

УДК 633.791:631.533.3:581.143.6(476)

М. С. КАСТРИЦКАЯ, Н. В. КУХАРЧИК, О. А. ГАШЕНКО

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ СОРТОВ ХМЕЛЯ *IN VITRO*

Институт плодородства, аг. Самохваловичи, Минский район, Республика Беларусь,
e-mail: Kychnataly@rambler.ru

(Поступила в редакцию 16.05.2012)

Введение. Хмель (*Humulus Lupulus* L.) – незаменимое сырье для пивоварения. Ценность шишек хмеля определяется главным образом наличием в них горьких эфирных масел, а также специфических веществ. Благодаря наличию в хмеле уникальных веществ его можно широко применять в пищевой промышленности, в медицине и других отраслях [1, 2]. Находящиеся в шишках хмеля горькие вещества подавляют развитие многих микроорганизмов, что делает его незаменимым в процессе брожения пива. Кроме этого, хмель придает пиву характерный аромат, специфический горький вкус, способствует пенообразованию и пеностойкости [1–3].

Традиционно хмель размножается вегетативно с использованием подземных частей растения. В среднем одно маточное растение дает 10–15 черенков, которые, как правило, поражены грибковыми, бактериальными и вирусными болезнями. При необходимости ускоренного размножения используют также корневища и зеленые побеги [3, 4]. К выращиванию хмеля из семян прибегают лишь в селекционной работе. Микроразмножение растений хмеля в культуре *in vitro* позволяет получать 105–107 черенков из одного растения в год. Саженцы, полученные из этих черенков, свободны от грибной, бактериальной и значительной части вирусных инфекций [5–9].

Основной метод, используемый при микроразмножении растений хмеля *in vitro*, – активация развития уже существующих в растении меристем при снятии апикального доминирования. Это может быть достигнуто как удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде, так и добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала многих сельскохозяйственных культур, в том числе технических, цветочных, плодовых и ягодных [10, 11].

Цель исследований – разработка и усовершенствование алгоритма размножения посадочного материала хмеля *in vitro* на основе изучения биологических и технологических параметров введения *in vitro*, выращивания на искусственных питательных средах и адаптации в нестерильных условиях.

Объекты и методы исследования. Культуральные исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства» в 2011 г. Объекты исследований: растения-регенеранты сортов хмеля Тетнангер, Бор, Сладек.

Сорт Тетнангер. Традиционный немецкий сорт, названный по области, в которой выращивался много лет. Созревает в середине августа. Урожайность составляет 800–1400 кг/га. Среднеустойчив к грибным заболеваниям, чувствителен к насекомым и клещам. Структура шишки: средней компактности, маленькая, светлая. Аромат: хорошо выраженный, слегка пикантный. Содержание альфа-кислот – 2,5–5,5 %, бета-кислот – 3,0–5,0 % (в весовом отношении). Соотношение альфа- и бета-кислот – 1,0.

Сорт Бор. Регион выращивания – Чехия. Сроки созревания – от среднего до позднего. Урожайность сорта составляет 1200–1500 кг/га. Содержание альфа-кислот – 6,5–0,5 %, бета-кислот – 3,5–8,5 % (в весовом отношении). Соотношение альфа- и бета-кислот – 0,6–2,3.

Сорт Сладек. Регион выращивания – Чехия. Сроки созревания – от среднего до позднего. Урожайность – 1250–530 кг/га. Содержание альфа-кислот – 5,0–9,0 % (в весовом отношении), бета-кислот – 3,5–8,0 %. Соотношение альфа- и бета-кислот – 0,7–1,3.

Порядок подготовки эксплантов. Растительный материал предварительно обрабатывали: удаляли покровные чешуи, почки стерилизовали, с помощью бинокулярного микроскопа Olympus-SZ61 при увеличении $\times 12$ и специального набора инструментов выделяли меристему размером до 0,5 мм.

Питательные среды. Для культивирования использовали минеральный состав питательных сред Мурасиге и Скуга (MS).

Режимы культивирования и техника проведения стерильных работ. Условия культивирования растений *in vitro*: освещение – 2,5–3 тыс. лк, температура – 21–23 °С, фотопериод – 16/8 ч. Длительность субкультивирования составляла 4 недели. Растения культивировали в пробирках размером 202×22 мм, объем питательной среды 10 мл. Среда стерилизовали при давлении 1 атм. в течение 15 мин.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе введения в культуру *in vitro* необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры, а на этапе собственно микроразмножения – максимальное количество побегов.

Ведение в культуру *in vitro*. Изучены 4 срока введения в культуру *in vitro* эксплантов хмеля (сорт Тетнангер), различающиеся по стадии онтогенеза, и два типа эксплантов.

Оптимальные результаты стерилизации отмечены при использовании следующей схемы: 70 %-ный этанол – 1 мин.; 33 %-ная перекись водорода – 10 мин.; однократная промывка стерильной водой – 5 мин.

В культуру *in vitro* вводили этиолированные вегетативные почки возобновления, находящиеся на корневищах, взятые в период органического покоя (первый срок, 5 апреля). Данный тип экспланта и период введения оказались нерезультативными по причине крайне высокого уровня инфицированности (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Результативность введения эксплантов хмеля в культуру *in vitro* в зависимости от сроков изоляции и типа экспланта, 2011 г., шт. (%)

Срок введения	Тип экспланта	Экспланты			
		введенные <i>in vitro</i>	инфицированные	некротированные	пролиферирующие
05.04.	Этиолированные почки корневища	20	20	0	0
16.06.	Почки из активно вегетирующих стеблей	49	5	24 (48,9)	20 (40,8)
01.07.		120	40	20 (16,7)	60 (50,0)
30.08.	Почки из стеблей в конце вегетации	160	65	95 (59,3)	0
07.09.	Почки из стеблей после окончания роста	92	12	80 (87,0)	0
13.09.		90	14	76 (84,4)	0

Вегетативные почки из активно вегетирующих стеблей хмеля вводили *in vitro* 16 июня и 7 июля. С почек в стерильных условиях удаляли 2–3 пары верхних зачаточных листьев, оставляя конус роста, включающий меристематическую ткань, с несколькими примордиальными листочками. Данный тип экспланта и период введения оказался единственно результативными – эффективность введения составила 40,8–50,0 %.

Третий и четвертый сроки введения (в период затухания и окончания роста) также не привели к получению пролиферирующих эксплантов, в первую очередь по причине большого количества некротировавших эксплантов (59,3–84,4 %).

Апикальные меристемы сортов хмеля Тетнангер, Бор и Сладек для дальнейших исследований выделяли из вегетативных почек активно растущих стеблей хмеля. Введение в культуру проводили в фазу активного роста побегов, в том числе принудительно выведенных из периода покоя в условиях климатической камеры (март).

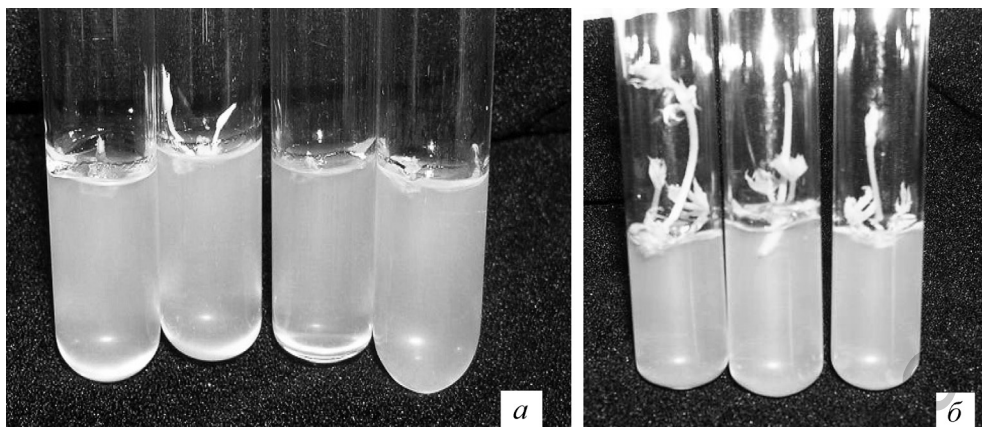


Рис. 1. Инициация культуры *in vitro* хмеля сорта Бор: а – 10 дней культивирования на 0-м пассаже; б – 20 дней культивирования

При введении в культуру *in vitro* меристематические аппексы сортов хмеля Бор и Сладек характеризовались высокой регенерационной способностью: доля жизнеспособных эксплантов (эффективность введения эксплантов *in vitro*) для сорта Бор составила 82,0 %, для сорта Сладек – 84,5 % (рис. 1, табл. 2). Несколько ниже результативность введения *in vitro* отмечена для сорта Тетнангер.

Т а б л и ц а 2. Результативность введения эксплантов хмеля в культуру *in vitro* в зависимости от сорта, 2011 г., шт. (%)

Сорт хмеля	Введено меристем	Экспланты		
		некроз	инфицированные	жизнеспособные
Тетнангер	235	51 (21,7)	58 (24,7)	126 (53,6)
Бор	61	3 (4,9)	8 (13,1)	50 (82,0)
Сладек	84	9 (10,7)	4 (4,8)	71 (84,5)

Т а б л и ц а 3. Результативность введения и размножения эксплантов хмеля *in vitro* (0-й пассаж) в зависимости от состава питательных сред, 2011 г.

Питательная среда	Пролиферирующие экспланты в пассаже		Коэффициент размножения в 0-м пассаже
	в начале пассажа	в конце пассажа	
MS, В ₁ – 0,5 мг/л; В ₆ – 0,5 мг/л; С – 1,0 мг/л; 6-БА – 2,5 мг/л; глюкоза – 40 г/л; агар – 4,8 г/л	9	19	2,1
MS, В ₁ – 0,5 мг/л; В ₆ – 0,5 мг/л; С – 1,0 мг/л; 6-БА – 2,0 мг/л; глюкоза – 30 г/л; ГК – 1,0 мг/л; агар – 4,8 г/л	11	30	2,7
MS, В ₁ – 0,5 мг/л; В ₆ – 0,5 мг/л; С – 1,0 мг/л; 6-БА – 0,5 мг/л; ГК – 1,0 мг/л; глюкоза – 30 г/л; агар – 4,8 г/л	60	66	1,1

Введенные *in vitro* экспланты хмеля выращивали на питательных средах, представленных в табл. 3.

Поскольку в культуру *in vitro* вводили достаточно крупные экспланты, содержащие не только истинно меристему, но и зачаток вегетативной почки, размножение было отмечено уже в течение нулевого пассажа, т. е. на этапе введения *in vitro*. Коэффициент размножения составил от 1,1 до 2,7. По этому показателю была выделена лучшая питательная среда для введения *in vitro* эксплантов хмеля, содержащая кроме макро- и микросолей по Мурасиге и Скугу, 6-бензиладенин (6-БА) в концентрации 2,0 мг/л, гибберелловую кислоту (ГК) в концентрации 1,0 мг/л, а также глюкозу вместо традиционной для MS-среды сахарозы.

Микроразмножение. Для дальнейшего размножения трех сортов хмеля – Тетнангер, Бор и Сладек – на 1–5-м пассажах питательная среда была модифицирована в сторону уменьшения

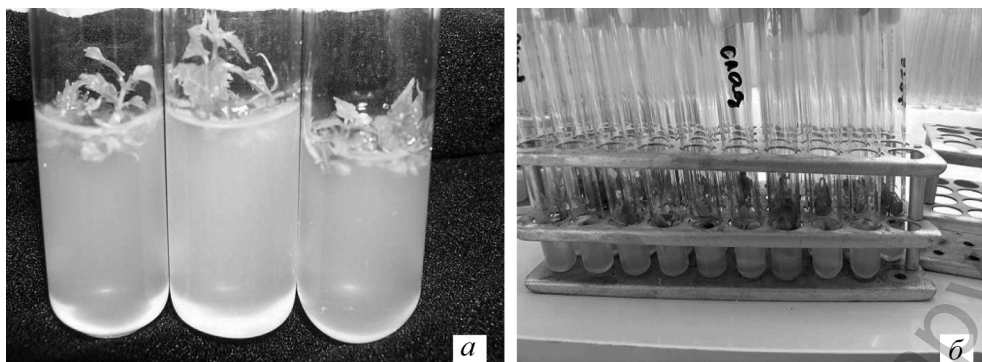


Рис. 2. Культивирование *in vitro* хмеля на первом пассаже: а – сорт Бор; б – сорт Сладек

концентрации цитокинина и углевода, также изменен состав витаминов. Разработанная питательная среда обеспечивает хорошее развитие (длина – не менее 10 мм) и достаточное количество микрочеренков в конгломерате (рис. 2).

В основе питательной среды для размножения трех сортов хмеля лежит минеральный состав среды Мурасиге и Скуга, дополненный витаминами (тиамин, 0,5 мг/л, пиридоксин, 0,5 мг/л, никотиновая кислота, 0,5 мг/л, витамин С, 1 мг/л, мезоинозит, 100 мг/л, глицин, 2 мг/л), цитокининами (цитокинин 6-БА, 0,5 мг/л), гибберелловой кислотой, 1,0 мг/л, и источником углевода – глюкозой, 20 г/л.

На этапе микроразмножения отмечена различная регенерация эксплантов в зависимости от пассажа и сорта хмеля (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Коэффициент размножения эксплантов хмеля *in vitro* в зависимости от сорта и пассажа культивирования (1–5-й пассажи)

Сорт хмеля	Пассаж				
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й
Тетнангер	1,9	5,6	7,7	8,0	7,1
Бор	1	1,2	4,5	–	–
Сладек	1	2,1	3,4	–	–

Т а б л и ц а 5. Концентрации ауксинов в питательных средах для укоренения хмеля, мг/л

Сорт хмеля	ИМК		ИУК		НУК	
	1	2	1	2	1	2
Тетнангер	0,1–0,5	0,5	0,1–0,5	0,5	0,1–0,5	–
Бор	0,2–0,5	0,5	0,2–0,5	0,5	0,2–0,5	–
Сладек	0,2–0,5	0,5	0,2–0,5	0,5	0,2–0,5	–

П р и м е ч а н и е: 1 – изученный диапазон концентраций; 2 – оптимальные концентрации.

Максимальные коэффициенты размножения, возрастающие от 1-го до 4-го пассажа, отмечены у сорта Тетнангер, они составили на 4-м пассаже 8,0 шт. растений-регенерантов; у сортов Бор и Сладек коэффициенты размножения и темпы их роста были ниже.

Установлено, что снижение температуры в культуральном помещении ниже 19 °С в течение любого периода микроразмножения приводит к наступлению физиологического покоя у регенерантов хмеля (пожелтению и в дальнейшем частичному отмиранию вегетативных органов регенерантов *in vitro*).

Укоренение микропобегов хмеля проводили в культуре *in vitro* на питательных средах, представленных в табл. 5. Исследования показали, что хмель хорошо укореняется в культуре *in vitro*, корни начинают формироваться через 7–10 дней после пересадки на среду, содержащую ауксины. Оптимальная концентрация индолилмасляной кислоты (ИМК) для хмеля – 0,5 мг/л. Индолилук-

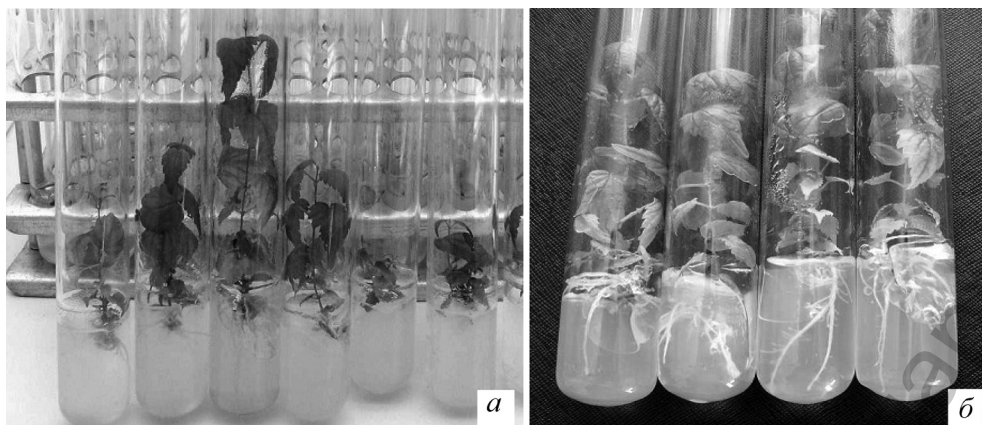


Рис. 3. Культивирование хмеля на питательных средах с индолилмасляной кислотой: а – сорт Тетнангер; б – сорт Бор

сусная кислота (ИУК), несмотря на хороший процент укоренения растений-регенерантов, вызывает гипертрофированное разрастание корней хмеля и дальнейшую их гибель. Нафтилуксусная кислота (НУК) способствует образованию гипертрофированного каллуса у основания микропобегов и практически не приводит к ризогенезу.

Необходимо отметить, что укореняемость растений-регенерантов хмеля в первую очередь зависит от качества микрочеренка. До 90,0 % растений-регенерантов с длиной побега 2 см, имеющих 5–7 междоузлий, образовывали корни на любых средах для укоренения, содержащих ИМК, и средах без ауксинов (рис. 3).

Высокий процент укореняющихся растений-регенерантов хмеля в культуре *in vitro* на безгормональных питательных средах и при добавлении ИМК обусловлен, с одной стороны, генетически, с другой – низкими концентрациями цитокинина, использовавшимися на этапе микроразмножения, и непродолжительным культивированием *in vitro*. В конце пассажа ризогенеза укорененные растения-регенеранты хмеля достигали 4,2–8,1 см, содержали 5–8 междоузлий, 3–5 шт. придаточных корней длиной не менее 2,5 см.

Заключение. Показана высокая результативность введения эксплантов хмеля *in vitro* (от 53,6 % у сорта Тетнангер до 84,5 % у сорта Сладек) при использовании вегетативных почек из активно растущих побегов, причем вегетация побега может быть вызвана искусственно. Выделена лучшая питательная среда для введения *in vitro* эксплантов хмеля, содержащая кроме макро- и микросолей, по Мурасиге и Скугу, 6-бензиладенин (2,0 мг/л), гибберелловую кислоту (1,0 мг/л), а также глюкозу (30 г/л).

Выявлена зависимость коэффициента размножения от пассажа культивирования и сорта хмеля. Максимальные коэффициенты размножения (до 8 в 4-м пассаже) отмечены у сорта Тетнангер.

Оптимальной средой для укоренения побегов хмеля в культуре *in vitro*, обеспечивающей 90,0 %-ное укоренение, длину корней 2,5 см, является среда Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением ИМК в концентрации 0,5 мг/л. Установлено, что для успешного процесса укоренения необходимо использовать только хорошо развитые растения-регенеранты, имеющие 5–7 междоузлий.

Литература

1. Хмель и его использование / А. А. Годованый [и др.]; под ред. И. С. Ежова. – К.: Урожай, 1990. – 336 с.
2. Герасимчук, В. И. Хмель в медицине, быту и народном хозяйстве / В. И. Герасимчук, И. Г. Рейтман, И. С. Ежов; под ред. И. С. Ежова. – К.: Урожай, 1994. – 352 с.
3. Способ размножения хмеля: пат. Рос. Федерации № 2372773 С 2, МПК A01G 17/00 / А. И. Марзоев, Г. К. Абиев, С. А. Бекузарова, В. В. Бязров, А. А. Марзоева; заявитель «ООО Хмель Кавказа». – № 2007141237/12; опубл. 20.05.2009. Бюл. – 2009. № 32. – 3 с.
4. *In vitro* технология оздоровления, культивирования, размножения и адаптации к условиям *in vivo* растений хмеля (*Humulus Lupulus* L.) ароматичных сортов: пат. Украины № 59131/7 A01H4/00 / М. Д. Мельничук; заявитель

Нац. аграр. ун-т. – № 2003021274, заявл. 12.02.2003; опубл. 15.08. 2003 // Офиц. бюл. «Промышленная собственность». Кн. 1: Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем. – 2003. – № 8. – 2 с.

5. Способ микроклонального размножения регенерантов хмеля, выращенных из апексов *in vitro*: пат. Украины № 30753 A01H4/00 // Б. Ф. Кормильцев, Л. П. Бадамшина, М. Г. Левчук; заявитель Ин-т сел. хоз-ва. – № u200712536, заявл. 12.11.2007; опубл. 11.03.2008 // Офиц. бюл. «Промышленная собственность». Кн. 1: Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем. – 2008. – № 5. – 5 с.

6. Vine, S. J. The culture of shoot tips of hop (*Humulus Lupulus*) to eliminate viruses / S. J. Vine, O. P. Jones // Journal of Horticultural Sciences. – 1996. – Vol. 44. – P. 281–284.

7. Ferant, N. Differentiation of hop (*Humulus Lupulus*) *in vitro* / N. Ferant // Plant Physiol. and biochem. – 1996. – P. 4.

8. Cerenak, A. Hop tissue culture in Slovenia / A. Cerenak, J. Sustar-Vozlic // International hop growers convention I. H. G. C. Proceedings of Scientific Commission. – 1999. – P. 19–25.

9. Kubo, S. Culture of stem tips of hop (*Humulus Lupulus*) and elimination of virus symptoms / S. Kubo, Y. Kagani, K. Nonaka // Dept. Res. Lab. Kirin brevery Co., LTD. – 1975. – N 18. – P. 55–62.

10. Probasco, G. The use of Shoot-tip Culture to eliminate viruses from Hop Varieties Growth in the United States / G. Probasco, S. Winslow // MBAA Technical Quarterly. – 1986. – N 23. – P. 26–31.

11. 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. 1191–1195.

N. V. KUKHARCHYK, M. S. KASTRYTSKAYA, O. A. HASHENKA

MICRO-PROPAGATION OF HOP VARIETIES *IN VITRO*

Summary

The basis for the establishment of virus-free hop plant production has been created for the first time in Belarus. Regeneration of apical meristems and vegetative buds of hop *in vitro* has been studied. Biological and technological elements (culture medium composition at different stages of propagation *in vitro*, types of explants and variety peculiarity) have been developed.