



Національна академія аграрних наук України
Інститут сільського господарства Полісся



ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У СЕЛЕКЦІЙНОМУ ПРОЦЕСІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО

Методичні рекомендації



Житомир – 2020

УДК 633.791: 57.085.2

ББК 42+28.57

B21

B21 Використання біотехнологічних методів у селекційному процесі хмелю звичайного : методичні рекомендації / уклад.: І.П. Штанько, Т.І. Козлик, І.А. Джус, О.Л. Дзядович, Т.А. Штанько, Н.О. Бражевська. Ін-т с/г Полісся НААН. // – Житомир, ПП «Рута», 2020. – 32 с.

Методичні рекомендації розроблені на основі узагальнення та систематизації фундаментальних наукових досліджень з питань використання біотехнологічних методів в селекції хмелю звичайного (*Humulus lupulus L.*). В рекомендаціях викладені основні методичні підходи до створення колекцій селекційних клонів та чоловічих форм в асептичних умовах та деталізовані технології розмноження селекційних форм в культурі *in vitro* та отримання біотехнологічними методами нових цінних генотипів хмелю.

Методичні рекомендації «Використання біотехнологічних методів у селекційному процесі хмелю звичайного» призначені для спеціалістів у галузі селекції і біотехнології рослин, фахівців науково-дослідних установ, викладачів, аспірантів та студентів закладів вищої освіти III-IV рівня акредитації сільськогосподарського профілю.

Методичні рекомендації розробили наукові співробітники Інституту сільського господарства Полісся НААН:

Штанько Ігор Павлович, кандидат сільськогосподарських наук;

Козлик Тетяна Іванівна, кандидат сільськогосподарських наук, с.н.с.;

Джус Ірина Андріївна;

Дзядович Ольга Леонідівна;

Штанько Тетяна Антонівна;

Бражевська Наталія Олександрівна.

Рецензенти:

Ковальов В.Б., доктор с.-г. наук, професор, завідувач кафедри технології зберігання та переробки продукції Поліського національного університету

Юрківський Й.М., кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник відділу біохімії хмелю та пива і біотехнології Інституту сільського господарства Полісся НААН

Рекомендовано до друку:

Координаційно-методичною радою ПНД 9 НААН «Хміль»

від 6.07.2020 року (протокол № 3)

Вченою радою Інституту сільського господарства Полісся НААН

від 18.09.2020 року (протокол № 10)

© Інститут сільського господарства Полісся НААН, 2020

© Штанько І.П., Венгер О.В. та ін., 2020

© ПП «Рута»

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1 ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ	7
2 ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА	10
2.1 Приготування маточних розчинів	10
2.2 Приготування живильного середовища	11
3 ПРОВЕДЕННЯ МАНІПУЛЯЦІЙ З РОСЛИННИМИ ОБ'ЄКТАМИ	
3.1 Відбір вихідного матеріалу та отримання стерильної культури	12
3.2 Створення колекцій <i>in vitro</i> цінних селекційних номерів (клонів) та чоловічих рослин хмелю	13
3.3 Одержання морфогенного калусу хмелю, вплив мутагенними сполуками на калус та індукція морфогенезу	17
3.4 Адаптація рослин хмелю з <i>in vitro</i> до умов відкритого ґрунту	22
4 МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ В СЕЛЕКЦІЙНОМУ ПРОЦЕСІ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ, СТВОРЕНОГО БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ	24
4.1 Оцінка вихідного селекційного матеріалу в умовах <i>in vivo</i>	24
4.2 Формування інформаційних баз даних для визначення фенотипової мінливості ознак рослин селекційних робочих колекцій хмелю	25
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	27

ВСТУП

Хміль звичайний (*Humulus lupulus L.*) є технічною культурою, яка з ХІХ століття традиційно вирощується у поліському регіоні України. Шишки хмелю використовуються у парфумерній, фармацевтичній і харчовій промисловості [1, 2], та все ж біля 90% хмелесировини у вигляді шишок, гранул та екстрактів використовується для на виробництво пива.

У 2020 р. розмір площ обробітку хмелю в світовому масштабі становить 62,188 тис. га, що на 0,8 тис. га більше ніж було у 2019 році. В 2020 році за оцінками Міжнародної конвенції виробників хмелепродукції (IHGC) очікується врожай близько 131,3 тис. тон шишок хмелю, що на 1% вище, ніж у 2019 році, валовий збір альфа–кислот становитиме близько 13,3 тис. тон. проти 13,2 у 2019 році. Впродовж останніх чотирьох років об'єми вирощуваного хмелю зросли у світі на 20,7% [3].

Вирощуванням хмелю у світі займаються майже 40 країн світу. 80% хмелю виробляється у США (24,9 тис. га) і Німеччині (20,7 тис. га). Окрім цих країн у десятку лідерів входять – Китай, Чехія, Великобританія, Польща, Австралія, Іспанія, Південна Африка і Нова Зеландія [4, 5].

В сортовій структурі насаджень 66,5% (41,4 тис. га) займають ароматичні сорти, решта – високосмольні сорти. Всього вирощується близько сотні комерційних сортів. Перевага віддається сортам хмелю, які відповідають визначеним критеріям: висока стабільна врожайність, стійкість до різного роду патогенів і несприятливих факторів довкілля, придатність до інтенсивних технологій вирощування, збирання, зберігання та переробки у ефективні хмелепродукти. Основними вимогами до хмелесировини є відповідність сортів високим пивоварним критеріям. Це – наявність в них необхідної кількості гірких речовин, зокрема, альфа– і бета–кислот, ефірної олії, біологічно–активних сполук – поліфенолів і ксантогумолу та певного співвідношення компонентів у складі цих груп речовин [6, 7].

Впродовж тривалих селекційних пошуків в сортах хмелю вдалося значно підняти врожайність, зріс вміст цінних компонентів в шишках. Якщо в 1900 році найкращі сорти ледь перевищували за врожайністю показник 1,5 т/га

і 4%–ий вміст альфа–кислот в шишках, то сучасні сорти здатні формувати врожайність 2,5–3,2 т/га та накопичувати більше 14–18% і навіть 21% (сорт Поларіс, ФРН) альфа–кислот. Даний напрям «супер–альфа» є одним з пріоритетних для хмелю.

В традиційних хмелярських регіонах (Чехія, Німеччина, Великобританія, Словенія, Польща, Україна), які за ґрунтово-кліматичними умовами є унікальними і найбільш придатними для вирощування високоякісних гатунків сировини продовжується селекція ароматичного хмелю.

В останні роки селекціонерами США, Німеччини, Австралії було створено низку нових сортів серії «смаковий хміль» (*Flavor Hops*) з особливими фруктовими відтінками для крафтового пивоваріння. Вони є новими на ринку хмелю, але за прогнозами їх частка буде поступово зростати [8, 9].

Виведення нових високопродуктивних сортів хмелю можливо тільки на основі широкого різноманіття вихідного селекційного матеріалу. Чим більшим різноманіттям вихідного матеріалу володіє селекціонер, тим більш значних результатів він може досягнути. В Інституті сільського господарства Полісся сформована робоча селекційна колекція, яка включає біля 1,5 тис. селекційних номерів хмелю і постійно поповнюється. Підтримання такої колекції в умовах польового банку *in vivo* потребує великих матеріальних та виробничих витрат.

Натомість, банк сортів і номерів хмелю звичайного культури *in vitro*, виконуючи такі ж самі завдання, що і колекційний розсадник, а тобто: тривале збереження генофонду і використання його у селекційній роботі та розсадництві, має ряд переваг [10, 11].

По перше, рослини у культурі *in vitro* легко і швидко відтворюються. Зазвичай, для їх повної регенерації необхідно півтора – два місяця, тоді, як у польових умовах цей процес займає два роки.

По друге, рослини, які утримуються в умовах *in vitro* знаходяться у постійних чітко регульованих умовах температури, освітлення та вологості повітря, тоді як рослини на плантації значно залежать від погодних умов і можуть загинути у разі вимерзання, вимокання, зневоднення тощо.

По третє, рослини на плантації наражаються на загрозу бути ураженими вірусними та іншими захворюваннями, тоді як у культуру *in vitro* вводять рослини, які пройшли курс оздоровлення після перевірки на відсутність хвороб, а у процесі їх зберігання перезараження рослин повністю виключено.

Метод апікальних меристем для виробництва оздоровлених рослин отримав значний розвиток в декількох головних наукових хмелярських центрах та лабораторіях, зокрема, його розробляли Gippert et al., (1974) [12] в Німеччині (Hull), Adams (1975) [13] у Великобританії, Kubo et al., (1975) [14] в Японії, Probasco end Winslow (1986) [15] в США. Нещодавно техніка оздоровлених меристем була використана для отримання оздоровлених безвірусних рослин в Чехії (Svoboda, 1992) [16] і Словаччині (Farago end Nestacova, 1998) [17]. Зокрема, в Словаччині, меристемна культура була успішно використана до десяти комерційних сортів хмелю на середовищі MS. Життєздатність культури після термотерапії була в середньому 65% (Farago end Nestacova, 1998 [18]). Починаючи з 1996 року, деякі сорти були висаджені з меристемної оздоровленої культури, що викликало істотне збільшення показників урожайності в наступні роки (наприклад, майже в два рази вміст альфа-кислот в шишках) (Farago et al., 2009 [19]). Розроблено ряд методик використання меристемної культури і в Україні [20–30].

У світовій селекційній практиці для прискорення її результативності широко використовують біотехнологічні методи, які дозволяють не тільки розмножувати та зберігати матеріали, створені традиційними методами, й отримувати нові форми на основі передових досягнень біотехнології. До таких методів відноситься клональне мікророзмноження, мутагенез та отримання протопластів у культурі *in vitro*, що дає можливість розмножувати, проводити маніпуляції з тканинами, калусом, окремими клітинами і отримувати нові генотипи (форми). Отримані вихідні матеріали можуть використовуватися селекціонерами при створенні нових сортів та гібридів хмелю звичайного. Розроблені методи дозволять значно скоротити селекційний процес.

1 ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Біотехнологічна лабораторія має бути укомплектована спеціальними приміщеннями і обладнанням. Для введення в культуру *in vitro* рослинного матеріалу (апикальні меристеми, калус) генотипів хмелю звичайного (селекційні форми – чоловічої та жіночої статі) та культивування культури пагонів необхідні лабораторні приміщення, які укомплектовані спеціальним обладнанням, зокрема:

1. Приміщення для миття посуду з системою підведення до глибоких раковин (мийок) із кислотостійкого матеріалу гарячої та холодної води та обладнане дистилятором води для ополіскування посуду, стелажми для сушіння посуду;

2. Лабораторна(–і) кімната(–и) для приготування стерильних живильних середовищ, забезпечена технічними, торзійними, і аналітичними терезами, рН–метром, ди– та бідистиляторами, холодильником для зберігання маточних розчинів і реактивів, електроплиткою, водяною банею, лабораторними столами, шафами і полицями для розміщення хімічних реактивів, приладів, для зберігання чистого посуду, мікроскопами з обладнанням для приготування мікропрепаратів тощо.

3. Приміщення для стерилізації живильного середовища, інструментів, посуду, яке оснащено горизонтальними чи вертикальними автоклавами, сушильними шафами з режимом роботи 150–180 °С; дистилятором, столами та полицями для розміщення простерилізованих предметів і, за можливості, стерилізатором.

4. Стерильне (асептичне) приміщення (бокс, операційна кімната) для ізоляції і пересадки культур, яке оснащено ламінар–боксами (II типу А або В, або III рівня біологічного захисту) і використовується для проведення стерильних робіт.

5. Світлові культуральні кімнати, які використовується для пророщування живців та вирощування ініціальних пагонів; для культивування ізольованих тканин рослин; для вирощування та адаптації рослин–регенерантів.

В цих кімнатах автоматично регулюється і підтримуються на постійному рівні температура 24 ± 2 °С, вологість повітря 70–80% (кондиційоване повітря), 16-годинний фотоперіод (автоматичні реле–регулятори часу освітлення (таймери)) – освітлення 3–4 тис. лк. (світлодіодні лампи, стрічки). Освітлення в кімнаті повинно бути боковим або верхнім. Кімната оснащена стелажами, які зручно розміщуються ярусами (один над другим). На стелажах встановлюють штативи з пробірками і колби (банки) з рослинним матеріалом, таким чином, щоб вони не затіняли одна другу.

6. Центрифужна кімната оснащена міні– та ультрацентрифугами для виділення білків і нуклеїнових кислот, розділення протопластів від клітинних оболонок, розділення пилових зерен на фракції тощо.

7. Темнова культуральна кімната з кондиційованим повітрям, температурою 24 ± 2 °С, відносною вологістю повітря 70–80%, оснащена установками ротаційного та шейкерного типу. Використовується для вирощування калусних культур та клітинних суспензій.

8. Лабораторне приміщення оснащують обладнанням, необхідним для біохімічних, гісто– і цитологічних та інших досліджень, пов’язаних з основними роботами з вирощування рослинних тканин.

Посуд, який використовують при роботі з асептичною культурою та культурою ізолюваних тканин має бути трьох груп:

1. Посуд для приготування і зберігання живильних середовищ.

Бутлі з темного скла на 10 і 5 л;

Колби Ерленмеєра на 5, 3, 2, 1, 0,5 л і 250 мл;

Колби плоскодонні на 5, 3, 2 л;

Колби мірні на 3, 2, 1, 0,5 л, 250, 100, 50, 25 мл;

Циліндри мірні на 2, 1, 0,5 л, 250, 100, 50, 25, 10, 5 мл;

Стакани хімічні на 1, 0,5 л, 350, 250, 200, 100 мл;

Піпетки градуйовані на 10, 5, 2, 1, 0,5 мл;

Мікропіпетки градуйовані (0,1–0,5 мл);

Автоматичні дозатори на 5, 2,5, 1, 0,5, 0,02, 0,005 мл.;

Фільтри Зейтца (металеві) або мембранні фільтри «Millipore», «Sartorius» для фільтрування термолабільних компонентів середовища;

Скляні палички різних розмірів;

Скляні лійки різних розмірів.

2. Посуд для вирощування ізолюваних тканин.

Колби Ерленмеєра або банки широкогорловинні на 1, 0.5 л, 250, 100 мл;

Пробірки біологічні розміром 23x200 мл, 23x150 мл, 40x150 мл;

Чашки Петрі (високі і низькі різного розміру, скляні і разові пластикові);

Скельця предметні без ямки і з ямкою;

Скельця покривні тонкі 24x24 мм;

3. Посуд, який використовується при пересаджуванні тканин.

Чашки Петрі низькі з діаметром 10 см.

Стакани фарфорові для стерилізації інструментів.

Інструменти для ізолювання і висаджування ізолюваних тканин:

пінцети анатомічні різних розмірів (20, 25 і 30 см);

скальпелі анатомічні ланцетовидні;

ножиці;

голки анатомічні;

спиртівки.

Матеріали: фільтрувальний папір, негігроскопічна вата, марля, ватні пробки, алюмінієва фольга для виготовлення ковпачків на колби, пергаментний папір, нейлонова тканина різної щільності.

Вату використовують для протирання рук і робочої поверхні ламінар-боксу при стерилізації. Для фільтрування клітинної суспензії необхідна нейлонова тканина різної щільності. Для загортання посуду при стерилізації в сухожаровій шафі використовують обгортковий або пергаментний папір. На фільтрувальному папері висушують рослинний матеріал після стерилізації.

2 ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА

2.1 Приготування маточних розчинів

Для приготування маточних розчинів використовують реактиви високої хімічної чистоти. Для зручності в роботі макроелементи готують у вигляді маточних розчинів у концентраціях, що в 10 разів перевищують необхідні, для приготування середовищ. Їх зберігають в холодильнику не більше двох місяців за температури 4 ± 1 °С.

Розчини мікроелементів і вітамінів готують у концентраціях, що в 100 разів перевищують необхідні і зберігають в замороженому стані.

При приготуванні хелатного заліза окремо розчиняють 37,3 мг $\text{Na}_2\text{ЕДТА}$ (трилон Б) і 27,8 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Потім ці розчини зливають в одну колбу і доводять їх об'єм до 1000 мл.

Маточні розчини гормональних речовин і вітамінів готують відповідно їх властивостям: 100 мг α -нафтилоцтової кислоти (α -НОК), або 100 мг індолілоцтової кислоти (ІОК) розчиняють в 0,5–2 мл етанолу, підігрівають і доводять до об'єму 100 мл бідистильованою водою (концентрація 1 мг/мл); 100 мг 6-бензиламінопурину (6-БАП) розчиняють у 1–2 мл 0,5 н HCl , підігрівають на водяній бані і доводять до об'єму 100 мл бідистильованою водою; вітаміни – тіамін (B_1), піридоксин (B_6), нікотинову кислоту (PP), аскорбінову кислоту (C) розчиняють у бідистильованій воді в концентрації 1 мг/мл.

2.2 Приготування живильного середовища

6,5–7,0 г агару (залежно від марки) заливають бідистильованою водою ($\frac{1}{2}$ об'єму середовища); агар розтоплюють на водяній бані або автоклавують за умов 1,25 атм упродовж 30 хв; 20–40 г сахарози розчиняють у 100–150 мл дистильованої води за температури 50–60 °С; ємність для приготування середовища на $\frac{1}{3}$ від запланованого об'єму наповнюють бідистильованою водою, додають необхідну кількість макро– та мікроелементів, Fe-хелату із

маточних розчинів та наважку мезо-інозиту, розчин сахарози. Вітаміни і гормони додають за допомогою піпеток із маточних розчинів; рН живильного середовища доводять до 5,6–5,8 за допомогою 1 н розчинів HCl або NaOH, підігрівають, додають розтоплений агар; живильне середовище розливають по 10 мл у пробірки для культивування апікальної меристеми та по 40–80 мл у 250–500 мл колби (банки) для культивування пагонів, калусних культур, ризогенезу, закривають фольгою або стерильними кришками і стерилізують у автоклаві за умов 1,5 атм упродовж 60 хв.

З ПРОВЕДЕННЯ МАНІПУЛЯЦІЙ З РОСЛИННИМИ ОБ'ЄКТАМИ

3.1 Відбір вихідного матеріалу та отримання стерильної культури

3.1.1 Для визначення ініціальних рослин для введення в культуру в робочих селекційних колекціях, базових колекціях, в гібридних розсадниках та розсадниках чоловічих форм проводиться добір за морфологічними ознаками, агрономічними характеристиками та біохімічною аналітикою. Відібраний матеріал (окремі кущі) фіксується на плантаціях за допомогою фарби, дерев'яних кілочків або пластикових етикеток. Весною відбираються живці з ініціальних кущів з обов'язковим позначенням етикетками, які прикріплюються до кожного живця або до пакету з живцями одного генотипу. Живці використовуються як матеріал для введення в культуру.

В лабораторних умовах проводиться стерилізація матеріалу (живців) антисептиками фунгіцидної дії (марганцевокислий калій 0,5–1%) і їх висаджування у перліт або торфосуміш для пророщування в умовах спеціально відведеної культуральної кімнати з регульованими умовами або теплиці. Після утворення пагонів на живцях, з них за допомогою гострих ножиць або скальпеля відбираються верхівки пагонів кожного окремого генотипу з обов'язковим маркуванням і фіксацією номера генотипу на етикетці.

3.1.2 Наступним етапом проводиться оздоровлення та стерилізація вихідного рослинного матеріалу. З цією метою відібрані верхівки стерилізують у 0,2% розчині сулеми впродовж двох хвилин, відмивають чотирикратно у дистильованій воді по 10 хвилин у кожній порції, після чого їх висаджують на спеціально підібрані живильні середовища для регенерації. Одержані таким чином регенеранти переносяться до термостата, де витримуються впродовж тижня при температурі 36⁰С. Після термотерапії з регенерантів знову відбирають апікальні бруньки і висаджують на живильне асептичне середовище для укорінення з маркуванням на посуді вихідних даних: генотип (номер, сорт), номер середовища, дата введення.

Регенерацію проводять у світокультуральній кімнаті при температурі повітря 22⁰–26⁰С, вологості 65–75%, освітленні 3,0 клк і світовому періоді – 16 годин. Після утворення регенерантами стебел з чотирма–п’ятьма парами листків, проводиться вибіркове вирощування рослинних об’єктів з ознаками захворювань та формуються в умовах культуральної кімнати колекційні чи дослідні партії того чи іншого генотипу.

3.2 Створення колекцій *in vitro* цінних селекційних номерів (клонів) та чоловічих рослин хмелю

На основі аналізу селекційних інформаційних та ознакових баз проводиться селекційний добір серед наявного вихідного матеріалу робочої селекційної колекції та виділяються (як у п. 3.1.1) певні генотипи для включення в колекцію *in vitro*.

Оптимальними строками морфологічного аналізу генотипів селекційної робочої колекції жіночої статі є період технологічної стиглості шишок (серпень–вересень).

Весною наступного року відбирається рослинний матеріал (живці) виділених форм та проводиться комплекс їх підготовки до введення в культуру (очищення від патогенів грибкової природи, пророщування в умовах ізольованої культуральної кімнати або теплиці (рис. 1)).

Наступним етапом проводиться введення всіх відібраних номерів для колекції в асептичну стерильну культуру. Згідно п. 3.1.2 проводиться стерилізація та термотерапія для відібраних частин рослин (верхівки пагонів). Після цього, дослідним шляхом проводиться добір індивідуальних живильних середовищ для кожного генотипу з переліку найбільш вживаних для хмелю на основі середовища Мурасіге–Скуга (MS) за приписами Калініна з додаванням глюкози і підібраного складу фітогормонів (табл. 1) і встановлюється найбільш придатне для певного генотипу середовища регенерування.

Таблиця 1 – Склад найбільш придатних живильних середовищ (концентрація речовин в г/л) для розмноження матеріалу селекційних номерів хмелю

№ з/п	Елементи	Середовище			
		MS	6 ₁	6 ₂	5 ₁
1	Макро, мл	20	20	20	20
2	Мікро, мл	10	10	10	10
3	Fe ₁ , мг	28	28	28	28
4	Тр, мг	38	38	38	38
5	Б ₁ , Б ₂ , мг	1	1	1	1
6	Б ₁₂ , мг	2	2	2	2
7	Інозит, мг	100	100	100	100
8	ІУК, мг	5	6	6	12
9	ІМК, мг	1	1	1	1
10	Кінетин, мл	4	4	5	4
11	Глюкоза, г	25	25	25	25
12	Агар-агар, г	6	6	6	6
13	NH ₄ NO ₃ , мг	-	-	-	200

В разі непридатності середовищ 5₁, 6₁, 6₂ для регенерації мікропагонів того чи іншого генотипу проводиться серія дослідів з уточнення індивідуального складу живильного середовища.

Пробірковий матеріал з експлантатами переноситься в умови культуральної кімнати, де формуються ряди генотипів колекції на окремій полиці або полицях стелажів з дотриманням вимог освітлення кожної окремої пробірки (колби, банки) (рис. 2).



Рис. 1 Пророщування пагонів у живців селекційних номерів в умовах теплиці при формуванні колекції цінних зразків в культурі *in vitro*



Рис. 2 Вирощування рослинного матеріалу колекції селекційних номерів в умовах культуральної кімнати в культурі *in vitro*

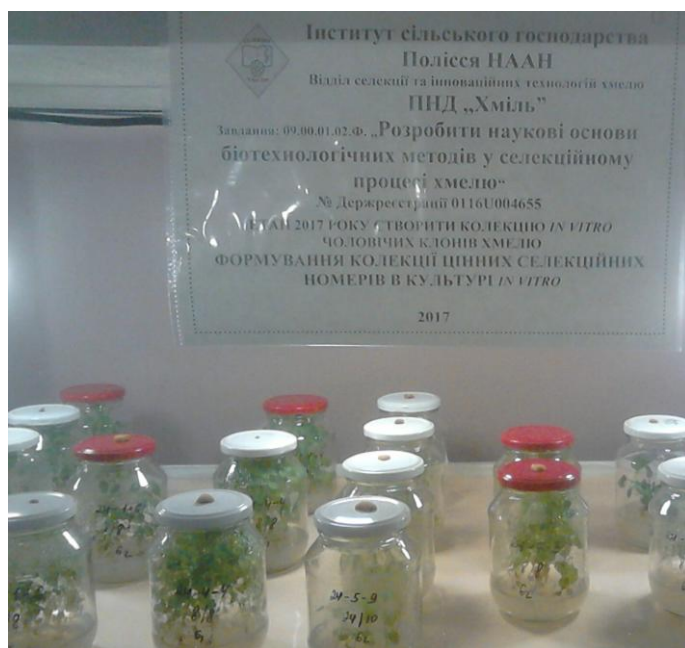


Рис. 3 – Вирощування рослинного матеріалу колекції чоловічих форм хмелю звичайного в умовах культури *in vitro*

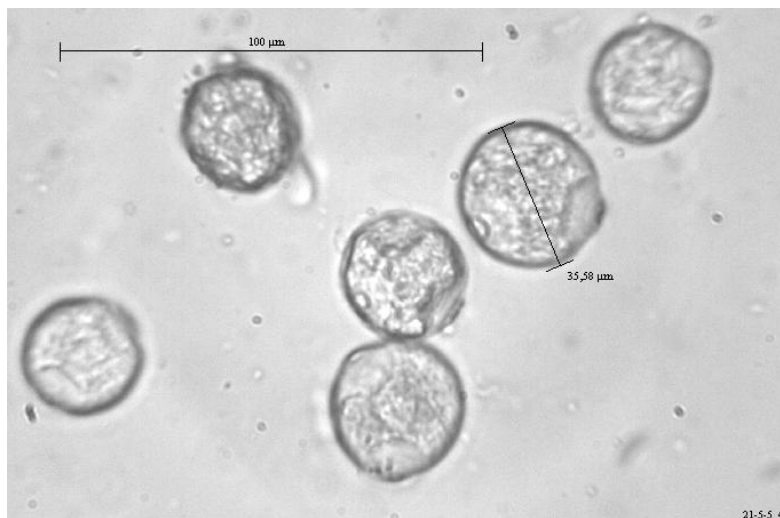


Рис. 4 – Аналіз пилкових зерен чоловічого генотипу 21–5–5 в полі зору світлового мікроскопу Leica GM E, 1x1000.



Рис. 5 – Забарвлення калусних тканин номера 60-5-6, отриманих на зрізах сегментів листя, 2018 р.



Рис. 6 – Утворення калусної тканини на частинах стебла мікроживця сорту Слов'янка в культурі *in vitro*, 2018 р.



Рис. 7 – Утворення калусної тканини білого кольору рихлої структури на мікророслинах чоловічої форми 21–6–6, 2018 р.



Рис. 8 – Утворення в асептичних умовах мутованих мікропагонів сорту Слов'янка, отриманих з морфогенного калусу культури, 2018 р.



Рис. 9 – Індукція розвитку рослин–регенерантів на калусній тканині сорту Слов'янка, 2018 р.



Рис. 10 – Мутантні мікросаджанці сорту Слов'янка, отримані з морфогенного калусу і підготовлені для адаптації, 2018 р



Рис. 11 - Вигляд перед закладанням польового дослідів рослин (ЗКС), отриманих шляхом регенерації із калусної тканини в умовах асептичної культури, 2020 рік



Рис. 12 – Вигляд дослідів з оцінки чоловічих форм хмелю колекцій *in vitro* та розсадника мутантних форм в умовах *in vivo*, 2020 р.

Проводиться маркування кожної окремої пробірки (колби, банки), дослід позначається етикетками та здійснюються відповідні записи в журналі ведення колекції. Матеріал підтримується за температури 22–26°C, освітленні 2,5 klx при світловому періоді 16 год на добу.

Формується інформаційна система умов культивування цінних селекційних номерів (клонів) хмелю та складу індивідуальних живильних середовищ.

Постійно проводиться моніторинг стану експлантатів, вибраковування заражених об'єктів. Через 3–4 місяці проводиться наступний пасаж з дотриманням асептичних умов та умов щодо дотримання сортової чистоти і використання певних індивідуальних середовищ для кожного генотипу.

Аналогічно до методики формування колекції селекційних номерів жіночої статі проводиться формування колекції генотипів чоловічої статі в умовах асептичної культури (рис. 3).

Оптимальними строками морфологічного аналізу та добору чоловічих форм в розсаднику *in vivo* є період повного цвітіння (75% пиляків на суцвіттях дозріли), який припадає на кінець червня–липень.

Для аналізу структури та будови пилкових зерен проводиться добір пилку, його підсушування, центрифугування для розділення на фракції та аналіз на світловому мікроскопі (рис. 4).

Аналогічно формуванню колекції жіночих генотипів проводиться введення відібраних чоловічих форм до асептичної культури. Формується інформаційна система умов культивування чоловічих форм (генотипів) хмелю та складу індивідуальних живильних середовищ.

Постійно проводиться моніторинг стану експлантатів, вибраковування заражених об'єктів. Через 3–4 місяці проводиться наступний пасаж з дотриманням асептичних умов та умов щодо дотримання сортової чистоти і використання певних індивідуальних середовищ для кожного генотипу.

3.3 Одержання морфогенного калусу хмелю, вплив мутагенними сполуками на калус та індукція морфогенезу

Для отримання калусу хмелю в якості експлантатів слід використовувати сегменти листа, стебел і черешків. Індукцію калусогенезу і подальше культивування калусу здійснюється на середовищах на основі середовища Мурасіге–Скуга (MS) з додаванням різних фітогормонів, які підбираються в залежності від генотипу. Як у жіночих, так і у чоловічих генотипів з пагонів калус виникає на середовищах, до складу яких входять цитокініни і ауксини, але з більш високим рівнем ауксинів. Найкращий ефект для сортономерів був досягнутий при концентрації цитокінінів 2,0 мг/л і ауксинів 3–5мг/л (табл. 2).

Таблиця 2 – Концентрація фітогормонів для індукції калусогенезу з різних видів експлантатів хмелю.

Уміст фітогормонів (мг/л) у поживних середовищах		Частина стебла		Вирізки з листа	
		Процент калусо- утворення (%)	Інтенсивність утворення калусу	Процент калусо- утворення (%)	Інтенсивність утворення калусу
2,4Д	5,0	64	++	84	++
БАП	5,0	80	++	88	++
ІУК	2,0 + 5,0	100	+++	100	+++
+БАП	5,0 + 5,0	100	+++	100	+++

Примітка: ++ середній розвиток калусної тканини, +++ інтенсивний розвиток калусної тканини

Оскільки тканини листа гинуть раніше, ніж тканини стеблових експлантатів, використовують спосіб надрізів чи насічок листових сегментів листа. Процес калусоутворення починається з набухання і деформування експлантату, потім на поверхні експлантату з'являється калусні тканини солом'яного чи кремового кольору (рис 5). Експлантати частин стебла, в переважній більшості випадків утворюють крупнозернистий калус жовтуватого відтінку (рис. 6). Сегменти листа і черешків на середовищах, що не містять БАП, утворюють дрібнозернистий калус білого кольору (рис. 7). При подальшому культивуванні структура і забарвлення калусу змінюється.

Частина клітин калусу швидко старіє, набуває темно-коричневого забарвлення і незабаром відмирає.

Після утворення калусу в асептичних умовах проводять його переміщення на поверхню свіжого живильного середовища. У результаті отримують стерильну культуру калусної тканини, яку можна підтримувати довгий час, періодично розділяючи її на фрагменти і субкультивуючи. Калус певного генотипу субкультивують на середовищі такого самого складу, як і для дедиференціювання, або на середовищі зі зменшеною концентрацією ауксинів для стимуляції приросту калусної маси.

Додаючи до живильного середовища підвищений вміст, зокрема БАП в концентрації 10–12 мг/л отримують в калусній культурі процеси індукції пагоноутворення з мутаційними змінами, зокрема потовщення стебла та видовжені пластинки листків (рис. 8). Використовуючи поживні середовища з умістом фітогормонів для ініціації органогенезу, отримують пагоноутворення на калусній тканині (рис. 9) та проводять подальше пасажування утворених мікропагонів сорту Слов'янка на вихідні середовища 5₁, 6₁, 6₂ та отримують укорінені мікророслини для адаптації. Наступним етапом проводять адаптацію отриманих рослин–регенерантів або мутантних мікророслин (рис. 10) з добре розвинутою вегетативною та кореневою системою до нестерильних умов вирощування та до умов відкритого ґрунту.

Адаптацію мікросаджанців проводять в торфоперегнійних горщечках об'ємом 100 г, щільно заповнених спеціально підготовленим субстратом – суміш торфу з піском у співвідношенні 3:1 з додаванням макро– і мікроелементів. У період адаптації, який складає в середньому 30–35 діб, рослини культивують при підвищеній вологості, яку штучно створюють за допомогою скляних банок.

Рослини, отримані із калусних тканин, проходять етап адаптації до умов вирощування в теплиці або польової шкільки та дорощуються до стандартних саджанців (рис. 11), які висаджуються в польові досліді на плантації для порівняльної оцінки з вихідною материнською формою на наявність морфологічних змін та їх придатності для селекції.

3.4 Адаптація рослин хмелю з *in vitro* до умов відкритого ґрунту

Пересаджування мікроживців. Укорінені (експлантати) мікроживці хмелю за допомогою пінцету виймають з пробірки, ретельно ополіскують у проточній воді до повного змивання залишків агаризованого середовища, занурюють їх на 1 хвилину у розчин фунгіциду системної дії і, обережно, щоб не зашкодити корінці, висаджують у контейнери з субстратом об'ємом 100 мл.

Склад субстрату. Субстрат готують ретельно перемішуючи торф, пісок та перліт у співвідношенні (2:1:1). До суміші додають розчин мікроелементів з вмістом: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 100 мг/л, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 100 мг, H_3BO_3 – 50 мг/л, KJ – 50 мг та 10 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в розрахунку на 10 л субстрату.

Перед застосуванням субстрат стерилізують (пропарюють). рН субстрату доводять до $6,0 \pm 0,5$, а вологість до 60–70%.

Акліматизація мікроживців. Акліматизацію мікроживців хмелю проводять у культуральних кімнатах при температурі повітря 23^0 – 26^0C , відносній вологості 70–80%, освітленні 3,0 кклукс та світлоперіоді 16 годин на добу. Рослини витримують у таких умовах впродовж одного–півтора місяців після чого висаджують в ємкості (горшки, перфоровані поліетиленові пакети об'ємом 0,5–1,2 л), які розміщують в теплиці. Перший тиждень рослини обприскують двічі за тиждень у подальшому поливають субстрат за потреби, так щоб вологість субстрату була в межах 45–65%.

Дорощування мікросаджанців до стандартних саджанців.

Впродовж наступного адаптаційного періоду розсадний матеріал дорощується в тепличних умовах при температурі повітря 18 – 20^0C , відносній вологості 75–90% та освітленні 9–11 клк. Полив рослин проводять в залежності від стану субстрату. Після адаптації рослинний матеріал в ємкостях (ЗКС)

розміщується в короби шкільки або висаджується в польову шкільку для дорощування до стандартних саджанців відповідно вимогам технології ДСТУ 4810.1:2007 і ДСТУ 4810.2:2007 «Садивний матеріал хмелю. Сортові і садивні якості».

4 МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ В СЕЛЕКЦІЙНОМУ ПРОЦЕСІ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ, СТВОРЕНОГО БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ

4.1 Оцінка вихідного селекційного матеріалу в умовах *in vivo*

Згідно затвердженої науково–дослідної програми (проєкту) складають план–схему проведення потових досліджень в розрізі площ, років, сортів, номерів та ін.

На схемі формують місце розташування ділянок (повторень), генотипів (зразків, сортів), визначають їх межі, орієнтацію щодо рядів на плантації, передбачаючи захисні смуги. У схемі встановлюють перелік генотипів (гібридів, номерів, форм, сортів, стандартів) для вивчення чи порівняльної оцінки.

Проводять закладання дослідів відповідно стандарту ДСТУ 7027:2009 «Селекція хмелю. Технологічний процес. Методи випробувань» з використанням саджанців вирощених генотипів.

Після закладання дослідів складають акт посадки з визначенням генотипів та фіксацією дати формування польового дослідів. Схеми та перелік номерів переносяться в «Журнал польового дослідів», в якому фіксуються всі зміни (підсадка чи ремонт ділянок), дати проведення технологічних операцій, спостережень, добору, оцінок тощо.

Дослідження відповідно оформлюють табличками, етикетками з наведенням назви дослідів, схеми, переліку номерів чи кодів рослин, які придатні для фіксації рослин при описах, в т.ч. при цифровому фото– і відео документуванні (рис. 12).

При проведенні технологічних операцій на селекційних дослідах з хмелем дотримуються технологічних регламентів вирощування хмелю, які прийнятих для певної ґрунтово–кліматичної зони (Полісся, Лісостеп). Регламентні вимоги та параметри проведених операцій на дослідах фіксуються в журналі досліджень.

4.2 Формування та аналіз інформаційних баз даних для визначення фенотипової мінливості ознак рослин селекційних робочих колекції хмелю

Всі спостереження і обліки на дослідних ділянках виконуються у відповідності з методиками загальноприйнятими для хмелю для визначення фенотипової мінливості ознак, генотипів селекційних робочих колекцій (чоловічих і жіночих), окремих унікальних генотипів випробувань.

Рослини аналізуються за 24 основними морфологічними ознаками і елементами структури продуктивності, зокрема: висота рослини, число вузлів на стеблі рослини, кількості міжвузлів на головному стеблі рослини, довжина міжвузлів, висота формування першої продуктивної бокової гілки, вага шишок з 1 рослини та їх кількість, маса 100 шишок, тривалість періоду вегетації. Впродовж вегетації хмелю обліковуються рослини, уражені різними хворобами такими, як псевдопероноспороз (несправжня борошниста роса) та вірусні, а також, облік ураженості шкідниками: павутинним кліщем, хмелевою попелицею, люцерновим довгоносом та іншими. Спостереження та обліки проводяться згідно загальноприйнятих методик та розроблених науково-методичних рекомендацій [31–35].

Для всіх генотипів визначається тривалість вегетаційного періоду (від початку появи сходів до настання повної технічної стиглості шишок). Облік врожаю проводять у фазі повної технічної стиглості шишок шляхом зважування маси сирих шишок з куща, ділянки. Після збору врожаю проводиться перерахунок врожаю сирих шишок з ділянки на врожай сухого хмелю (в тонах) з 1 га площі.

Отримані показники фенологічних описів, характеристики за результатами ідентифікації генотипів хмелю робочих селекційних колекцій за

визначеними ознаками накопичуються в базі даних і аналізуються шляхом детальної оцінки взаємозалежностей з показниками погоди за етапами росту і розвитку рослин хмелю в дослідях. Базы даних оформлюються у форматі Excel або Access Microsoft Office Word Windows (2003–2015), які дозволяють працювати з масивами отриманих інформаційних показників.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ляшенко М.І. Біохімія хмелю і хмелепродуктів. – Житомир: Полісся, 2001.
2. Хмель и его использование / Годованый А.А., Ляшенко Н.И., Рейтман Й.Г. и др. – К.: Урожай, 1990.– 336 с.
3. Електронний ресурс: http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2020_AUG_IHGC_EC_Report.pdf
4. Електронний ресурс: http://www.hopsteiner.com/wp-content/uploads/2019/08/2019-09_MarketUpdate.pdf
5. Електронний ресурс: Звіт компанії Barth–Haas/Group «Hops 2018–2019». http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/reports/2015/BarthReport_2018-2019.pdf
6. Шабликін В.В. Використання колекції генофонду хмелю при створенні високопродуктивних сортів адаптованих до умов Полісся / В.В. Шабликін, І.П. Штанько, К.П. Михайліченко, М.І. Ляшенко // *Генетичні ресурси рослин.* – № 3. – Х., 2006. – С.103–110.
7. Штанько І.П. Вивчення базової колекції генофонду хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) / І.П. Штанько, К.П. Михайліченко // *Агропромислове виробництво Полісся.* – № 1. – К: «Есе», 2008. – С. 23–27.
8. Штанько І.П. Досягнення селекції хмелю в світі та напрями удосконалення сортової структури насаджень в Україні / І.П. Штанько // *Агропромислове виробництво Полісся*, 2013. – Вип. 6. – С. 92–98.
9. Розробити новітні генетико–селекційні підходи отримання цінних за якісними і кількісними ознаками генотипів хмелю екологічно стійких до глобальних змін клімату: звіт про наук.–дослід. роботу за 2011–2015 рр. (заключний), № держ. реєстрації 0111U002874 / Нац. акад. аграр. наук України, Ін–т сільського госп–ва Полісся ; кер. НДР І.П. Штанько. – Житомир, 2015.– 102 с.
10. Сиволап Ю.М. Сучасні біотехнології в оцінці генетичного різноманіття українських сортів хмелю звичайного (*Humulus lupulus* L.) / Ю.М. Сиволап

О.О.Захарова, Н.Е.Кожухова, С.О. Ігнатова та ін. // *Цитология и генетика*. - 2010. - Т. 44, № 5. - С. 3-12.

11. Удосконалити біотехнологічні методи збереження генотипів хмелю та створити колекцію сортів світової селекції *in vitro*: звіт про наук.-дослід. роботу за 2011–2015 рр. (заключний), № держ. реєстрації 0111U002876 / Нац. акад. аграр. наук України, Ін-т сільського госп-ва Полісся ; кер. НДР Т.І. Козлик. – Житомир, 2015.– 66 с.

12. Gippert, R.; Schmidt, H.E.; Schmelzer, K.: Einige Ergebnisse mit Spitzenmeristemkulturen bei hopfen (*Humulus lupulus* L.). Arch. Pflanzensch., 10, 1974, 7–13.

13. Adams, A.N.: Elimination of viruses from the hop (*Humulus lupulus* L.) by heat and meristem culture. J. Hort. Sci., 50, 1975, 151–160.

14. Kubo, S.; Kagami, Y.; Nonaka, K.: Culture of stem tips of the hop and elimination of virus symptoms. Rep. Res. Lab. Kirin Brewing, 18, 1975, 55–62.

15. Probasco, G.; Winslow, S.: The use of shoot-tip culture to eliminate viruses from hop varieties grown in the United States. MBAA Tech. Q., 23, 1986, 26–31.

16. Svoboda P.: Kultivace izolovaných vrcholů chmele (*Humulus lupulus* L.) in vitro. [Culture of isolated shoot tips of hops (*Humulus lupulus* L.) in vitro.] Rostl. Výr., 38, 1992, 523–528.

17. Faragó, J.; Hudcovicová, M.; Lajchová, Z.; Vidová, B.; Vojteková, P.; Faragová, N.: In vitro storage of hop (*Humulus lupulus* L.) germplasm derived from meristem culture. Proc. Int. Sci. Meet. «Use of Genetic Resources of Cultivated Plants», Žatec, Czech Republic, 2008, 22–25.

18. Faragó, J.; Nešťáková, M.: Kultivácia meristémov v *in vitro* kultúre a produkcia bezvírusovej sadby pri chmeli obyčajnom (*Humulus lupulus* L.) [Cultivation of meristems *in vitro* culture and production of virus-free stock plants in hop (*Humulus lupulus* L.)]. Zb. 4. odb. sem. «Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín», 1998, Piešťany, 29–31.

19. Faragó J., Pšenáková I., Faragová N. The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus* L.) improvement / Nova Biotechnologica 9–3 (2009) 279.

20. Кормільцев Б.Ф. Ефективність мікроклонального методу при розмноженні хмелю *in vitro* / Б.Ф.Кормільцев // *Хмелярство*. – Броди., Просвіта, 2006, – вип.23, – с. 38–44.
21. Кормільцев Б.Ф. Використання термотерапії для одержання садивного матеріалу хмелю без вірусних хвороб / Б.Ф.Кормільцев // *Хмелярство*. – К. Аграрна наука, 1987. – №18 – с. 8–12.
22. Мельничук М.Д., Кріпкий О.Є., Бойко А.Л., Юрківський Й.М., Кормільцев Б.Ф. Біотехнологічний процес одержання хмелю на безвірусній основі // *Доп. НАН України*. – 1996. – №9. – С.139–141.
23. Мельничук М.Д., Клюваденко А.А., Давиденко О.А. Отримання безвірусного посадкового матеріалу хмелю (*Humulus lupulus* L.) в умовах *in vitro* // *Науковий вісник НАУ*. – 2000. – Вип.29. – С.47–52.
24. Дек. пат. No59131A Україна. *In vitro* технологія оздоровлення, культивування, розмноження та адаптації до умов *in vivo* рослин хмелю (*Humulus lupulus* L.) ароматичних сортів / М.Д. Мельничук – Опубл. 15.08.2003, Бюл. No 8.
25. Кормільцев Б.Ф. Використання методу культури апікальних меристем для оздоровлення хмелю від деяких вірусів / Б.Ф. Кормільцев, А.Л. Бойко, Л.Т. Горшкова // *Хмелярство*. – 1992. – № 14. – С. 20–22.
26. Способ мікроклонального розмноження регенерантів хмеля, вирощених із апексов *in vitro*: пат. України No 30753 A01N4/00 // Б. Ф. Кормильцев, Л. П. Бадамшина, М. Г. Левчук; заявитель Ин-т сел. хоз-ва. – No u200712536, заявл. 12.11.2007; опубл. 11.03.2008 // Офиц. бюл. «Промышленная собственность». Кн. 1: Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем. – 2008. – No 5. – 5 с.
27. Патент України № 120207, 2019. «Спосіб мікроклонального розмноження регенерантів хмелю, вирощених з апексів *in vitro*».
28. Штанько І.П. Результати дослідження геному сортів хмелю в умовах тривалого культивування *in vitro* / І.П. Штанько, В.Б.Ковальов, Б.Ф. Кормільцев // *Агропромислове виробництво Полісся*. – № 9. – К: «Аграрна наука», 2016. – С. 60–68.

29. Кормільцев Б.Ф. Використання біотехнологічних методів при розмноженні вихідного селекційного матеріалу хмелю / Б.Ф. Кормільцев, І.П. Штанько, К.П. Михайліченко // *Агропромислове виробництво Полісся*. – 2014. – Вип. 7. – С. 73–76.
30. Штанько І.П. Удосконалення схеми селекційного сортовивчення генотипів хмелю з використання біотехнологічних методів їх розмноження / І.П. Штанько, К.П. Михайліченко, О.Л. Дзядович // *Агропромислове виробництво Полісся*. — 2012. — Вип. 5. — С. 57–60.
31. Test Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability of Hop (*Humulus lupulus L.*) (TG/227/1, UPOV) // Geneva. 2006–04–05. – 24 P.
32. Селекція хмелю. Методи випробувань. Технічні умови. ДСТУ 2027–2009. [Чинний від 2011 р.]. Київ : Держспоживстандарт України, 2011. 26 с. (Національні стандарти України).
33. Методика проведення експертизи сортів на відмітність, однорідність та стабільність (ВОС). Технічні та кормові культури. / під ред. В.В. Вовкодава / *Держ. служба з охорони прав на сорти рослин*. – К.: Алефа, 2000. – 226 с.
34. Методика проведення експертизи сортів рослин групи технічних на відмінність, однорідність і стабільність. URL: <http://sops.gov.ua/vos>.
35. Розробити наукові основи біотехнологічних методів у селекційному процесі хмелю: звіт про наук.–дослід. роботу за 2018 р. (проміжний), № держ. реєстрації 0111U002867 / Нац. акад. аграр. наук України, Ін-т сільського госп-ва Полісся ; кер. НДР І.П. Штанько. – Житомир, 2018.– 41с.

Наукове видання

ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У СЕЛЕКЦІЙНОМУ ПРОЦЕСІ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО

Методичні рекомендації

*Відповідальний за випуск – І.П. Штанько
Комп'ютерний набір – І.П. Штанько
Світлини – І.П. Штанько*

Підписано до друку 14.10.2020 р. Формат 60x84/16.
Папір Data Copy. Гарнітура Таймс. Друк циф. дуплікаттор.
Ум. Друк. Арк. 1,69. Обл.-вид. арк. 1,04.
Тираж 100. Зам. 20/03.
Віддруковано в ПП «Рута».
10014, м. Житомир, вул. М. Бердичівська, 17-а.
Реєстраційне свідоцтво серія ЖТ №2 від 24.12.2001 р.

