

## МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ СОРТОВ ХМЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Гашенко О. А., Кастрицкая М. С., Кухарчик Н. В.

Республиканское научно-производственное  
дочернее унитарное предприятие «Институт плодородства»,  
аг. Самохваловичи, Республика Беларусь, e-mail: GashenkoOlga@yandex.by

В статье представлены результаты по микроразмножению сортов хмеля в культуре *in vitro*. Разработаны биологические и технологические составляющие получения посадочного материала хмеля в культуре *in vitro* (тип эксплантов, коэффициент размножения, длина побегов, количество пассажей). На этапе введения в культуру *in vitro* высокой жизнеспособностью характеризовались двухпочковые черенки (66,67–98,77 %) всех сортов хмеля и меристемы (77,47–84,07 %) сортов ‘Sladek’, ‘Bog’, ‘Perle’, ‘Hallertaner Magnum’, ‘Рита’. Слабой регенерационной способностью отличались этиолированные почки корневища (8,33–27,78 %). На этапе микроразмножения отмечена зависимость коэффициента размножения и длины побегов растений-регенерантов хмеля от сорта и пассажа ( $p < 0,001$ ). Высокий коэффициент размножения отмечен у сорта ‘Tettnanger’ (до  $8,00 \pm 0,12$  на 4-ом пассаже), а длина побегов у сортов ‘Рита’ и ‘Perle’ (до  $2,47 \pm 0,32$  и  $2,27 \pm 0,34$  см соответственно, на 3-ем пассаже). Длительность этапа микроразмножения – 4 пассажа.

**Ключевые слова:** *Humulus* spp., культура *in vitro*, микроразмножение, пассаж, Беларусь.

Развитие хмелеводства требует оптимального выбора способа производства посадочного материала хмеля в почвенно-климатических условиях Беларуси. В производстве хмель размножают вегетативно: стеблевыми, зелёными, корневищными черенками, этиолированными побегами – ростками, выросшими в почве [1, 6, 7].

Наиболее эффективным способом получения посадочного материала хмеля является культура *in vitro*. В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур [9]. Самым важным этапом любых биотехнологических исследований, связанных с культурой тканей растений, является введение растительного материала в культуру *in vitro* [2]. Из основных факторов, влияющих на эффективность инициации культуры *in vitro*, можно выделить размер первоначального экспланта, период изоляции,

местоположение экспланта на исходном растении, состав питательных сред. Введение *in vitro* меристематических верхушек предполагает достаточно длительный период инициации начала роста и развития меристемы в пригодный для микроразмножения конгломерат (1–2 месяца). Поэтому интерес представляют и ускоренные методы введения в культуру *in vitro* – посадка на питательные среды черенков и вегетативных почек. Метод введения в культуру *in vitro* крупных эксплантов может являться наиболее перспективным при размножении свободных от вирусов растений, а также при необходимости размножения редких генотипов без учёта их фитосанитарного статуса [5]. Состав питательной среды наряду с освещением и температурным режимом является не менее важным фактором для эффективного морфогенеза и размножения эксплантов. Чаще всего используют среды с минеральным составом по Мурасиге-Скуга. Необходимыми для роста и развития эксплантов являются фитогормоны, или ростовые вещества, которые относятся к трём группам: цитокинины, ауксины, гиббереллины. Наиболее часто используемым цитокинином является 6-бензиладенин (6-БА), а из группы гиббереллинов – гибберелловая кислота (ГК). Подбор оптимального состава среды обеспечивает максимальные показатели роста и развития эксплантов и высокий выход посадочного материала. Следует отметить высокую не только видовую, но и сортовую специфичность разных культур по отношению к составу питательной среды [3, 4, 8].

**Цель исследования** – изучение особенностей развития растений-регенерантов хмеля в культуре *in vitro* на этапе введения в культуру и в течение первых пассажей после введения.

**Объекты, условия и методика исследований.** Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства». Объектами исследований служили растения-регенеранты сортов хмеля: ‘Tettmanger’, ‘Bor’, ‘Sladek’, ‘Hallertaner Magnum’, ‘Perle’, ‘Рита’.

В качестве эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* использовали этиолированные почки корневища, двухпочковые черенки из активно вегетирующих стеблей, меристемы.

Стерилизацию растительного материала проводили по следующей схеме: промывка проточной водой в течение 1 часа; обработка 70%-ным этанолом – 1 минута; обработка 30%-ной перекисью водорода – 7–10 минут; промывка стерильной водой – 5 минут 1 раз. Меристематические верхушки вычленили под бинокулярным микроскопом «Olympus-SZ61».

Для культивирования хмеля использовали питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга (MS) [10] с добавлением: 6-БА – 0,2 мл/л и

GA<sub>3</sub> – 1,0 мг/л на этапе введения, 6-БА – 0,5 мл/л и GA<sub>3</sub> – 1,0 мг/л на этапе микроразмножения. Стерилизацию среды проводили при давлении 0,9 атм в автоклаве в течение 15 минут. В качестве основного углевода на всех этапах культивирования хмеля использовали глюкозу.

Условия культивирования растений *in vitro*: освещение 2,5–3,0 тыс. люкс, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 часов. Длительность субкультивирования 4 недели.

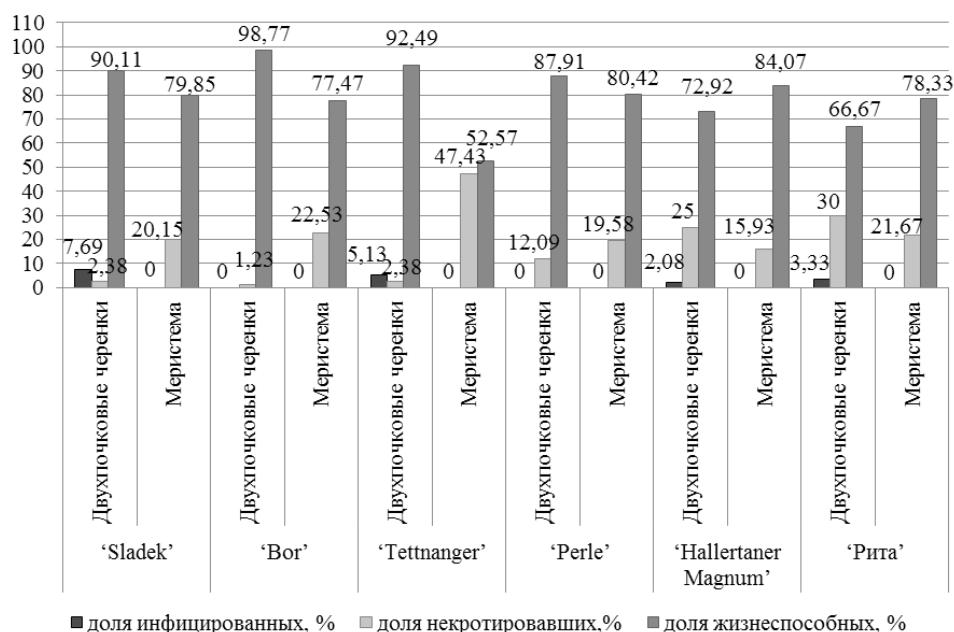
Статистическую обработку проводили в программе Statistica 7.0, используя ANOVA, критерий Дункана ( $p < 0,05$ ) для сравнения средних значений ( $n = 3$ ). Построение графиков проводили в программе Microsoft Excel.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В результате проведённых исследований было установлено значимое влияние сорта, типа экспланта и совместного действия этих факторов на долю инфицированных ( $p < 0,05$ ), некротировавших ( $p < 0,001$ ), а также жизнеспособных эксплантов хмеля ( $p < 0,001$ ).

В целом экспланты всех сортов характеризовались высокой жизнеспособностью (двухпочковые черенки – 66,67–98,77 %, меристемы – 77,47–84,07 %), за исключением меристем сорта ‘Tettnanger’ (52,57 %) (рис. 1).

Большее число жизнеспособных и минимальное число некротировавших эксплантов хмеля было получено при использовании в качестве первичных эксплантов двухпочковых черенков из активно вегетирующих стеблей: 98,77 и 1,23 % – у сорта ‘Bor’, 92,49 и 2,38 % – у сорта ‘Tettnanger’, 90,11 и 2,38 %, 87,91 и 12,09 % – у сортов ‘Sladek’ и ‘Perle’ соответственно. При этом доля инфицированных эксплантов составила 0 % для сортов ‘Bor’ и ‘Perle’, 5,13 и 7,69 % – ‘Tettnanger’ и ‘Sladek’ соответственно. Несколько худшие результаты по введению в культуру *in vitro* двухпочковыми черенками отмечены для сортов ‘Hallertaner Magnum’ и ‘Рита’. Доля жизнеспособных эксплантов составила 72,92 и 66,67 % соответственно. Количество некротировавших эксплантов оказалось выше по сравнению с другими сортами – 25 % для сорта ‘Hallertaner Magnum’ и 30 % – сорта ‘Рита’, однако число инфицированных меньше – 2,08 и 3,33 % соответственно.

При использовании в качестве первичных эксплантов меристем отмечено отсутствие инфицированных эксплантов. Большим количеством жизнеспособных эксплантов (от 77,47 %) характеризовались все сорта, за исключением ‘Tettnanger’ (52,57 %). Доля некротировавших эксплантов колебалась от 15,93 до 47,43 % (рис. 1).



**Рис. 1.** Влияние типа экспланта на количество жизнеспособных, некротировавших и инфицированных эксплантов сортов хмеля при введении в культуру *in vitro*

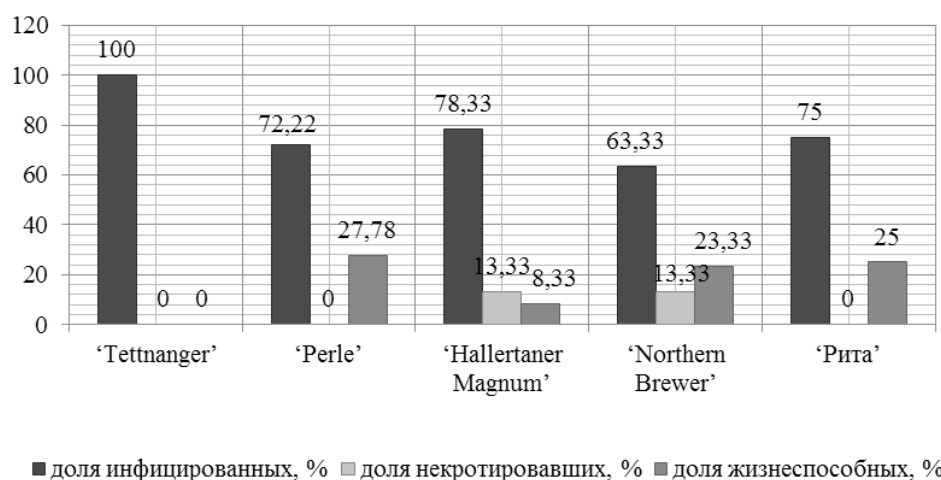
Для сортов 'Tettnanger', 'Perle', 'Hallertaner Magnum', 'Northern Brewer' и 'Рита' в качестве первичных эксплантов использовали также этиолированные почки. Анализ полученных данных показал, что сорт оказал значимое влияние на количество жизнеспособных и инфицированных эксплантов ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

В целом этиолированные почки оказались непригодными для использования их в качестве первичных эксплантов для введения в культуру *in vitro* для сортов хмеля 'Tettnanger', 'Perle', 'Hallertaner Magnum', 'Northern Brewer' и 'Рита', т. к. доля инфицированных эксплантов составила 63,33–100 %, а выход жизнеспособных – 8,33–27,78 %.

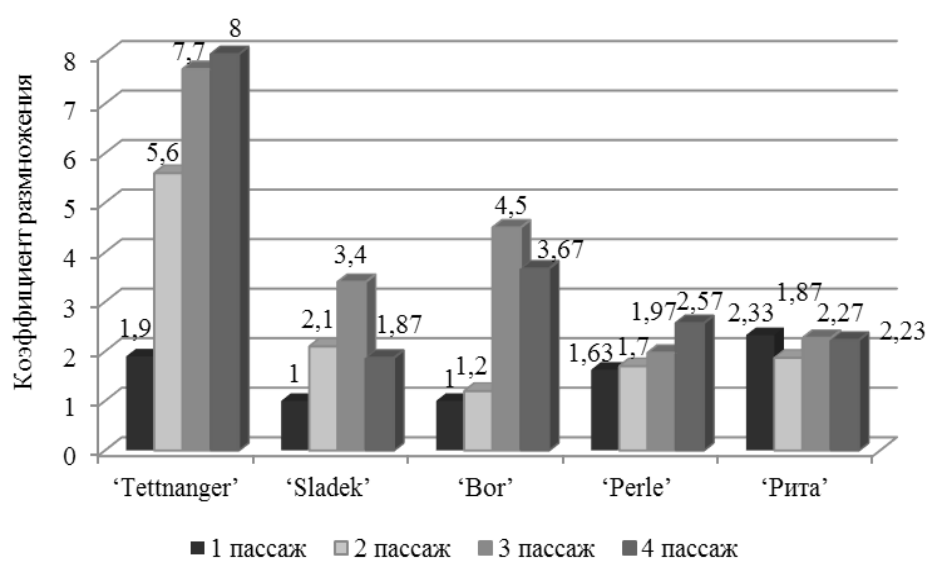
На этапе микроразмножения отмечена зависимость коэффициента размножения от сорта и пассажа ( $p < 0,001$ ), а также от совместного действия двух факторов сорта и пассажа ( $p < 0,001$ ).

Хорошее качество микрочеренков и высокий коэффициент размножения отмечено у сорта 'Tettnanger', который к концу четвёртого пассажа составил  $8,00 \pm 0,12$ , что было достоверно выше по сравнению с другими сортами (рис. 3).

Этиолированные почки корневища



**Рис. 2.** Доля жизнеспособных, некротировавших и инфицированных эксплантов сортов хмеля при введении в культуру *in vitro* этиолированными почками корневища



**Рис. 3.** Зависимость коэффициента размножения растений-регенерантов сортов хмеля в культуре *in vitro* от сорта и числа пассажей на питательной среде с концентрацией 6-БА 0,5 мг/л и GA<sub>3</sub> 1,0 мг/л

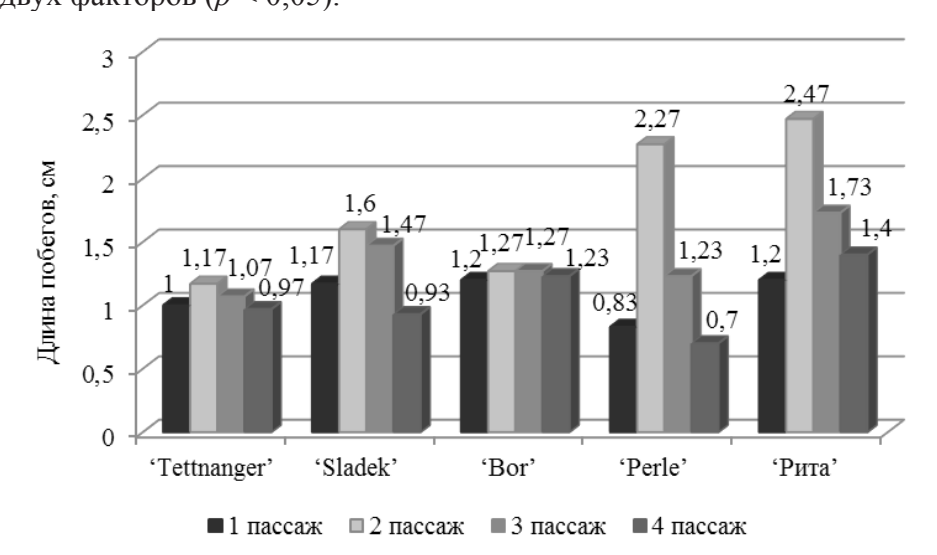
Самый низкий коэффициент размножения был на первом пассаже у сорта 'Sladek' (1,00 ± 0,12), на первом (1,00 ± 0,06) и втором (1,20 ± 0,06)

пассажах у сорта 'Bor', что достоверно отличались от коэффициентов размножения других сортов. Однако для сортов 'Sladek' и 'Bor' достоверно лучшие результаты зафиксированы на 3 пассаже  $3,40 \pm 0,06$  и  $4,50 \pm 0,06$  соответственно, но на 4 пассаже данный показатель уменьшался до  $1,87 \pm 0,07$  для сорта 'Sladek' и  $3,67 \pm 0,20$  для сорта 'Bor'.

Для сорта 'Рита' коэффициент размножения на пассажах был одинаково невысоким:  $2,33 \pm 0,07$  – на первом пассаже,  $2,27 \pm 0,32$  и  $2,23 \pm 0,07$  – на третьем и четвёртом пассаже соответственно, за исключением второго пассажа –  $1,87 \pm 0,15$ .

Низкий коэффициент размножения на первых трёх пассажах ( $1,63 \pm 0,12$  – на первом,  $1,70 \pm 0,25$  и  $1,97 \pm 0,12$  – на втором и третьем соответственно) зафиксировано у сорта 'Perle', тогда как на четвёртом пассаже коэффициент размножения составил  $2,57 \pm 0,07$ .

Длина побегов растений-регенерантов сортов хмеля зависела как от сорта ( $p < 0,001$ ) и пассажа ( $p < 0,001$ ), так и от совместного влияния двух факторов ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 4.** Зависимость длины побегов растений-регенерантов сортов хмеля в культуре *in vitro* от сорта и числа пассажей на питательной среде с концентрацией 6-БА 0,5 мг/л и GA<sub>3</sub> 1,0 мг/л

Максимальная длина побегов была на втором пассаже у сорта 'Рита' ( $2,47 \pm 0,32$  см) и 'Perle' ( $2,27 \pm 0,34$  см). Эти различия были достоверны. Минимальная длина была у сорта 'Perle' на четвёртом пассаже  $0,70 \pm 0$  см и  $0,83 \pm 0,07$  см на первом пассаже. Несколько ниже

была длина побегов у сорта 'Рита' на третьем пассаже ( $1,73 \pm 0,20$  см), а на первом и четвёртом – достоверно не отличались друг от друга ( $1,20 \pm 0,30$  см и  $1,40 \pm 0,25$  см соответственно) (рис. 4).

Данный показатель значимо не различался на всех пассажах у сорта 'Bor' и варьировал от  $1,20 \pm 0,17$  см до  $1,27 \pm 0,15$  см, у сорта 'Tettninger' – от  $0,97 \pm 0,07$  см до  $1,17 \pm 0,12$  см. Культивирование сорта 'Sladek' к четвёртому пассажиру привело к уменьшению длины побега до  $0,93 \pm 0,12$  см. Наибольшие показатели для данного сорта были на предыдущих пассажах – от  $1,17 \pm 0,15$  см до  $1,60 \pm 0,35$  см.

Приведённые показатели размножения в культуре *in vitro* сортов хмеля отмечались в течение 1–4 пассажей. На 5 пассаже наблюдалось уменьшение или полное отсутствие коэффициента размножения, витрификация растений, что отрицательно повлияло на дальнейшее развитие сортов хмеля в культуре *in vitro*.

**Заключение.** На этапе введения в культуру *in vitro* высокой жизнеспособностью характеризовались двухпочковые черенки (66,67–98,77 %) всех сортов хмеля и меристемы (77,47–84,07 %) сортов 'Sladek', 'Bor', 'Perle', 'Hallertaner Magnum', 'Рита'. Слабой регенерационной способностью отличались этиолированные почки корневища (8,33–27,78 %).

На этапе микроразмножения питательная среда MS, дополненная 6-БА в концентрации 0,5 мг/л и гибберелловой кислотой 1,0 мг/л обеспечивает высокие коэффициент размножения (до 8) и длину побегов (до 2,5 см) при отсутствии витрификации. Длительность этапа микроразмножения – 4 пассажа.

#### Библиографический список

1. Гаврилова С.Е. Особенности выращивания посадочного материала хмеля // Современное экологическое состояние природной среды и научно-практические аспекты рационального природопользования: материалы I Междунар. науч.-практ. конф., с. Соленое Займище, 29 февраля 2016 г. / ФГБНУ «Прикарпатский науч.-исслед. ин-т аридного земледелия»; редкол.: Н. А. Щербакова. – с. Соленое Займище, 2016. – С. 1878-1882. – ISBN 978-5-9908130-0-7.
2. Гашенко О.А. Вирусные заболевания растений вида *Humulus lupulus* L. в Республике Беларусь и получение посадочного материала хмеля обыкновенного в культуре *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук. – аг. Самохваловичи, Минской обл., 2018. – 134 с.
3. Джигадло Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е. Н. Джигадло. – Орёл: ВНИИСПК, 2005. – 50 с.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В. В. Технология микроклонального размножения растений / под ред. В.П. Лобова. – Киев: Ин-т физиологии растений и генетики, 1992. – С. 149-150.

5. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Семенас С.Э., Колбанова Е.В., Красинская Т.А. Вегетативное размножение плодовых и ягодных культур *in vitro* // Генетические основы селекции растений. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларус. навука, 2012. – Т. 3. – Гл. 5. – С. 289–315. – ISBN 978-985-08-1392-3.
6. Либацкий Е.П. Хмелеводство: учебники и учеб. пособия для подгот. с.-х. кадров массовых профессий / под ред. Е. В. Колесникова. – М.: Колос, 1984. – 287 с.
7. Милоста Г.М., Лапа В.В. Агробиологические основы выращивания хмеля в Республике Беларусь: монография. – Гродно: ГТАУ, 2010. – 286 с. – ISBN 978-985-6784-70-8.
8. Попов В.И., Высоцкий В.А., Туктагулов И.М. Условия культивирования изолированных апексов хмеля для клонального микроразмножения // Физиология растений. – 1985. – Т. 32. – Вып. 6. – С. 1191-1195. – ISSN 0015-3303.
9. Certification schemes. Pathogen-tested material of Hop. EPPO Standards PM 4/16 (1) // Bulletin OEPP/EPPO. – 1998. – Vol. 23. – P. 735-736.
10. Murashige T., Skoog F.A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

## **IN VITRO MICROPROPAGATION OF HOP CULTIVARS**

**Gashenko O. A., Kastritskaya M. S., Kukharchik N. V.**

*Republican Research and Production  
Associated Unitary Enterprise "Institute for Fruit Growing",  
agro-town Samokhvalovichy, Republic of Belarus, e-mail: GashenkoOlga@yandex.by*

The results of *in vitro* micropropagation of hop cultivars are presented in the paper. Biological and technological components for obtaining hops planting material *in vitro* (explants type, multiplication factor, shoots length, and quantity of passages) were developed. During *in vitro* introduction stage, two-bud cuttings (66.67–98.77 %) of all hop cultivars and ‘Sladek’, ‘Bor’, ‘Perle’, ‘Hallertaner Magnum’, and ‘Rita’ meristems (77.47–84.07 %) were characterized by high viability. Etiolated buds of rhizome were characterized by weak regeneration (8.33–27.78 %). At the stage of micropropagation we registered that the multiplication factor and the shoots length of hop regenerants depended on the cultivar and passage ( $p < 0.001$ ). A high multiplication rate was observed in the ‘Tettnanger’ cultivar (up to  $8.00 \pm 0.12$  at the 4th passage), in the ‘Rita’ and ‘Perle’ cultivars the following length of the shoots was registered (up to  $2.47 \pm 0.32$  and  $2.27 \pm 0.34$  cm, at the 3rd passage). The micropropagation stage lasted 4 passages.

**Key words:** *Humulus* spp., *in vitro* culture, micropropagation, passage, Belarus.