

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ

КАФЕДРА ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

"На правах рукопису"

УДК 582.681.81:630.832

МАГІСТЕРСЬКА ДИСЕРТАЦІЯ

з спеціальності 8.05140101 – промислова біотехнологія
(код та назва спеціальності)

на тему: Інтродукція в культуру *in vitro* та мікроклональне розмноження клонів тополь

Студент групи БТ-31м Бульботка Катерина Сергіївна
(шифр групи) (прізвище, ім'я, по батькові)

Науковий керівник д.б.н., проф. кафедри пром. біотехнології, Дуган О.М.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

Консультанти: з експериментальної частини - к.б.н., с.н.с. Куцоконь Н.К.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

з охорони праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях - к.т.н., доц. Орленко А.Т.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

ВСТУП

Актуальність. Енергетика була і залишається важливою стратегічною передумовою розвитку економіки та основою забезпечення усіх видів життєдіяльності суспільства. Попит на енергоносії у світі зростає з кожним роком. Потреби України у вугіллі, нафті та природному газі задовольняються лише на рівні 47-48% за рахунок власного видобутку. Тому значну їх частину держава змушена імпортувати, що робить її залежною від цінової політики країн-постачальників [Худолеєва та ін. 2014].

Сучасна глобалізація економіки, загострення конкурентної боротьби за енергетичні ресурси на світовому ринку зумовили підвищену увагу з боку як світової спільноти, так і уряду країни до проблеми енергетичної безпеки. Питання енергозабезпечення, заощадження й ефективного використання усіх видів палива та енергії, пошуку і застосування нових джерел енергії та технологій набувають першочергового значення [Фризоренко 2013].

Згідно прийнятої в ЄС енергетичної стратегії, до 2050 року передбачається встановлення частки альтернативної енергетики в усьому енергоспоживанні на рівні не менше 70 %. Країни Європейського Союзу щорічно використовують 118 млн. т. умовного палива у вигляді біомаси [Худолеєва та ін. 2014].

Одним з методів вирішення цієї проблеми є широке впровадження до складу наших лісів швидкорослих і господарсько-цінних видів. Серед них одне з перших місць належить видам родів тополі (*Populus*) та верби (*Salix*), які відрізняються швидкістю росту і скоростиглістю. Вони можуть рости на землях непридатних для агрогосподарства, являються важливими культурами у захисному лісорозведенні, у тому числі на зрошуваних землях, оскільки, маючи активний ріст, швидко створюють захисний ефект. Все це надає видам роду *Populus* та *Salix* першочергового значення і вимагає більшої уваги до їх селекції, розведення та вирощування в нашій країні [Королева 2012, Худолеєва та ін 2014].

Дослідження особливостей культивування і підбір перспективних форм тополь проводяться в багатьох країнах світу на всіх континентах: в Італії, Франції, Угорщині, Чехії, Польщі та ін. [Kutsokon et al. 2015, Літвін 2011]. Найбільші площі енергетичних культур закладено в таких європейських країнах, як Норвегія, Данія, Німеччина, Австрія, Польща та Швеція, державна політика яких спрямована на енергетичну незалежність від країн-експортерів енергоносіїв [Кравчук 2013].

В Україні плантаційне лісовирощування поки що не набуло належного визнання, хоча спроби вирішити проблему дефіциту деревини створенням насаджень швидкорослих деревних порід мали місце неодноразово [Літвін 2011]. Наразі в Україні ще не впроваджено методів короткоротаційного лісівництва, не проведено оцінку сортів на їх придатність вирощування у короткоротаційних плантаціях і недостатньо опрацьовано методики, що дозволили б значно покращити генотипи вже існуючих клонів, зокрема методи генетичної інженерії та мікроклонального розмноження цінних генотипів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконувалась на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, проект №13 (2013-2017 рр.) «Створення генофонду високопродуктивних клонів тополь та швидкорослих плантацій біопаливного матеріалу» в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії».

Мета й завдання дослідження.

Метою даної роботи є інтродукція в культуру *in vitro* та мікроклональне розмноження рослинного матеріалу цінних клонів тополь та верб вітчизняної селекції, що в майбутньому зможуть бути використані для створення енергетичних плантацій.

Для досягнення поставленої мети в роботі було поставлено наступні **завдання**: опрацювати методику мікроклонального розмноження і підтримання рослин тополі і верби в культурі *in vitro*; провести аналіз контрольних рослин тополі з метою визначення гену домашнього господарства, що може надалі використовуватись як контроль для ПЛР-аналізу; порівняти теплоту згорання дослідних зразків тополь і верб різних клонів; інтродукувати перспективні клони

тополь та верб в культуру *in vitro*; проаналізувати умови праці на робочому місці в лабораторії сигнальних систем на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, надати рекомендації щодо усунення недоліків та скласти розділ з охорони праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях.

Об'єкт дослідження: високопродуктивні клони тополь і верб вітчизняної селекції.

Предмет дослідження: введення в культуру *in vitro* та мікроклональне розмноження клонів.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що вперше в Україні проведено порівняння теплоти згорання дослідних зразків тополь і верб різних клонів. Підібрано праймери до генів «домашнього господарства», які будуть використовуватися як контроль для ПЛР при визначенні генетично-трансформованих рослин.

Практичне значення одержаних результатів.

На базі проведених робіт, співробітниками Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ спільно із співробітниками Українського науково-дослідного інституту лісового господарства та агролісомеліорації, у Данилівському лісництві в Харківській області було закладено дослідну енергетичну плантацію тополь та верб вітчизняної селекції для дослідження продуктивності різних клонів. Із використанням результатів по визначенню енергії спалювання буде визначено клони з найкращим біоенергетичним потенціалом.

Апробація результатів дисертації: VIII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 200-й річниці з дня народження Т.Г. Шевченка (К.: НТУУ «КПІ», 2014) та IX Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 170-й річниці з дня народження І.І. Мечникова(К.: НТУУ «КПІ», 2015).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 2 тез доповідей та 1 стаття у науковому фаховому журналі.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Методи дослідження, які було використано для досягнення поставленої мети.

Задля нагромадження посадкового матеріалу, призначеного для створення майбутніх енергетичних плантацій в Україні використовувались методи введення в культуру *in vitro* цінних клонів тополь і верб вітчизняної селекції, мікроклональне розмноження рослин, підтримання в культурі *in vitro* клонів тополь, адаптація рослин з культури *in vitro* до ґрунтових умов.

Для визначення біоенергетичного потенціалу деревини швидкорослих клонів тополь і верб проводилося виділення ДНК з рослин та її ПЛР-аналіз з подальшою детекцією результатів за допомогою електрофорезу.

Результати та їх обговорення.

Опрацьовано методику мікроклонального розмноження та підтримання в культурі *in vitro* перспективних клонів тополь і верб для розробки методів вирощування енергетичних плантацій в Україні та оцінки продуктивності різних клонів тополь, перспективних для біопаливної галузі.

Проведено ПЛР-аналіз контрольних рослин тополі з метою визначення гена домашнього господарства – убіквітину. Підібрані праймери для даного гену можуть бути використані у подальших молекулярно-генетичних аналізах як контроль для наявності ПЛР-продуктів в геномах аналізованих рослин тополі.

Проведено аналіз теплоємності дослідних зразків тополь і верб різних клонів шляхом визначення біоенергетичного потенціалу деревини швидкорослих клонів тополь і верб. Виявлено, що теплота згорання дослідної деревини всередньому становить 18- 20 МДж, що є близьким до літературних даних. Отримані результати будуть використані для порівняння теплотворної здатності у різних клонів тополь з метою пошуку серед них найбільш енергоефективних.

Розроблено методи інтродукції цінних клонів тополь та верб вітчизняної селекції в культуру *in vitro*.

ВИСНОВКИ

1. Опрацьовано методику мікроклонального розмноження та підтримання в культурі *in vitro* перспективних клонів тополь і верб, що буде використовуватися при закладенні експериментальних швидкорослих плантацій тополь для розробки методів вирощування енергетичних плантацій в Україні та оцінки продуктивності різних клонів тополь, перспективних для біопаливної галузі. Проаналізовано літературні джерела та оцінено стан енергетичної ситуації в Україні та перспективи плантаційного вирощування тополь і верб.

2. Проведено ПЛР-аналіз контрольних рослин тополі з метою визначення гена домашнього господарства, що надалі може використовуватись як контроль для ПЛР. Встановлено, що у рослин тополі різних видів детектується фрагмент гена убіквітину (454 п.н.), а у рослини тютюну, що виступали негативним контролем, відповідний ПЛР продукт відсутній.

3. Проведено аналіз теплоємності дослідних зразків тополь і верб різних клонів. Виявлено, що теплота згорання дослідної деревини становила 18- 20 МДж. Такі показники є близькими до літературних даних. Найкращі результати показали клони тополі «Ноктюрн», «Роганська» та «Гулівер».

4. Розроблено методи інтродукції цінних клонів тополь та верб вітчизняної селекції в культуру *in vitro*.

5. Проаналізовано умови праці на робочому місці в лабораторії сигнальних систем на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, проведено атестацію робочого місця та надано рекомендації, щодо усунення недоліків.