АНАЛІЗ ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ ЩОДО ОДЕРЖАННЯ ВИСОКОЯКІСНОГО САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ РОСЛИН РОДИНИ *SALICACEAE* MIRB. *IN VITRO* ДЛЯ СТВОРЕННЯ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ПЛАНТАЦІЙ

О. Ю. ЧОРНОБРОВ, кандидат сільськогосподарських наук
<https://orcid.org/0000-0002-1330-8878>, e-mail: oksana_chornobrov@ukr.net
ВП НУБіП України «Боярська ЛДС»

В умовах різкого скорочення запасів традиційних видів палива актуальним є пошук нових ефективних і відновлювальних вуглецево-нейтральних джерел енергії. Одним із найперспективніших серед таких джерел є біомаса деревних рослин, зокрема родини Вербові (*Salicaceae* Mirb.). Традиційно рослини *Salicaceae* розмножують генеративним і вегетативним способами. Мікроклональне розмноження на противагу традиційним способам дає змогу одержувати упродовж року генетично однорідний оздоровлений садивний матеріал. Значну кількість біотехнологічних публікацій зосереджено на розробленні оптимальних протоколів розмноження рослин родини *Salicaceae*, дослідженні морфогенетичного потенціалу тканин та оптимізації їх росту. Разом з тим, автори зазначають про індивідуально зумовлену регенераційну здатність рослинного матеріалу в умовах *in vitro*, яка залежить від низки чинників. Мета дослідження – аналіз результатів біотехнологічних досліджень щодо одержання високоякісного садивного матеріалу рослин родини *Salicaceae* методом тканин *in vitro*. Для цього використовували результати біотехнологічних досліджень тканин рослин родини *Salicaceae* *in vitro* зарубіжних і вітчизняних авторів опублікованих у фахових виданнях упродовж 2010–2020 рр. Методи дослідження – аналіз, порівняння, синтез, узагальнення. У результаті проведеного аналізу з'ясовано, що режим стерилізації рослинного матеріалу *Salicaceae* залежить від типу експлантату, фенологічної фази й віку рослини-донора. Ефективно знешкоджує екзогенну біоту здерев'янілих експлантатів ступінчаста стерилізація з використанням хлориду ртуті, гіпохлориду натрію та нітрату срібла. Стадія активної вегетації – оптимальний період ізоляції експлантатів. Для одержання безвірусних рослин-регенерантів доцільно застосовувати апікальні меристеми, калюсної тканини – листові пластинки, активної регенерації – мікропагони. Стійка система регенерації, її тип, коефіцієнт мультиплікації рослин *Salicaceae* є генетично зумовленими. Для введення рослин в умови *in vitro*, активної проліферації, ризогенезу, масового мікроклонального розмноження доцільно використовувати живильні середовища за прописом WPM (McCown & Lloyd, 1981) та MS (Murashige & Skoog, 1962). Для регенерації рослин шляхом прямого морфогенезу й активації росту наявних меристем експлантату потрібно застосовувати середовище із цитокінінами (БАП (6-бензиламінопурин), кінетин, 2-іП (N-ізопентеніламінопурин), для ризогенезу – із ауксинами (НОК (α-нафтилоцтова кислота), ІМК (3-індолілмасляна кислота) та ІОК (β-індоліл-3-оцтова кислота). Подальші дослідження спрямовані на оптимізацію протоколів розмноження окремих генотипів рослин *Salicaceae* в умовах *in vitro*.

Ключові слова: Вербові, культура тканин рослин *in vitro*, експлантати, стерилізація, живильне середовище, регенераційна здатність, мікроклональне розмноження.

Актуальність. Для України надзвичайно гострою є проблема енергетичної безпеки – один із вирішальних чинників

її конкурентоспроможності на міжнародному рівні. В умовах різкого скорочення запасів традиційних видів палива акту-

альним є пошук нових ефективних і відновлювальних вуглецево-нейтральних джерел енергії (Energy strategy, 2013). Одним із найперспективніших серед таких джерел є біомаса деревних рослин, зокрема родини Вербові (*Salicaceae* Mirb.). Окрім створення біоенергетичних плантацій рослини *Salicaceae* використовують для озеленення населених пунктів, агролісомеліорації та фітореMediaції ґрунтів. Вони є джерелом деревини та лікарської сировини, чудові медоноси й кормові рослини, матеріал для селекційних і гібридизаційних робіт тощо. Традиційно рослини *Salicaceae* розмножують генеративним і вегетативним способами. Мікроклональне розмноження, на противагу вегетативному, дає змогу масово одержувати оздоровлені генетично однорідні рослини упродовж року з мінімальною кількістю донорного матеріалу. Рослини, одержані таким методом, більш продуктивніші порівняно із рослинами, вирощеними традиційним розмноженням (Smith, 2012). Окрім того, культура тканини рослин *in vitro* – вихідний матеріал для одержання рослин із необхідними параметрами якості з поліпшеними господарськи цінними ознаками і властивостями (стійкі до біотичних та абіотичних чинників, зокрема хвороб та шкідників, солестійкі) (Kalinin et al., 1980; Kataeva & Butenko, 1983).

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Доволі значна різноманітність і важлива господарська цінність рослин родини Вербові зумовили проведення низки наукових досліджень біотехнологічного спрямування вітчизняними та зарубіжними авторами. Дослідження зосереджені на вивченні морфогенетичного потенціалу рослин родини *Salicaceae*; розробленні технології мікроклонального розмноження; визначенні впливу компонентів живильного середовища, генетичних, фізичних та фізіологічних чинників на регенерацію рослин *in vitro*. Нині розроблено технології збереження

зародкової плазми *in vitro* (Chou & De-li, 2010) та створено генетично модифіковані рослини тополі берлінської шляхом внесення гену дегідрину *TaWCS120* із пшениці м'якої сорту Іркутська для збільшення морозо- і/або холодостійкості (Zolotovskaya et al., 2018).

Відібрано 10 найбільш інформативних поліморфних локусів (PMGC2060, PMGC2571, PMGS2679, WPMS12, WPMS14, WPMS20, PMGC433, PMGC2852, WPMS5, ORPM344) для ідентифікації і генотипування внутрішньовидових (гібриди тополі білої) і міжвидових (тополя сіріюча, тополя біла × гібрид (біла × осика), тополя дельтовидна × тополя бальзамічна) відмінностей; генетичної паспортизації індивідуальних генотипів і клонів. Здійснено мікросателітний і хромосомний аналіз; оцінено внутрішньоклонову генетичну однорідність і ідентичність клонів, розмножених *in vitro*, донорам. Отримано алотриплоїдні тополі ($2n=3x=57$) з використанням мікросателітних маркерів (Mashkina et al., 2016).

Нині розроблено й апробовано технології мікроклонального розмноження для окремих генотипів *Salicaceae*. Автори для введення в культуру *in vitro* рослин роду *Salix* L. використовують різні типи експлантатів, зокрема частини пагона, міжвузля, адвентивні пагони, листки тощо (Sant, 1980; Shuang-Xiu & Yuan-Gang 2006; Skálová et al., 2012).

Для поверхневої стерилізації експлантатів деревних рослин застосовують низку стерилізуючих речовин, зокрема хлорид ртуті, мертіолят, гіпохлорид натрію, хлорамін (Shabanova & Mashkina, 2015). Для збільшення відсотка ефективності стерилізації використовують двоступеневу стерилізацію (Kärkönen et al., 2011; Skálová et al., 2012; Shi, 2014).

Автори також вивчали регенераційну здатність рослинного матеріалу залежно від фенологічної фази рослини-донора (Shabanova & Mashkina, 2015).

Для культивування рослинного матеріалу деревних рослин *in vitro* використовують живильні середовища за прописом MS (Murashige & Skoog, 1962), WPM (McCown & Lloyd, 1981), DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) та Сміта і МакКоуна (Sant, 1980; Azarova et al., 2010; Sergeev et al., 2010; Khan et al., 2011; Kärkönen et al., 2011; Khattab, 2011; Skálová et al., 2012; Khan et al., 2011; Khan & Anis, 2012; Erst & Bakulin, 2012; Shi, 2014; Shabanova & Mashkina, 2015; Kakimzhanova et al., 2019).

Для стеблової регенерації експлантів *Salix* автори використовували регулятори росту цитокінінового типу дії у різних концентраціях і комбінаціях, зокрема БАП (6-бензиламінопурин), кінетик, 2-іП (N-ізопентеніламінопурин) (Sant, 1980; Azarova et al., 2010; Skálová et al., Khan et al., 2011; Kärkönen et al., 2011; Khattab, 2011; Khan & Anis, 2012).

Для посилення ростових процесів застосовують гіберелову кислоту (ГК); коренеутворення – живильне середовище із половинним складом мінеральних сполук та ауксинами (β-індоліл – 3-оцтова кислота (ІОК), індоліл-3-масляна кислота (НОК) (Kärkönen et al., 2011; Khan et al., 2011; Khan, Anis, 2012; Kakimzhanova et al., 2019). На регенераційну здатність експлантів деревних рослин в умовах *in vitro* діє низка чинників, що визначає необхідність ретельного підбору умов культивування для розроблення ефективного протоколу мікроклонального розмноження з урахуванням індивідуальних особливостей.

Мета дослідження – аналіз результатів біотехнологічних досліджень щодо одержання високоякісного садивного матеріалу рослин родини *Salicaceae* методом тканин *in vitro*. Дослідженнями передбачалося виконання таких завдань: 1) з'ясувати найбільш доцільний режим стерилізації рослинного матеріалу; 2) визначити оптимальні умови введення експлантів у культуру *in vitro*; 3) виокре-

мити чинники, які чинять значний вплив на мікроклональне розмноження рослин; 4) добрати оптимальні живильні середовища та умови культивування для реалізації морфогенетичного потенціалу рослин.

Матеріали і методи дослідження.

Використовували результати біотехнологічних досліджень тканин рослин родини *Salicaceae in vitro* зарубіжних і вітчизняних авторів, опублікованих у фахових виданнях упродовж 2010–2020 рр. У досліджуваних публікаціях автори застосовували біотехнологічні методи (культура тканин рослин *in vitro*, мікроклональне розмноження, калюсна культура). Для опрацювання даних автори використовували середнє арифметичне, стандартну помилку та дисперсійний аналіз. Для аналізу результатів досліджень окремих авторів було використано загальні методи теоретичного рівня (аналіз, порівняння, синтез, узагальнення).

Результати досліджень та їх обговорення. Режим стерилізації автори підбирали експериментально під кожний об'єкт із урахуванням індивідуальних особливостей рослинного матеріалу, типу експлантату, фенофази та віку рослини-донора. Для цього використовували широкий спектр стерилізуючих речовин із різними експозиціями оброблення експлантів. Стерилізація рослинного матеріалу полягала у попередній підготовці рослинного матеріалу у нестерильних умовах з наступним витриманням в умовах ламінарного боксу у стерилізуючих речовинах та промиванні у стерильній дистильованій воді. Найпоширеніші режими стерилізації рослинного матеріалу відображено у таблиці.

За результатами досліджень, найбільш доцільною є ступінчаста стерилізація кількома речовинами із використанням для нейтралізації екзогенної біоти хлориду ртуті, гіпохлориду натрію та нітрату срібла. Для експлантів, ізольо-

Режими стерилізації експлантатів рослин *Salicaceae in vitro*

Вид, культивар, сорт, гібрид	Експлантат	Режим стерилізації	Інше	Джерело
<i>Salix Matsudana</i> × <i>Alba</i> NZ-1002	частини пагонів (2–3 см)	70 % етанол – 30 с, 20 % «Janola» (3 % NaClO) – 15–20 хв	середовище для культивування MS	Sant S. Bhojwani, 1980
Алотриплоїдний гібрид Е.с. (Воронезький гігант), Болід (гібрид Тополя біла × Болле)	частини пагонів, ізольовані у зимовий період	попереднє оброблення у нестерильних умовах у 2 % «Domestos» (10 хв), витримування у суміші розчинів 0,025 % мертіюлята (10 хв) і 7 % «Білизни» (10 хв)	середовище для культивування ½ MS, ½ WPM; ефективність стерилізації 73,3 ± 3,3 %	Shabanova & Mashkina, 2015
	частини пагонів, ізольовані у літній період	попереднє оброблення у нестерильних умовах у 2 % «Domestos» (7 хв), витримування у суміші розчинів 0,025 % мертіюлята (10 хв) і 7 % «Білизни» (10 хв)	ефективність стерилізації 82,8 ± 3,6 %	
<i>Populus nigra</i> L. × <i>Populus balsamifera</i> L.	частини пагонів (10–15 мм), період опадання листків у донорів	70 етиловий спирт (60 с), 0,1 % HgCl ₂ (20 хв)	ефективність стерилізації 87,8 ± 2,0 %	Chornobrov et al., 2016
<i>Populus maximowiczii</i> Henry	пазушні бруньки	70 % етиловий спирт (1 хв), NaClO (2 % активний хлор) (10–18 хв)	середовище для культивування MS	Kärkönen et al., 2011
<i>Salix retusa</i> L., <i>Salix alpine</i> Scop.	частини пагонів (5–10 см), із 3–4 річних донорів, вересень місяць	70 етиловий спирт (30–60 с), 0,1 % HgCl ₂ (5–6 хв), 1,0 % AgNO ₃ (5–6 хв) та 2,5 % NaClO (5–6 хв)	ефективність стерилізації 85,0 ± 6,5 %	Chornobrov et al., 2019
<i>Salix viminalis</i> L.	частини пагонів (10–15 мм), стадія активної вегетації донорів	70 етиловий спирт (30 с), 0,1 % HgCl ₂ (10 хв)	ефективність стерилізації 86,7 ± 1,7 %	Chornobrov et al., 2016

ваних у зимовий період, тривалість витримування у стерилізуючій речовині потрібно збільшити, порівняно з експлантатами у літній період (таблиця).

На регенераційну здатність рослин *Salicaceae in vitro* значний вплив має фенологічна фаза рослини-донора. Травень–червень – оптимальний строк для ізоляції експлантатів тополі (Shabanova & Mashkina, 2015).

Для введення у культуру *in vitro* рослин досліджуваної родини використовують різні типи експлантатів. Зокрема, автори в роботі (Shuang-Xiu & Yuan-Gang, 2006) фіксували високу регенераційну здатність адвентивних бруньок *Populus spp.*, які починали відразу ж рости і розмножуватися на живильному середовищі. Для введення рослин гібриду *Salix matsudana* × *alba* доцільно викорис-

товувати фрагменти пагонів завдовжки 2–3 см (Sant, 1980). Зазначено, що для введення рослин *Salix tetrasperma* Roxb потрібно використовувати вузлові фрагменти (Khan & Anis, 2012).

Живильне середовище – основний фактор успішного культивування тканин рослин *in vitro*. Компоненти живильного середовища й умови культивування добирають індивідуально; вони, значною мірою, залежать від генотипу вихідної рослини. Найбільшої ефективності пагоноутворення у експлантатів тополі досягнуто за використання $\frac{1}{2}$ WPM. Інтенсивне пагоноутворення фіксували на середовищі WPM із додаванням $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП. Тривалість та інтенсивність проходження етапів мікроклонального розмноження рослин достовірно залежить від генотипу донора (Shabanova & Mashkina, 2015).

Зазначено, що для культивування вузлових фрагментів *S. tetrasperma* доцільно використовувати середовище WPM із $2,5 \text{ }\mu\text{М}$ ТДЗ або $1,0 \text{ }\mu\text{М}$ БАП і $0,5 \text{ }\mu\text{М}$ НОК (прямий морфогенез), для коренеутворення – $\frac{1}{2}$ MS / $\frac{1}{2}$ WPM із $0,5 \text{ }\mu\text{М}$ ІМК. Середовище WPM є більш достовірно ефективним, ніж MS (Khan & Anis, 2012).

Мікроклональне розмноження тополі сибірської сріблястої проводили шляхом активації росту пазушних меристем із використанням середовища MS та додаванням $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину і ІОК. Ефективним для укорінення мікропагонів було безгормональне $\frac{1}{2}$ MS (Erst & Bakulin, 2012).

Автори визначили умови значної регенерації основних пазушних пагонів тополі сріблястої і тополі Болле: живильне середовище WPM із додаванням $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП і $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ГК. Для достовірного збільшення кількості мікропагонів доцільно використовувати WPM із додаванням $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП і ГК. Для подальшого росту мікропагонів та їх

укорінення необхідно використовувати WPM із додаванням $0,01 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК (Kakimzhanova et al., 2019).

Для введення експлантатів *P. taximowiczii* потрібно використовувати середовище WPM з $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП; для мікропагоноутворення – MS із половиною концентрацією NH_4NO_3 та із додаванням $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП; для укорінення мікропагонів – середовище $\frac{1}{2}$ Сміта і МакКоуна з $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК (Kärkönen et al., 2011).

Розроблено ефективну технологію мікроклонального розмноження клону W52 (*P. tremula*), чоловічого дерева *P. alba* і клону Т89 гібриду осики (*P. tremula* $\times$ *P. tremuloides* Michx.) за використання прямого морфогенезу. Мікророзмноження експлантатів *P. tremula* і *P. tremula* $\times$ *P. tremuloides* індукували на WPM із $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}/0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП; *P. alba* – MS із $0,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП (Khattab, 2011).

На етапі введення в культуру *in vitro* експлантати цінних видів і гібридів *Salix* культивували на MS або WPM із $0,2$ – $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП. Використання $0,5$ – $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ГК та $0,5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ глутаміну достовірно посилювало регенерацію експлантатів та зменшило довжину міжвузлів (Azarova et al., 2010).

Для мікроклонального розмноження рослин *S. tetrasperma* та укорінення мікропагонів *in vitro* доцільно їх культивувати на WPM із $5,0 \text{ }\mu\text{М}$ БАП та $\frac{1}{2}$ WPM із $0,5 \text{ }\mu\text{М}$ ІМК (Khan et al., 2011).

На інтенсивність калусоутворення експлантатів, окрім регуляторів росту, сильно впливає мінеральний склад середовища. Дослідження Сергеева показали, що культивування експлантатів на середовищах із $2,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК, ІМК та ІОК, а також у контролі (без ауксинів) не індукувало утворення калусної тканини, натомість на середовищі з 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота) інтенсивне калусоутворення починалося з

Рис. 1. Одержання рослин *Salix* (е) із фрагментів пагона (а) і листових пластинок (б) шляхом прямого (з, д) і непрямого (в) морфогенезу *in vitro*

другого тижня культивування. На 21 добу культивування індекс росту калюсної тканини на середовищі з 2,4-Д склав 384,1. На середовищі MS спостерігалося відмирання калюсної тканини у 20–25 % експлантатів (Sergeev et al., 2010).

Автори підібрали оптимальний склад живильних середовищ для мікроклонального розмноження, укорінення та одержання рослин-регенерантів *S. alba* (МС з 0,25 мг·л⁻¹ кінетину), *S. fragilis* (МС безгормональне), *S. babylonica* й *S. matsudana* 'Tortuosa' (МС з 0,25 мг·л⁻¹ кінетину й 2 г·л⁻¹ активованого вугілля) за використання активації росту наявних меристем експлантатів (Chornobrov, 2016). Одержано мікропагони рослин за використання прямого й непрямого морфогенезу рослин. Кількість мікропагонів, одержаних із калюсу стеблових походження, є достовірно більшою порівняно із листовим. Установлено, що рослини *in vitro* *S. alba* й *S. fragilis* потрібно мікроклонально роз-

множувати шляхом мікроживцювання стеблової культури (коефіцієнт розмноження – $10,0 \pm 1,0$ й $8,0 \pm 1,0$ відповідно), *S. babylonica* – непрямым морфогенезом (коефіцієнт розмноження – $5,0 \pm 1,0$), а *S. matsudana* 'Tortuosa' – прямим морфогенезом (коефіцієнт розмноження – $6,0 \pm 1,0$) (рис. 1) (Chornobrov, 2016).

На етапі введення в культуру *in vitro* експлантати *S. retusa* і *S. alpina* характеризувалися значною регенераційною здатністю (що становила, відповідно, $93,3 \pm 3,3$ % і $83,3 \pm 8,8$ %) на базовому безгормональному живильному середовищі MS (Chornobrov et al., 2019).

Одержані за використання технологій *in vitro* різними типами індукованого морфогенезу, рослини-регенеранти *S. viminalis* використовують у біоенергетиці (рис. 2).

Отже, результати біотехнологічних досліджень свідчать про доцільність застосування біотехнологій *in vitro* для одержання високоякісного садивного матеріалу рослин родини *Salicaceae*.

Рис. 2. Схема масового розмноження рослин *S. viminalis* *in vitro*, їх адаптація до умов *in vivo*, створення біоенергетичних плантацій та одержання біопалива (за матеріалами Chornobrov, 2016)

Висновки і перспективи. Проаналізовано результати біотехнологічних досліджень зарубіжних і вітчизняних авторів, опублікованих у фахових виданнях упродовж 2010–2020 рр., щодо можливості одержання високоякісного садивного матеріалу рослин родини *Salicaceae* *in vitro*. При розробленні протоколу *in vitro* для окремих генотипів *Salicaceae* необхідно урахувати таке: 1) режим стерилізації рослинного матеріалу родини *Salicaceae* залежить від багатьох чинників (типу експлантату, фенофази, віку рослини-донора); 2) найбільш доцільно використовувати ступінчасту стерилізацію кількома речовинами; 3) за результатами досліджень, ефективно знешкоджують екзогенну біоту здерев'янілих експлантатів хлорид ртуті, гіпохлорид натрію та нітрат срібла; 4) на мікроклональне розмноження рослин окрім фізіологічних, гормональних та фізичних чинників значний вплив має генотип; 5) умови введення рослинного матеріалу

in vitro, фенологічну фазу й вік донорів, типи експлантів, компоненти живильного середовища, регулятори росту, умови культивування та тип регенерації добирають індивідуально для кожного генотипу; 6) для одержання калюсних тканин доцільно застосовувати листкові пластинки, а для активної регенерації – мікропагони; 7) значення коефіцієнта мультиплікації, як і найбільш ефективний тип регенерації, залежить від генотипу і для кожного сорту, культивару, виду є індивідуальним; 8) для введення в умови *in vitro*, активної проліферації, ризогенезу, масового мікроклонального розмноження потрібно використовувати живильні середовища за прописом WPM та MS; 9) для більшості генотипів живильне середовище із додаванням цитокинінів викликає регенерацію рослин шляхом активації росту наявних меристем експлантату та прямим морфогенезом, а наявність ауксинів стимулює ризогенез.

Список літератури

- Azarova, A. B., Shadrina, T. E., & Mashkina, O. S. (2010). Highly efficient technology of clonal micropropagation of species and hybrids of the genus *Salix*. In *Materials of the international. scientific-practical conf. Forest science of the XXI century*. Gomel, November 17–19 (pp. 120–121) [in Russian].
- Chornobrov, O. Yu. (2016). Biotechnological aspects of microclonal propagation of plants of the genus *Salix* L. *Scientific Bulletin of NLTU of Ukraine*, 26, 7, 171–178 [in Ukrainian].
- Chornobrov, O. Yu., Bilous, S. Yu., & Kruhliak, Yu. M. (2016). *Biotechnology of reproduction and cultivation of plants of the family Salicaceae Mirbel for the creation of energy plantations*. Kyiv: Printeko [in Ukrainian].
- Chornobrov, O., Bilous, S., Chornobrov, O., & Manko, M. (2019). Peculiarities of Morphogenesis of the Endangered Species of Willow (*Salix* spp.) *in vitro*. *Biologija (Lietuvos mokslu akademija)*, 65 (1), 48–55. <https://doi.org/10.6001/biologija.v65i1.3986>
- Chou, Y. L., De-ii, Wang. (2010). Study on the Germplasm Conservation *in vitro* of *Salix Polyadenia* var. *Tschangbaischanica*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 38 (34), 19266–19267. Available at http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-AHNY201034010.htm.
- Energy strategy of Ukraine for the period up to 2030*. (2013). Available at <https://de.com.ua/uploads/0/1703-EnergyStrategy2030.pdf>.
- Erst, A. A., & Bakulin, V. T. (2012). Clonal micropropagation of Siberian silver poplar. *Turczaninowia*, 15 (1), 58–62 [in Russian].
- Kakimzhanova, A. A., Zhagipar, F. S., Naziran, F., Karimova, V. K., & Nurtaza, A. S. (2019). Optimization of Microclonal Propagation Conditions for Increasing the Multiplication Factor of Poplar Microshoots. *Bulletin of L.N. Gumilyov Eurasian National University. Bioscience Series*, 1 (126), 57–65. <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2019-126-1-57-65>
- Kalinin, F. L., Sarnatskaya, V. V., & Polishchuk, V. E. (1980). *Methods of Tissue Culture in Plant Physiology and Biochemistry*. Kyiv: Naukova dumka [in Ukrainian].
- Kärkönen, A., Santanen, A., & Iwamoto, K. (2011). Plant Tissue Culture. *Methods in Molecular Biology*, 715, 1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-008-9_1
- Kataeva, N. V., & Butenko, R. H. (1983). *Clonal Micropropagation of Plants*. Moscow: Science [in Russian].
- Khan, I., Md., Ahmad, N., & Anis, M. (2011). The Role of Cytokinins on *in vitro* Shoot Production in *Salix Tetrasperma* Roxb.: a Tree of Ecological. *Tree – structure and function*, 25 (4), 577–584. <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0534-6>
- Khan, I., Md., & Anis, M. (2012). Modulation of *in vitro* Morphogenesis in Nodal Segments of *Salix Tetrasperma* Roxb. Through the Use of TDZ, Different Media Types and Culture Regimes. *Agroforestry systems*, 86 (1), 95–103. <https://doi.org/10.1007/s10457-012-9512-x>
- Khan, M. I., Naseem, A., & Anis, M. (2011). The Role of Cytokinins on *in vitro* Shoot Production in *Salix Tetrasperma* Roxb.: a Tree of Ecological Importance. *Tree – Structure and Function*, 25 (4), 577–584. <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0534-6>
- Khattab, S. (2011). Effect of Different Media and Grown Regulators on the *in vitro* Shoot Proliferation of Aspen, Hybrid Aspen and White Poplar Male Tree and Molecular Analysis of Variants in Micropropagated Plants. *Life science journal*, 8 (1), 177–184.
- Mashkina, O. S., Fedulova, T. P., Tabatskaya, T. M., Kondratyeva, A. M., & Shabanova, E. A. (2016). Molecular genetic and cytogenetic assessment of promising hybrids and clones of poplar and aspen propagated *in vitro*. *VSU Bulletin, series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2, 60–69 [in Russian].
- Sant, S. B. (1980). Micropropagation Method for a Hybrid Willow (*Salix Matsudana* x *Alba* NZ-1002). *Nell' Zealand Journal of Botany*, 18, 209–214.
- Sergeev, R. V., Shurgin, A. I., & Shevelova, N. N. (2010). Development of a protocol for *in vitro* propagation of Norway willow (*Salix acutifolia* Willd.) for plantation cultivation. *Biotechnology as a tool for the conservation of plant biodiversity*, 304–308 [in Russian].
- Shabanova, E. A., & Mashkina, O. S. (2015). Clonal micropropagation of economically valuable forms of poplar. *Forest selection and genetics*, 4, 74–81 [in Russian].
- Shi, D. (2014). Effects of Culture Media and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Willow (*Salix matsudana* 'Golden Spiral') and Hazelnut (*Corylus colurna* 'Te Terra Red'). *Theses, Dissertation, and Student Research in Agronomy and Horticulture*, 79.
- Shuang-Xiu, W., & Yuan-Gang, Z. (2006). *In vitro* Regeneration of *Populus Langfangensis* 3 for Transformation and Micropropagation. *Bulletin of Botanical Research*, 26 (2), 201–205.
- Skálová, D., Navrátilová, B., Richterová, L., Knittl, M., Sochor, M., & Vašut, R. J. (2012). Biotechnological Methods of *in vitro* Propagation

- gation in Willows (*Salix* spp.). *Central European Journal of Biology*, 7 (5), 931–940. <https://doi.org/10.31255/978-5-94797-319-8-1244-1247>
- Smith, R. H. (2012). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. Academic Press.
- Zolotovskaya, E. D., Protopopova, M. V., Kononov, A. D., & Pavlichenko, V. V. (2018). Genetic transformation of *Populus berolinensis* by wcs120 dehydrin gene from soft wheat. In *The All-Russian Scientific Conference with International Participation and Schools of Young Scientists. Mechanisms of resistance of plants and microorganisms to unfavorable environmental* (pp. 1244–1247). Irkutsk [in Russian].

Chornobrov, O. Yu. (2020). Analysis of application of biotechnologies to obtain high quality planting material of plants of the Salicaceae Mirb. family in vitro for creation of bioenergy plantations. *Ukrainian Journal of Forest and Wood Science*, 11 (4), 60–68. <https://doi.org/10.31548/forest2020.04.006>

In conditions of a sharp reduction in the stocks of traditional fuels, it is important to find new efficient and renewable carbon-neutral energy sources. One of the most promising sources of renewable energy is the biomass of woody plants, in particular the family Willow (Salicaceae Mirb.). Traditionally, Salicaceae plants are propagated by generative and vegetative methods. Microclonal propagation, in contrast to traditional methods of reproduction, allows to obtain genetically homogeneous healthy planting material throughout the year. A significant number of biotechnological publications focus on the development of the optimal protocol for the reproduction of plants of the family Salicaceae, the study of the morphogenetic potential of tissues and optimizing their growth. However, the authors note the individually determined regenerative ability of plant material in vitro, which depends on a number of factors. The purpose of the study is to analyze the results of biotechnological research on the effectiveness (possibility) of obtaining high-quality planting material of plants of the family Salicaceae by tissue in vitro. For this purpose, we used the results of biotechnological studies of plant tissues of the family Salicaceae in vitro by foreign and domestic authors published in professional journals during 2010–2020. Research methods – analysis, comparison, synthesis, generalization. The analysis revealed that the sterilization regime of Salicaceae plant material depends on the type of explant, phenological phase and age of the donor plant. Step-by-step sterilization using mercury chloride, sodium hypochlorite and silver nitrate effectively neutralizes the exogenous biota of woody explants. The stage of active vegetation is the optimal period of isolation of explants. To obtain virus-free regenerating plants, it is advisable to use apical meristems, callus tissue – leaf blades, active regeneration – microshoots. Stable regeneration system, its type, multiplication factor of Salicaceae plants are genetically determined. For the introduction of plants in vitro, active proliferation, rooting, microclonal propagation, it is advisable to use nutrient media according to WPM (McCown & Lloyd, 1981) and MS (Murashige & Skoog, 1962). For regeneration of plants by direct morphogenesis and activation of growth of existing meristems of an explant to apply the environment with cytokinins (BAP (6-benzylaminopurine), kinetin or 2-isopentenyladenine (2-ip), for rooting – with auxins NAA (α -naphthylacetic), IBA (3-indolylbutyric acid) and IAA (β -indolyl-3-acetic acid). Further research is aimed at optimizing the propagation protocols of Salicaceae plants in vitro.

Keywords: willow, plant tissue culture in vitro, explants, sterilization, culture medium, regenerative ability, microclonal propagation.

Отримано: 2020-11-01