

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЗВИРУСНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

**Бровка Елена Сергеевна, Хлебова Любовь Петровна, Бычкова Ольга
Владимировна, Мироненко Ольга Николаевна**

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия
alenaplyuscheva.721@mail.ru

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) – вьющееся многолетнее эфирно-масличное и лекарственное растение – является незаменимым сырьем для пивоварения. Для хмелеводства России последние 30 лет характерно ухудшение материально-технического обеспечения хмелеводческих предприятий, снижение площадей и валового сбора шишкового сырья, что привело к практически полной зависимости пивоваренной отрасли от импортных поставок хмелепродуктов. В настоящее время наблюдается повышение интереса сельхозпроизводителей к выращиванию культуры, но ощущается острый дефицит качественного посадочного материала. Хмель, как многолетняя монокультура, возделывается на одном участке до 10–15 лет. Вегетативное размножение и длительное производственное использование монокультуры приводит к повреждению и поражению разнообразными видами фитофагов, фитопатогенов и вирусов. Для хмеля на территории Европы и европейской части России отмечено около 20 вирусных болезней: инфекционная стерильность хмеля, хлороз, крапивообразность листьев хмеля, некроз жилок, скручивание листьев, разные виды мозаик и др. Проблема получения оздоровленного посадочного материала может быть решена с использованием биотехнологических и молекулярно-генетических методов.

Целью настоящего исследования явилась диагностика, оздоровление и микроразмножение *in vitro* безвирусного посадочного материала сортового хмеля. Для анализа использовали образцы листьев 3-х сортов хмеля (*Флагман*, *Spalter Select* и *Taurus*). Выделение РНК осуществляли с помощью набора DiamondDNA™, согласно инструкции производителя. ОТ-ПЦР-РВ проводили на ДНК-Амплификаторе CFX96 Touch фирмы «Bio-Rad». Для выявления и дифференциальной диагностики РНК вирусов методом ОТ-ПЦР-РВ использовали наборы ООО «Синтол»: «*Potato Virus M* и *Potato Leafroll Virus-PB*» – для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля; «*Prunus necrotic ring spot ilarvirus-PB*» – для выявления РНК иларвируса некротической кольцевой пятнистости косточковых (PNRV). Режимы работы амплификатора устанавливали, согласно инструкции производителя наборов для анализа – компании «Синтол». Обработку результатов проводили с использованием программы «Bio-Rad CFX MANAGER».

По результатам анализа *Potato Virus M* выявлен в 50%, а PNRV – в 30 % образцов. *Potato Leafroll Virus* в исследуемом материале не обнаружен. Для оздоровления пораженных растений использовали метод термотерапии в сочетании с культурой апикальных меристем. Растения выращивали в климатической камере ICH 750L Memmert (Германия) при чередовании каждые 4 часа температуры 38 и 30°C. Через 2 недели отбирали отрастающие побеги и стерилизовали 70 % этанолом с последующей обработкой в 30 % растворе H₂O₂. Изолированные апикальные меристемы культивировали *in vitro* на среде Мурасиге-Скуга, содержащей 20 г/л глюкозы, 2 мг/л БАП и 1 мг/л ГКЗ. Микроразмножение проводили на среде МС, включающей 1 мг/л ГКЗ в сочетании с 0,5 мг/л БАП либо 0,5 мг/л ТДЗ. После адаптации регенерантов к условиям *ex vitro*, проводили их повторное тестирование на исследуемые вирусы методом ОТ-ПЦР-РВ. В результате выполненного исследования получен оздоровленный от тестируемых вирусов посадочный материал сортового хмеля.

Благодарность. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-26-20092).

Ключевые слова: хмель, посадочный материал, вирусы, оздоровление, *in vitro* размножение.

OBTAINING A VIRUS-FREE PLANTING MATERIAL OF HOPS (*HUMULUS LUPULUS* L.)

**Brovko Elena Sergeevna, Khlebova Lyubov Petrovna, Bychkova Olga Vladimirovna,
Mironenko Olga Nikolaevna**

Altai State University, Barnaul, Russia

alenaplyuscheva.721@mail.ru

Hop (*Humulus lupulus* L.), a climbing perennial essential oil and medicinal plant, is an indispensable raw material for brewing. For the last 30 years, hop-growing in Russia has been characterized by a deterioration in the material and technical support of hop-growing enterprises, a decrease in the area and gross harvest of cone raw materials, which has led to the almost complete dependence of the brewing industry on imported supplies of hop products. Currently, there is an increase in the interest of agricultural producers in growing this crop, but there is an acute shortage of high-quality planting material. A hop, as a perennial monoculture, is cultivated in one area for up to 10–15 years. Vegetative reproduction and long-term production use of a monoculture leads to damage by various species of phytophages, phytopathogens and viruses. For hops in Europe and the European part of Russia, about 20 viral diseases have been noted: hop infectious sterility, chlorosis, hop nettle leaf, vein necrosis, leaf curl, various types of mosaics, etc. The problem of obtaining a healthy planting material can be solved using biotechnological and molecular genetic methods.

The study is aimed at detection, elimination of viruses and *in vitro* micropropagation of virus-free planting material of hop varieties. Leaf samples of 3 hop varieties (*Flagman*, *Spalter Select*, and *Taurus*) were used for analysis. RNA isolation was carried out using the DiamondDNATM kit, according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was carried out on a Bio-Rad CFX96 Touch DNA Amplifier. For the detection and differential diagnosis of virus RNA by RT-PCR, the following kits were used by Syntol LLC: *Potato Virus M* and *Potato Leafroll Virus-RV* – for differential diagnosis and detection of potato virus RNA; *Prunus necrotic ring spot ilarvirus-RV* – to detect PNRV. The operating modes of the cyclers were set according to the instructions of the manufacturer of the assay kits, Synthol. The results were processed using the Bio-Rad CFX MANAGER software.

Potato Virus M was found in 50 % of samples and PNRV in 30% of samples. *Potato Leafroll Virus* was not found in the test material. To eliminate the viruses from the affected plants, the method of thermotherapy was used in combination with the culture of apical meristems. Plants were grown in an ICH 750L Memmert climate chamber (Germany) with alternating temperatures of 38 and 30°C every 4 hours. After 2 weeks, growing shoots were selected and sterilized with 70 % ethanol, followed by treatment in 30 % H₂O₂ solution. Isolated apical meristems were cultured *in vitro* on Murashige-Skoog medium containing 20 g L⁻¹ glucose, 2 mg L⁻¹ BAP, and 1 mg L⁻¹ GA₃. Micropropagation was carried out on MS medium containing 1 mg L⁻¹ GA₃ in combination with 0.5 mg L⁻¹ BAP or 0.5 mg L⁻¹ TDZ. After adaptation of the regenerants to *ex vitro* conditions, they were retested for the studied viruses by RT-PCR. As a result of the study, planting material of hop varieties was obtained that was improved to the tested viruses.

Acknowledgment. The research was supported by RSF (project No. 22-26-20092).

Keywords: hops, planting material, virus detection, virus elimination, *in vitro* reproduction.