

А. О. Глибовець,
С. О. Лашук,
Л. М. Мазурець
 Український інститут експертизи
 сортів рослин

УДК: 633.791:631.526.3

Вплив стерилізуючих агентів, регуляторів росту, вуглеводів і гелюючих агентів на регенерацію повноцінних рослин хмелю при мікроклональному розмноженні*

Розглянуто питання розроблення технологій клонального мікророзмноження на безвірусній основі цінних і перспективних гірких сортів хмелю та вивчення морфогенетичних потенціалів різних клітин, тканин та органів хмелю в умовах культури in vitro.

Ключові слова:

хміль звичайний, клональне мікророзмноження, живильне середовище, рослина-регенерант, вуглеводи, агар, калюс.

В Україні хміль почали вирощувати у промислових масштабах з ХІХ століття. У 70–80 роки ХХ століття хмелярство досягло піку, цією культурою було засаджено 10 тис. га, а валовий збір досяг 8 тис. тонн, що повністю задовольняло потреби Держави. Але на початку 1990-х років посівні площі, та й саме виробництво хмелю, різко скоротилося.

Однією з проблем при вирощуванні хмелю є вірусні хвороби, які значно знижують і погіршують якість сировини. Система заходів, спрямованих на оздоровлення посадкового матеріалу хмелю, базується на методах in vitro зокрема і методу мікроклонального розмноження (МКР). Мікроклональне розмноження – масове безстатеве розмноження, при якому отримані рослини ідентичні до вихідної батьківської форми [1].

У цілому метод МКР ґрунтується на індукованому цитокінінами розростанні верхівкових і пазушних меристем, кожна з яких дає початок багатьом пагонам. Швидкість МКР варіює залежно від виду рослини,

але часто можна отримати з єдиної бруньки декілька мільйонів рослин за рік. При цьому треба вивчити вплив факторів, які впливають на процес мікроклонального розмноження, зокрема типу експлантату, складу живильних середовищ та умов культивування.

Мета роботи – встановлення впливу стерилізуючих агентів, регуляторів росту, вуглеводів та гелюючих агентів на регенерацію повноцінних, стерильних рослин хмелю при мікроклональному розмноженні.

Об'єкт дослідження – сорт хмелю Слов'янка, який занесений до Державного реєстру сортів рослин. Оригіном сорту є Інститут хмелярства Національної академії аграрних наук України [2]. Дослідження проводили в лабораторії біотехнології оздоровлення і мікроклонального розмноження рослин на базі Інституту садівництва НААН.

Методика досліджень. Для отримання здорових експлантатів хмелю використовували живильне середовище Мурасіре-Скуга (МС).

Приготування поживних середовищ проводилось з використанням традиційних методик, прийнятих у роботах по культурі тканин [3] (табл. 1).

Стерилізацію матеріалу проводили наступним чином: експлантати промивали проточною водою протягом 1 год., потім стерилізували в 25% розчині гідрохлориду натрію та в 0,1% HgCl₂ (сулеми) з різною тривалістю часу. (табл. 2).

Таблиця 1

Склад живильного середовища

Макро МС	50 мл
Мікро МС	1 мл
CaCl ₂	10 мл
Na ₂ Fe ЕДТА	40 мг
Тіамін HCl ₂ (B ₁)	1 мл
Піридоксин HCl ₂ (B ₆)	0,5 мл
PP	0,5 мл
Адемінсульфат	40 мг
Мезоінозит	100 мг
БАП	0,5 мл
ІОК	0,1 мл
Глюкоза	30 г/л
Агар	7 г
pH	5,6–5,8

* Керівник роботи: Медведєва Т. В. ст. наук. співробітн. (ІС) НААН

Вплив стерилізуючих агентів, регуляторів росту, вуглеводів і гелюючих агентів на регенерацію повноцінних рослин хмелю при мікроклональному розмноженні

Культури тканин і органів *in vitro* потребують введення у середовище екзогенних регуляторів росту і морфогенезу рослин. Як правило, це синтетичні аналоги ауксинів і цитокінінів, гібереліни і абцисова кислота природного походження (таб. 3).

Після 2–3 тижнів культивовані експлантати перенесли на рідке живильне середовище того ж складу, але лише з вмістом бензиламінопурину (БАП) (0,5 мг/л). На цьому середовищі через 10 днів почалося інтенсивне утворення пагонів. Пасажування (перенесення) на свіже середовище проводили через кожні два тижні. Сформовані пагони відокремлювали із проліферуючих експлантатів та пересаджували в окремі пробірки на тверде середовище МС з низькими концентраціями індолилоцтової кислоти (ІОК) (0,1 мг/л) для вкорінення [4, 5].

Результати досліджень. Одним з головних факторів, що зумовлює успіх МКР, є підбір живильного середовища. Основу всіх середовищ складають мінеральні солі, які містять необхідні для росту рослин макро- і мікроелементи. Крім того, до їхнього складу входять амінокислоти, фізіологічно активні речовини, вітаміни тощо [6].

Досліди з добору оптимальних середовищ для інтенсифікації регенераційних процесів у апексі хмелю показали, що з цілої низки агаризованих або рідких середовищ найкращим є тверде середовище Мурасіге-Скуге (МС).

Для введення в культуру *in vitro* в якості первинного експлантату використовували апікальні (пазушні) бруньки здорових рослин хмелю (рис. 1).

Основною умовою одержання калюсних культур є додержання стерильності. Для цього використовували 70% розчин спирту, розчин гідрохлориду натрію 25% та 0,1% розчин HgCl₂.

У наших дослідженнях найкращі результати одержали при викорис-

Таблиця 2
Вплив стерилізуючих речовин на вихід стерильного матеріалу

Стерилізуючі речовини	Кількість експлантатів шт.	Тривалість стерилізації хв.	Вихід стерильних експлантатів %
70% спирт 0,1% HgCl ₂	50	1 5	83
Гідрохлорид натрію 25% 1:2 0,1% HgCl ₂	50	10 1,5	89
Гідрохлорид натрію 25% 1:3 0,1% HgCl ₂	50	20 2	90
Гідрохлорид натрію 25%	50	20	48
0,1% HgCl ₂	50	2	94
70% спирт	50	5	73

Таблиця 3
Вплив концентрації регуляторів росту на регенерацію повноцінних рослин

Концентрація БАП	Кількість експлантатів, шт.	% регенерації	Параметри проліферації	
			кількість листків	довжина пагона, см.
МС 0 мг/л БАП	50	12	2–3	2,0
0,5 мг/л БАП +0.1 мг/л ГК	50	51	8–10	7,3
0,7 мг/л БАП +0.1 мг/л ГК	50	48	5–9	6,8
1,0 мг/л БАП +0.1 мг/л ГК	50	39	5–7	6,2
1,5 мг/л БАП+0.1 мг/л ГК	50	24	3–4	5,7

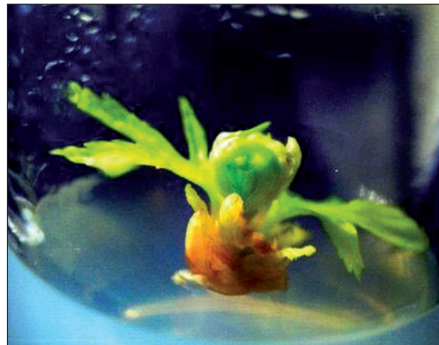


Рис. 1. Апікальні бруньки рослин хмелю.

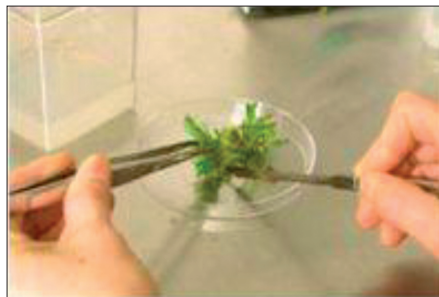


Рис. 2. Регенерація експлантатів з утворенням листків та пагонів.

танні 0,1% HgCl₂ (94% стерильних експлантатів) і гідрохлориду Na 25% 1:3 і 1:2 з додаванням 0,1% HgCl₂ та 89%. Стерильні експлантати висаджували на живильне середовище МС [7].



Рис. 3. Рослини хмелю на живильному середовищі із використанням глюкози.

Отримані стерильні пазушні бруньки поміщали в колби Ерленмейєра з 5 мл рідкого поживного середовища МС з різною концентрацією БАП і гіберелової кислоти (ГК), у світлову культуральну кімнату, в якій протягом певного часу (2–3 тижнів) проводились спостереження.

Вже на 11 день був помітний розвиток експлантатів, формування пагонів. Особливо помітно це було на середовищі, в якому вміст БАП становив 0,5 мг/л та 0,1 мг/л ГК. У результаті досліджень (на 21 день) було встановлено, що саме концентрація

Таблиця 4

Вплив вуглеводів на ріст рослин-регенерантів

Вуглеводи	Кількість експлантатів, шт.	Довжина пагонів, см	Кількість листків, шт.	Кількість коренів, шт.	Довжина коренів, см
Глюкоза	30	8,0 ± 1,2	10,2±0,5	7,7±0,4	1,8±0,3
Сахароза	30	6,0 ± 0,8	8,4±0,3	5,1±0,3	1,5±0,2

Таблиця 5

Вплив гелюючих агентів на ріст рослин – регенерантів

Назва агенту	Концентрація г/л	Кількість рослин-регенерантів, шт.	Довжина пагонів, см.	Кількість листків, шт.	Число вкорінених експлантатів шт.
Фітогель	2	20	3,4	3,5±0,15	10
Желріт	2	20	5,6	5,1±0,17	13
Желріт + агар	1,25+3	20	6,9	6,4±0,21	15
Агар	8	20	8,9	8,2±0,32	20

БАП 0,5 мг/л та вміст ГК 0.1мг/л стимулювали утворення 51% регенерації з найбільшим утворенням листків та довжини пагонів (рис. 2).

Для росту в культурі *in vitro* ізольованих органів, тканин або клітин до складу середовища включають джерела вуглеводів (табл. 4)

Для більшості культур тканин з метою інтенсивного росту та розвитку експлантатів використовують сахарозу. Проте для хмелю кращий ріст *in vitro* спостерігався при використанні глюкози (рис. 3).

Отримані результати свідчать про те, що використання глюкози в поживних середовищах сприяє розвитку регенерантів, зокрема їх росту та кількості.

Для вивчення впливу гелюючого агенту використали наступні речовини: фітогель, желріт, агар та суміш желріту та агару (таб. 5).

Дослідження показали, що фітогель виявився негативним гелеутворюючим агентом для середовища. При його використанні регенеранти мали найменшу довжину пагонів

і кількість листків. Дещо кращим агентом був желріт, при використанні якого довжина пагонів та кількість листків регенерантів була дещо більшою. Найкращим гелеутворюючим компонентом виявився агар. Середня довжина пагонів на агарі складала 8,9 см, середня кількість листків – 8,2 шт., число укорінених експлантатів сягло 20 шт.

Висновки та пропозиції. Методика мікроклонального розмноження гарантує отримання високоякісних безвірусних живців хмелю із генетично цінними ознаками. Для одержання стерильного матеріалу з високою регенераційною здатністю необхідно використовувати стерилізуючий агент 0,1% HgCl₂, а найвищу регенерацію експлантатів можна забезпечити, використовуючи регулятор росту БАП у концентрації 0,5 мг/л з додаванням 0,1 мг/л ГК. Найбільше число укорінених експлантатів одержали при використанні гелюючого агенту агару з глюкозою – найкращим джерелом вуглеводів для росту та розвитку експлантатів.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Бойко, А. Л. Вирусы и вирусные болезни хмеля, способы борьбы с ними / А. Л. Бойко, Г. С. Литвинов, Е. А. Кондратюк, С.А. Ромашов [и др.] // Хмелеводство, 1983. – № 12. – С. 31–35.
2. Державний реєстр сортів рослин придатних до поширення в Україні (витяг станом на 01.03.2010). – К.: ТОВ «Алефа», 2010. – 245 с.
3. Калинин, Ф. Л. Методы культуры тканей физиологии и биохимии растений. / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. Кушнір, Г. П. Мікроклональне розмноження рослин / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – К.: Наукова думка, 2005. – 242 с.
5. Кормильцев, Б. Ф. Використання методу культури апікальних меристем для оздоровлення хмелю від деяких вірусів / Б. Ф. Кормильцев, А. Л. Бойко // Хмелярство. – 1992. – Вип. 14. – С. 20–23.
6. Мельничук, М. Д. Біотехнологічний процес одержання рослин хмелю на безвірусній основі: Доповіді НАН України / М. Д. Мельничук, О. Є. Кріпкий [та ін.]. – 1996. – № 98. – С. 139–141.
7. Мельничук, М. Д. Отримання безвірусного посадкового матеріалу хмелю (*Humulus lupulus*) в умовах *in vitro*: Науковий вісник НАУ / М. Д. Мельничук, О. Є. Кріпкий [та ін.]. – К.: Ірена, 2000. – Вип. 29. – С. 47–52.