

Ольга Владимировна Бычкова^{1✉}, Ольга Николаевна Мироненко²,
Анастасия Викторовна Небылица³, Юлия Романовна Желонкина⁴,
Елена Павловна Мякишева⁵

^{1,2,3,4,5}Алтайский центр прикладной биотехнологии Алтайского государственного университета, Барнаул, Россия

¹olga4ka_asu@mail.ru

²olgmironenko@mail.ru

³nastaynebylitsa@mail.ru

⁴lynxclaw@yandex.ru

⁵emjak@yandex.ru

АДАПТАЦИИ РЕГЕНЕРАНТОВ *HUMULUS LUPULUS* L. К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*

Цель исследования – отработка схемы двухступенчатой адаптации растений регенерантов хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) к условиям *ex vitro* с использованием гидропонной установки. Задачи: изучение влияния способа фиксации регенерантов хмеля в гидропонной системе; определение длительности этапа адаптации на гидропонике; подбор состава субстрата на втором этапе адаптации. Объект исследования – стерильная культура хмеля обыкновенного трех сортов: Цивильский, Флагман и Таурус, после завершения этапа укоренения *in vitro* на питательной среде по прописи Мурасиге-Скуга (MS), содержащей глюкозу (20 г/л) и ИМК (0,5 мг/л). Определена длительность этапа адаптации хмеля, укорененного в условиях *in vitro*, на гидропонной системе приливно-отливного типа, определяемая по устойчивому поддержанию тургора листьями и активному росту побегов – 18–21 день. Изучено влияние способа фиксации регенерантов хмеля в гидропонной системе: использование рассадных кассет с субстратом из перлита и вермикулита (1 : 1) показало на 25 % выше выживаемость растений по сравнению с бессубстратными кюветами с вкладышами из полиэтиленовой пленки. Показано, что в условиях гидропонной установки, независимо от способа фиксации, высота побегов увеличивалась на 36,0–48,3 %. Корневая система у адаптируемых в кассетах с субстратом образцов была лучше развита и характеризовалась большим количеством корней 2-го порядка длиной не менее 4 см. Последующий этап адаптации в большинстве торфосодержащих субстратов обеспечивает 100 % выживаемость и получение посадочного материала высокого качества. Представлены рекомендации по выращиванию посадочного материала хмеля после двухэтапной адаптации.

Ключевые слова: адаптация *ex vitro*, гидропонная установка, посадочный материал, регенеранты, хмель обыкновенный, *Humulus lupulus* L.

Для цитирования: Адаптации регенерантов *Humulus lupulus* L. к условиям *ex vitro* / О.В. Бычкова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 5. С. 27–33. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-5-27-33.

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-64-10040.

Olga Vladimirovna Bychkova^{1✉}, Olga Nikolaevna Mironenko², Anastasia Viktorovna Nebylitsa³,
Yulia Romanovna Zhelonkina⁴, Elena Pavlovna Myakisheva⁵

^{1,2,3,4,5}Altai Center for Applied Biotechnology, Altai State University, Barnaul, Russia

¹olga4ka_asu@mail.ru

²olgmironenko@mail.ru

³nastaynebylitsa@mail.ru

⁴lynxclaw@yandex.ru

⁵emjak@yandex.ru

ADAPTATION OF *HUMULUS LUPULUS* L. REGENERANTS TO EX VITRO CONDITIONS

The purpose of the study is to develop a scheme for two-stage adaptation of regenerated plants of common hop (*Humulus lupulus* L.) to ex vitro conditions using a hydroponic installation. Objectives: to study the influence of the method of fixing hop regenerants in a hydroponic system; to determine the duration of the adaptation stage in hydroponics; to select the substrate composition at the second stage of adaptation. The object was a sterile culture of common hop of three varieties: Tsivilsky, Flagman and Taurus, after completion of the in vitro rooting stage on a nutrient medium according to the Murashige-Skoog recipe (MS) containing glucose (20 g/l) and IBA (0.5 mg/l). The duration of the adaptation stage of hops rooted in vitro in a tidal-type hydroponic system was determined, identified by the stable maintenance of turgor by leaves and active growth of shoots – 18–21 days. The influence of the method of fixing hop regenerants in a hydroponic system was studied: the use of seedling cassettes with a substrate of perlite and vermiculite (1 : 1) showed a 25 % higher survival rate of plants compared to substrate-free cuvettes with liners made of polyethylene film. It was shown that under hydroponic installation conditions, regardless of the fixation method, the height of the shoots increased by 36.0–48.3 %. The root system of the samples adapted in cassettes with substrate was better developed and was characterized by a large number of 2nd order roots with a length of at least 4 cm. The subsequent stage of adaptation in most peat-containing substrates ensures 100 % survival and the production of high-quality planting material. Recommendations for growing hop planting material after two-stage adaptation are presented.

Keywords: ex vitro adaptation, hydroponic facility, planting material, regenerants, common hop, *Humulus lupulus* L.

For citation: Adaptation of *Humulus lupulus* L. regenerants to ex vitro conditions / O.V. Bychkova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(5): 27–33 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-5-27-33.

Acknowledgments: the study was funded by the Russian Science Foundation № 23-64-10040.

Введение. Выращивание растений в условиях *in vitro* влечет за собой ряд морфофизиологических и биохимических изменений в условиях очень высокой влажности воздуха, низкой освещенности, постоянной температуры, очень низкой турбулентности воздуха. Зачастую отмечается недостаточная концентрация CO₂, зависящая от источников углерода, регуляторов роста и водного потенциала питательной среды, этилена и других летучих веществ и т. д. К тому же условия могут меняться от типа сосуда и степени его закупорки. В связи с этим адаптация к септическим условиям и акклиматизация регенерантов требует большего внимания, чем растения, выращенные в естественных условиях [1, 2].

После переноса в условия *ex vitro* растениям требуется некоторое время, чтобы «исправить» аномалии, вызванные культивированием *in vitro* [3, 4]. Растения должны перестроиться со смешанного, а зачастую гетеротрофного типа питания на автотрофный. Помимо этого происходит адаптация фотосинтетического аппарата. Для стабилизации водного баланса и эффективной регуляции транспирации необходимо развитие кутикулы, эпикутикулярного воска и повышение функциональности устьичного аппарата. Как

правило, корневая система, сформированная в условиях *in vitro*, характеризуется отсутствием корневых волосков и корней второго порядка [5]. В связи с этим для успешного роста и развития необходимо новообразование корней, имеющих характерное морфологическое строение интактных растений.

Таким образом, на последнем, ключевом этапе микроразмножения для растений-регенерантов необходимо создание условий, при которых они смогут перестроиться к внезапным изменениям условий окружающей среды для дальнейшего полноценного роста и развития.

Большинство растений адаптируют в теплицах, подбирая оптимальный субстрат (органический, минеральный или смешанный), дозы обработки фунгицидами, поскольку повышенная влажность в начале адаптации ведет к бурному развитию грибков на растениях и поверхности субстрата, дополнительно проводят обработку абсцизовой кислотой и/или обогащают CO₂ и т. д. [6]. В качестве альтернативы ряд исследователей предлагает использование гидропонной установки на этапе адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro* [5, 7, 8]. Замена субстрата жидкой средой и автоматический режим освещения и контроля подачи питательного раствора обеспе-

чивают высокую производительность при создании больших объемов посадочного материала. Разные эколого-морфологические характеристики культур обуславливают необходимость индивидуального подбора условий адаптации.

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) является мезогигрофитной многолетней травянистой лианой, которая культивируется как эфирномасличная, техническая и лекарственная культура. В производственных целях сорта размножают вегетативно, и усовершенствование технологических процессов производства саженцев является очень актуальным.

Цель исследования – отработка схемы двухступенчатой адаптации растений-регенерантов хмеля обыкновенного к условиям *ex vitro* с использованием гидропонной установки.

Задачи: изучение влияния способа фиксации регенерантов хмеля в гидропонной системе; определение длительности этапа адаптации на гидропонике; подбор состава субстрата на втором этапе адаптации.

Объект и методы. Объектом служила стерильная культура хмеля обыкновенного трех сортов: Цивильский, Флагман и Таурус, после завершения этапа укоренения *in vitro* на питательной среде по прописи Мурасиге-Скуга (MS),

содержащей глюкозу (20 г/л) и ИМК (0,5 мг/л). Адаптация растений-регенерантов проходила в два этапа, на первом использовали гидропонную установку приливно-отливного типа. Растения отмывали от агара в дистиллированной воде (рис. 1, А) и закрепляли в кассеты с полиэтиленовыми вкладышами без субстрата (рис. 1, Б) либо помещали в рассадные кассеты объемом 95–120 мл с субстратом из перлита и агровермикулита (1 : 1) (рис. 1, В). Для поддержания повышенной влажности первые 5–7 сут растения укрывали прозрачной полиэтиленовой пленкой. Гидропонную установку заправляли питательным раствором по прописи $\frac{1}{4}$ MS, модифицированной по содержанию K_2HPO_4 , pH раствора контролировали ежедневно. Режим подачи раствора: 5 мин подача, 20 мин перерыв. Освещение в режиме 16 ч день / 8 ч ночь. Окончание этапа определяли по совокупности двух показателей: стойкое поддержание тургора листьями и интенсивный рост побегов. По завершении этапа на гидропонной установке оценивали следующие параметры: количество побегов 1-го и 2-го порядков (шт.), высота главного побега (см), количество корней (шт.), средняя длина корней (см).

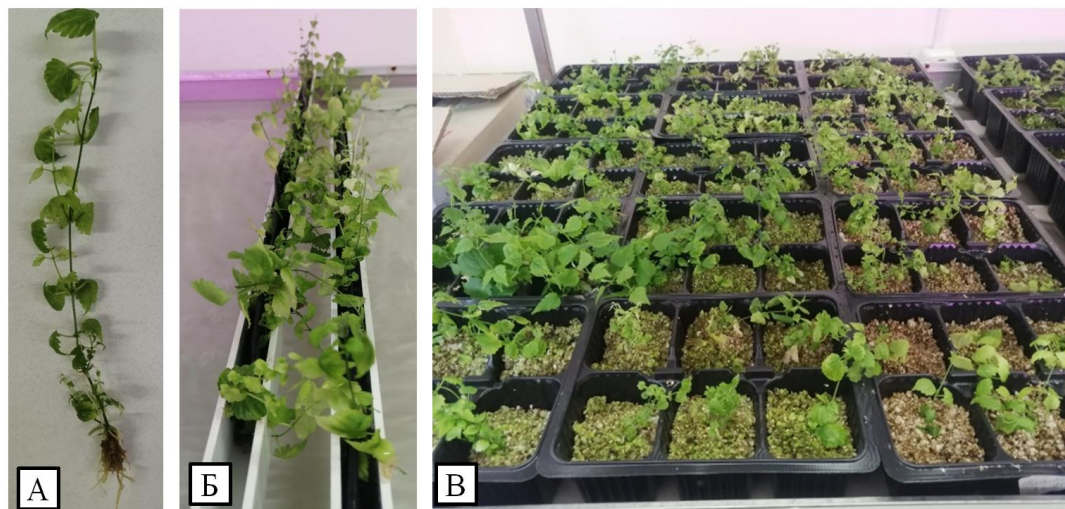


Рис. 1. Регенеранты *H. lupulus* L. на гидропонной установке: А – после укоренения *in vitro* перед высадкой; Б – высаженные в кювету с полиэтиленовыми вкладышами; В – высаженные в рассадные кассеты

На втором этапе адаптации растения пересаживали в рассадные горшки объемом 500 мл с заранее подготовленными и простерилизованными субстратами. Оценивали 10 вариантов субстрата следующего состава (в скобках указаны объемные доли): 1 – чернозем; 2 – верховой

торф Klassman TS1 (торф I); 3 – чернозем : перлит (3 : 1); 4 – чернозем : песок речной (3 : 1); 5 – чернозем : перегной (3 : 1); 6 – торф I : перегной (3 : 1); 7 – торф I : песок (3 : 1); 8 – торф I : перлит (3 : 1); 9 – чернозем : торф верховой раскисленный Сибирский «БиоМастер» (торф II) :

перлит (1 : 1 : 1); 10 – торф I : чернозем : перегной : песок (3 : 3 : 1 : 1). Горшки размещались в вегетационной комнате с досвечиванием в режиме 16 ч день / 8 ч ночь. Полив осуществлялся по мере подсыхания земляного кома. Визуальную оценку проводили спустя 3 недели: оценивали развитие корневой системы, формирование

корневого кома, количество побегов, рассчитывали среднюю высоту побегов.

Результаты и их обсуждение. Перед началом адаптации высота регенерантов хмеля *in vitro* независимо от сорта составляла 13,8–14,6 см. Мериклоны имели сформированную корневую систему и развитую систему побегов в количестве от 1 до 3 с 6–7 узлами (рис. 2).

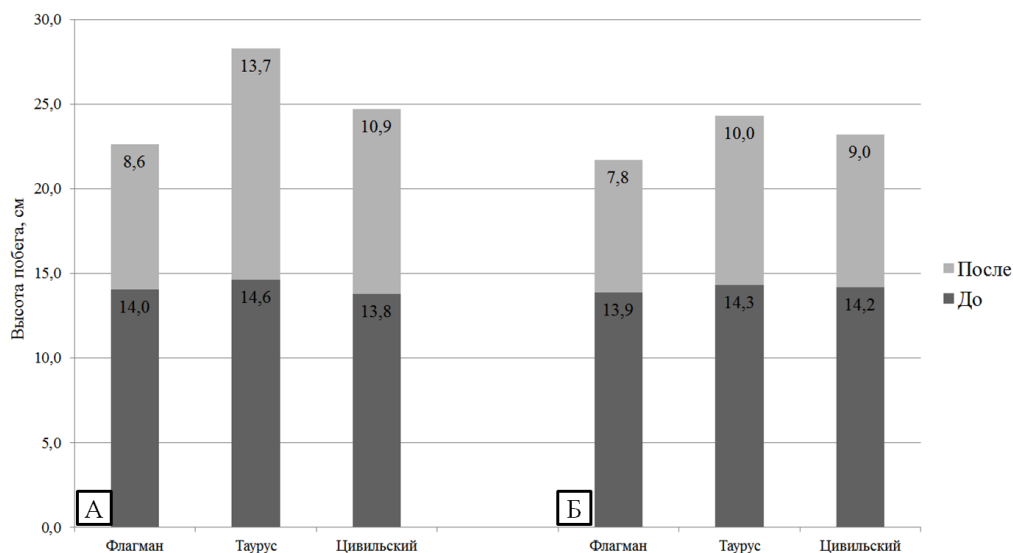


Рис. 2. Высота побегов хмеля обыкновенного до и после адаптации на гидропонной установке: А – в рассадных кассетах; Б – в кюветах с полиэтиленовыми вкладышами

Период адаптации составил 18–21 сут. В условиях гидропонной установки высота побегов увеличивалась на 36,0–48,3 %. Способ фиксации оказывал влияние как на ростовые характеристики хмеля, так и на выживаемость. Регенеранты, адаптируемые в кюветах, показали худший результат по развитию побегов и корневой системы (рис. 3). Так, в кюветах прирост побегов составил в среднем 8,9 см, а в рассадных кассетах – на 19,3 % больше (11,1 см). Корневая сис-

тема у всех адаптируемых в кассетах образцов была лучше развита и характеризовалась большим количеством корней 2-го порядка, величина самого длинного корня составляла 4 см и более (рис. 3, А). При использовании рассадных кассет не было потери растительного материала – выживало 100 % растений-регенерантов, при использовании кювет без субстрата процент адаптированных растений был ниже – 75 %, наиболее слабые растения погибали.

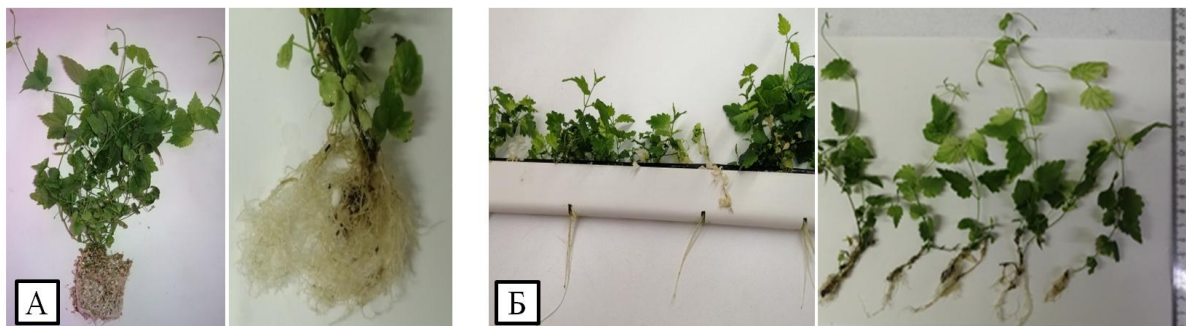


Рис. 3. Развитие регенерантов хмеля сорта Флагман на гидропонной установке: А – в рассадных кассетах; Б – в кюветах с вкладышами

После 3 недель адаптации независимо от типа фиксации регенерантов на гидропонике средняя высота побегов была максимальной у сорта Таурус – 28,3 и 24,3 см, минимальной – 22,6 и 21,7 см у сорта Флагман. В то же время последний сорт при адаптации в кассетах обладал высокой кустистостью, формируя до 15 побегов 2-го порядка, средняя высота которых составляла 12,4 см (рис. 3, А).

Согласно литературным данным, высокий уровень приживаемости растений (90–100 %) на этапе адаптации *ex vitro* обеспечивает высаживание в субстраты растений с развитыми *in vitro* корнями [9]. Однако некоторые авторы предлагают укоренять и адаптировать микрорастения одновременно [10]. Для трудноукореняющихся растений это единственный способ адаптации растений к условиям *ex vitro*.

Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о нецелесообразности адаптации регенерантов хмеля со слаборазвитой корневой системой. Доля жизнеспособных регенерантов после акклиматизации на гидропонике не превышала 15 % независимо от способа фиксации (рассадная кассета или кювета с вкладышами).

После адаптации на гидропонной установке растения пересаживались в рассадные горшки в подготовленные смеси. При этом не было необходимости накрывать только что высаженные растения пленкой для поддержания высокой влажности, было достаточно опрыскивания во-

дой из распылителя однократно в течение трех суток. Состав большинства субстратов способствовал росту и развитию растений, 8 из 10 типов смесей показал 100 % приживаемость. В варианте торф : перегной в соотношении 3 : 1 не удалось адаптировать ни одного растения; в смеси чернозем : перегной (3 : 1) доля погибших образцов составила 20 %.

Средняя высота побегов в зависимости от состава субстрата варьировала от 33,7 (чернозем : перегной, 3 : 1) до 63,7 см (чернозем : песок, 3 : 1). Количество побегов у одного растения составляло в среднем от 3,3 (чернозем : перегной, 3 : 1) до 8,0 шт. (чернозем). Развитие корневой системы происходило на всех субстратах. Достаточно плотный корневой ком сформировали растения в следующих субстратах: чернозем : торф (рис. 4, А); чернозем : перлит (3 : 1); чернозем : песок (3 : 1); торф : перлит (3 : 1); чернозем : торф II : перлит (1 : 1 : 1).

Для дальнейшего использования адаптированных регенерантов как посадочного материала лимитирующим фактором является развитие корневой системы, чем развитие надземной части. В природных условиях хмель как многолетняя травянистая лиана умеренного климата вегетирует только в теплый сезон и к зиме формирует мощные зимующие почки в прикорневой зоне. В течение всего периода живой остается только подземная часть, состоящая из главных корневищ и боковых корней [11].

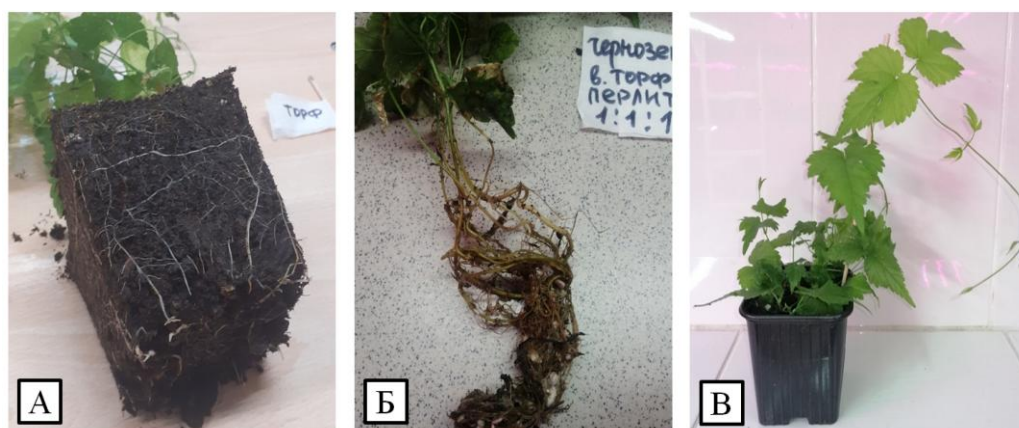


Рис. 4. Хмель после двухэтапной адаптации:

А – корневая система саженцев, сформированная на торфе I; Б – корневая система саженцев, сформированная на смеси чернозема, торфа II, перлита; В – общий вид адаптированного растения

После адаптации с целью получения крепкого посадочного куста рекомендуется присыпать корневую шейку на 1–3 см, благодаря чему происходит утолщение побега и закладка новых почек. Стебли, сформированные *in vitro*, сле-

дует срезать до высоты 2–3 междоузлий, благодаря чему развиваются новые побеги, регенерирующие из почек *de novo*, более крепкие, с крупными листьями (рис. 4, В).

Заключение. В ходе отработки схемы двух-этапной адаптации растений хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) к условиям *ex vitro* с использованием гидропонной установки показано нецелесообразность адаптации регенерантов со слабо развитой корневой системой – их выживаемость на гидропонике не превышала 15 %. Определена длительность этапа адаптации на гидропонной системе, которая характеризуется устойчивым поддержанием тургора листьями и активным ростом побегов – 18–21 день. Показано, что в условиях гидропонной установки высота побегов увеличивалась на 36,0–48,3 %. Изучено влияние способа фиксации регенерантов хмеля в гидропонной системе: использование рассадных кассет с субстратом из перлита и вермикулита (1 : 1) показало на 25 % выше выживаемость растений по сравнению с бессубстратными кюветами с вкладышами из полиэтиленовой пленки. Последующий этап адаптации в большинстве торфосодержащих субстратов обеспечивает 100 % выживаемость и получение посадочного материала высокого качества.

Список источников

1. Acclimation of Plantlets to Ex Vitro Conditions: Effects of Air Humidity, Irradiance, CO₂ Concentration and Abscisic Acid (a Review) / J. Pospíšilová [et al.] // Acta Horticulturae, 2007. Vol. 748. P. 29–38.
2. Влияние светодиодного освещения на адаптацию растений-регенерантов мяты водной в климатической камере / И.В. Князева [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2023. № 10. С. 41–47. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-10-41-47.
3. Hazarika B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants // Scientia Horticulturae, 2006. Vol. 108. P. 105–120. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.01.038.
4. Isah T. Adjustments to in vitro culture conditions and associated anomalies in plants // Acta biologica cracoviensia. Series Botanica, 2015. Vol. 57/2. P. 9–28. DOI: 10.1515/abcsb-2015-0026.
5. Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники / Н.А. Вечернина [и др.] // Известия Алтайского государственного университета, 2008. № 3. С. 7–10.

6. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land / Sh. Chandra [et al.] // Biotechnol. Lett., 2010. Vol. 32. P. 1199–1205. DOI: 10.1007/s10529-010-0290-0.
7. Адаптация регенерантов *Rhododendron hybridum* к условиям *ex vitro* / А.А. Эрст [и др.] // Научные ведомости. 2012. № 9 (128). Вып. 19. С. 44–48.
8. Зайцева Ю.Г., Амброс Е.В., Новикова Т.И. Укоренение и адаптация регенерантов морозоустойчивых представителей рода *Rhododendron* к условиям *ex vitro* // Turczaninowia, 2018. Т. 21 (1). С. 144–152. DOI: 10.14258/turczaninowia.21.1.13.
9. Krasinskaya T., Kukhartchik N., Matushevich V. The effect of ion exchange substrate and succinic acid on *ex vitro* adaptation of the cherry rootstock VSL-2 (*Prunus fruticosa* Pall. × *P. lannesiana* Carr.) // Acta Horticulturae, 2008. Vol. 795. P. 401–408.
10. Кухарчик Н.В. Размножение плодовых растений в культуре *in vitro*. Минск: Беларуская навука, 2016. 208 с.
11. Перспективная ресурсосберегающая технология производства хмеля: метод. рекомендации. М.: Росинформротех, 2008. 52 с.

References

1. Acclimation of Plantlets to Ex Vitro Conditions: Effects of Air Humidity, Irradiance, CO₂ Concentration and Abscisic Acid (a Review) / J. Pospíšilová [et al.] // Acta Horticulturae, 2007. Vol. 748. P. 29–38.
2. Vliyanie svetodiodnogo osvescheniya na adaptaciyu rastenij-regenerantov myaty vodnoj v klimaticheskoy kamere / I.V. Knyazeva [i dr.] // Vestnik KrasGAU. 2023. № 10. S. 41–47. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-10-41-47.
3. Hazarika B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants // Scientia Horticulturae, 2006. Vol. 108. P. 105–120. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.01.038.
4. Isah T. Adjustments to in vitro culture conditions and associated anomalies in plants // Acta biologica cracoviensia. Series Botanica, 2015. Vol. 57/2. P. 9–28. DOI: 10.1515/abcsb-2015-0026.
5. Adaptaciya rastenij-regenerantov s ispol'zovaniem gidroponiki / N.A. Vechernina [i dr.] //

- Izvestiya Altajskogo gosudarstvennogo universiteta, 2008. № 3. S. 7–10.
6. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land / Sh. Chandra [et al.] // Biotechnol. Lett., 2010. Vol. 32. P. 1199–1205. DOI: 10.1007/s10529-010-0290-0.
 7. Adaptaciya regenerantov *Rhododendron hybridum* k usloviyam *ex vitro* / A.A. `Erst [i dr.] // Nauchnye vedomosti. 2012. № 9 (128). Вып. 19. S. 44–48.
 8. Zajceva Yu.G., Ambros E.V., Novikova T.I. Ukorenenie i adaptaciya regenerantov morozoustojchivyh predstavitelej roda *Rhododendron* k usloviyam *ex vitro* // Turczaninowia, 2018. T. 21 (1). S. 144–152. DOI: 10.14258/turczaninowia.21.1.13.
 9. Krasinskaya T., Kukhartchik N., Matushevich V. The effect of ion exchange substrate and succinic acid on *ex vitro* adaptation of the cherry rootstock VSL-2 (*Prunus fruticosa* Pall. × *P. lannesiana* Carr.) // Acta Horticulturae, 2008. Vol. 795. P. 401–408.
 10. Kuharchik N.V. Razmnozhenie plodovyh rastenij v kul'ture *in vitro*. Minsk: Belaruskaya navuka, 2016. 208 s.
 11. Perspektivnaya resursosberegayuschaya tehnologiya proizvodstva hmelya: metod. Rekomendacii. M.: Rosinformagroteh, 2008. 52 s.

Статья принята к публикации 16.04.2024 / The article accepted for publication 16.04.2024.

Информация об авторах:

Ольга Владимировна Бычкова¹, старший научный сотрудник, кандидат сельскохозяйственных наук

Ольга Николаевна Мироненко², ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук

Анастасия Викторовна Небылица³, лаборант-исследователь

Юлия Романовна Желонкина⁴, лаборант-исследователь

Елена Павловна Мякишева⁵, младший научный сотрудник

Information about the authors:

Olga Vladimirovna Bychkova¹, Senior Researcher, Candidate of Agricultural Sciences

Olga Nikolaevna Mironenko², Leading Researcher, Candidate of Biological Sciences

Anastasia Viktorovna Nebylitsa³, Research Assistant

Yulia Romanovna Zhelonkina⁴, Research Assistant

Elena Pavlovna Myakisheva⁵, Junior Researcher

