УДК 634.8.037:581.143 6

**НОВЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА**

**ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА**

**NEW GROTH REGULATORS**

**FOR CLONAL MICROPROPAGATION OF GRAPES**

|  |  |
| --- | --- |
| *Н.П. Дорошенко* | *N.P. Doroshenko*  |
| ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко. г. Новочеркасск, Россия. e-mail: ruswine@yandex.ru | All-Russian Research Y.I. PotapenkoInstitute for viticulture and winemaking Novocherkassk, Russiae-mail: ruswine@yandex.ru |
| **Аннотация**. Приведены результаты изучения регуляторов роста нового поколения: Эмистим, салициловая кислота, циркон, эпин-экстра, Мелафен на отдельных этапах клонального микроразмножения. Доказана высокая физиологическая и фунгицидная активность изученных биорегуляторов и полифункциональность их действия, проявляющаяся в стимуляции роста и развития растений, антибактериальной и противовирусной активности в сочетании с антистрессовым действием на растения. | **Summary**. Paper presents the study of growth regulators of a new generation: Èmistim, salicylic acid, zircon, aepinus-extra, Melafen on different stages of clonal micro propagation. It was proved that the studied bioregulators have high physiological and fungicidal activity and polyfunctionality in the stimulation of plant growth and development, antibacterial and antiviral activity in combination with anti-stress effect on plants. |
| **Ключевые слова:** виноград, клональное микроразмножение, Эмистим, салициловая кислота, Циркон, Эпин-экстра, Мелафен. | **Keywords**: grapes, micro propagation, Èmistim, salicylic acid, Zirconium, Aepinus-extra, Melafen. |

**Введение.** Клональное микроразмножение позволяет получать генетически однородный, оздоровленный посадочный материал, иметь высокий коэффициент размножения, сокращать селекционный процесс, проводить работы в течение круглого года, экономя при этом площади, необходимые для выращивания растений.

Одним из наиболее важных факторов при клональном микроразмножении является содержание в питательной среде регуляторов роста. В мировой практике клонального микроразмножения растений наиболее широко применяется цитокинин 6-бензиламинопурин (БАП) и ауксин -нафтилуксусная кислота (НУК), что связано со стабильностью промышленного производства этих синтетических соединений, устойчивостью их химической структуры при автоклавировании и эффективным индуцированием морфогенеза [1].

Однако для ряда генотипов эффективными в отношении регенерации растений оказываются нетрадиционные индукторы морфогенеза. Природные фитогормоны и синтетические регуляторы роста и развития растений являются мощным химическим средством управления онтогенезом и продукционным процессом растений. Фиторегуляторы – важное средство регулирования дифференцировки клеток, клеточных делений, образования новых тканей и органов, темпов роста и развития растений, их продуктивности и качества урожая. Решающее значение в управлении онтогенезом растений и их продуктивностью имеет изучение и мониторинг фитогормонального статуса.

В задачу нашего исследования входило изучение на отдельных этапах клонального микроразмножения винограда регуляторов роста нового поколения: Эмистим, салициловая кислота, циркон, эпин-экстра, Мелафен. В работе использовали аборигенные сорта, перспективные сорта селекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко и подвойные сорта винограда.

Исследования проводились в стационарных условиях лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ им Я.И. Потапенко по общепринятым в биотехнологии методикам [Ф.Р. Уайт, 1949, Р.Г. Бутенко, 1964; П.Я. Голодрига и др., 1986, Н.П. Дорошенко, 1992].

***Эмистим***– универсальный регулятор роста, выделенный из гриба Acremonium lichenicola, имеет широкий спектр действия. Он обладает слабой гибберелловой и цитокининовой активностью, положительно влияет на процессы роста и развития растений, снижает влияние неблагоприятных и стрессовых факторов, активирует защитные механизмы против многих патогенов, является индуктором устойчивости к вирусным заболеваниям [4, 5].

Особое значение имеет применение этого препарата на этапе ввода меристем в культуру *in vitro*. Меристемы размером 0,1 – 0,2 мм, выделенные и высаженные на питательную среду, нуждаются в защите от стресса и патогенов, в стимуляции клеточного деления для их роста и усиления пролиферации (новообразование узлов и побегов) на следующем этапе собственно микроразмножения.

Добавление в состав питательной среды препарата Эмистим в разведениях 10-8, 10-10 и 1012.способствует улучшению регенерации меристем. Оптимальная концентрация препарата зависит от сортовых особенностей, а также связана с пластичностью поведения сорта в условиях *in vitro.* Лучшей концентрацией Эмистима по этим показателям для сортов Красностоп золотовский и Сибирьковый является концентрация 10-12%, а для сорта Кумшацкий – 10-8.

Значительное улучшение приживаемости меристем под влиянием эмистима как на первом, так и на втором этапе ввода произошло у сорта Дружба. При концентрации Эмистима 10-9 и 10-11 % приживаемость меристем увеличилась с 56,1 до 71,8–81,2 %. Улучшение репаративной регенерации меристем также отмечено у сортов Платовский и Шардоне, при концентрации 10 –5– 10-6 %.

Улучшение приживаемости меристем можно объяснить тем, что Эмистим защищает их от стресса и патогенов. Увеличение размерных характеристик связано со стимуляцией клеточного деления под действием Эмистима.

Основной показатель результативности следующего этапа: собственно микроразмножения – количество адвентивных побегов, образовавшихся в расчете на одну выделенную меристему (коэффициент размножения). В лучших вариантах с добавлением Эмистима у аборигенных сортов винограда он составил 4,4; 5,4; 7,5 шт. В контрольных вариантах этот показатель равен 2,0; 1,6; 3,2, т.е. меньше в 1,7–4,7 раза.

У сорта Сибирьковый число образовавшихся побегов под влиянием эмистима увеличилось в 1,7 раза, у сорта Красностоп золотовский – в 4,6 раза, у сорта Кабашный – в 1,2–2,1 раза в зависимости от концентрации препарата (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние Эмистима на пролиферацию аборигенных сортов винограда,**

**2007--2009 гг.**

|  |  |
| --- | --- |
| Сорт винограда | Образовалось и срезано побегов (шт.) в вариантах |
| контроль | Эмистим | всего, шт. |
| 10-6 | 10-8 | 10-10 | 10-12 |
| Кумшацкий белый | 85 | — | 20 | 0 | 23 | 128 |
| Сибирьковый | 45 | — | 75 | 5 | 20 | 145 |
| Красностоп золотовский | 19 | — | **105** | 7 | 20 | 151 |
| Кабашный | 28 | 39 | 42 | **61** | 34 | **204** |

Таким образом, препарат эмистим оказывает положительное влияние на улучшение регенерационной способности меристем на этапе собственно микроразмножения. Эффективность действия Эмистима зависит от сортовых особенностей винограда и от концентрации этого препарата в составе питательной среды, применяемой на первом этапе ввода того или иного сорта винограда в культуру *in vitro.*

Помимо положительного влияния эмистима на приживаемость меристем на этапе ввода, повышение регенерационной способности на этапе собственно микроразмножения, отмечено стимулирование роста растений в результате действия этого препарата на этапе микрочеренкования, повышение адаптивной способности растений при переносе их в нестерильные условия.



**Рис.1. Влияние различных концентраций Эмистима**

**на образование побегов у сорта Платовский**

При микроразмножении эмистим оказывает двоякое действие на микрочеренки: способствует индукции ризогенеза и, кроме этого, оказывает влияние на конус нарастания почек глазка, способствуя делению клеток и вытягиванию в длину клеток всех тканей. То есть, в данном случае воздействие Эмистима направлено на микрочеренок с целью регенерации из него растения и осуществляется одновременно на тканевом и организменном уровне. В результате его применения происходит оптимизация метаболических процессов, усиливаются функции иммунитета у растений, активизируются защитные механизмы растений против многих патогенов. Гиббереллиновая и цитокининовая активность препарата положительно влияет на процессы роста растений.

Установлены оптимальные концентрации препарата эмистим в составе питательных сред в зависимости от сортовых особенностей. На этапе ввода меристем в культуру следует применять препарат в концентрации 108–10-12, для улучшения ризогенеза – 10-10 %, на этапе микрочеренкования – от 10-8 до 10-10.

В публикациях последнего десятилетия ***салициловая кислота*** рассматривается как фитогормон растений и один из факторов их защиты от воздействия патогенов микробной и грибной природы [6]. Во время атаки патогенов она резко накапливается в клетках, индуцируя программируемую клеточную смерть вокруг пораженного участка.

В присутствии салициловой кислоты происходит ингибирование распространения вируса ВТМ, одной из причин которого ученые из ИФР им. К.А. Тимирязева и кафедры вирусологии МГУ [7] считают снижение проводимости плазмодесм и межклеточного транспорта вируса, что делает желательным применение салициловой кислоты при оздоровлении и клональном микроразмножении в культуре изолированных тканей и органов.

М.Т. Упадышев, А.Д. Петрова [8] в процессе хемотерапии выявили антивирусную активность салициловой кислоты в отношении вирусов различной природы у ягодных и плодовых культур. Более того, М.Т. Упадышевым [9] доказано, что способ оздоровления растений от вирусов с использованием салициловой кислоты позволяет повысить эффективность оздоровления растений от вирусов в среднем на 28–30 % и в 25 раз снизить стоимость процесса оздоровления.

Все вышеизложенное послужило основанием для включения салициловой кислоты в программу исследований с целью улучшения адаптации меристем к условиям культивирования и повышения устойчивости их к вирусной инфекции.

Салициловая кислота, добавленная в состав питательной среды на этапе ввода, способствует улучшению адаптации меристем к условиям культивирования и регенерации из них растений; на этапе микрочеренкования применение СК в диапазоне концентраций 0,14 – 1,0 мг/л улучшает приживаемость микрочеренков, стимулирует корнеобразование, но ингибирует рост растений.

Отмечена различная реакция отдельных сортов винограда на её применение: для подвойных сортов винограда лучшей оказалась концентрация – 1,4 мг/л; для сорта Красностоп золотовский – 0,14 мг/л/.

Салициловая кислота в оптимальных концентрациях отличается низкой фитотоксичностью и даже проявляет стимулирующее действие на процессы органогенеза у растений, повышая коэффициент размножения и ризогенную способность. Учитывая это и антивирусную активность, её следует применять для оздоровления растений в дополнение к культуре меристем.

Таблица 2

**Продуктивная регенерация меристем при добавлении в состав питательной среды**

**салициловой кислоты, Красностоп золотовский, 2006 – 2007 гг.**

|  |  |
| --- | --- |
| Варианты, мг/л | Число образовавшихся побегов, шт. в пассаже |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | всего |
| Контроль | — | 10 | 2 | 3 | 3 | — | 1 | 8 | 27 |
| СК —0,14 | 3 | **12** | 4 | **17** | 9 | 7 | 6 | **11** | **69** |
| СК —1,4 | — | — | 2 | 2 | — | 10 | 16 | 4 | 34 |

Препарат ***Циркон*** разработан фирмой ННПП «НЭСТ М». Действующим веществом препарата является смесь гидроксикоричных кислот (ГКК), получаемых из растительного сырья эхинацеи пурпурной. Биологическая активность циркона в значительной степени обусловлена антиоксидантными свойствами, характерными для фенольных соединений. Циркон является физиологически активным соединением и выполняет при попадании в организм растений функции росторегулятора, антистрессового адаптогена и индуктора болезнеустойчивости [10].

Добавление препарата циркон в состав питательной среды оказывает положительное влияние на морфогенез растений. Происходит увеличение длины корней и ризогенной зоны в 1,1 – 1,7 раза по сравнению с контролем. Намного улучшается рост растений и их облиственность. При концентрации 0,1 мл/л рост растений увеличился в 3,2 раза, при 0,05 мл/л — в 4,2 раза, а при концентрации 0,01 мл/л в 4,9 раза. Примерно так же улучшилась и облиственность растений.

Таким образом, препарат циркон, благодаря своим защитным свойствам, способствует повышению приживаемости микрочеренков и улучшает выход растений. Добавление циркона в состав питательной среды, при соблюдении его препаративной формы, оказывает положительное влияние на ростовые процессы пробирочных растений: увеличение длины ризогенной зоны, рост и облиственность растений, что способствует улучшению качественных характеристик оздоровленных растений винограда.

***Брассиностероиды*—** новый класс фитогормонов. Благодаря множественным эффектам, оказываемым на растения, брассиностероиды рассматриваются как растительные гормоны с плейотронным действием на растения. Во–первых, они участвуют в гормональной регуляции роста и развития растений, во-вторых им принадлежит важная роль в адаптации растений к неблагоприятным условиям выращивания. Важную роль брассиностероиды играют в повышении природной устойчивости растений к фитопатогенам и вирусной инфекции

***Эпин – экстра* —** синтетический брассиностероид, аналог природного фитогормона, производится фирмой ННПП «НЭСТ М».

Это регулятор роста, способствующий усилению роста растений, повышению урожая и качества, устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды и возбудителям болезней [11].

Проведенные нами исследования, подтвердили плейотронное действие брассиностериода ***Эпин - ®экстра*** на растения винограда при микроклональном размножении. Во–первых, установлено, что он участвует в гормональной регуляции роста и развития растений, во-вторых в адаптации растений к новым условиям культивирования.

При применении брассиностероидов, как общеизвестно и установлено нами, огромное значение имеет их концентрация. Высокие концентрации данных соединений индуцируют аномальные ростовые реакции и могут быть летальными. Использование брассиностероидов в наномолярных и субнаномолярных концентрациях позволяет предотвращать токсические эффекты, усиливать рост и развитие растений.

Таблица 3

**Результаты добавления препарата Эпин - ®экстра в питательную среду**

**при микроклональном размножении, сорт Фиолетовый ранний, 2006 г.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Варианты, мл/л | Корни | Длина ризоген.зоны, мм | Надземная часть | Коэф, полярн. |
| число, шт. | длина, мм | высота, мм | листьев, шт. |
| Состояние растений на 30 день культивирования |
| Контроль | 2,2 | 18,4 | 40,4 | 10,2 | 1,2 | 4,0 |
| Эмистим 10-9 | 1,9 | 15,2 | 28,4 | *8,6* | 1,1 | 3,3 |
| Эпин-®экстра 0,5 | **2,3** | **23,4** | **53,8** | 10,5 | 1,4 | 5,1 |
| Эпин - ®экстра 1,5 | 1,6 | 19,8 | 32,2 | 10,4 | **1,7** | 3,1 |
| Состояние растений на 45 день культивирования |
| Контроль | 2,9 | 23,8 | 68,2 | 28,5 | 2,6 | 2,4 |
| Эмистим 10-9 | 3,3 | 19,0 | 62,6 | 20,3 | 2,4 | 3,1 |
| Эпин - ®экстра 0,5 | 3,3 | **28,8** | **94,3** | **32,5** | **3,6** | 2,9 |
| Эпин - ®экстра 1,5 | 2,4 | 18,9 | *45,3* | *18,4* | 2,7 | 2,5 |
| Состояние растений на 60 день культивирования |
| Контроль | 4,1 | 27,7 | 114,5 | 75,7 | 5,5 | 1,5 |
| Эмистим 10-9 | 3,4 | 27,6 | 93,0 | 52,6 | 5,3 | 2,4 |
| Эпин - ®экстра 0,5 | 4.7 | 27.3 | **128.2** | **62,6** | 5,8 | 1,5 |
| Эпин - ®экстра 1,5 | 3,1 | 21,7 | 67,4 | 44,7 | 5,1 | 1,5 |

Высокая эффективность при применении препаратов на основе брассиностероидов может быть получена лишь при условии высокой химической чистоты действующего вещества. Кроме этого, необходим оптимальный подбор компонентов препаративной формы с подходящей липофильностью для увеличения проницаемости растительных клеток.

***Мелафен* —** синтетический регулятор роста растений нового поколения, представляющий собой меламиновую соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты.

Мелафен, как и цитокинины, участвует в регуляции физиологических процессов в течение всего онтогенеза, в регуляции обмена веществ закончивших рост органов, повышает содержание пигментов, увеличивает интенсивность фотосинтеза, повышает скорость фотофосфорилирования, улучшает энергетический обмен растения [12].

 

 А —контроль Б - Мелафен 10-7

**Рис.2. Этап ввода меристем сорта Саперави северный в культуру in vitro**

В наших исследованиях Мелафен в концентрации 10-7 способствовал повышению регенерационной способности меристем у всех изучаемых сортов винограда. При введении его в состав питательной среды меристемы быстрее увеличиваются в размерах, у них улучшается линейный рост, и быстрее образуется розетка листьев, они быстрее переходят к этапу собственно микроразмножения. Рострегулирующее действие Мелафена, по-видимому, проявляется через его влияние, как на процессы растяжения клеток, так и на процессы деления клеток в отдельных зонах меристемы.

Получены четкие данные о положительном влиянии препарата Мелафен на клональное микроразмножение винограда сорта Цимладар (табл.4). Отмечено при концентрациях 10-7, 10-9, 10-11% улучшение всех качественных показателей растений уже через 23 дня культивирования. Лучшие результаты получены при концентрации 10-7%. Несколько хуже показатели в варианте с концентрацией 10-9%. Дальнейшее уменьшение положительного эффекта отмечено при минимальной концентрации препарата.

При дальнейшем культивировании (48 дней) скорость роста замедляется, но превосходит контрольный вариант в 1,2 раза; сохраняются преимущества препарата Мелафен по всем показателям роста при концентрациях 10-7,10-9, 10-11%.

Таблица 4

**Результаты изучения регулятора роста Мелафен при клональном**

**микроразмножении сорта винограда Цимладар, 2013–2014 гг.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Концентрации Мелафена | Приживаемость,% | Корни | Высота, см | Листьев, шт. | Скорость см/сутки | Коэф. полярности |
| число, шт. | длина,см | ризог. зона, см |
| Учет через 23 дня после посадки |
| Контроль | 96,4 | 3,0 | 3,0 | 9,0 | 2,7 | 3,0 | 0,12 | 3,3 |
| 10-5 | 78,6 | 3,3 | 2,6 | 8,4 | 2,9 | 3,0 | 0,13 | 2,9 |
| 10-7 | **100,0** | **4,6** | **5,9** | **27,4** | **4,4** | **4,3** | **0,19** | **6,1** |
| 10-9 | **100,0** | **4,3** | **3,6** | **15,2** | **4,3** | **3,8** | **0,19** | **3,5** |
| 10-11 | **100,0** | **3,1** | **3,6** | **11,1** | **4,3** | **3,8** | **0,19** | **2,6** |
| Учет через 48 дней после посадки |
| Контроль | 92,9 | 4,9 | 4,2 | 20,3 | 8,9 | 7,2 | 0,19 | 2,3 |
| 10-5 | 71,4 | 4,2 | 4,7 | 19,7 | **9,2** | 7,8 | 0,19 | 2,1 |
| 10-7 | **100,0** | **5,5** | **5,8** | **31,9** | **10,6** | **8,9** | **0,22** | **3,0** |
| 10-9 | **100,0** | **4,6** | 5,5 | **25,6** | **10,5** | **9,0** | **0,22** | 2,4 |
| 10-11 | **100,0** | **4,4** | 4,2 | 18,5 | **10,0** | **9,7** | **0,20** | 1,8 |

Применение препарата Мелафен в качестве регулятора роста позволило увеличить приживаемость и развитие микрочеренков, сократить в среднем в 1,5–3 раза цикл их развития, регенерацию в растения; у регенерированных растений улучшить корнеобразование и развитие ризогенной зоны, рост и облиственность побегов, готовность растений к адаптации в нестерильные условия, выход растений с улучшенными качественными показателями и, в целом, повысить эффективность клонального микроразмножения винограда.

В результате проведенных исследований предложен новый способ клонального микроразмножения винограда *in vitro* с использованием нетоксичного, устойчивого во времени, водорастворимого, синтетического росторегулирующего препарата Мелафен, эффективного в концентрации 10-7–1011%. Использование предлагаемого способа позволяет увеличить выход растений за счет более эффективной приживаемости микрочеренков, регенерации растений и улучшения их качественных показателей. Учитывая низкую себестоимость препарата и высокий оказываемый эффект, применение этого способа экономически обосновано.

Таким образом, особенностью действия изученных регуляторов роста является то, что они интенсифицируют физиолого-биохи-мические процессы в растениях и одновременно повышают устойчивость к стрессам и болезням. Высокая физиологическая и фунгицидная активность новых биорегуляторов проявляется в низких концентрациях, они включаются в метаболизм растений, не оказывая вредного влияния на почву и окружающую среду. Характерной особенностью действия этой группы веществ является их полифункциональность, проявляющаяся в стимуляции роста и развития растений, повышения устойчивости к абиотическим факторам среды, антигрибковая, антибактериальная и противовирусная активность в сочетании с антистрессовым действием на растения.

Литература

1. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнология на их основе / Р.Г. Бутенко – М., 1999.

2. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Л.А. Чекмарев [и др.] – Ялта, 1986. – 26 с.

3. Дорошенко, Н. П. Клональное микроразмножение и оздоровление посадочного материала винограда для создания из него сортовых маточников интенсивного типа: рекомендации / Н.П. Дорошенко. – М., 1998. – 24 с.

4. Пономаренко, С.П. Определение типа физиологической активности Эмистима с использованием специфических биотестов / С.П. Пономаренко, З.Г. Гашников // Аграрная Россия. —1999. — №1(2).—С.15 – 16.

5. Эмистим индуктор устойчивости к вирусным болезням пасленовых / Н.А. Рожнова и др. // Аграрная Россия. – 1999. – №1 (2). – С. 35-39.

6. Может ли салициловая кислота влиять на межклеточный транспорт вируса табачной мозаики через изменение проводимости плазмодесм. / М.С. Красавина и др. // Физиология растений. – 2002. – Т. 49. – № 1. – С. 71–77.

7. Тимофеева, О.А. Эффект салициловой кислоты на активность лектинов при действии на растения биотических и абиотических факторов / О.А. Тимофеева, Т.В. Трифонова, Н.А. Шадрина // Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях.— М., 2001.—С. 65.

8. Петрова, А.Д. Хемотерапия и размножение садовых культур на питательных средах с фенолкарбоновыми кислотами / А.Д. Петрова, М.Т. Упадышев: сб. науч. работ «Плодоводство и ягодоводство России». – М., 2000. – Т.7. – С. 67–72.

9. Упадышев, М.Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур: Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук. – М., 2011.

10. Регуляторы роста растений с антистрессовыми и иммунопротекторными свойствами / Л.Д. Прусакова и др. // Агрохимия. – 2005. – № 11. – С.76–86.

11. Прусакова, Л.Д. Применение брассиностероидов в экстремальных условиях / Л.Д, Прусакова, С.И. Чижова // Агрохимия. – 2005. – №7. – С.87–94.

12.Фаттахов С.Г. Мелафен — перспективный регулятор роста растений для сельского хозяйства и биотехнологии / С.Г. Фаттахов, В.С. Резник, А.И. Коновалов // Материалы Всероссийского семинара – совещания «Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста нового поколении Мелафен в сельском хозяйстве и биотехнологии». — Казань, 2006. – С. 3–12.