

УДК 633.791:632.953.2

**В.Б. Ковальов,**  
доктор сільсько-  
господарських наук

**Т.І. Козлик,**  
кандидат сільсько-  
господарських наук

**Б.Ф. Кормільцев,**  
кандидат біологічних наук

Інститут сільського  
господарства Полісся НААН

## ВПЛИВ СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩ У ПОЄДНАННІ З ПРОТИВІРУСНИМИ ПРЕПАРАТАМИ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ РІЗНИХ СОРТІВ ХМЕЛЮ ТА НАЯВНІСТЬ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Наведено результати досліджень впливу протівірусних препаратів на регенерацію рослин хмелю культури *in vitro* та наявність в них вірусної інфекції. Встановлено, що регенерація мікроживців хмелю в умовах *in vitro* залежить від концентрації і виду протівірусних препаратів у складі середовища та від сортових особливостей рослиного матеріалу, який розмножується. Інтенсивність коренетворення у регенерантів хмелю найкраще проходить при застосуванні протівірусного препарату Аміксин, зокрема кількість сформованих коренів збільшується до 8–10 проти 6–7 у контрольному варіанті.

**Ключові слова:** хміль, мікроклональне розмноження, середовище, регенерація, протівірусні препарати, вірусні хвороби.

Відомо, що вірусні хвороби наносять значну шкоду сільськогосподарським культурам. Вражаючи хміль, вони пригнічують розвиток рослин, знижують врожайність і зменшують вміст гірких речовин у шишках [1, 2].

Найбільш поширеними вірусними хворобами у біоценозах України є вірус скручування листя хмелю (*Hop latent virus*) з групи *carlavirus* та деякі форми мозаїчних захворювань, збудниками яких є віруси, які відносяться до груп *ilarvirus* і *nepovirus* [3, 4]. Уражена вірусами доросла рослина вже не може одужати. Традиційні методи боротьби з хворобами на плантаціях можуть тільки загальмувати розвиток захворювання і тимчасово зняти симптоми. Тому основним напрямком оздоровлення хмелеплантацій є засадження їх здоровим посадковим матеріалом. У зв'язку з цим вимоги до посадкового матеріалу в світі постійно зростають і нині у більшості країн засадження нових плантацій здійснюється тільки здоровим рослинним матеріалом.

Для одержання здорового садивного матеріалу хмелю було розроблено методи апікальних меристем та термотерапії. Застосування цих методів дало можливість повністю звільнити рослини хмелю від ряду вірусів [5–9]. Найкращі результати оздоровлення отримуються при комплексному застосуванні обох методів [10].

Проте ці методи є доволі тривалими і витратними. В останні роки з'явилося ряд антивірусних препаратів широкого спектра дії.

Випробування цих препаратів у культурі *in vitro* для боротьби з вірусними хворобами деяких кісточкових культур та картоплі показало перспективність їх застосування у технологіях оздоровлення посадкового матеріалу [11, 12].

**Метою роботи** було визначити ефективність дії препаратів Аміксин і Ацикловір на елімінацію вірусів скручування листя хмелю (ВСЛХ), мозаїки хмелю (ВМХ) у культурі *in vitro* та їх вплив на регенерацію мікроживців.

**Методика досліджень.** Об'єктом досліджень були процеси росту та розвитку регенерантів хмелю при мікроклональному розмноженні.

Дослідження по вивченню 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 р.

Схема досліду з вивчення впливу протівірусних препаратів на регенерацію хмелю у культурі *in vitro* включала варіанти з різними концентраціями протівірусних препаратів Аміксин та Ацикловір:

1. Контроль — поживне середовище на основі Мурасіга-Скуга.
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 противірусних препаратів на регенераційні процеси регенерантів використовували загальноприйняті методики, які затверджені в Інституті, а також діючі нормативні документи, ДСТУ.

Усі операції проводили в умовах абсолютної антисептики. Для стерилізації поживних середовищ використовували автоклави ВК-75. Стерилізацію середовищ проводили при додатковому тиску 1 атм. протягом 20 хв, посуд та інструменти, стерилізували у сушильних шафах при температурі 160°C.

Експланти висаджували на середовища М.С. з додаванням глюкози — 25 г/л, агар-агару — 6 г/л та ІОК і кінетин залежно від сорту.

Маніпуляції з культурами проводили в ламінарних боксах — КІПГ-1. Регенерацію експлантів проводили у культуральних кімнатах при температурі 25±1°C, 16-годинному світловому періоді і освітленні 3000 люкс. Результати знімали після півтора місяця культивування.

Для ідентифікації вірусних хвороб використовували серологічний метод. Для проведення аналізу з листя рослини виділяли сік, який очищували від білкових домішок методом диференційного центрифугування.

Після очищення відбирали краплину соку, наносили її на предметне скло, додавали рівну кількість розчину вірус специфічних антитіл і витримували у термостаті протягом 1–2 год при t 24–26°C, після чого проглядали результати реакції під біокуляром МБЦ-9.

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

**Результати досліджень.** Додавання противірусних препаратів до складу живильних середовищ мало чітко виражений вплив на регенераційні процеси рослин хмелю. Ріст і розвиток мікроживців хмелю сортів Промінь, Заграва, Кумир посилювався на живильному середовищі з додаванням противірусного препарату Ацикловір проти варіантів, де у поживне середовище додавали препарат Аміксин.

Відсоток приживленості у досліді був у межах 40–100% залежно від сорту хмелю.

Так, приживлюваність мікроживців сорту хмелю Промінь за застосування 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 приживлення на варіантах із застосуванням противірусних препаратів було в межах 40–97%.

Вплив препаратів на процес коренотворення також мав місце. Додавання до живильного середовища противірусного препарату Аміксину 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%. Збільшення концентрації противірусного препарату Ацикловір до 0,1% спричинило зменшення кількості корінчиків у порівнянні з контрольним варіантом на 48%.

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

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

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

## 1. Вплив протівірусних препаратів на коренетворення регенерантів хмелю

№ п/п	Варіанти (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
<i>Аміксин</i>							
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
<i>Ацикловір</i>							
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

Як і за показниками кількості пагонів, кількості 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 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 хме-

лю у висоту. Цей показник в залежності 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.

Результати впливу протівірусних 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 протівірусних препаратів чіткої залежності їх впливу на показник висоти рослин не відзначалось.

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

## 2. Вплив протівірусних препаратів на висоту регенерантів хмелю

№ п/п	Варіанти (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
<i>Аміксин</i>							
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
<i>Ацикловір</i>							
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

### 3. Результати серологічного аналізу рослин хмелю на наявність вірусної інфекції за застосування противірусного препарату Аміксин

Сорт	Концентрація Аміксину, %	ВСЛХ			ВМХ	
		1:100	1:200	1:400	1:100	1:200
Промінь	0,0 — контроль	0/16	0/16	1/16	1/16	0/16
	0,01	1/16	2/16	3/16	3/16	2/16
	0,05	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16
	0,10	—	—	—	—	—
Заграва	0,0 — контроль	0/16	0/16	0/16	2/16	1/16
	0,01	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16
	0,05	1/16	0/16	0/16	1/16	0/16
	0,10	—	—	—	—	—
Кумир	0,0 — контроль	1/16	0/16	3/16	0/16	0/16
	0,01	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16
	0,05	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16
	0,10	—	—	—	—	—

Примітка. 0–3/16 — кількість заражених зразків з 16.

Проведений серологічний аналіз на вірус скручування листя хмелю (ВСЛХ) та вірус мозаїки хмелю (ВМХ) показав відсутність вірусної інфекції у більшості досліджуваних зразків. Чітко виражена реакція була виявлена лише у поодинокі виявлених регенерантів хмелю. У переважній більшості досліджуваних сортів вірусна інфекція була повністю відсутньою. Так, у сорту Промінь, за даними серологічного аналізу лише варіант із застосуванням Аміксину у концентрації 0,01% мав виражену реакцію на ВСЛХ та ВМХ (табл. 3).

Результати серологічного аналізу, проведені на рослинах сорту Заграва за застосування противірусного препарату Ацикловіру показали, що регенеранти хмелю були практично вільні від вірусів скручування листя та мозаїки хмелю (табл. 4). Відібрані зразки мали поодинокі не чітко виражену реакцію на буферні розчини. Схожі результати аналізів на наявність вірусів було отримано і за дослідження сорту хмелю Кумир.

При аналізі отриманих даних, проведених серологічних досліджень на контрольних варіантах — поживне середовище без додавання противірусних препаратів — відмічено низьку концентрацію вірусної інфекції на усіх сортах хмелю.

Результатами серологічних аналізів визначено, що досліджувані рослини на середовищах з використанням противірусних препаратів, оздоровлюються від вірусів скручування

### 4. Результати серологічного аналізу рослин хмелю на наявність вірусної інфекції за застосування противірусного препарату Ацикловір

Сорт	Концентрація Ацикловіру, %	ВСЛХ			ВМХ	
		1:100	1:200	1:400	1:100	1:200
Промінь	0,0 — контроль	0/16	0/16	1/16	1/16	0/16
	0,02	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16
	0,05	0/16	0/16	2/16	0/16	0/16
	0,10	0/16	1/16	0/16	0/16	0/16
Заграва	0,0 — контроль	0/16	0/16	0/16	2/16	1/16
	0,02	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16
	0,05	0/16	0/16	0/16	0/16	1/16
	0,10	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16
Кумир	0,0 — контроль	1/16	0/16	3/16	0/16	0/16
	0,02	1/16	0/16	0/16	0/16	0/16
	0,05	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16
	0,10	0/16	0/16	0/16	1/16	1/16

Примітка. 0–3/16 — кількість заражених зразків з 16.

листя хмелю (ВСЛХ) та мозаїки хмелю (ВМХ). Відсоток ураження розсадного матеріалу у культурі *in vitro* вірусами знаходиться набагато нижче допустимого рівня. Усі досліджені

сорти хмелю знаходились у належному стані і були придатними до подальшого розмноження і одержання елітного посадкового матеріалу.

## ВИСНОВКИ

Таким чином, за результатами досліджень визначено оптимальні концентрації протівірусних препаратів Аміксину та Ацикловіру для їх застосування в поживних середовищах при оздоровленні та вирощуванні регенерантів хмелю.

Встановлено, що регенерація мікроживців хмелю в умовах *in vitro* залежить від концентрації і виду протівірусних препаратів у складі середовища та від сортових особливостей рослинного матеріалу, який розмножується. Розвиток надземної час-

тини регенерантів хмелю різних сортів на середовищах з використанням протівірусних препаратів проходить менш інтенсивно ніж на звичайних середовищах, але при цьому підвищуються фітосанітарні кондиції рослин.

Інтенсивність коренетворення у регенерантів хмелю найкраще проходить при застосуванні протівірусного препарату Аміксин, зокрема кількість сформованих коренів збільшується на 33–43% проти контрольного варіанта.

## БІБЛІОГРАФІЯ

1. Бойко А.Л. Вирусы и вирусные заболевания хмеля и розы эфиромасличной / А.Л. Бойко. — К.: Наукова думка, 1976. — 76 с.
2. Кормильцев Б.Ф. Вредоносность и распространность вирусных болезней хмеля на маточниках / Б.Ф. Кормильцев, В.Д. Полищук, Л.П. Бадамшина, Н.Л. Бут // Хмелеводство. — 1984. — № 6. — С. 31–36.
3. Бойко А.Л. Экология вирусов растений / А.Л. Бойко. — К.: Выща школа, 1990. — 166 с.
4. Svoboda P. Diagnostika virů ve šlechtitelském materiálu a možnosti jeho ozdravení: autoreferat kandidátske disertační práce: 41–03–09 Zemědělská a lesnická fytopatologie a ochrana rostlin / P. Svoboda Žatec, 1994. — 27 s.
5. Adams A.N. Elimination of viruses the hop (*Humulus lupulus*) by heat therapy and meristem culture / A.N. Adams // J. Hort. Sci. — 1975. — Vol. 50, № 4. — P. 151–160.
6. Попов В.И. Условия культивирования изолированных апексов хмеля для клонального микроразмножения / В.И. Попов, В.А. Высоцкий, И.М. Туктагулов // Физиология растений. — 1985. — Т. 32, Вып. 6. — С. 1191–1196.
7. Svoboda P. Kultivace izolovaných vrcholů chmele (*Humulus lupulus*) *in vitro* / P. Svoboda // Viroba. — 1992. — № 38. — S. 523–528.
8. Rigr A. Vysledky tepelne inaktivace viru chmele / A. Rigr // Vyzk. Zprava. — 1979. — S. 1–57.
9. Кормильцев Б.Ф. Використання термотерапії для одержання садивного матеріалу хмелю без вірусних хвороб / Б.Ф. Кормильцев // Хмелярство. — 1996. — № 18. — С. 8–12.
10. Кормильцев Б.Ф. Використання методу культури апікальних меристем для оздоровлення хмелю від деяких вірусів / Б.Ф. Кормильцев, А.Л. Бойко, Л.Т. Горшкова // Хмелярство. — 1992. — № 14. — С. 20–22.
11. Митрофанова О.В. Биотехнологические системы оздоровления косточковых культур и получения безвирусного посадочного материала / О.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко, С.Н. Чирков и др. // Фактори експериментальної еволюції організмів. — 2008. — № 5. — С. 410–415.
12. Слободян К.А. Оздоровлення картоплі від вірусних хвороб з використанням методу хіміотерапії / К.А. Слободян, Т.М. Олійник, С.О. Слободян // Генوم рослин. — 2008. — С. 219–222.