

УДК 581.165.7:633.791

ОСОБЛИВОСТІ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ХМЕЛЮ (*HUMULUS LUPULUS L.*) НА БЕЗВІРУСНІЙ ОСНОВІ

А. А. Клюваденко, М. Д. Мельничук

Ability Of Micropagation Of Hops (Humulus Lupulus L.) On Anvirus Basis. — A. Klyuvaldenko, M. Melnichuk. — The morphology ability of the different genotypes of hops in vitro have been investigated and the effectively of using of thermography with combination on cultivation apical meristeme for termination of plants from virus. The effecton methodic of obtaining of remediate planting materials had been developed. This methodic could be proposed for widely using during hope reproduction.

Address: National agricultural university of Ukraine, 15 Geroiv Oborony Str., Kyiv – 41. 03041 Ukraine, e-mail vir-lab@nauu.kiev.ua

Вступ

Для Полісся хміль є однією з основних і традиційних технічних культур. В 80-х роках за площею насаджень 9,4 тисяч га і валовим збором шишок біля 8 тисяч тон Україна вийшла на п'яте місце в світі після США, Німеччини, Китаю і Чехословаччини. Занепад галузі хмелярства на початку 90-х років привів майже до повного знищення промислових насаджень хмелю. Так, в 1998 році об'єми виробництва хмелю знизились до 438 тон, площа насаджень скоротилась у шість разів і складала біля 1,5 тисяч га.

В останні роки нарощування темпів виробництва пивоварної, фармацевтичної, парфумерної галузей та стимулювання виробників хмелю з боку держави, призвело до різкого збільшення процесів закладання нових хмільників та реанімації старих. В зв'язку з цим виникла необхідність забезпечення господарств великою кількістю високоякісного посадкового матеріалу хмелю вітчизняної селекції.

Світовий досвід практичного використання методу клонального мікророзмноження свідчить про те, що він може забезпечити потреби країн в здоровому садивному матеріалі у необхідній кількості за досить невеликий проміжок часу. Особливо важливим, при цьому, є боротьба з вірусними хворобами, які передаються при вегетативному розмноженні рослин, що призводить до значного погіршення якості сировини та зниження урожайності [1, 3, 9, 13].

Першими вдалими спробами отримання генетично-однорідного посадкового матеріалу хмелю були досліді Vine та Jones в 1969 році за допомогою методу клонального мікророзмноження [15].

В подальшому, при клональному мікророзмноженні почали широко використовувати метод виділення апікальної меристеми для боротьби з

вірусними фітопатогенами, що дозволяло отримувати певну кількість безвірусного матеріалу [5, 8, 14]. Практикою хмелярства доведено, що не завжди можна отримати меристеми, позбавлені вірусів. Тому використовують додаткові технологічні операції з метою підвищення ефективності одержання оздоровленого посадкового матеріалу, такі як термотерапія [2, 7, 12].

Так, протягом 2000 – 2005 років отримано велику кількість клонованих рослин хмелю ароматичних сортів, які інтродуковані в семи областях України [6]. Нагальною проблемою вбачається те, що переваги в вирощуванні хмелю на сьогодні віддаються гірким сортам. Останні є безальтернативними в питаннях отримання хмельових екстрактів та гранул для великих пивзаводів України та світу.

Практична значимість клонального мікророзмноження хмелю полягає також у вдосконаленні селекційних робіт – як методу швидкого отримання необхідної кількості перспективних та районованих сортів і гібридів української селекції

Метою роботи було розроблення технологій клонального мікророзмноження на безвірусній основі цінних і перспективних гірких сортів хмелю (*Humulus lupulus L.*) та вивчення морфогенетичних потенціалів різних клітин, тканин та органів хмелю в умовах культури *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження

В роботі використовували маточний матеріал хмелю української селекції сортів Гайдамацький та Кумир, які занесено до Державного реєстру сортів хмелю України.

Для введення в культуру *in vitro* в якості первинного експланту використовували верхівкові бруньки (5-15 мм), міжвузля (15-25 мм), а також

бруньки підземних етиольованих пагонів (5-15 мм), для проліферації калюсної тканини хмелю використовували фрагменти стебел, міжвузля та листові пластинки рослин вищезгаданих сортів.

Для детекції на вірусосойство використовували візуальний метод рослин-індикаторів (біо-тест) з подальшим підтвердженням більш чутливим методом імуноферментного аналізу (ІФА) для визначення таксономічної спорідненості фітопатогену [10].

При проведенні біотестування нами використовувались рослини лободи (*Chenopodium quinoa*, Ch. amaranticolor, Ch. album), тютюну (*Nicotiana tabacum* L.), томатів (*Lycopersicon esculentum* L.), гарбузу (*Cucurbita pepo* L.) та кабачків (*Solanum melongena* L.).

ІФА застосовували для діагностики вірусів на плантаціях хмелю перед відбором рослинного матеріалу для дослідів та в зразках, отриманих із культури тканин *in vitro* після проведення термотерапії та виділення апексу із сироватками до М-ВК та S-ВК, які серологічно споріднені із хмельовими вірусами. При цьому використовували діагностичний тест набір фірми "BIORAD" (Франція). Оптичну щільність реакційної суміші імуноферментного аналізу вимірювали при довжині хвилі 405 нм на спектрофотометрі StarFax 303.

Нами була використана методика швидкої ідентифікації наявності вірусної інфекції в рослинному матеріалі хмелю [4], який відбирався безпосередньо з плантацій хмелю, а також з рослин-регенерантів, які були одержані з різних типів експлантів (меристем, верхівкових бруньок та міжвузлів) на електронному мікроскопі "ЕМВ 100А" (при інструментальному збільшенні 30 - 50 тис.). Рослини, які пройшли тестування на відсутність вірусних патогенів за вище запропонованими методиками використовувались безпосередньо для клонального мікророзмноження.

В якості стерилізуючих речовин використовували 70 %-й етиловий спирт, 20 %-й розчин перекису водню H_2O_2 , 0,1 %-й розчин сулеми $HgCl_2$, 5 %-й розчин гіпохлориту натрію $NaClO$ з різним часом експозиції від 4 до 20 хвилин. Асептичну роботу проводили в ламінарних боксах марки YLGH-19 (Німеччина).

Для отримання безвірусних вихідних експлантів рослин хмелю використовували метод виділення апікальної меристеми (три типи меристематичних експлантів, які відрізнялись між собою за розмірами: 250-400 мкм, 400-550 мкм, 550-800 мкм) та термотерапію (адаптацію рослин до експериментальних умов теплової обробки починали поступово, з температури $+ 25^{\circ} C$, щоденно підвищуючи на $2^{\circ} C$ протягом 6 днів та доводили до заданої температури $+ 37 \pm 1^{\circ} C$, цей період вважали початком безпосередньо термотерапії було 3 періоди експозиції: 10, 20 та 30 дб.)

В роботі використовували поживні середовища власних модифікацій на основі середовища Мура-

сіге-Скуга (МС) [11]: МС-О (основне), МС-М (морфогенне), МС-К (калюсогенне), МС-Е (ембріогенне), МС-Р (ризогенне).

МС-О: 6-бензил-амінопурин (БАП)- 0,5 мг/л, вітамін С – 1 мг/л;

МС-М: БАП - 0,2 до 3,0 мг/л, гіберелова кислота (ГК) - 1,0 та 2,0 мг/л;

МС-К: кінетин – 0,5-2,0 мг/л, α -нафтилоцтова кислота (НОК) – 2,0 мг/л, 2,4-дихлорфеноксилоцтова кислота (2,4-Д) – 0,5-1,5 мг/л та гідролізат казеїну – 500 мг/л.

МС-Е: кінетин - 0,5 - 2,0 мг/л, сахароза – 30 г/л.

МС-Р: $\frac{1}{2}$ макросолей за МС, мезоінозит – 50 мг/л, глюкоза – 15 г/л, 3-індолил-масляна кислота (ІМК) – 0,5-2,0 мг/л, БАП – 0,1 мг/л.

Для культивування на всіх етапах морфогенезу використовували агаризоване середовище (вміст агару – 8 г/л); в якості джерела вуглецю використовували глюкозу (15-30 г/л).

Рослинний матеріал культивували на даних варіантах поживних середовищ в світловій кімнаті та термостаті ТС-80 при температурі $+ 26 \pm 1^{\circ} C$ при освітленні 2000-3000 лк з 14-16 годинним фотоперіодом.

Добре сформовані рослини-регенеранти перед висаджуванням у відкритий ґрунт адаптували протягом трьох-п'яти тижнів на різних типах субстратів (суміш торфу з піском у різних співвідношеннях) до умов навколишнього середовища (*in situ*).

Експериментальний цифровий матеріал було опрацьовано стандартними сучасними статистичними методами, використовуючи комп'ютерні програми Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Для вироблення правильної стратегії боротьби з вірусними захворюваннями сільськогосподарських культур необхідно встановити збудників вірусних захворювань, визначити фактори, що впливають на стійкість рослин в природних умовах, виявити шляхи передачі та зберігання збудників в агробіоценозах і розробити діагностичні тест-системи для виявлення і ідентифікації збудників.

На першому етапі проводили візуальний огляд рослин на плантаціях хмелю Житомирської області. На всіх досліджених нами плантаціях найбільш розповсюдженими були симптоми скручування та мозаїки листя. Ознаки таких симптомів з'являлися в травні місяці і підсилювалися до середини вегетації. В подальшому останні могли зникати і в фазі технічної стиглості їх можна було спостерігати тільки в значно уражених рослинах. Симптоми ж хлорозу, як правило, з'являлися тільки в червні і також підсилювалися до кінця вегетації.

При проведенні біологічного тестування екстрактів листя хмелю на рослинах-індикаторах було показано про чутливість рослин кабачків та гарбуза, які мали чітко виражену симптоматику пожовтіння, точкових некрозів та скручування листя

(Рис. 1). Симптоми, які візуалізувались в результаті проведення дослідів з рослинами-індикаторами, дали можливість свідчити про те, що ізолят, отриманий з рослин хмелю, містив в собі вірусний фітопатоген.

Візуальний аналіз симптоматики підтверджували проведенням ІФА за вищезгаданою методикою на наявність S- та М-вірусів картоплі, що мають спорідненість до вірусу скручування листків хмелю (ВСЛХ), які відносяться до однієї групи *Carlavirus*, який є найбільш розповсюдженим і шкочинним по відношенню до хмелю [6]. Результати проведених ІФА-тестів, показали наявність біля 12 % ураженого рослинного матеріалу сорту Кумир та 9 % - сорту Гайдамацький. Отримані результати свідчили про наявність вірусної інфекції також і в безсимптомних хмельових про-

бах, що дало можливість говорити про латентну форму захворювання.

Результати електронної мікроскопії засвідчили наявність вірусних часток паличкоподібної форми розмірами 630-640 x 12 нм з внутрішнім каналом 3,5-3,7 нм, що повністю відповідають характеристикам для паличковидних вірусів представників групи *Carlavirus* (Рис.2).

Комплекс проведених аналізів щодо виявлення ураженості вірусами хмільників НД господарства "Хмельярство" дав змогу отримати реальну картину наявності вірусної інфекції, характерну для нових сортів української селекції Кумир та Гайдамацький, що складала 11 % та 8 % ураженості досліджуваної плантації відповідно.

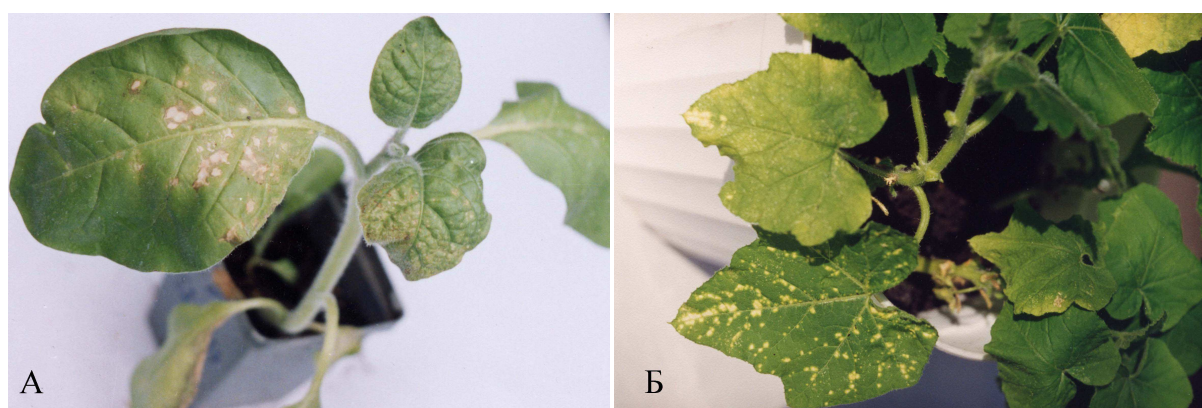


Рис.1. Вірусні симптоми пожовтіння та точкових некрозів на рослинах-індикаторах кабачку (А) та гарбуза (Б) при експериментальному зараженні карлавірусом хмелю

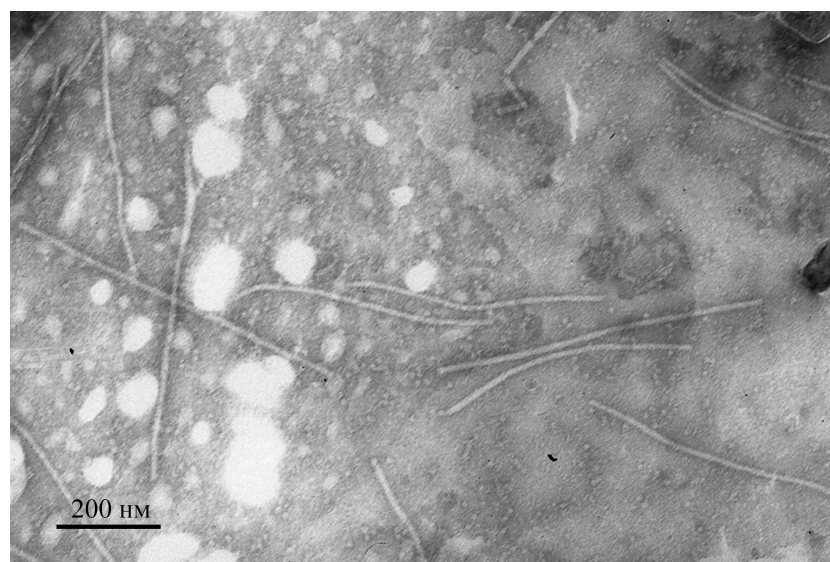


Рис. 2. Електроннографія карлавірусу хмелю із соку інфікованих рослин

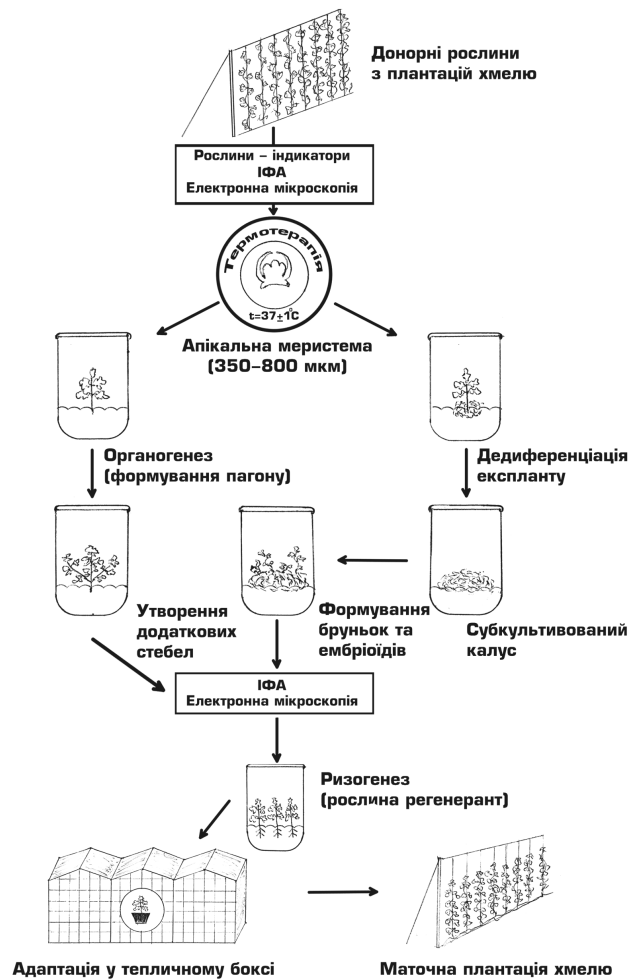


Рис.3. Загальна схема одержання мериклонів хмелю

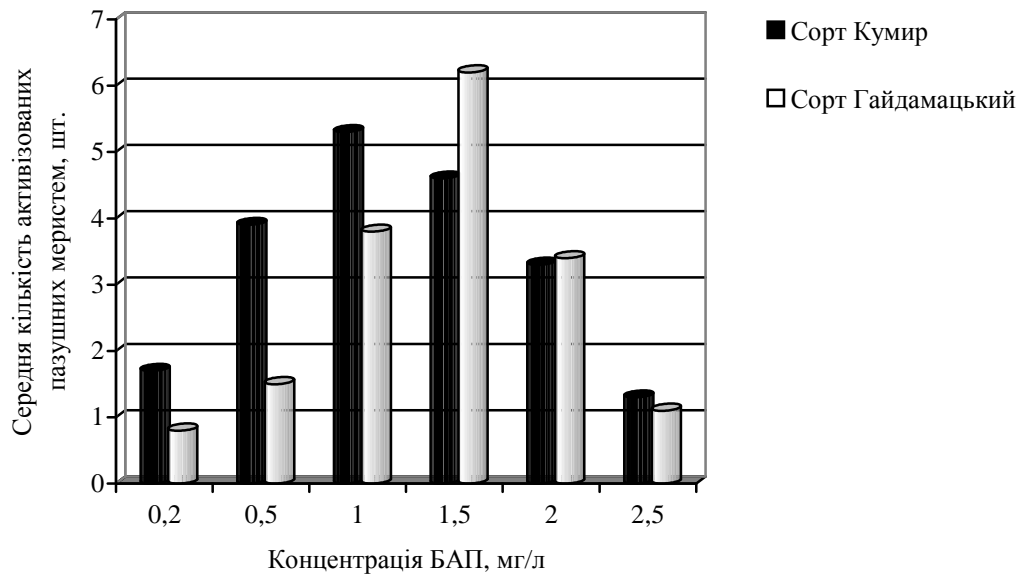


Рис. 4. Вплив різних концентрацій БАП на активізацію пазушних меристем хмелю сортів Кумир та Гайдамацький

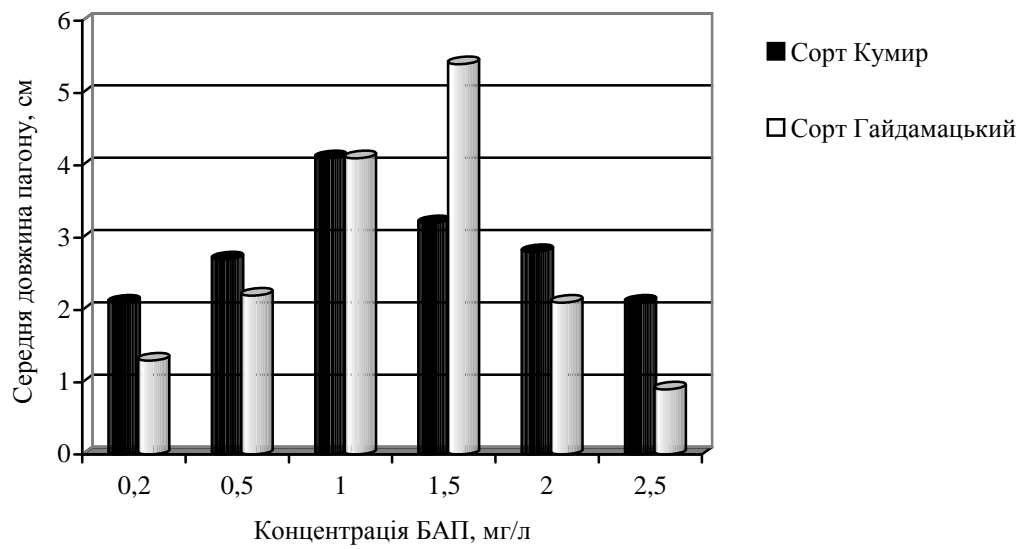


Рис. 5. Вплив різних концентрацій БАП на ріст пагонів хмелю сортів Кумир та Гайдамацький



Рис. 6. Адаптовані рослини хмелю перед висадкою на маточні плантації

Для отримання безвірусного рослинного матеріалу, який в подальшому використовувався для мікроклонального розмноження, нами була обрана методика виділення апікальної меристеми, в основі використання якої лежить принцип відсутності вірусних часток в верхівці росту рослини - апексі. Також використовували метод термотерапії для позбавлення рослин від вірусної інфекції.

Результати наших попередніх робіт свідчили про кращу можливість використання експлантів рослин хмелю з апікальної зони, розмір яких складав ~400-550 мкм тому, що саме ці розміри дозволили оптимально використати регенераційну здатність тканин та звільнити їх від вірусного патогену [4]. Продовжуючи цей дослід для підвищення коефіцієнту отримання безвірусного рослинного матеріалу було запропоновано використати методику термотерапії. Отримані нами результати свідчать про те, що використання методу термотерапії (час експозиції 20 днів при температурі 37 ± 1 °C) в поєднанні з методом виділення апікальної меристеми (меристема з примордіями та частково меристематична зона, розмірами 400-550 мкм) дають змогу отримати до 75% та 90 % оздоровленого рослинного матеріалу для сортів хмелю Кумир та Гайдамацький відповідно.

Модифікуючи класичну схему отримання безвірусного садивного матеріалу, ми пропонуємо такі технологічні операції, виходячи з матеріально-технічного забезпечення хмелярських господарств та подальшого розвитку галузі (Рис. 3).

Запропонована схема клонального мікророзмноження районуваних та перспективних високоякісних сортів хмелю у поєднанні з швидкими та надійними методами діагностики вірусної інфекції дозволить забезпечувати виробництво здорового однорідного садивного матеріалу, що є основою отримання якісної сільськогосподарської продукції.

Від вибору експланту залежить прояв регенераційної здатності тканини в умовах *in vitro*. Вичленення бруньок та введення їх в культуру *in vitro* проводили в різні фази вегетації рослин в залежності від сезону та розвитку пагонів та кореневищ.

В результаті проведених досліджень було виявлено, що більш придатним періодом для відбору вегетативних бруньок з надземної частини рослин хмелю в агроценозах є період з травня по середину липня місяця. У випадку відбору зимуючих бруньок кореневищ для використання їх в якості первинних експлантів при введенні в культуру *in vitro*, цей період припадає на квітень місяць.

При отриманні асептичної культури тканин хмелю як і в попередніх дослідях виявилось кращим використання 0,1 % розчину сулеми з часом експозиції 7 хвилин, що дозволило отримати 93,3 % та 92,2 % стерильних експлантів для сортів хмелю Кумир та Гайдамацький відповідно.

Експерименти по активації меристем та росту пагонів показали, що ключовим діючим агентом при вивченні морфо-фізіологічної активності тканин хмелю є співвідношення різних концентрацій БАП з ГК. Виходячи з того, що в ході проведених досліджень, було з'ясовано, що концентрація 1,0 мг/л ГК є оптимальною, ми експериментували з різними концентраціями БАП (від 0,2 мг/л до 2,5 мг/л), що містились у варіантах середовищ МС-М. Варіювання концентраціями дало нам змогу отримати більш суттєвий результат (рис. 4, 5).

Виходячи з вищенаведеного та аналізуючи отримані результати, можна свідчити про те, що більш оптимальним співвідношенням регуляторів росту для активації пазушних меристем та росту мікропагонів є БАП в концентрації 1,0 мг/л для експлантів хмелю сорту Кумир та 1,5 мг/л – для експлантів хмелю сорту Гайдамацький та ГК в концентрації 1,0 мг/л для обох сортів.

Для отримання морфогенного калюсу хмелю нами було запропоновано використання в якості первинних експлантів фрагментів стебел, міжвузля та листові пластинки. Для сорту Гайдамацький найбільш вдалою комбінацією регуляторів росту був варіант середовища який складався з кінетину (1,5 мг/л) та 2,4-Д (1,0 мг/л). Утворення калюсу спостерігалось на 7 – 8 день і вихід експлантів з калюсогенезом становив до 84 %. Процес калюсоутворення починався з набухання і деформування експланту, потім на поверхні експланту з'являвся калюс – маса недиференційованих клітин солом'яного чи кремового кольору.

Отримані результати калюсоутворення на експлантах хмелю сорту Кумир свідчили про те, що початок калюсогенезу спостерігався на 6 – 8 добу і складав 72 % калюсогенних експлантів на середовищі з кінетином (2,0 мг/л) та 2,4-Д (1,0 мг/л).

Для отримання рослин-регенерантів з калюсної тканини хмелю сортів Гайдамацький та Кумир нами було запропоновано ряд варіантів поживного середовища до складу якого входили мікро- та макроелементи по середовищу МС, вітаміни по МС, регулятор росту кінетин з концентрацією 0,5 – 2,0 мг/л, в якості джерела вуглецю використовувалась сахароза – 30 мг/л. Сорт Гайдамацький регенерував на середовищі з кінетином 1,5 мг/л, на 8 – 10 добу культивування була відмічена поява зелених осередків та формування меристематичних зон з подальшим формуванням з них бруньок, з яких через 7 – 9 діб почали розвиватися стебла з листовими пластинками. Листки на початку культивування мали редукований вигляд, на 26 – 28 добу культивування нами було відмічено нормальні фенотипові ознаки. Для калюсу хмелю сорту Кумир нами не були відмічені прояви морфогенетичних властивостей на жодному з запропонованих варіантів регенераційного середовища. Слід відзначити, що морфогенна здатність калюсу хмелю сорту Гайдамацький теж втрачалась з кожним наступним перепасуванням.

Обов'язковим етапом розробки прийомів клонального мікророзмноження рослин є індукція ризогенезу та адаптація отриманих рослин-регенерантів з добре розвинутою вегетативною та кореневою системою до нестерильних умов вирощування та до умов відкритого ґрунту.

При активізації ризогенезу було запропоновано ряд середовищ з вмістом фітогормону фуксिनного ряду – 3-індоліл-масляна кислота (ІМК) в різних концентраціях (0,5 – 2,5 мг/л). Найвищий відсоток укорінення для експлантів сорту хмелю Гайдамацький дало можливість отримати на середовищі з вмістом ІМК в концентрації 1,5 мг/л, який складав 98 %. Середня кількість коренів, що утворились в даному випадку налічувала 5,7 штук, а довжина сягала 4,5 см. Так, мікропагони сорту Кумир проявили більш активну ризогенну здатність при культивуванні на середовищі з додаванням 2,0 мг/л ІМК. Укорінення рослин при цьому складало 94 %, нормально розвинута коренева система сформувалась на 30 – 35 добу культивування, середня кількість коренів складала 5,78 штук, середня довжина – 2,42 см.

Рослини-регенеранти хмелю двох сортів Кумир та Гайдамацький з добре розвинутою кореневою системою та вегетативною масою в подальшому використовували для адаптації в ґрунтовій суміші. Адаптацію регенерантів проводили в торфоперегнійних горшечках об'ємом 100 г, щільно запов-

нених різними варіантами спеціально підготовлених субстратів. Отримані результати свідчили про те, що кращим субстратом із запропонованих є суміш торфу з піском у співвідношенні 3:1. Саме на цьому субстраті було відмічено оптимальне приживлення, яке складало 93 %, спостерігався активний розвиток регенерантів та приріст вегетативної маси більше 10,0 см (рис. 6).

Під час адаптації, який складав в середньому 30-35 діб, рослини культивували при підвищеній вологості, яку штучно створювали за допомогою скляної банки у випадку з 1-2 рослинами, та в спеціальних герметичних боксах, в яких одночасно можна було адаптувати по 100 рослин, що значно зменшувало витрати по догляду за рослинами під час адаптації.

На етапі перенесення рослин-регенерантів, які мали добре сформовану вегетативну масу, до умов *in situ*, використовували загальноприйнятну методику загартування (поступове прилаштування рослини до прямого сонячного світла та обвітрювання), яка тривала біля 5 - 7 днів. Рослини, прилаштовані до природних умов вирощування, мали нормальні ознаки згідно технічним вимогам до стандартного посадкового матеріалу хмелю, що дає змогу використовувати їх в якості вихідного матеріалу для закладання маточників безвірусних рослин хмелю.

1. Бойко А.Л., Литвинов Г.С., Кондратюк Е.А., Ромашев С.А., Муж Г.В. и др. Вирусы и вирусные болезни хмеля, способы борьбы с ними // Хмелеводство. - 1983. - № 12. - С. 31 - 35.
2. Кормильцев Б.Ф., Бойко А.Л., Горшкова Л.Т. Використання методу культури апікальних меристем для оздоровлення хмелю від деяких вірусів. // Хмелярство, 1992, вип.14. -С.20-23.
3. Мельничук М.Д. Проблема карлавірусної інфекції хмелю в Україні// Науковий вісник Національного аграрного університету. –К., 1998, № 4. –С.28-33.
4. Мельничук М.Д., Кловаденко А.А., Давиденко О.А. отримання безвірусного посадкового матеріалу хмелю (*Humulus lupulus* L.) в умовах *in vitro* // Науковий вісник НАУ. – К.: Ірена, 2000. Вип. 29.– С.47-52.
5. Мельничук М.Д., Кріпкий О.Є., Бойко А.Л. та ін. // Біотехнологічний процес одержання рослин хмелю на безвірусній основі. Доповіді НАН України. № 9, 1996. С. 139 – 141.
6. Мельничук М.Д., Заграфова М.Й., Кловаденко А.А. та ін. Біологічні технології та економічна ефективність створення маточників хмелю для промислових плантацій // Аграрна наука та освіта. – 2004. – 5, № 3-4. – С. 20-25.
7. Adams A.N Elimination of viruses of hop (*Humulus lupulus* L.) by heat therapy and meristem culture // J Hort Sci.- 1975 – V. 58. - P.151-160.
8. Gurriarán M.J., Revilla Y., Tamés R.S. Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brewers Gold and Nugget // Plant Cell Reports. – 1999. – V. 18. – P. 1007-1011.
9. Hataya T., Arimoto R., Suda N. and Uyeda I. Molecular characterization of Hop mosaic virus: its serological and molecular relationships to Hop latent virus// Arch Virol.- 2001.- V. 146.- P.1935-1948
10. Legg J.T. Mechanical transmission of hop mosaic virus // Nature. - 1965. - 208. - P. 1017-1018.
11. Murashige T. Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells // Amer. J. Bot. – 1967. –V. 54. – P. 963-970.
12. Probasco G., Winslow S. The use of shoot-tip culture to eliminate viruses from hop varieties grown in the United States // MBAA Tech Q. - 1986– V. 23. – P. 26-31.
13. Sano T., Yoshida H., Goshono M., Monma T., Kawasaki H., Ishizaki K. Characterization of a new viroid strain from hops: evidence for viroid speciation by isolation in different host species// J Gen Plant Pathol.- 2004.- V. 70.- P. 181-187
14. Samyn G., Welvaert W. Producing a “nuclear stock” of virus-free hop plants // Med Fac Landbouw Rijksuniv Gent. – 1983. – V.48. – P. 877-881.
15. Vine S.J, Jones O.P The culture of shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses // J Hort Sci.- 1969. – V. 44.- P.181-284.

Отримано: 12 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 лютого 2007 р.