

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

GA₃ – 1,0 мг/л на этапе введения, 6-БА – 0,5 мл/л и GA₃ – 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).

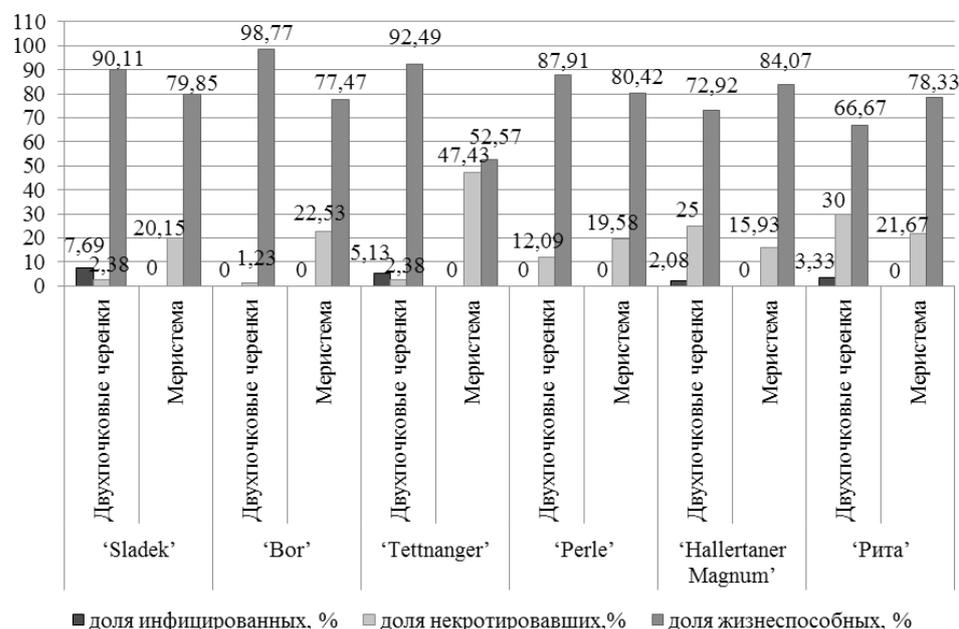


Рис. 1. Влияние типа экспланта на количество жизнеспособных, некротировавших и инфицированных эксплантов сортов хмеля при введении в культуру *in vitro*

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

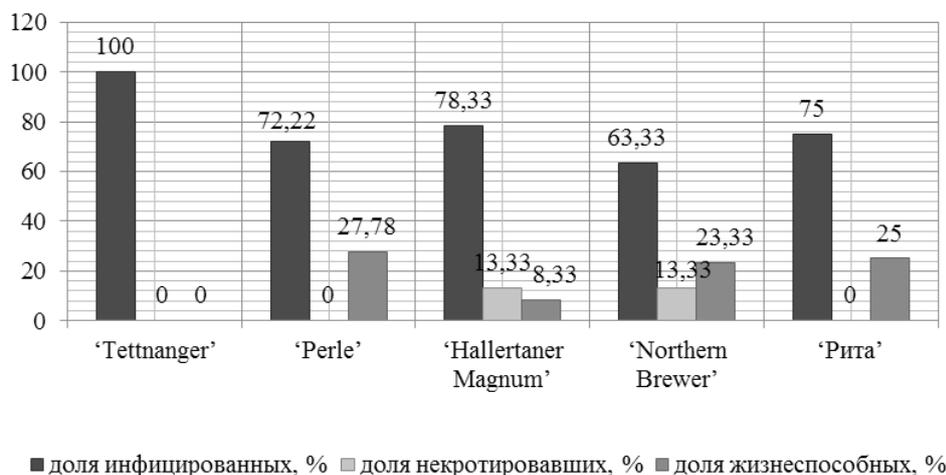


Рис. 2. Доля жизнеспособных, некротировавших и инфицированных эксплантов сортов хмеля при введении в культуру *in vitro* этиолированными почками корневища

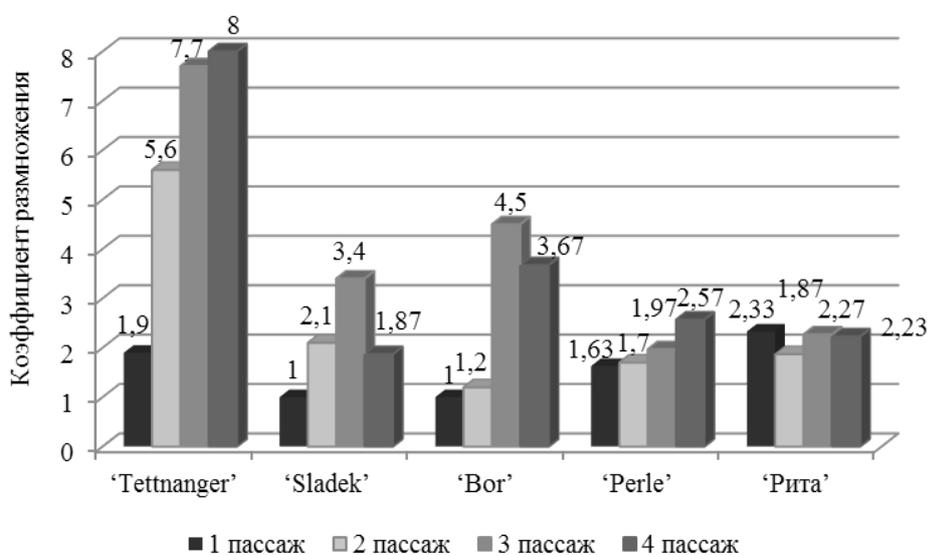


Рис. 3. Зависимость коэффициента размножения растений-регенерантов сортов хмеля в культуре *in vitro* от сорта и числа пассажей на питательной среде с концентрацией 6-БА 0,5 мг/л и GA₃ 1,0 мг/л

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 ($p < 0,05$).

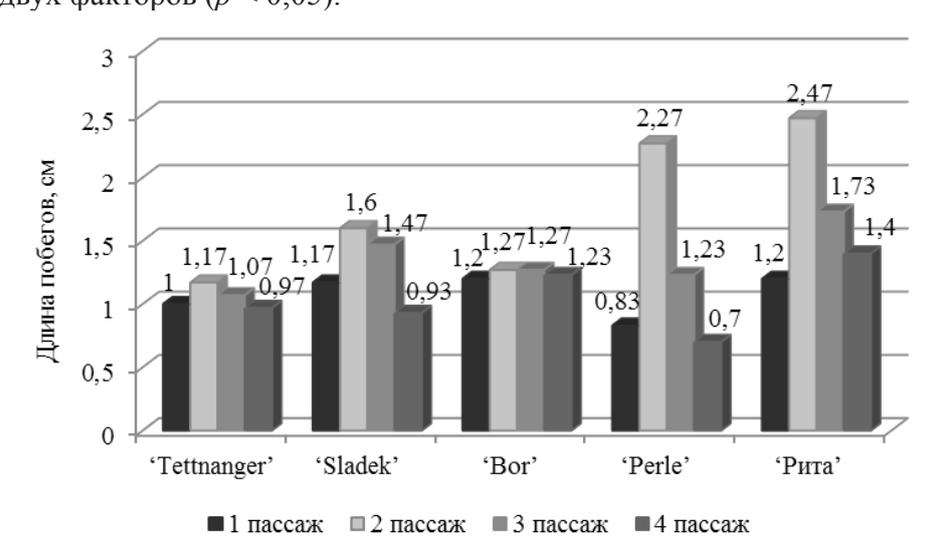


Рис. 4. Зависимость длины побегов растений-регенерантов сортов хмеля в культуре *in vitro* от сорта и числа пассажей на питательной среде с концентрацией 6-БА 0,5 мг/л и GA₃ 1,0 мг/л

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 ± 0.12 at the 4th passage), in the ‘Rita’ and ‘Perle’ cultivars the following length of the shoots was registered (up to 2.47 ± 0.32 and 2.27 ± 0.34 cm, at the 3rd passage). The micropropagation stage lasted 4 passages.

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