A., Morabito D., Delmotte F., et al. (2002). Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiol Biochem.*, 40: 1033-1042.

140. Dietz K.J., Vogel M.O., Viehhauser A. (2010). AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma*, 245: 3-14.

141. Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et biophysica acta (BBA) – Gene regulatory mechanisms*, 1819 (2): 86–96.

142. Yang J., Wang H., Zhao S., et al. (2020). Overexpression levels of LbDREB6 differentially affect growth, drought, and disease tolerance in poplar. *Front. Plant Sci.*, 11: 528550.
143. Larchevêque M., Maurel M., Desrochers A., Larocque G. (2011). How does drought tolerance compare between two improved hybrids of balsam poplar and an unimproved native species? *Tree Physiology*, 31(3): 240–249.
144. Rasheed F., Condal A., Kudus K., et al. (2021). Effects of Soil Water Deficit on Three Tree Species of the Arid Environment: Variations in Growth, Physiology, and Antioxidant Enzyme Activities *Int. Sustainability*, 13: 3336.
145. McIvor L., Jones T. (2015). Novel poplars and willow adapted to climate change. Final report. *Plant and food research.*, 11980: 171.
146. Li J., Jia H., Han X., et al. (2016). Selection of reliable reference genes for gene expression analysis under abiotic stresses in the desert biomass willow, *Salix psammophila*. *Front Plant Sci.*, 7: 1505.
147. Huang J., Zhou Y., Yin L., Wenninger J., et al. (2015). Climatic controls on sap flow dynamics and used water sources of *Salix psammophila* in a semi-arid environment in Northwest China. *Environ Earth Sci.*, 73(1): 289-301.
148. Zhang J., Yuan H., Yang Q., et al. (2017). The genetic architecture of growth traits in *Salix matsudana* under salt stress. *Hortic Res.*, 4: 17024.
149. Ran X., Huang X., Wang X., et al. (2022). Ion absorption, distribution and salt tolerance threshold of three willow species under salt stress. *Front Plant Sci.*, 13: 969896. doi: 10.3389/fpls.2022.969896.
150. Патлай И.Н., Руденко В.Н. (1990). Сортоведение быстрорастущих древесных пород на Украине. *Лесоведение и агролесомелиорация*, 81: 3-7.
151. Провести испытание ранее полученных гибридов тополей и вывести новые, высокопродуктивные с хорошим качеством древесины культивары (сорты) тополей и ив для целей защитного лесоразведения в степной части УССР (1975). *Отчет НИИР по теме № 34 (том II)*,

руководитель Старова Н.В. Украинский НИИ лесного хозяйства и агролесомелиорации имени Г.Н.Высоцкого.

152. Торосова Л.О., Висоцька Н.Ю., Лось С.А., Орловська Т.В., Золотих І.В. (2015). Дослідження представників роду *Populus* за морфологічними ознаками. *Лісівництво і агролісомеліорація*, 126: 148-157.

153. Збереження генетичних ресурсів лісових порід і отримання генетично поліпшеного репродуктивного матеріалу для лісових насаджень та біоенергетичних плантацій (2013). *Звіт про НДР за темою № 7*, керівник Лось С.А. Український НДІ лісового господарства та агролісомеліорації.

154. Khudolieieva L., Kutsokon N., Nesterenko O., Rashydov N., Dugan O. (2017). *In vitro* establishing of poplar and willow clones perspective for renewable energetics. *Biological systems*, 9: 18-22.

155. Meilan R., Ma C. (2006). Poplar (*Populus* spp.). *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, 2: 143-151.

156. Li Q., Yeh TF., Yang C., et al. (2015). *Populus trichocarpa*. *Methods Mol. Biol.* 1224: 357-63.

157. Kutsokon N., Rakhmetov D., Khudolieieva L., Rakhmetova S., Fishchenko V. (2017). Growth characteristics and energy productivity of poplars and willows under short rotation planting for the first vegetation year. *Biological systems*, 9: 238-246.

158. Kutsokon N., Rakhmetov D., Rakhmetova S., Khudolieieva L., Rashydov N. (2022). Nursery screening of poplar and willow clones for biofuel application in Ukraine. *iForest* 15: 401-410. doi: 10.3832/ifor3732-015

159. Хома Ю., Куцоконь Н., Нестеренко О., Худолєєва Л., Шейкіна А., Рашидов Н.М. (2018). Вплив водного дефіциту на ростові параметри різних клонів тополь та верб. *Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»*, С. 90.

160. Старова Н. Селекция ивовых. *Лесн. пром-сть*, 1980. 208 с.



161. Weih M. (2009). Genetic and environmental variation in spring and autumn phenology of biomass willows (*Salix* spp.): effects on shoot growth and nitrogen economy. *Tree Physiol.*, 29(12): 1479-1490.
162. Хома Ю., Куцоконь Н. (2019). Фенологія розкривання бруньок у різних клонів тополь та верб. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія.* 79: 86-94.
163. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rashydov N. (2021). Influence of water deficit on proline content in Salicaceae trees. The 5<sup>th</sup> Symposium on EuroAsian Biodiversity. Kazakhstan-Turkey. 277 p.
164. Carillo P., Gibon Y. (2011). Protocol: Extraction and determination of proline Available from: <https://www.researchgate.net/publication/211353600>(accessed 11 January 2018).
165. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rashydov N. (2021). Proline content in the plants of poplar and willow at the water deficit. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(3): 519-522.
166. Лопатина А.Б. (2016). Метод исследования ДНК. *Международный научно-исследовательский журнал*, 6(48): 78-80.
167. Сверстюк А., Бігуняк Т., Перевізник Б.О. (2014). Огляд методів та моделей полімеразно-ланцюгової реакції. *Медична інформатика та інженерія*, 3: 97-100.
168. Волков Р., Панчук І., Борисюк Л., Борисюк М. (2003). рДНК рослин: організація, еволюція, застосування. *Цитология и генетика*, 37 (1): 72-78.
169. Сокольський О. (2012). «Пакувальне обладнання». *Методичні вказівки*, 4-6.

170. Хома Ю., Куцоконь Н., Рашидов Н., Павліський В., Нестеренко О. (2018). Вплив додавання розчину гліцерину на щільність пелет із соломи пшениці та деревини осики. *Наукові доповіді НУБіП України*, 5 (75): 1-10.
171. REST 2009. (2009). Software User Guide. Technical University Munich. QIAGEN GmbH.
172. Pfaffl M., Horgan G., Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research.*, 30: 9-36.
173. Pardhi Y., Dahayat A., Ganwir M., Mishra M. (2019). *In vitro* shoot regeneration of *Populus nigra*. *Int. J. Adv. Sci. Res. Manag.*, 5: 98-101.
174. Aggarwal G., Gaur A., Srivastava DK. (2015). Establishment of high frequency shoot regeneration system in Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall. ex Royle) from petiole explants using thidiazuron cytokinin as plant growth regulator. *J. Forestry Res.*, 26: 651-656.
175. Khathab S. (2011) Effect of different media growth regulators on the *in vitro* shoot proliferation of aspen, hybrid aspen and white poplar male tree the molecular analysis of variant in micropropagated plants. *Life Sci. J.*, 8: 177-184.
176. Cai Z., Jing X., Tian X., Jiang J., Liu F., Wang X. (2015). Direct and indirect *in vitro* plant regeneration and the effect of brassinolide on callus differentiation of *Populus euphratica* Oliv. *S. Afr. J. Bot.*, 97: 143-148.
177. Kwon A-R., Cui H-Y., Lee H., Shin H., Kang K-S., Park S-Y. (2015). Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. *Acta Physiol. Plant.*, 37: 65.
178. Tsvetkov I., Hausman J-F., Jouve L. (2007). Thidiazuron-induced regeneration in root segments of white poplar (*P. alba* L.). *Bulg. J. Agric. Sci.*, 13: 623-626.
179. Pavlichenko VV., Protopopova MV., Zolotovskaya ED., Bairamova EM., Konovalov AD., Voinikov VK. (2016). The different cytokines

influence on the berlin poplar (*Populus berolinensis* Dipp.) regeneration efficiency during its micropropagation. *Izvestiya Vuzov. Prikl. Khim Biotekhnol.*, 6: 164-168.

180. García-Angulo P., Villar I., Giner-Robles L., Centeno ML. (2018). *In vitro* regeneration of two *Populus hybrid* clones. The role of pectin domains in cell processes underlying shoot organogenesis induction. *Biol. Plant.* 62: 763-774.

181. Wang C., He J., Zhao Tian-Hong. , Cao Y. (2019). The Smaller the leaf is, the faster the leaf water loses in a temperate forest. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1-2. doi=10.3389/fpls.2019.00058

182. Brelsford C., Robson T. (2018). Blue light advances bud burst in branches of three deciduous tree species under short-day conditions. *Trees: Structure and Function.*, 32 (4): 1157-1164.

183. Ghelardini L., Berlin S., Weih M., Lagercrantz U., Gyllenstrand N., Rönnerberg-Wästljung A. (2014). Genetic architecture of spring and autumn phenology in *Salix*. *BMC Plant Biol*, 14: 31. doi:10.1186/1471-2229-14-31

184. Pellis A., Laureysens I., Ceulemans R. (2004). Genetic variation of the bud and leaf phenology of seventeen poplar clones in a short rotation coppice culture. *Plant Biology*, 6: 38-46.

185. Signorelli S., Dewi JR., Considine MJ. (2022). Soil water content directly affects bud burst rate in single-node cuttings of perennial plants. *Agronomy*, 12: 360.

186. Хома Ю., Худолєєва Л., Куцоконь Н. (2020). Вплив сольового стресу на рослини тополі клону ‘INRA 353-38’ та верби клону ‘Житомирська – 1’ в умовах культури *in vitro*. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. *Серія: Біологія*, 4(83): 43-49.

187. Shahbaz M., Mushtaq Z., Andaz F., & Masood A. (2013). Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and

photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Scientia Horticulturae*, 164: 507-51.

188. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rasydov N. (2021). Proline content in the plants of poplar and willow at the water deficit. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(3): 519-522. DOI:10.15421/022171

189. Pelosi C., Agresti G., Calienno L., et al. (2013). Application of spectroscopic techniques for the study of the surface changes in poplar wood and possible implications in conservation of wooden artefacts. In Proceedings of the SPIE—*The International Society for Optical Engineering*, 8790: 41.

190. Civitarese V., Faugno S., Picchio R., et al. (2018). Production of selected short-rotation wood crop species and quality of obtained biomass. *Eur. J. For. Res.*, 137: 541-552.

191. Picchio R., Spina R., Sirna A., et al. (2012). Characterization of woodchips for energy from forestry and agroforestry production. *Energies*, 5: 3803-3816.

192. Ardi M., Aroua M., Hashim N. (2015). Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: a review. *Renew. Sust. Energy Rev.* 42: 1164-1173. doi:10.1016/j.rser.2014.10.091.

193. Vignesh G., Barik D. (2019). Toxic waste from biodiesel production industries and its utilization. In: *Energy from Toxic Organic Waste for Heat and Power Generation*. Woodhead Publishing. 69-82. doi:10.1016/b978-0-08-102528-4.00006-7

## ДОДАТОК.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

#### в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Хома Ю. А., Куцоконь Н.К., Рашидов Н. М., Павліський В. М., Нестеренко О. В. (2018). Вплив додавання розчину гліцерину на щільність пелет із соломи пшениці та деревини осики. *Наукові доповіді НУБіП України*, 5 (75): 1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.31548/dopovidi2018.05.007>

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

2. Хома Ю. А., Куцоконь Н. К. (2019). Фенологія розкривання бруньок у різних клонів тополь та верб. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 79: 86-94. DOI: 10.17721/1728\_2748.2019.79.79-84

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

3. Хома Ю. А., Худолєєва Л. В., Куцоконь Н. К. (2020). Вплив сольового стресу на рослини тополі клону ‘INRA 353-38’ та верби клону ‘Житомирська – 1’ в умовах культури *in vitro*. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*, 4(83): 43-49. DOI:10.17721/1728\_2748.2020.83.43-49

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

4. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rashydov N. (2021). Proline content in the plants of poplar and willow at the water deficit. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(3): 519-522. DOI:10.15421/022171.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

5. Khoma Y., Khudolieieva L., Rasydov N., Kutsokon N. (2022). *In vitro* culture initiation and regeneration of two highly productive clones of poplar. *Nova Biotechnologica Et Chimica*, e1089: 1-8. DOI.org/10.36547/nbc.1089

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці статті до друку.

#### **які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

6. Худолєєва Л.В., Хома Ю.А., Куцоконь Н.К. (2018). Вплив сольового стресу на ростові параметри тополі та верби в культурі *in vitro*. *Міжнародна науково-практична конференція «Кліматичні зміни та сільське господарство. Виклики для аграрної освіти та науки»*, Київ, «Агроосвіта», С. 569 – 572.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

7. Khoma Y., Kutsokon N., Rasydov N. (2018). Peculiarities of producing pellets from wheat straw and aspen wood. *The 4-rd International Symposium On EuroAsian Biodiversity*, P. 387.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

8. Хома Ю., Куцоконь Н., Нестеренко О., Худолєєва Л., Шейкіна А., Рашидов Н.М. (2018). Вплив водного дефіциту на ростові параметри різних клонів тополь та верб. *Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології»*, С. 90.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

9. Хома Ю.А., Худолієва Л.В., Куцоконь Н.К., Шейкіна А., Володарський Є.В. (2019). Чутливість верби до сольового стресу в умовах культури *in vitro*. *Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів*: Матеріали XIV конференції молодих вчених. С. 107-108.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

10. Хома Ю.А., Куцоконь Н.К., Шейкіна А., Володарський Є.В. (2019). Фенологія розкриття бруньок у різних клонів швидкорослих дерев тополі та верби за дії водного дефіциту. *Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів*: Матеріали XIV конференції молодих вчених. С. 105-107.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

11. Хома Ю.А., Куцоконь Н.К., Рашидов Н.М., Нестеренко О.В., Рахметов Д.Б., Рахметова С.О., Фіщенко В.В. (2020). Порівняння фізичних властивостей пелет із біомаси швидкорослих дерев. *Відновлювана енергетика та енергоефективність у XXI столітті*: матеріали XXI міжнародної науково-практичної конференції. С. 567–571.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

12. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rashydov N. (2021). Influence of water deficit on proline content in Salicaceae trees. *The 5<sup>th</sup> Symposium on EuroAsian Biodiversity*. P. 277.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

13. Літвінов С.В., Хома Ю.А., Худолієва Л.В., Музя М.П. (2021). Співвідношення бета-структурних та альфа-спіральних доменів у протеомі як маркер чутливості рослин до абіотичного стресу та появи білків з пріоноподібними властивостями. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, Міністерство освіти і науки України, КПІ ім. Ігоря Сікорського, Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. с. 150.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

14. Litvinov S., Rashydov N., Kutsokon N., Rakhmetov D., Nesterenko O., Krivohizha M., Khudolieieva L., Khoma Y., Kozikova D. (2021). Screening markers of prion-like proteins formation in plants under environmental stress. *The 5<sup>th</sup> Symposium on EuroAsian Biodiversity*. P. 221.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

15. Khoma Y., Nesterenko O., Kutsokon N., Khudolieieva L., Shevchenko V., Rashydov N. (2021). Effect of salt stress on proline content in willow clone 'Zhytomyrska-1' in *in vitro* culture. *The 1<sup>st</sup> International Conference on Experimental Sciences and Biotechnology*. P. 64.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

16. Khoma Y.A., Kutsokon N.K., Rashydov N.M. (2021). Effect of water deficit on bud break in different clones of poplar and willow. *26th Session of The International*



*Commission on Poplars and Other Fast-Growing Trees Sustaining People and the Environment (IPC) “The role of Salicaceae and other fast-growing trees in economic recovery, sustainable wood supplies and climate change mitigation”.*

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

17. Rashydov N., Kutsokon N., Khoma Y., Kozikova D., Khudolieieva L., Kryvokhyzha M., Litvinov S., Rakhmetov D. (2022). Evaluation of prion-like proteins synthesis of the plant under influence stress factors. *6th edition of Global Congress on Plant Biology and Biotechnology*, 650p.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

18. Litvinov S., Khoma Y., Kutsokon N., Khudolieieva L., Kryvokhyzha M., Nesterenko O., Rashydov N. (2023). Drought stress increases the rate of beta sheets in poplar leaves. *Abstract book of FEBS Advanced Course 2023: Protein Folding, Aggregation and Compartmentalization*. P. 52.

*Особистий внесок:* здобувачка приймала участь у пошуку наукової літератури за темою публікації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та обробці отриманих результатів, написанні та підготовці тез до друку.

**які додатково відображають наукові результати дисертації:**

19. Спосіб підвищення якості пелет з біомаси. Патент № 135501 Україна. Хома Ю., Куцоконь Н., Рашидов Н., Павліський В., Нестеренко О. Зареєстровано 07.10.2019. Бюл. № 13, 2019. 2с.

*Особистий внесок:* здобувачка прийняла участь у патентному пошуку, проведенні випробувань, написанні та оформленні патенту.

20. Спосіб виготовлення пелет з біомаси однорічних пагонів павловнії. Патент № 144268 Україна. Хома Ю., Рахметов Д., Рахметова С., Фіщенко В., Нестеренко В., Куцоконь Н., Рашидов Н. Зареєстровано 25.09. 2020. Бюл. № 18, 2020. 2с.

*Особистий внесок:* здобувачка прийняла участь у патентному пошуку, проведенні випробувань, написанні та оформленні патенту.

ДОДАТОК. Патент № 135501 Україна. Спосіб підвищення якості пелет з біомаси.



**ДОДАТОК.** Патент № 144268 Україна. Спосіб виготовлення пелет з біомаси однорічних пагонів павловнії.

