



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01H 4/00 (2022.05)

(21)(22) Заявка: 2021139393, 27.12.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.12.2021

Дата регистрации:
01.08.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.12.2021

(45) Опубликовано: 01.08.2022 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

656049, г. Барнаул, пр-кт Ленина, 61, ФГБОУ
ВО "Алтайский государственный университет",
ЦРТПТТУИС

(72) Автор(ы):

Хлебова Любовь Петровна (RU),
Бровко Елена Сергеевна (RU),
Мироненко Ольга Николаевна (RU),
Бычкова Ольга Владимировна (RU),
Хлыновский Михаил Данилович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: КАСТРИЦКАЯ М.С. и др.
Микроразмножение сортов хмеля *in vitro* II
Вес. Нац. акад. наук Беларусь Сер. аграр.
Наук, 2014, N 2, с. 75-80. КУХАРЧИК Н.В.
Получение посадочного материала плодовых
и ягодных растений *in vitro*, Наука и
инновации, 2019, N 6 (196), с.17-21. ROY A.T.,
et al. Development of a shoot multiplication
system for hop *Humulus* (см. прод.)

(54) Способ клонального микроразмножения *in vitro* сортового хмеля

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ клонального микроразмножения *in vitro* сортового хмеля, включающий стерилизацию двухпочковых черенков с последующим культивированием на питательной среде, размножение побегов, их укоренение с последующей адаптацией к условиям *ex vitro*.

Изобретение позволяет повысить коэффициент размножения в отдельном пассаже, увеличить длительность культивирования (число последовательных пассажей) с высоким коэффициентом размножения, улучшить качество и жизнеспособность растений-регенерантов при длительном субкультивировании. 4 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):

lupulus L., *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 2001, Vol. 37(1), p. 79-83.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A01H 4/00 (2022.05)

(21)(22) Application: **2021139393, 27.12.2021**

(24) Effective date for property rights:
27.12.2021

Registration date:
01.08.2022

Priority:

(22) Date of filing: **27.12.2021**

(45) Date of publication: **01.08.2022** Bull. № 22

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr-kt Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPTTUIS**

(72) Inventor(s):

**Khlebova Lyubov Petrovna (RU),
Brovko Elena Sergeevna (RU),
Mironenko Olga Nikolaevna (RU),
Bychkova Olga Vladimirovna (RU),
Khlynovskij Mikhail Danilovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**

(54) **METHOD FOR IN VITRO CLONAL MICROPROPAGATION OF VARIETAL HOP**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a method for in vitro clonal micropropagation of varietal hop, including sterilization of two-bud stalks with subsequent cultivation on nutrient medium, propagation of shoots, their rooting with subsequent adaptation to ex vitro conditions.

EFFECT: invention allows for an increase in a propagation coefficient in a separate passage, increase in the duration of cultivation (a number of subsequent passages) with a high propagation coefficient, improvement of the quality and viability of regenerating plants in long-term subcultivation.

1 cl, 4 dwg, 3 tbl

RU 2 777 200 C1

RU 2 777 200 C1

Изобретение относится к области сельскохозяйственной биотехнологии, в частности, к способам размножения и может быть использовано для получения качественного посадочного материала.

5 Возделываемый в производстве хмель относится к виду хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) - многолетнее растение, ботанически родственное конопле, из семейства Cannabineae (Коноплевые), порядка Urticaceae (Крапивоцветных). Это многолетняя двудомная вьющаяся лиана с однолетними (монокарпическими) побегами. Многолетняя (функционирующая в течение 20 лет и более) у хмеля только подземная часть растения. Надземные органы (вегетативные и генеративные) ежегодно весной отрастают из почек
10 возобновления, за вегетацию проходят весь цикл, а на зиму отмирают [1].

Ценность хмеля, как сырья для пивоварения обусловлена наличием специфических горьких веществ (общих смол), полифенольных соединений и эфирных масел, которые придают пиву характерный хмелевой аромат, особый горький вкус, усиливают брожение, повышают стойкость готового пива против прокисания, способствуют пеностойкости
15 и прозрачности [2, 3]. В каждую из этих групп веществ входит большое число компонентов, сложных по своей химической природе. Все попытки ученых найти замену хмелю в пивоварении не принесли результатов.

Интенсификация хмелеводства и увеличение объемов выращивания саженцев высокопродуктивных сортов требуют выбора оптимального способа производства
20 посадочного материала. В производстве хмель размножают традиционным способом - вегетативно через укоренение разных частей материнского растения: зелеными, стеблевыми черенками - отрезками подземной части стебля, корневищными черенками - отрезками подземной части бокового корневища с одной или более парами глазков с почками [4].

25 Недостатками данного способа являются значительные затраты ручного труда, низкий коэффициент размножения, короткий период и сезонность заготовки черенков и как следствие низкий выход полноценных саженцев в год [5, 6].

Альтернативой традиционному способу размножения является клональное микроразмножение *in vitro*, которое позволяет получать большое количество саженцев
30 от одного растения [7, 8]. Основное преимущество заключается в возможности использования методов культуры клеток и тканей для оздоровления посадочного материала от вирусов и виридов [9], поскольку вегетативное размножение и длительное производственное использование монокультуры на одном участке (10-15 лет) приводит к повреждению и поражению разнообразными видами фитофагов и фитопатогенов,
35 численность которых с годами повышается [10].

Наиболее близким предлагаемому изобретению является способ размножения в культуре *in vitro* сортов хмеля, который включает культивирование эксплантов (двухпочковые черенки) на питательной среде по прописи Мурасиге-Скуга, дополненной
40 6-БА в концентрации 0,5 мг/л и гибберелловой кислотой 1,0 мг/л, что, в свою очередь, обеспечивает высокий коэффициент размножения (до 8) и длину побегов (до 2,5 см) у отдельных генотипов при отсутствии витрификации [11]. Стоит отметить, что длительность культивирования не превышает 3-4 пассажей. При более длительном субкультивировании коэффициент размножения снижается либо регенерация вовсе отсутствует. Недостатком данного способа является низкий коэффициент размножения
45 в отдельном пассаже и ограниченное количество пассажей.

Задача, на решение которой направлено изобретение - разработка способа размножения в культуре *in vitro* сортового хмеля, включающего стерилизацию эксплантов с последующим культивированием на питательной среде, элонгацию,

укоренение, адаптацию растений к условиям *ex vitro*.

Техническим результатом является повышение коэффициента размножения в отдельном пассаже, увеличение длительности культивирования (числа пассажей) с высоким коэффициентом размножения, улучшение качества и жизнеспособности растений-регенерантов при длительном субкультивировании.

Предлагаемый способ клонального микроразмножения *in vitro* сортового хмеля, включает стерилизацию, культивирование *in vitro* микрочеренков или адвентивных побегов оздоровленных растений сортового хмеля на питательной среде, содержащей макро-, микроэлементы, Fe-хелат по прописи Мурасиге-Скуга, дополненной тиамин хлоридом, пиридоксин хлоридом, никотиновой кислотой по 0,5 мг/л, мезоинозитом, глицином в концентрациях 100 и 2 мг/л, соответственно, глюкозой - 2%, агаг-агаром - 0,53%, получение растений-регенерантов, их адаптацию, при этом в питательную среду в процессе 6-ти последовательных субкультивирований дополнительно вносят 0,5 мг/л тидиазурона - 1, 3, 5-й пассажи и 4 мг/л янтарной кислоты - 2, 4, 6-й пассажи.

Задача, на решение которой направлено изобретение, решается оптимизацией питательной среды на этапе собственно микроразмножения, включающей культивирование *in vitro* микрочеренков или адвентивных побегов оздоровленных растений сортового хмеля на питательной среде, содержащей макро-, микроэлементы, Fe-хелат по прописи Мурасиге-Скуга, дополненной витаминами, мезоинозитом и глицином, янтарной кислотой, гормонами группы цитокининов - 6-Бензиламинопуридин или тидиазурон и гиббереллинов - гибберелловая кислота (Табл. 1.)

Таблица – 1. Состав питательных сред

Компонентный состав питательной среды	Варианты питательной среды MS, мг/л			
	MS ₀	MS ₁	MS ₂	MS ₃
Нитрат аммония (аммиачная селитра) (NH ₄ NO ₃)	1650	1650	1650	1650
Нитрат калия (KNO ₃)	1900	1900	1900	1900
Сульфат магния 7-водный (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	370	370	370	370
Дигидрофосфат калия (KH ₂ PO ₄)	170	170	170	170
Молибдат натрия 2-водный (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0,25	0,25	0,25	0,25
Борная кислота (H ₃ BO ₃)	6,2	6,2	6,2	6,2
Хлорид кобальта (II) 6-водный (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0,025	0,025	0,025	0,025
Йодистый калий (KI)	0,83	0,83	0,83	0,83
Сульфат меди (II) - 5-водный CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
Сульфат цинка 7-водный (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8,6	8,6	8,6	8,6
Сульфат марганца (II) 4-водный MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3
Сульфат железа (II) 7-водный (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	27,8	27,8	27,8	27,8
Динариевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты	37,3	37,3	37,3	37,3

	(Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈)				
	Хлорид кальция 2-водный (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	440	440	440	440
5	Тиамин гидрохлорид (3-[(4-амино-2-метил-5-пиримидинил)метил]-5-(2-гидроксиэтил)-4-метилтиазолия хлорид) (C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS·HCl)	0,1	0,5	0,5	0,5
	Пиридоксин гидрохлорид (C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS·HCl)	0,5	0,5	0,5	0,5
	Никотиновая кислота 3-пиридинкарбоновая кислота, азин-3-овая кислота (C ₆ H ₅ NO ₂)	0,5	0,5	0,5	0,5
10	Мезо-инозит (цис-1,2,3,5-транс-4,6-циклогексангексол) (C ₆ H ₁₂ O ₆)	100	100	100	100
	Глицин (Аминоуксусная кислота) (C ₂ H ₅ NO ₂)	2	2	2	2
	Сахароза (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	30000			
	Глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆)		20000	20000	20000
	Агар	7000	5300	5300	5300
15	6-Бензиламинопуридин (N - (фенилметил) -7 Н - пуридин-6-амин) (C ₁₂ H ₁₁ N ₅) (БАП)		0,5		
	Гибберелловая кислота (7,12-Дигидрокси-3-метил-6-метил-2-оксопергидро-4а, 7-метано-9b, 3-пропеноазулен [1,2-б] фуран-4-карбоновая кислота) (C ₁₉ H ₂₂ O ₆) (ГК)		1	1	1
20	Тидиазурон (1-фенил-3- (1,2,3-тиадиазол-5-ил) мочевины) (C ₉ H ₈ N ₄ OС) (ТДЗ)			0,5	
	Янтарная кислота (1,4-бутандиовая кислота) (C ₄ H ₆ O ₄)				4

В процессе исследований разработана методика клонального микроразмножения
 25 хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.). В качестве объектов были использованы сорта Vor, Marynka, Sladek, Shpalter Select.

Стерилизация эксплантов включала три этапа: предстерилизацию - механическая
 очистка эксплантов, промывание в мыльной воде на магнитной мешалке в течение 20
 минут, 10-15 минутное промывание в проточной воде; ступенчатую стерилизацию -
 30 обработка 70% этанолом - 1 минута и 30% пероксидом водорода - 5 минут,
 постстерилизацию - 4 кратное промывание стерильной дистиллированной водой не
 менее 5 минут каждое.

Инициацию первичной асептической культуры сортов хмеля обыкновенного - после
 0 пассажа - проводили путем переноса эксплантов на питательную среду MS₁,
 35 включающую 2 мг/л БАП, 1 мг/л ГК, 20 мл/л глюкозы, 7 г/л агара.

Для оптимизации этапа микроразмножения - 1 пассаж - провели тестирование
 различных концентрации 2 типов регуляторов роста цитокининового ряда - 6-
 Бензиламинопурина (БАП) и тидиазурина (ТДЗ) (9 вариантов) в диапазоне 0,5-2,0 и
 0,1-0,5 мг/л, соответственно. Регуляторы роста добавляли в питательные среду MS,
 40 дополненную 1 мг/л гибберелловой кислотой, 20 мл/л глюкозы, 5,3 г/л агара. Контролем
 служила безгормональная среда MS₀ (Табл. 1).

Использование БАП и ТДЗ в качестве стимуляторов роста на этапе размножения в
 различных концентрациях позволило достичь коэффициентов размножения на уровне
 1,6-3,9 и 3,5-4,8, соответственно (Табл. 2). Тидиазурон в составе питательной среды в
 45 концентрации 0,5 мг/л обеспечил максимальный коэффициент размножения для
 большинства сортов хмеля обыкновенного (Фиг. 1). Увеличение концентрации ТДЗ
 выше 0,5 мг/л приводило к витрификации побегов.

Таблица 2 – Влияние гормонального состава питательной среды на коэффициент размножения хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.)

Сорт	БАП, мг/л					ТДЗ, мг/л				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
<i>Bor</i>	1,2	2,6	2,7	2,1	2,3	1,3	2,4	3,1	4,2	4,1
<i>Marynka</i>	1,3	1,6	1,2	1,2	1,0	1,3	1,8	2,8	3,7	4,6
<i>Sladek</i>	1,0	1,8	1,8	1,5	1,1	1,2	1,9	1,9	2,6	3,5
<i>Shpalter Select</i>	1,3	3,9	3,0	2,9	2,6	1,4	2,3	2,1	3,6	4,8

Высота побегов изученных сортов хмеля, сформированных на питательной среде MS₂ с добавлением 0,5 мг/л ТДЗ, не превышала 10 мм, что обусловило необходимость их элонгации при последующим пассировании на MS₃, содержащей 4 мг/л янтарной кислоты. Янтарную кислоту успешно использовали в качестве стимулятора роста для микропобегов сливы [13]. Увеличение числа пассажей эксплантов сортового хмеля в процессе этапа собственно микроразмножение приводит к значительному снижению коэффициента размножения [12], витрификации побегов и хлорозу листьев (Фиг. 2а, 2б).

Полученные нами данные показали что, последовательная смена стимуляторов роста в питательной среде - MS₂ ↔ MS₃ - в процессе субкультивирования в течение 1-6 пассажей повысила эффективность размножения эксплантов с сохранением качества регенерантов (Табл. 3).

Таблица 3 – Коэффициент размножения in vitro различных сортов хмеля в зависимости от частоты субкультивирования

Сорт	Пассаж					
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й
MS₀						
<i>Shpalter Select</i>	1,2	-	-	-	-	-
<i>Marynka</i>	1,1	-	-	-	-	-
<i>Bor</i>	1,1	1,0	1,2	-	-	-
<i>Sladek</i>	1,0	1,0	-	-	-	-
MS₁						
<i>Shpalter Select</i>	3,9	2,3	3,5	-	-	-
<i>Marynka</i>	1,6	1,1	-	-	-	-
<i>Bor</i>	2,6	1,5	4,0	-	-	-
<i>Sladek</i>	1,8	1,9	3,8	-	-	-
MS₂ MS₃ MS₂ MS₃ MS₂ MS₃						
<i>Shpalter Select</i>	4,8	8,2	5,6	9,8	6,1	10,9
<i>Marynka</i>	4,6	7,3	5,2	8,0	5,8	8,6
<i>Bor</i>	4,1	10,3	4,8	12,4	6,5	12,8
<i>Sladek</i>	3,5	9,8	4,6	10,6	6,0	12,1

Примеры осуществления способа.

Пример 1. Использовали безгормональную питательную среду - MS₀. Длительность субкультивирования не превышала 3 пассажей, при этом средний коэффициент размножения сортов в отдельном пассаже варьировал от 0,3 до 1,1.

Пример 2. Использовали питательную среду - MS₁. Средний коэффициент размножения в процессе субкультивирования составил 0,9-3,2 в зависимости от сорта. Количество пассажей, на которых происходила регенерация растений, зависело от

генотипа и составляло 2-3.

Пример 3. Использовали чередование питательных сред, содержащих ТДЗ-MS₂ либо янтарную кислоту - MS₃ в процессе 6-ти последовательных культивирований обеспечило высокий коэффициент размножения. ТДЗ индуцировал увеличение числа побегов на экспланте - 1, 3, 5-й пассажи. Янтарная кислота стимулировала рост регенерантов, предотвращала хлороз листьев и витрификацию побегов в сравнении с культивированием на средах MS₁ и MS₂ - 2, 4, 6-й пассажи (Фиг. 3).

После 6 пассажа побеги переносили для укоренения на питательную среду MS, содержащую 0,5 мг/л ИМК (индолил-3-масляная кислота), 20 г/л глюкозы и 7,3 г/л агар-агара. Мериклоны формировали хорошо развитую корневую систему (Фиг. 4) и надземную часть растений, сохраняли 100% жизнеспособность при адаптации к условиям *ex vitro*, что позволило получить посадочный материал сортового хмеля высокого качества.

Список литературы

1. Иванов А.Л., Савин И.Ю., Егоров А.В. Методология оценки ресурсного потенциала земель России для сельскохозяйственного производства (на примере хмеля) // Бюллетень Почвенного института им. В.В. Докучаева, 2014. - Вып.73. - С. 19-53.

2. Гаврилова С.Е. Эффективность применения биопрепаратов при выращивании посадочного материала хмеля // Актуальные вопросы развития аграрной науки в современных экономических условиях: материалы IV-й Междунар. научно-практич. конф., Волгоград, 22-23 мая 2015 г. - Волгоград, 2015. - С. 82-85.

3. Милоста Г.М., Лапа В.В. Агробиологические основы выращивания хмеля в Республике Беларусь. - Гродно: ГГАУ, 2010. - 286 с.

4. Христюк А.В., Касьянов Г.И. Хмель в пивоварении // Пиво и напитки, 2007. - №1. - С. 10-12.

5. Whittock S., Tedone L., Staskova L., Bird M., Yan D., Price A., Koutoulis A., Shellie R. Hop flavoromics for distinctive beer// Acta Horticulturae, 2019. - Vol. 1236. - P. 113-120.

6. Технология возделывания хмеля: Метод. Рекомендации / под общей ред к.с.-х. н. А.А. Фадеева. П. Опытный: ФГБНУ Чувашский НИИСХ, 2016. - 39 с.

7. Кухарчик Н.В. Получение посадочного материала плодовых и ягодных растений *in vitro* // Наука и инновации, 2019. - №6 (196). - С.17-21.

8. Roy A.T., Leggett G., Koutoulis A. Development of a shoot multiplication system for hop *Humulus lupulus* L. // *In vitro* Cell. Dev. Biol. - Plant, 2001. - Vol. 37(1). - P. 79-83.

9. Adams A.N. Elimination of viruses from the hop (*Humulus lupulus*) by heat and meristem culture // J. Hort. Sci., 1975. - Vol.50. - P. 151-160.

10. Перспективная ресурсосберегающая технология производства хмеля: метод. рекомендации / сост. А.С. Якимов, А.Н. Смирнов, С.С. Данилов и др. М.: Росинформагротех, 2008. - 52 с.

11. Кастрицкая М.С., Кухарчик Н.В., Гашенко О.А. Микроразмножение сортов хмеля *in vitro* II Вес.Нац. акад. наук Беларусь Сер. аграр. наук. - 2014. - №2. - С. 75-80.

12. 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.

13. Бунцевич Л.Л., Беседина Е.Н., Костюк М.А. Изучение препарата-1, янтарной кислоты и ее солей в качестве стимуляторов роста эксплантов растений *in vitro* // ТППП АПК, 2015. - №4 (8). - С. 64-69.

(57) Формула изобретения

Способ клонального микроразмножения *in vitro* сортового хмеля, включающий стерилизацию, культивирование *in vitro* микрочеренков или адвентивных побегов оздоровленных растений сортового хмеля на питательной среде, содержащей макро-, микроэлементы, Fe-хелат по прописи Мурасиге-Скуга, дополненной тиамин хлоридом, пиридоксин хлоридом, никотиновой кислотой по 0,5 мг/л, мезоинозитом, глицином в концентрациях 100 и 2 мг/л соответственно, глюкозой - 2%, агаг-агаром - 0,53%, получение растений-регенерантов, их адаптацию, отличающийся тем, что в питательную среду в процессе 6-ти последовательных субкультивирований дополнительно вносят 0,5 мг/л тидиазурона – 1-й, 3-й, 5-й пассажи и 4 мг/л янтарной кислоты – 2-й, 4-й, 6-й пассажи.

15

20

25

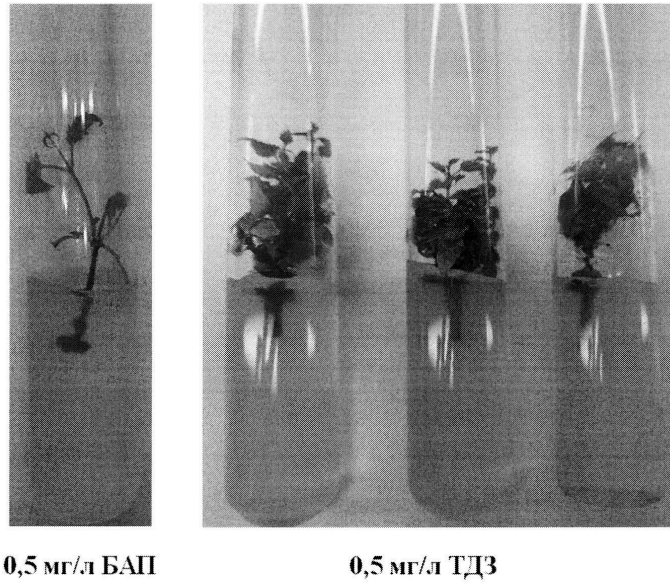
30

35

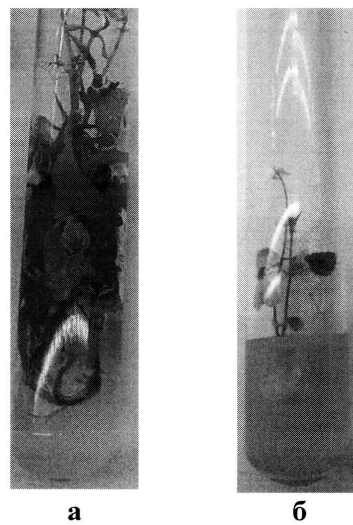
40

45

1

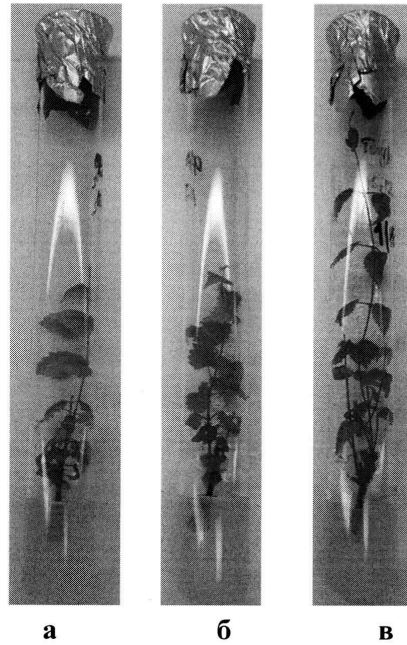


Фиг. 1 – Влияние регуляторов роста в составе питательной среды Мурасиге-Скуга на микроразмножение хмеля сорта *Marynka*

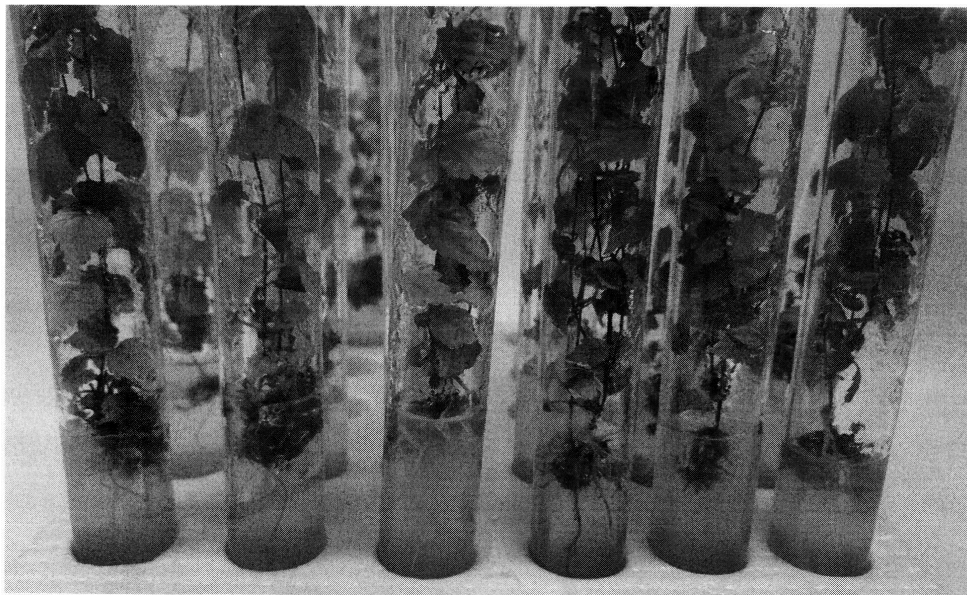


Фиг. 2 – Аномальное развитие побегов при микроразмножении *in vitro* сортового хмеля: а – вирифицированный побег; б – хлороз листьев

2



Фиг. 3 – Этап микроразмножения сорта Бор на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 4 г/л янтарной кислоты: а – 2-й пассаж, б – 4-й пассаж, в – 6-й пассаж



Фиг. 4 – Этап укоренения in vitro сорта Бор