Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

УДК: 581.14

Влияние типа культуральных сосудов на морфогенез хмеля в культуре *in vitro*

Мякишева Е.П., Мироненко О.Н., Бычкова О.В., Бережных А.В., Полтарацкая Ю.Р., Унжакова М.А.

Алтайский государственный университет

Аннотация

Одним из факторов, определяющих эффективность морфогенеза растений в культуре in vitro*, является тип культурального сосуда. В работе изучено влияние восьми вариантов культуральных сосудов на рост, развитие и ризогенез хмеля двух сортов. Установлено, что наиболее оптимальными для обоих сортов являются круглые пластиковые контейнеры объемом 350 мл с плотностью посадки 10 растений. Использование крупных контейнеров с высокой плотностью посадки оказывало выраженное угнетающее действие, приводя к витрификации, избыточному каллусообразованию и резкому подавлению ризогенеза. Выявлена сортоспецифичность реакции на стрессовые условия. Полученные данные имеют практическое значение для оптимизации протоколов массового микроразмножения хмеля.*

Ключевые слова: КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, *IN VITRO*, ХМЕЛЬ ОБЫКНОВЕННЫЙ, РИЗОГЕНЕЗ, ФАЗЫ РАЗВИТИЯ

Введение

Клональное микроразмножение является высокоэффективным методом получения генетически однородного, оздоровленного посадочного материала ценных сельскохозяйственных культур, в том числе хмеля [1, 2]. Современные биотехнологии микроразмножения растений *in vitro* требуют комплексного подхода к оптимизации всех этапов культивирования. Одним из ключевых факторов, определяющих эффективность процесса, тип культурального сосуда, который непосредственно влияет на

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

морфофизиологические характеристики регенерантов [3]. Форма, объем, материал изготовления и способ герметизации сосуда формируют специфический микроклимат *in vitro*, регулируя газообмен, влажность, световой режим и доступность питательных веществ, что в конечном итоге сказывается на морфогенезе, росте и укоренении растений [4, 5]. Оптимальный культуральный сосуд должен не только обеспечивать высокие физиологические показатели растений, но и быть технологичным в условиях массового производства.

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) – двудомная многолетняя лиана умеренного пояса с отмирающей в зимний период надземной частью. Хмель является перспективной технической культурой, используемой в пивоваренной, косметической и фармацевтической промышленности. Хмель светолюбив, требователен к влажности и почвенному плодородию [6]. В хмелеводстве в последние годы наблюдается проблема значительного дефицита посадочного материала, в решении которой могут помочь эффективные технологии клонального микроразмножения перспективных генотипов.

Целью данной работы была оценка влияния различных типов культуральных сосудов и плотности посадки на морфологические показатели хмеля на этапе микроразмножения *in vitro.*

Материалы и методы исследования.

Объектами исследования служили регенеранты хмеля двух сортов – отечественного «Фаворит» и иностранного «Spalter Select» из биотехнологической коллекции *in vitro* Алтайского центра прикладной биотехнологии Алтайского государственного университета.

При проведении исследований придерживались общепринятых методик работы с культурами клеток и тканей растений, приготовления и стерилизации питательных сред, инструментов и оборудования [7, 8]. В качестве контроля использовался протокол клонального микроразмножения *Humulus lupulus* [2], в котором показана возможность совмещения этапов микроразмножения и укоренения хмеля на среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 0,5 мг/л индол-3-масляной кислоты (ИМК). В качестве культуральных сосудов использованы стеклянные пробирки размером 21×200 мм с 10 мл питательной среды,

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

укупоренные фольгой. Недостатком данного способа при массовом тиражировании растений является использование хрупкой, тяжелой, дорогостоящей стеклянной посуды, которая ограничивает масштабируемость технологии и безопасность транспортировки растений *in vitro*. Кроме того, закрытие пробирки фольгой создает значительное затенение растений при плотном размещении в штативах и вынуждает предусматривать расстановку штативов с пробирками на некотором удалении друг от друга на стеллажах.

С целью оптимизации технологии клонального микроразмножения было протестировано 8 вариантов культуральных сосудов, различающихся по материалу (стекло, пластик), объему питательной среды (от 5 до 400 мл), плотности посадки микрочеренков. Всего было проанализировано 12 вариантов технологии на этапе микроразмножения in vitro.

В качестве эксплантов использовали микрорастения хмеля из коллекции in vitro, из которых в асептических условиях ламинарного бокса для субкультивирования получали микрочеренки – фрагменты длиной 1,0-2,0 см с одним узлом и двумя почками. Микрочеренки помещали в среду, заглубляя основание побега на 0,5–1,0 см, после чего контейнеры герметично закрывали и размещали на стеллажах в культуральном помещении при температуре 21-23°С и 16-часовом фотопериоде при интенсивности освещения 2000-3000 лк.

Для оценки эффективности морфогенеза регистрировались следующие показатели регенерантов через 21 сутки культивирования: высота растения (мм), степень укоренения (%), длина корней (мм), доля регенерантов, достигших II фазы развития (%), при которой можно переходить на следующий этап – этап адаптации *ex vitro*. Использовалась авторская методика оценки фаз развития хмеля [9], где I фаза – формирование 2-х пар листьев, II – 3-4 пар, III – 5-6 пар, IV – более 7 пар листьев.

Результаты и их обсуждение

Проведенный эксперимент выявил значимое влияние типа культурального сосуда и плотности посадки на все изучаемые морфологические параметры регенерантов хмеля (табл. 1).

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

Таблица 1. Развитие регенерантов хмеля *in vitro* на 21 день культивирования

№	Тип культурального сосуда	Объем среды, мл	Кол-во раст. в культ. сосуде, шт.	«Spalter Select»		«Фаворит»	
				Высота раст., мм	Доля раст. во II фазе, %	Высота раст., мм	Доля раст. во II фазе, %
1	Пробирка большая стеклянная, 21×200 мм (контроль)	10	1	49,1±1,1	70	57,2±1,4	75
2	Пробирка малая стеклянная, 16×150 мм	5	1	29,4±1,2	0	44,2±2,4	65
3	Контейнер пластиковый круглый, 350 мл	80	10	41,8±0,7	100	42,2±1,4	100
			15	32,1±0,8	100	36,4±1,7	100
			20	30,4±0,9	100	24,1±0,9	100
4	Контейнер пластиковый круглый,400 мл	80	10	47,4±1,4	100	57,2±0,7	100
			15	39,1±0,7	100	46,2±0,7	100
			20	32,3±0,7	100	46,9±0,7	100
5	Банка стеклянная, 350 мл	100	14	32,3±1,5	100	39,5±0,7	100
6	Банка стеклянная, 650 мл	130	18	49,2±1,9	100	42,1±1,9	100
7	Контейнер пластиковый круглый, 1000 мл	200	28	24,1±0,7	0	27,2±2,7	65
8	Контейнер пластиковый прямоугольный, 2000 мл	400	57	19,9±0,6	0	25,0±1,8	0
9	Среднее	-	-	53,39	-	61,02	-

Выбор плотности посадки напрямую определял уровень обеспеченности каждого регенеранта жизненно важными элементами питания. Объем питательной среды, приходящийся на одно растение в эксперименте, изменялся от 4 до 10 мл. Минимальный объем питательной среды на одно растение наблюдался при использовании пластикового контейнера объемом 350 мл с 80 мл питательной среды и высадке в него 20 микрорастений. Максимальный объем – в контрольном варианте с единичным регенерантом в большой стеклянной пробирке. При использовании самых больших культуральных сосудов – прямоугольного пластикового контейнера объемом 2000 мл и круглого пластикового контейнера объемом 1000 мл, на каждое высаженное растение приходилось около 7 мл питательной среды.

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

В среднем за 21 день культивирования прирост побегов составил у сорта «Spalter Select» 53,39 мм, у сорта «Фаворит» 61,20 мм. У обоих сортов максимальные показатели роста (49,1 и 57,2 мм соответственно) отмечались в контрольном варианте при наибольшем количестве питательной среды, что создавало оптимальные условия для развития корневой системы и доступа к необходимым ресурсам на начальных этапах роста. Но объяснить скорость роста только влиянием объема питательной среды, приходящейся на один эксплант, невозможно, поскольку прямой корреляции выявлено не было. Так, например, у сорта «Фаворит» в маленькой пробирке при половинном объеме среды от контрольного варианта показатель роста падал на 32,7% и составлял 44,2 мм, а при наименьшем количестве среды 4 мл/эксп., но при групповой посадке в пластиковый контейнер объемом 350 мл высота составляла – на 57,9% (24,1 мм). Аналогичное снижение ростовых характеристик почти на 57% наблюдалось при групповой посадке в большие контейнеры и при большем количестве среды (7 мл/эксп.).

Условия культивирования *in vitro* являются критическим фактором, определяющим не только скорость роста, но и успешность прохождения фаз развития регенерантов. Использование различных типов сосудов с варьируемым объемом и количеством растений позволило выявить закономерности, важные для совершенствования технологии клонального микроразмножения.

В малых объемах питательной среды (малая стеклянная пробирка) сорт «Spalter Select» показал относительно низкую высоту – 29,4 мм (59,9% от контроля) и задержку в развитии – все растения через 21 день культивирования оставались в фазе роста I и были не готовы для пересадки в условия *ex vitro*. В то же время сорт «Фаворит» был лучше развит – 44,2 мм и 65% регенерантов находились во II фазе развития с 3-4 узлами с листьями (рис. 1 А).

При переходе к групповому культивированию регенерантов в контейнерах проявлялось влияние плотности посадки. В круглых контейнерах на 350 и 400 мл у обоих сортов при хорошем развитии регенерантов наблюдалась четкая обратная зависимость высоты растений от их количества (рис. 1 Д-К).

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

Рис. 1. Внешний вид растений хмеля сорта «Фаворит» на 21 день культивирования в различных типах культуральных сосудов: А – пробирка 16×15 мм; Б – пробирка 21×200 мм; В – стеклянная банка 350 мл; Г – в стеклянная банка 650 мл; Д – контейнер 350 мл (10 шт); Е – в контейнер 350 мл (15 шт); Ж – контейнер 350 мл (20 шт); З – контейнер 400 мл (15 шт); И – контейнер 4000 мл (15 шт); К – контейнер 400 мл (20 шт); Л – контейнер1000 мл; М – контейнер 2000 мл.

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

При использовании стеклянных банок в качестве культуральных сосудов, в большем объеме (650 мл) оба сорта отличались более удлиненными междоузлиями по сравнению с пластиковыми контейнерами и пробирками (рис. 1 В-Г). Показатели высоты при использовании банок большего объема были выше для обоих сортов, что подтверждает общую тенденцию увеличения роста в больших объемах при адекватной плотности.

Крупные пластиковые контейнеры (1000 мл и 2000 мл) с высокой плотностью посадки оказывали угнетающее воздействие на растения обоих сортов. Культивирование 28 регенерантов в сосуде объемом 1000 мл привело к выраженному угнетению роста. Так у сорта «Spalter Select» отмечалась минимальная высота (24,1 мм) и растения остались в фазе развития I, что свидетельствует о сильном стрессовом воздействии. Высота регенерантов сорта «Фаворит» не превышала 27,2 мм, находясь в фазе II. Кроме этого, наблюдались изменения морфогенеза: множественные аномалии развития, витрификация, избыточное каллусообразование (рис. 1 Л).

Наибольшее угнетающее воздействие зафиксировано при максимальной плотности посадки (57 регенерантов) в прямоугольном пластиковом контейнере 2000 мл. Сорт «Spalter Select» продемонстрировал абсолютно минимальную высоту во всем эксперименте – всего 19,9 мм и фазу I. Сорт «Фаворит», хотя и показал больший рост 25,0 мм, но также был в I фазе, что указывает на глубокую задержку развития (рис. 1 М). Практически у всех регенерантов в этом варианте опыта наблюдалось разрастание стекловидного обводненного каллуса, что блокировало ризогенез и развитие побегов. Вероятно, это явление в больших сосудах объясняется конкуренцией за ресурсы (питательные вещества, свет, пространство) и накоплением ингибирующих рост веществ (этилена или фенольных соединений) в замкнутой системе.

Помимо этого, к концу пассажа наблюдалось изменение самой питательной среды – значительная обводненность, признаки окисления, отставание от стенок культурального сосуда. Прямоугольный контейнер, вероятно, создает еще менее благоприятные условия для распределения света, влажности и воздуха по сравнению с круглым, особенно в углах и при максимальной заполненности. Сочетание значительного количества растений и неоптимальной формы сосуда создало предельно стрессовые условия, не позволившие регенерантам реализовать свой ростовой потенциал и нормально развиваться.

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

Влияние типа сосуда и плотности посадки на развитие корневой системы сортов «Фаворит» и «Spalter Select» показаны на рис. 2.

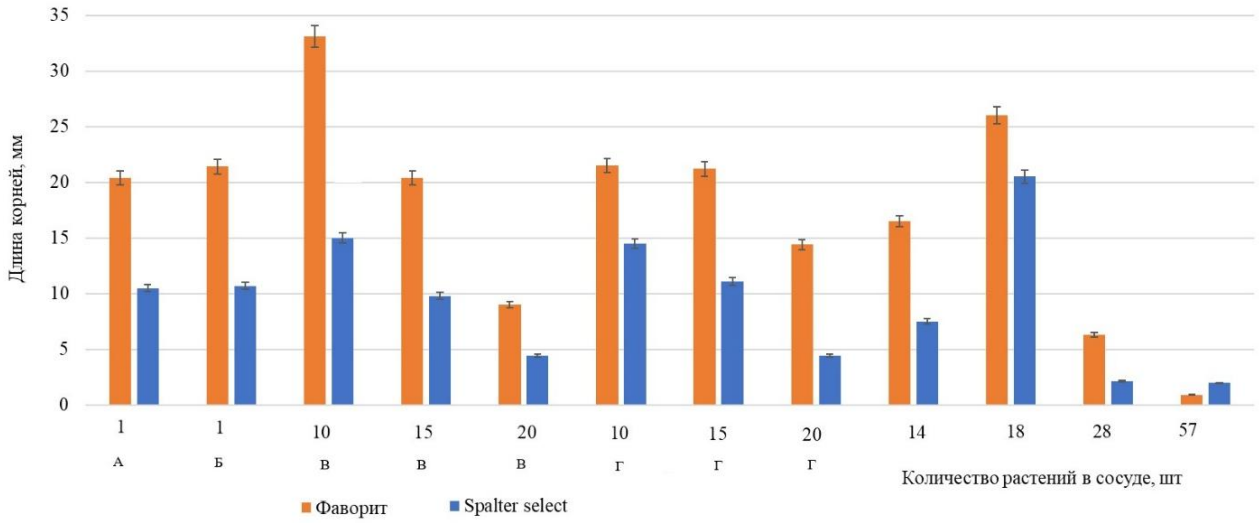

Рис. 2. Влияние плотности посадки в культуральные сосуды на ризогенез растений хмеля *in vitro* (А – пробирка стеклянная 16×150 мм; Б – пробирка стеклянная 21×200 мм; В – круглый контейнер 350 мл; Г – круглый контейнер 400 мл)

Данные демонстрируют выраженную зависимость длины корней от условий культивирования. Сорт «Фаворит» неизменно формировал более длинную корневую систему по сравнению с «Spalter Select» во всех вариантах опыта. При индивидуальном выращивании в пробирках данный сорт показал длину корней 20,4 мм и 21,4 мм, в то время как «Spalter Select» – лишь 10,5 мм и 10,7 мм. В крупных сосудах отчетливо проявлялась тенденция угнетения корнеобразования с ростом плотности посадки. Например, в контейнерах объемом 350 мл с 10 растениями длина корней сорта «Фаворит» варьировала от 33,1 мм до 21,5 мм, «Spalter Select» – от 15,0 мм до 14,5 мм, а при максимальной тесноте 20 растений наблюдалось резкое уменьшение длины корней – у сорта Фаворит до 9,0 мм, «Spalter Select» – до 4,4 мм. При использовании контейнеров объемом 400 мл показатели ризогенеза – длина и количество корней для обоих сортов были ниже, чем при использовании контейнеров меньшего объема.

Наибольшее подавление ризогенеза зафиксировано в крупных пластиковых контейнерах с высокой плотностью. Так, в круглом контейнере объемом 1000 мл корни регенерантов сорта «Фаворит» достигли лишь 6,3 мм, «Spalter Select» – 2,13 мм. Абсолютный минимум отмечен в прямоугольном контейнере 2000 мл: сорт Фаворит показал рекордно

низкие показатели ризогенеза – 0,9 мм, «Spalter Select» – 1,97 мм.

Таким образом, корневая система оказалась еще более чувствительной к стрессовым факторам (ограничение объема, высокая плотность, материал сосуда), чем надземная часть. Сорт «Фаворит» показал преимущество в силе роста корней на всех этапах, но его показатели резко падали в экстремальных условиях.

Выводы

1. Тип культурального сосуда, объем питательной среды и плотность посадки оказывают значимое влияние на морфогенез регенерантов хмеля *in vitro.* Полученные данные имеют практическое значение для оптимизации протоколов микроразмножения хмеля, позволяя подбирать тип и размер культурального сосуда в зависимости от сортовых особенностей и требуемой плотности посадки на этапе укоренения или размножения регенерантов.

2. Наилучшие показатели развития регенерантов хмеля сорта «Фаворит» и «Spalter Select» наблюдались при использовании круглых пластиковых контейнеров объемом 350 мл с плотностью посадки 10 растений, обеспечивающие высокие показатели роста и 100%-ный переход растений в фазу развития, пригодную для адаптации *ex vitro,* и оптимальное развитие корневой системы.

3. Крупные пластиковые контейнеры (1000 мл и более) с высокой плотностью посадки микрочеренков вызывают угнетение ростовых процессов, подавление ризогенеза, возникновение аномалий развития (витрификация, каллус).

4. Выявлены сортовые особенности реакции на условия культивирования: сорт «Фаворит» показал большую устойчивость к ограниченному объему питательной среды и высокой плотности посадки и более высокий потенциал ризогенеза по сравнению с сортом «Spalter Select».

Список использованных источников:

1. Гашенко, О. А. Кастрицкая М. С., Кухарчик Н. В. Микроразмножение сортов хмеля в культуре *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2019. – № 68. – С. 111-118. – DOI 10.31360/2225-3068-2019-68-Ш-П8. – EDN COFRQX.

2. Mironenko O. N., Bychkova O. V., Myakisheva E. P. et al. Protocol of clonal micropropagation of *Humulus lupulus* (*Cannabaceae*) // Turczaninowia. – 2024. – Vol. 27, No. 4. – P. 130-140. – DOI 10.14258/turczaninowia.27.4.15. – EDN BOBMTZ.

3. Kozai, T., Fujiwara, K., Hayashi, M., Aitken-Christie, J. The In Vitro Environment and its Control in Micropropagation // Transplant Production Systems / eds. K. Kurata, T. Kozai. – Dordrecht: Springer, 1992. – P. 247–282. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2785-1_14

4. Hazarika B.N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants // Scientia Horticulturae. – 2006. – Vol. 108, Issue 2. – P. 105–120.

5. Pantchev I., Rakleova G., Pavlov A., Atanassov A. History of plant biotechnology development // Bioprocessing of Plant in Vitro Systems. – 2018. – P. 3–37.

6. Милоста, Г. М., Лапа В. В. Агробиологические основы выращивания хмеля в Республике Беларусь: монография. – Гродно: ГГАУ, 2010. – 285 с.

7. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiology Plant. – 1962. – Vol. 15. – No 2. – P. 473–497.

9. Мякишева, Е. П., Бычкова О.В., Мироненко О.Н. Новые элементы оценки морфогенеза регенерантов хмеля *in vitro* // Аграрный научный журнал. – 2024. – № 5. – С. 40-46. – DOI 10.28983/asj.y2024i5pp40-46. – EDN UGXNVZ.

==========

Цитирование: Мякишева Е.П., Мироненко О.Н., Бычкова О.В., Бережных А.В., Полтарацкая Ю.Р., Унжакова М.А. Влияние типа культуральных сосудов на морфогенез хмеля в культуре *in vitro* [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2025. – № 5. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2025/5/st_544.pdf DOI: https://doi.org/10.51419/202155544.