

УДК 633.791.234

Б.Ф. Кормільцев,
кандидат біологічних наук

О.В. Черненко

Інститут сільського
господарства Полісся НААН

П.Г. Дульнев

Науково-інженерний
центр "АКСО"
Інституту біоорганічної хімії
і нафтохімії НАНУ

ВИКОРИСТАННЯ ДДКамоду ПРИ МІКРОКЛОНАЛЬНОМУ РОЗМНОЖЕННІ І ЗБЕРЕЖЕННІ IN VITRO СОРТІВ ХМЕЛЮ (HUMULUS LUPULUS L.)

Наведено результати досліджень впливу модифікованого крохмалю — ДДКамоду на процеси регенерації хмелю в культурі *in vitro*. Показано, що ДДКагод поліпшує умови зберігання сортів хмелю у колекції *in vitro* і може бути заміником агар-агару у середовищах при мікроклональному розмноженні хмелю.

Ключові слова: хміль, культура *in vitro*, агар-агар, модифікований крохмаль.

Існуючі біотехнологічні методи дають можливість швидко і надійно звільнити рослини від вірусних, грибових та бактеріальних захворювань [1] та забезпечити їх прискорене розмноження [2–4]. Плантації, закладені на основі такого матеріалу, більш вирівняні за розвитком, дають прибавку до 30% урожаю шишок хмелю і до 20% вмісту α -кислот у сировині. Тому розробка та удосконалення біотехнологічних методів має велике значення для подальшого розвитку хмелярства.

Досвід впровадження біотехнологічних методів розмноження хмелю у виробництво. Останнім часом, довів їх високу ефективність і здатність за малий термін забезпечити виробників хмелю здоровим високоякісним садивним матеріалом [5].

При використанні біотехнології *in vitro* у виробничих масштабах важливим моментом є зниження її собівартості і підвищення економічної ефективності. Як показують розрахунки, найбільші витрати при приготуванні поживних середовищ припадають на гелетворюючий компонент — агар-агар, доля вартості якого у складі середовищ досягає 70%. Тому заміна цього препарату на більш дешевий могла б значно знизити собівартість біотехнології розмноження хмелю і утримання колекції сортів *in vitro*.

Як альтернатива агар-агару в останній час пропонується використовувати різні форми модифікованого крохмалю, зокрема ДДКагод, розроблений в Науково-інженерному центрі "АКСО" Інституту біоорганічної хімії і нафтохімії Національної академії наук України [6]. Як свідчать літературні джерела, використання ДДКамоду значно покращує регенерацію рослин при мікроклональному розмноженні деяких овочевих культур [7, 8].

О.В. Білінською встановлено, що заміна агар-агару на ДДКагод діє позитивно на розвиток рослин-регенерантів за рахунок зниження їх вітрифікації, а також стимулює утворення андрогенних структур і рослин-регенерантів в культурі пильників *in vitro* ярого ячменю. [9, 10]. У цій роботі ми досліджували вплив ДДКамоду на процеси регенерації мікроживців хмелю в культурі *in vitro*.

Мета досліджень — встановити можливість використання модифікованого крохмалю ДДКамоду у якості гелетворювального компонента середовищ при мікроклональному розмноженні хмелю і створенні колекції сортів хмелю *in vitro*.

Об'єкт досліджень — регенерація мікроживців хмелю в культурі *in vitro*.

Матеріали та методи. Для проведення досліджень використовували регенеранти хмелю з колекції *in vitro* сортів: Альга, Слов'янка, Заграва, Промінь.

Усі дослідження проводили в стерильних умовах. Експланти, посуд і матеріали стерилізували згідно загальноприйнятим методикам за прописом Калініна [11]. Регенерацію мікроживців хмелю проводили згідно розробленої нами методики [12]. Мікроживці хмелю культивували на середовищі Мурасига і Скуга у нашій модифікації. Стерилізацію середовищ проводили у автоклаві при додатковому тиску 1 атм протягом 20 хв. Для проведення дослідів в середовища замість агар-агару вносили ДДКагод у концентрації від 80 до 150 г/л.

Після висадки, посуд з експлантами переносили у культуральну кімнату і вирощували за температури 22–26°C, освітленні 2,5–3,0 клк і світловому періоді 16 год. Після того, як регенеранти утворювали 5–6 вузлів їх зно-

ву живцювали і процес регенерації повторювали. Усі досліди проводили у трьох повтореннях по 20 рослин у кожному. Спостереження і обробку експериментальних даних проводили через кожні півтора місяці.

Результати досліджень. У дослідах по регенерації деяких культур автори пропонують використовувати ДДКагод концентрації від 120 до 150 мг/л [7–9]. Для мікроклонального розмноження хмелю нами випробовувались середовища з концентрацією ДДКагоду від 80 мг/л до 150 мг/л. Найбільш оптимальною концентрацією ДДКагоду для культивування мікроживців хмелю виявилась концентрація 100 г/л. При застосуванні більш високих концентрацій утворювались доволі щільні середовища, що ускладнювало процес висаджування мікроживців, до того ж частина їх ламалася і вибраковувалась. В той же час, середовище з концентрацією ДДКагоду 80 мг/л виявилось рідким і не забезпечувало фіксування мікроживців у середовищі, що робило його непридатним для використання при мікроклональному розмноженні.

Приживлення мікроживців хмелю, висаджених на середовища з ДДКагодом, не відрізнялось від їх приживлення на середовищах з агар-агаром і становило в середньому 99%, але розвиток експлантів на середовищах з ДДКагодом перші тижні після висаджування проходив повільніше, ніж на контрольних середовищах з агар-агаром. Так, якщо у контролі початок розвитку бруньок спостерігався вже на 4–7 добу, то на експериментальних середовищах лише на 7–10 добу (табл. 1).

Аналогічно на середовищах з ДДКагодом відбувалась затримка розвитку кореневої системи. Якщо на середовищах з агаром початок різогенезу у мікроживців хмелю спостерігався на 8–12 добу після висадки, то на середовищах з ДДКагодом тільки на 10–18 добу.



Розвиток експлантів хмелю на середовищах з ДДКагодом (зліва) і агар-агаром (справа)

У процесі культивування розвиток мікроживців на середовищі з ДДКагодом прискорювався і після двох місяців зовнішньо вони не відрізнялись від регенерантів, які були отримані у контролі (рисунок) і були придатні для подальшого розмноження.

Морфологічний аналіз регенерантів, проведений після 1,5 міс. культивування показав, що рослини, вирощені на середовищі з ДДКагодом, не дивлячись на зовнішню схожість, значно відставали по масі від тих, що вирощувались на звичайних середовищах. Так, якщо середня маса регенерантів у контролі була 221 мг, то середня маса регенерантів, вирощених на ДДКагоді, становила усього 130 мг. Особливо на середовищі з ДДКагодом відставала в розвитку коренева система регенерантів. Як бачимо з таблиці (табл. 2) у контрольному варіанті кожний регенерант утворював у середньому 7,6 корінців, а на середовищах з ДДКагодом тільки 5,9, що також відносилось і до маси кореневої системи, яка була меншою від контролю більш ніж вдвічі.

Слабкий розвиток кореневої системи робить регенеранти малоприсадними для ви-

1. Вплив ДДКагоду на ініціацію стебло- і різогенезу у мікроживців хмелю в культурі *in vitro*

| № | Сорт | Середовища з агар-агаром | | Середовища з ДДКагодом | |
|---|-----------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | | Початок стеблогенезу (доба) | Початок різогенезу (доба) | Початок стеблогенезу (доба) | Початок різогенезу (доба) |
| 1 | Альга | 5–7 | 9–10 | 7–10 | 12–15 |
| 2 | Слов'янка | 4–5 | 8–9 | 7–8 | 10–14 |
| 3 | Заграва | 5–6 | 8–10 | 7–9 | 12–16 |
| 4 | Промінь | 5–7 | 8–12 | 9–10 | 15–18 |

2. Вплив ДДКамоду на розвиток регенерантів хмелю у культурі *in vitro*

| Середовища | Термін, міс. | Вага рослин, мг | Вага коренів, мг | Кількість коренів, шт. |
|------------|--------------|-----------------|------------------|------------------------|
| Агар-агар | 1,5 | 0,212±0,06 | 0,056±0,01 | 7,6±1,1 |
| | 3,0 | 0,321±0,07 | 0,120±0,08 | 8,0±1,1 |
| | 5,0 | 0,427±0,17 | 0,180±0,06 | 8,2±1,4 |
| ДДКагод | 1,5 | 0,110±0,04 | 0,025±0,01 | 5,9±1,2 |
| | 3,0 | 0,208±0,08 | 0,073±0,01 | 6,4±1,3 |
| | 5,0 | 0,402±0,11 | 0,152±0,05 | 7.1±1,4 |

саджування їх у ґрунт. Стебло ж регенерантів, вирощених на середовищах з ДДКамодом майже не відрізнялось від стебла регенерантів, вирощених на агар-агарі, що давало можливість з успіхом використовувати їх для мікроклонального розмноження на перших пасажах і лише на етапі, коли потребувалось висаджування мікросаджанців у ґрунт застосовували середовища з агар-агаром.

При більш тривалому культивуванні регенеранти на середовищах з ДДКамодом поступово доганяли в розвитку регенеранти, які культивували на звичайному середовищі, так, що через п'ять місяців загальна вага їх не відрізнялась від ваги регенерантів, вирощених на агарі, а вага коренів була лише незначно меншою. Певно, що це відбувалось внаслідок того, що регенеранти на середовищі з агар-агаром вже після двох місяців культивування поступово знижували темпи росту, а до кінця п'ятого місяця ріст їх повністю припинявся, вони мали напівжовте листя і багато повітряних коренів. Швидкий розвиток регенерантів у перші місяці призводив до швидкого виснаження і підсихання середовища, на якому вони культивувались. У той же час,

у регенерантів на середовищі з ДДКамодом наприкінці п'ятого місяця культивування хоч і відмічалося гальмування ростових процесів, але вони ще подовжували розвиток і мали здорове зелене листя. Повне припинення їх розвитку спостерігалось тільки після 7–8 міс. культивування, тобто на два — три місяці пізніше, ніж у варіанті з агар-агаром. Якщо мікроживці хмелю висаджувались на середовища з ДДКамодом і культивувались при температурі на 5–6° нижчою, ніж передбачено технологією, то термін їх культивування на одному середовищі подовжувався удвічі.

Таким чином, використання модифікованого крохмалю ДДКагод в якості гелеутворювального компонента поживних середовищ для культивування регенерантів хмелю сприяє подовженню терміну їх культивування. Ця особливість середовищ з ДДКамодом є важливим аргументом для використання їх при створенні колекції сортів хмелю *in vitro*, коли подовження терміну культивування рослин на одному середовищі призводить до відповідного скорочення матеріальних і трудових витрат.

ВИСНОВКИ

Виходячи з результатів проведених досліджень, можна зробити висновок, що використання модифікованого крохмалю ДДКагод в якості гелеутворювального компонента поживних середовищ для культивування регене-

рантів хмелю сприяє подовженню терміну їх культивування, зменшує собівартість середовища і може бути рекомендовано для використання при створенні колекції *in vitro* і на перших етапах мікроклонального розмноження.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Probasko E.G. The use shoot — tip culture to eliminate viruses from hop varieties grown in the Unites States. / E.G. Probasko, S.Vinslow // Technical quarterly — Master, 1986. — V. 23. — № 1. — P. 26–29.
2. Кормільцев Б.Ф. Біотехнологічні прийоми розмноження і оздоровлення сортів хмелю селек-

- ції інституту сільського господарства Полісся / Б.Ф. Кормільцев // Сімферополь. Суч. стан та перспективи розв. насін. В Україні, 2008. — Вип. 107. — С. 148–150.
3. Мельничук М.Д. Технологія отримання морфогенного калюсу хмелю гірких сортів на безвірусній основі *in vitro* / М.Д. Мельничук, А.Н. Ключ

- ваденко, К.П. Михайличенко // Аграрна наука і освіта. — 2003. — Т. 4, № 24. — С. 15–21.
4. Svoboda P. Diagnostika viro ve slechtitel'skev materialu chmele / P. Svoboda — Zatec. 1994. — 23 s.
 5. Кормільцев Б.Ф. Ефективність мікроклонального методу при розмноженні хмелю *in vitro* / Б.Ф. Кормільцев // Хмелярство. — Броди: Промсвіт, 2006. — Вип. 23. — С. 38–44.
 6. Деклараційний патент на винахід 52031, Україна, МПК 7, C08B31/02, A01N57/00, A01N59/00, A01C1/06. Спосіб отримання полімерних матеріалів / П.Г. Дульнев, С.І. Кондратенко, Т.В. Чернищенко, В.П. Мірошниченко, Т.В. Івченко, С.А. Гончарова. — Опубл. 16.12.02. Бюл. № 12.
 7. Гончарова С.А. Вивчення впливу заміників агар-агару на гідратацію тканин у рослин-регенерантів колекційних сортотипів огірка / С.А. Гончарова // Генетичні ресурси рослин. — 2004. — № 1. — С. 47–50.
 8. Кондратенко С.И., Івченко Т.В., Чернышенко Т.В., Дульнев П.Г. Особенности физиологического действия заменителей агар-агара в опытах по выращиванию *in vitro* двулетних овощных культур // Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений: Тез. междунар. конф. молодых ученых. — Харьков. — 2001. — С. 30.
 9. Білінська О.В. Вплив гелеутворюючих і поживних вуглеводних компонентів живильного середовища на індукцію гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro* / О.В. Білінська // Науковий вісник національного аграрного університету. Серія Біологія. — 2009. — Вип. 1. — С. 91–98.
 10. Белинская Е.В. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* / Е.В. Белинская, П.Г. Дульнев // Физиология и биохимия культурных растений. — 2007. — Т. 39, № 2. — С. 136–143.
 11. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии культурных растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. — К.: Наукова думка, 1980. — 488 с.
 12. Патент № 92168. 2010. Україна. МПК (2009) A01N4/00 C12N5/04. Б.Ф. Кормільцев, Л.П. Бадамшина, М.Г. Левчук. Спосіб мікроклонального розмноження регенерантів хмелю, вирощених з апексів *in vitro* / Заявник і патентоутримувач Інститут с.-г. Полісся. Заявка 25.10.2007. Дата публікації 10.06.2008, бюл. № 11.

ЛЮПИН ВУЗЬКОЛИСТИЙ ПЕРЕМОЖЕЦЬ

Розробник — Інститут сільського господарства Полісся НААН.

Автори — Ратошнюк В.І., Ратошнюк І.Ю.

Цикл розвитку: ярий.

Сорт зареєстровано від: 2013 р.

Група стиглості — середньостиглий.

Напрямок використання — зерновий.

Рекомендовані зони вирощування: Полісся, Лісостеп.

Агрономічні та технологічні показники.

Рослина з детермінантним типом росту та підвищеною насінневою продуктивністю завдяки відсутності явища гетерогамії і формуванню підвищеної кількості бобів на головному стеблі.

Квітка: забарвлення кінчика човника — синьо-чорне.

Зерно: основне забарвлення (в стадії повної стиглості) — біле. Орнаментация — наявна (крапчастість насіння локалізована по колу, де насіння розділяється на сім'ядолі). Гірка речовина — відсутня.

Вегетаційний період до дозрівання зеленої маси (I укіс) — 89–91 днів.

Урожайність зеленої (сухої) маси — 225 (4,8) ц/га. Урожайність насіння — 15 ц/га.

Стійкість до посухи — 3 бали, стійкість до полягання — 5 балів, стійкість до осипання — 5 балів. Ураження фузаріозом — 1%.

Вміст білка в зерні — 24,5%, вміст жиру, — 7,35%, вміст алкалоїдів в зерні — 0,008%, вміст алкалоїдів в зеленій масі — 0,005%.

За додатковою інформацією можна звертатися за адресою:

ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ПОЛІССЯ НААН.

10007, м. Житомир, Київське шосе, 131. Тел. (0412) 48–62–31,

Ратошнюк В.І., Ратошнюк І.Ю.