

## **ВПЛИВ ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН ХМЕЛЮ КУЛЬТУРИ IN VITRO**

*Наведено результати досліджень впливу противірусних препаратів на регенерацію рослин хмелю культури in vitro. Встановлено, що регенерація мікроживців хмелю в умовах in vitro залежить від концентрації й виду противірусних препаратів у складі середовища та від сортових особливостей рослинного матеріалу, який розмножується. Інтенсивність коренеутворення у регенерантів хмелю найкраще відбувається при застосуванні противірусного препарату Аміксин, зокрема кількість сформованих коренів збільшується до 8–10 проти 6–7 у контрольному варіанті.*

### **Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень**

Одним із актуальних і першочергових заходів в програмі розвитку хмелярської галузі на період 2013–2015 років в Україні є швидке за сучасними технологіями закладання маточників хмелю. Отримані рослини (донори) слугують для відновлення існуючих і закладки нових плантацій хмелю за новітніми біотехнологічними технологіями культури in vitro з їх оздоровленням від патогенів бактеріальної, грибної та вірусної природи [3, 11, 12].

Патогени вірусної природи широко розповсюджені на рослинах хмелю та уражують їх в різних формах [7]. У 80-х роках минулого століття ураженість вірусами насаджень окремих сортів хмелю становила понад 90%, що призводило до значних втрат врожайності та погіршення якості хмелесировини. Протягом останніх 40 років в агроценозах України багатьма дослідниками виявлено понад 20 вірусів, що уражують рослини хмелю [6, 10].

Саме ураження рослин вірусами зменшує врожай в середньому на 25–30%. Крім цього, віруси створюють загальний інфекційний фон, який сприяє розвитку інших видів інфекцій – грибної, бактеріальної тощо. Вірус скручування листків за рахунок деформації листкової пластинки хмелю створює сприятливе середовище для розвитку бактерій і грибів, а також розмноження комах-переносників [4].

У зв'язку тим, що у виробничих умовах практично не існує засобів боротьби з вірусами, вирощування чистого від патогенів садивного матеріалу має практичне значення. Комплексний підхід із забезпечення вірусного контролю практично стовідсотково гарантує отримання безвірусних рослин за методами

біотехнології *in vitro*, які є безальтернативними на шляху масового і швидкого розмноження та підвищення якості отриманих рослин. Схема перевірки передбачає лабораторний аналіз та контроль у закритому і відкритому ґрунтах, що доповнені методами ІФА чи ПЛР.

На хмелеплантаціях важливо постійно проводити моніторинг виявлення вірусних захворювань та аналітичну діагностику. Найбільш поширеними методами діагностування вірусних хвороб рослин є такі: рослин-індикаторів, серологічний [1] та електронномікроскопічний. Використання методу мікроклонального розмноження дозволяє оздоровлювати рослини від вірусів і інших патогенів [2, 9, 8, 5].

В той же час використання протівірусних препаратів дозволяє дещо спростити технологію стерилізації матеріалу в біотехнології *in vitro* та забезпечити високу якість безвірусних рослин. Однак використання протівірусних препаратів у поживних середовищах по-різному може впливати на приживлюваність, укорінення та ріст мікроживців різних сортів хмелю.

У зв'язку з цим, **метою наших досліджень** було поглиблене вивчення впливу протівірусних препаратів на приживлюваність, ріст і розвиток рослин хмелю та розробка оптимальних, раціональних схем мікроклонального розмноження.

### **Методика досліджень**

Дослідження з вивчення впливу протівірусних препаратів на регенерацію хмелю у культурі *in vitro* проводили в лабораторії селекції, біотехнології та мікроклонального розмноження хмелю Інституту сільського господарства Полісся НААН у 2012 році.

Схема досліду з вивчення впливу протівірусних препаратів на регенерацію хмелю у культурі *in vitro* містила варіанти з різними концентраціями протівірусних препаратів Аміксин та Ацикловір: 1. контроль – поживне середовище на основі Мурасіґа-Скуґа; 2. поживне середовище з Аміксином в концентрації 0,01 %; 3. поживне середовище з Аміксином в концентрації 0,05 %; 4. поживне середовище з Аміксином в концентрації 0,10 %; 5. поживне середовище з Ацикловіром в концентрації 0,02 %; 6. поживне середовище з Ацикловіром в концентрації 0,05 %; 7. поживне середовище з Ацикловіром в концентрації 0,10 %.

При вивченні питань впливу протівірусних препаратів на регенераційні процеси регенерантів використовували загальноприйняті методики, які затверджені в Інституті сільського господарства Полісся НААН України, визначення зараженості вірусами, методику серологічного аналізу, а також діючі нормативні документи, ДСТУ.

Варіабельність морфологічних показників регенерантів у дослідях визначали за математично-статистичними методами за допомогою пакета програм MS Office XP 2007.

## Результати досліджень та їх обговорення

Ріст та розвиток мікроживців сортів Промінь, Заграва, Кумир посилювався на живильному середовищі з додаванням противірусного препарату Ацикловір. Відсоток приживленості у досліді був у межах 40–100 % залежно від сорту хмелю. Так, приживлюваність мікроживців сорту хмелю Промінь із застосуванням противірусного препарату Аміксин була близькою до контрольного варіанта (без застосування противірусних препаратів). Додавання ж до живильного середовища противірусного препарату Ацикловір у концентраціях 0,02, 0,05 та 0,1 % не призводило до зниження показників приживлюваності мікроживців. Дещо нижчі показники були зафіксовані за дослідження сорту Кумир, де приживленість на варіантах із застосуванням противірусних препаратів була в межах 40–97%.

Вплив препаратів на процес коренеутворення також мав місце. Додавання до живильного середовища противірусного препарату Аміксин збільшило показники кількості коренів, порівняно з контрольним варіантом (без застосування противірусних препаратів), на 40–61 % (табл.1) залежно від досліджуваної концентрації. Введення Ацикловіру до живильного середовища, за культивування сорту Промінь, призвело до переваги над показниками контрольного варіанта на 42 %. Кількість утворених корінчиків експлантів сорту Заграва залежала від складу поживного середовища. У варіантах досліджень з концентрацією противірусного препарату Аміксин у концентраціях 0,01 та 0,05 % перевага над показниками контролю була у межах 15–32 %. За введення у поживне середовище противірусного препарату Ацикловір усі досліджувані концентрації не характеризувалися позитивним впливом на процес коренетворення. Порівняно з контрольним варіантом (без застосування противірусних препаратів), відставання показників кількості утворених корінчиків було 11,4 та 25,3 % за 0,05 та 0,02 % концентрації. Збільшення концентрації противірусного препарату до 0,1 % спричинило зменшення кількості корінчиків, порівняно з контрольним варіантом, на 48 %.

**Таблиця 1. Вплив противірусних препаратів на коренетворення регенерантів хмелю**

| № з/п | Варіант (концентрація) | Кількість коренів у регенерантів хмелю сортів |               |         |               |       |               |
|-------|------------------------|---|---------------|---------|---------------|-------|---------------|
|       |                        | Промінь                                       |               | Заграва |               | Кумир |               |
|       |                        | шт.   | % до контролю | шт.     | % до контролю | шт.   | % до контролю |
| 1.    | Контроль               | 6,2   | 100           | 7,9     | 100           | 7,6   | 100           |
|       |                        | Аміксин                                       |               |         |               |       |               |
| 2.    | 1–0,01 %               | 10  | 161,3         | 10,4    | 132           | 6,4   | 84,2          |
| 3.    | 2–0,05 %               | 8,7   | 140,3         | 9,1     | 115,2         | 2,2   | 29,0          |
|       |                        | Ацикловір                                     |               |         |               |       |               |

|    |          |     |      |     |      |     |      |
|----|----------|-----|------|-----|------|-----|------|
| 4. | 1–0,02 % | 8,8 | 142  | 5,9 | 74,7 | 6,6 | 87,0 |
| 5. | 2–0,05 % | 8,8 | 142  | 7,0 | 88,6 | 3,5 | 46,0 |
| 6. | 3–0,10 % | 6,1 | 98,4 | 4,1 | 52,0 | 4,9 | 64,3 |

Введення протівірусних препаратів Аміксин та Ацикловір до поживного середовища позитивно не впливало на процес коренеутворення за культивування сорту Кумир. Відставання від показників контролю сягало 71 % залежно від досліджуваної концентрації препаратів.

За показниками кількості пагонів у регенерантів хмелю перевагу у досліді мав контрольний варіант – удосконалене поживне середовище на основі прописів Мурасіге та Скуга без додавання протівірусних препаратів.

Сорти хмелю Промінь, Заграва та Кумир за показниками кількості утворених пагонів були близькими. Так, у варіанті з концентрацією протівірусного препарату Аміксин 0,01 % кількість пагонів становила 1,6–1,5 шт., залежно від сорту, але порівняно з контрольним варіантом, спостерігалось відставання.

Введення до поживного середовища препарату Ацикловір за культивування сорту Промінь не сприяло збільшенню показника кількості утворених пагонів, але й не призвело до різкого погіршення. В цілому на введення протівірусних препаратів, не залежно від концентрації, найгірше відреагував сорт хмелю Кумир.

Як і за показниками кількості пагонів та коренів, кількість міжвузлів не перевищувала показники контролю у жодному досліджуваному варіанті не залежно від протівірусного препарату та його концентрації у живильному середовищі.

За культивування у дослідних варіантах сорту Заграва показник кількості міжвузлів був близьким за значенням. Так, за концентрації протівірусних препаратів у концентраціях 0,01 % та 0,02 % у поживному середовищі було отримано кількість міжвузлів на рівні 3,6–3,7 шт. Таку ж саму кількість міжвузлів у регенерантів хмелю *in vitro* сорту Заграва отримали за введення Ацикловіру в концентрації 0,05 %, що становить 90 % від контролю.

Показники висоти рослин регенерантів хмелю *in vitro* на контрольному варіанті були в межах 5,7–6,8 см залежно від сорту (табл. 2). Протівірусні препарати Аміксин і Ацикловір дещо стримували ріст рослин хмелю у висоту. Даний показник, залежно від сорту, становив 1,3–6,2 см. При цьому у сорту Кумир відставання від показників контролю становило 80 %, а найкращий приріст у висоту рослин був одержаний при введенні у поживне середовище препарату Ацикловір у концентрації 0,02 % та становив 54,5 % від контролю, що на 45,5 % менше.

**Таблиця 2. Вплив противірусних препаратів на висоту регенерантів хмелю**

| № з/п     | Варіант (концентрація) | Висота регенерантів хмелю сортів |               |         |               |       |               |
|-----------|------------------------|----------------------------------|---------------|---------|---------------|-------|---------------|
|           |                        | Промінь                          |               | Заграва |               | Кумир |               |
|           |                        | см                               | % до контролю | см      | % до контролю | см    | % до контролю |
| 1.        | Контроль               | 6,8                              | 100           | 5,7     | 100           | 6,6   | 100           |
| Аміксин   |                        |                                  |               |         |               |       |               |
| 2.        | 1–0,01%                | 4,1                              | 60,3          | 4,8     | 84,0          | 2,3   | 35,0          |
| 3.        | 2–0,05 %               | 1,5                              | 22,0          | 3,3     | 58,0          | 1,3   | 20,0          |
| Ацикловір |                        |                                  |               |         |               |       |               |
| 4.        | 1–0,02 %               | 6,2                              | 91,2          | 4,8     | 84,0          | 3,6   | 54,5          |
| 5.        | 2–0,05 %               | 5,6                              | 82,3          | 4,7     | 82,0          | 1,6   | 24,2          |
| 6.        | 3–0,10 %               | 2,5                              | 37,0          | 1,8     | 32,0          | 1,9   | 29,0          |

Результати впливу противірусних препаратів на показники висоти рослин за культивування сорту Заграва мали схожу тенденцію з показником кількості міжвузлів. При вирощуванні хмелю сорту Промінь на досліджуваних варіантах з різною концентрацією противірусних препаратів чіткої залежності їх впливу на показник висоти рослин не спостерігалось.

Встановлено, що введення до середовища збільшеної концентрації противірусного препарату Аміксин з 0,01 % до 0,1 % сприяло повному пригніченню розвитку регенерантів усіх досліджуваних сортів.

### **Висновки**

У результаті досліджень визначено оптимальні концентрації противірусних препаратів для їх застосування в поживних середовищах при оздоровленні та вирощуванні регенерантів хмелю.

Встановлено, що регенерація мікроживців хмелю в умовах *in vitro* залежить від концентрації та виду противірусних препаратів у складі середовища, від сортових особливостей рослинного матеріалу, який розмножується. Розвиток надземної частини регенерантів хмелю різних сортів на середовищах з використанням противірусних препаратів відбувається менш інтенсивно, ніж на звичайних середовищах, але при цьому підвищуються фітосанітарні кондиції рослин.

Інтенсивність коренеутворення у регенерантів хмелю найкраще відбувається при застосуванні противірусного препарату Аміксин, зокрема кількість сформованих коренів збільшується на 3–3,3 – 42,9 %, тобто до 8–10 проти 6–7 у контрольному варіанті.

## Література

1. *Власов Ю. И.* Сельскохозяйственная вирусология/ *Ю. И. Власов, Э. И. Ларина.* М.: Наука, 1982. – 97 с.
2. *Иванова Н. И.* Клональное микроразмножение некоторых декоративных растений / *Н. И. Иванова* // Сб. науч. тр. Никитского бот. сада. – 1997.– Т.119.– С. 133–143.
3. *Заградова М. Й.* Новий ароматичний сорт хмелю Заграва / *М. Й. Заградова, М. І. Ляшенко, А. А. Годованій, Л. В. Проценко* // Хмелярство. – 2004. – №21. – С.13–15.
4. *Кормильцев Б. Ф.* Изменение состава фенольных соединений хмеля при вирусном хлорозном заболевании/ *Б. Ф. Кормильцев, В. П. Лобов* // Хмелярство. – 1986. – Вып. 8. – С. 16–18.
5. *Кормильцев Б. Ф.* Використання термотерапії для одержання садивного матеріалу хмелю без вірусних хвороб / *Б. Ф. Кормильцев* // Хмелярство. – 1996. Вип. 18. – С. 8–12.
6. *Мельничук М. Д.* Изучение формирования точечных некрозов на растениях хмеля (*Humulus lupulus* L.) инфицированных вирусом скручивания листьев хмеля. / *М. Д. Мельничук, Г. И. Мартын, А. Л. Бойко* // Доп. НАН України. – 1997. – № 5. – С. 166–169.
7. *Мельничук М. Д.* Патологічні зміни рослин хмелю (*Humulus lupulus* L.) індуковані вірусом скручування листя : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук – К.М.Д.М. 1997. – 18 с.
8. *Митрофанова О. В.* Регенерация растений из изолированных органов и тканей *Artemisia balhonorum* F. *Scoraria* W.K./ *О. В. Митрофанова, И. Е. Логвиненко, Н. Н. Иванова* // Сб. науч. тр. Никитский бот.сад. – 1997. – Т.119. – С 143–153.
9. *Михайличенко К. П.* Сорт хмелю Регент / *К. П. Михайличенко, М. А. Кулинич* // Хмелярство. – 1997. – № 19. – С. 3–4.
10. *Московець С. М.* Вірусні захворювання хмелю і заходи боротьби з ними / *С. М. Московець, А. Л. Бойко.* – К. 1970. – 36 с.
11. Хмель и его использование / *А. А. Годованій, Н. И. Ляшенко, Й. Г. Рейтман* и др. – К.: Урожай, 1990.– 336 с.
12. *Burgess A. H.* Hops: Botany cultivation and utilization. Leonard Hill (Grampian Press Ltd.. – New York: London and inter science Publishers inc., 1964.