

УДК 634.8.037:581.143

UDC 634.8.037:581.143

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА ЭМИСТИМ
ПРИ КЛОНАЛЬНОМ
МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА**

**PHYSIOLOGICAL SUBSTANTIATION OF
APPLICATION OF EMISTIM PREPARATION
AT CLONAL GRAPE MICRO REPRODUCTION**

Дорошенко Наталья Петровна
д-р с.х. наук
*Всероссийский НИИ виноградарства и виноделия
им. Я.И. Потанина, Россия*

Doroshenko Natalia Petrovna
Dr. Sci. Agr.
*Russian national scientific research institute of wine
growing and winemaking of Y.I.Potapenko, Russia*

Исследована и обоснована необходимость
применения препарата эмистим на различных
этапах клонального микроразмножения: введения
меристем в культуру, собственно
микроразмножения, ризогенеза и
микрочеренкования

Necessity of application of Emistim preparation at
various stages of clone micro reproduction is
investigated and proved: induction of meristems into
culture, micro reproduction itself, education of roots and
micro grafting

Ключевые слова: ВИНОГРАД, IN VITRO,
РЕГУЛЯТОР РОСТА ЭМИСТИМ,
КОНЦЕНТРАЦИИ, ПРИЖИВАЕМОСТЬ
МЕРИСТЕМ, ОБРАЗОВАНИЕ ПОБЕГОВ,
РИЗОГЕНЕЗ, РОСТ РАСТЕНИЙ, СОРТОВАЯ
ОТЗЫВЧИВОСТЬ

Keywords: GRAPE, IN VITRO, EMISTIM GROWTH
REGULATOR, CONCENTRATION, SURVIVAL OF
MERISTEMS, ARMS GROWING, EDUCATION OF
ROOTS, PLANT GROWTH, VARIETAL
RESPONSIVENESS

Альтернативой традиционным методам размножения винограда является клональное микроразмножение, имеющее перед ними целый ряд преимуществ, среди которых основным является получение генетически однородного, безвирусного посадочного материала.

Как следует из обзора П. Абрашевой [1] вирусы, размножаясь в растительных клетках и, используя их для своей репродукции, вызывают нарушения в обмене веществ хозяина. Нарушения процесса обмена веществ ведут к задержке роста побегов, постепенному редуцированию надземной части зараженных вирусами виноградных растений до полной их гибели. Нарушая ход физиологических процессов, вирусы, оказывают отрицательное влияние на больные растения, которые, в большинстве случаев, снижают количество и качество урожая, сильно страдают от неблагоприятных условий внешней среды. Ослабленные кусты нередко преждевременно усыхают, вызывая раннюю изреженность виноградников.

Основным направлением борьбы с этими заболеваниями является получение здорового посадочного материала и предохранение его от вторичного заражения, перевод питомниководства на безвирусную основу и ведение системы сертификации посадочного материала по образцу большинства европейских стран.

Основой сертифицированного посадочного материала является базовый посадочный материал, который производится в научных учреждениях и должен быть свободным от карантинных объектов, возбудителей хронических заболеваний (вирусных, бактериальных и др.).

В настоящее время проблема борьбы с вирусными болезнями, а также поддержания и хранения коллекционного генофонда, решается с помощью культуры апикальных меристем и клонального микроразмножения *in vitro* [2,3,4].

Чтобы повысить эффективность оздоровления от вирусной инфекции, применяют дополнительные противовирусные воздействия. Среди таких способов активации защитных реакций к вирусным патогенам особый приоритет получило применение метаболитов – элиситоров из патогенных грибов, в частности архидоновой кислоты [5,6]. В этой связи, представляет интерес препараты серии «симбионт», выделенные из грибов *Acremonium lichenicola* ряда растений, в частности, универсальный регулятор роста растений эмистим, который имеет широкий спектр действия. Он обладает слабой гибберелловой и цитокининовой активностью [7], положительно влияет на процессы роста и развития растений, снижает влияние неблагоприятных и стрессовых факторов, активирует защитные механизмы против многих патогенов [8] является индуктором устойчивости к вирусным болезням пасленовых [9].

Особое значение имеет применение этого препарата на этапе ввода меристем в культуру ткани. 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. Воздействие эмистима на меристематические ткани, которые представляют собой группы недифференцированных клеток, образующих все постоянные ткани и органы растительного организма, осуществляется на клеточном уровне. Под влиянием эмистима повышается меристематическая активность тех участков меристемы конуса нарастания, которые не проявляют видимой активности в данное время, а будто «выжидают» своего времени для образования тех или иных тканей или структур, то есть, сокращается период «меристемы ожидания». В результате повышается и надолго сохраняется способность клеток к делению. Таким образом, активизируются ростовые формообразовательные и функциональные процессы.

Кроме этого, эмистим включает защитные механизмы меристематических тканей, которые приобретают способность активно сопротивляться инфекции, в результате чего повышается их устойчивость к патогенам и приживаемость меристем.

Целью исследования явилось оздоровление растений винограда от вирусной инфекции, улучшение регенерации меристем, повышение выхода и улучшение качественных характеристик оздоровленных растений.

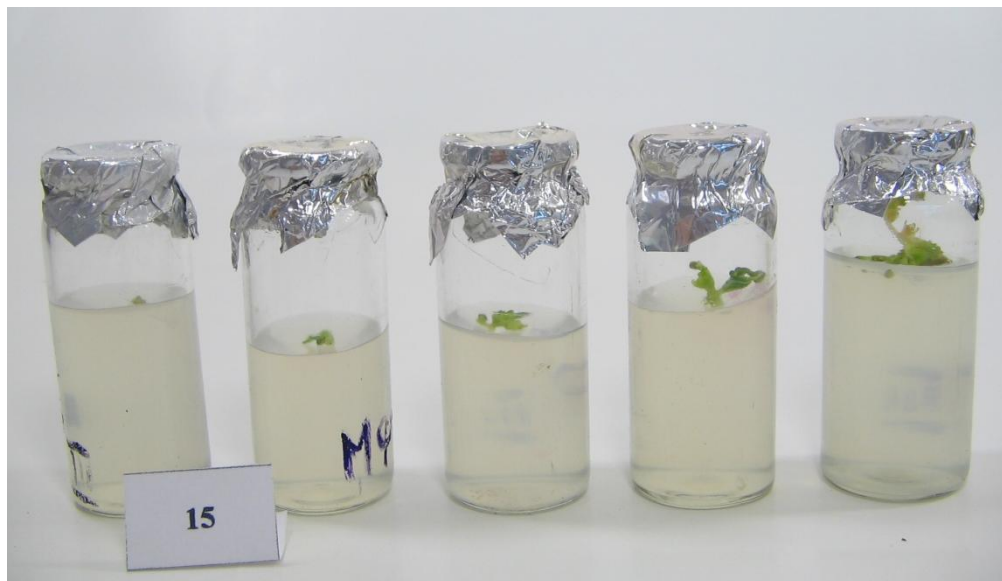


Рисунок 1 – Меристемы винограда на этапе ввода.

Поставленная цель достигалась вычлениением меристематических эксплантов размером 0,1-0,2 мм в асептических условиях и высадкой их в пробирки на стерильную питательную среду, в состав которой добавляли препарат эмистим в концентрации 10^{-5} - 10^{-11} %. Концентрации эмистима изучали на этапе ввода в культуру *in vitro* сортов Дружба, Каберне северный, Платовский, Шардоне.

Следующим этапом является процесс собственно микроразмножения – пролиферации (новообразование) пазушных побегов, образовавшихся после прохождения этапа ввода меристем, основанный на снятии апикального доминирования путем введения в питательную среду Мурасиге и Скуга (по прописи) регулятора роста с цитокининовой активностью — 6-бензиламинопурина (6-БАП). Это приводит к формированию побегов с относительно укороченными междоузлиями, а пазушные почки и меристематические бугорки дают начало новым побегам. Экспланты на этой среде приобретают вид пучков маленьких побегов, каждый из которых может быть повторно рекультивирован и образовать новые побеги.

Эффективность применения эмистима оценивали по приживаемости меристем на этапах ввода и по образованию побегов на этапе собственно микроразмножения

Четкое улучшение приживаемости меристем с 56,1% до 71,8-81,2% под влиянием эмистима отмечено у сорта Дружба при концентрациях 10^{-9} и 10^{-11} %. У сорта Каберне северный приживаемость меристем находилась на уровне контроля. Улучшение регенерации меристем при применении эмистима отмечено у сортов Платовский и Шардоне, особенно, при концентрации 10^{-5} – 10^{-6} %.

Более значительное влияние препарат эмистим оказал на репродуктивную регенерацию (новообразование узлов и побегов, срезка побегов для укоренения и дальнейшего микроразмножения). Этот показатель также зависел от сортовых особенностей. При этом оптимальная концентрация препарата была различной для каждого отдельного сорта.



Рисунок 2 – Образование побегов на этапе собственно микроразмножения

Наиболее отзывчивым на эмистим оказался сорт Дружба. При продолжительности этапа собственно микроразмножения 414 дней был

осуществлен 21 пассаж, 20 из которых оказались продуктивными. В каждом пассаже было срезано 10,3 побега (в 2 раза больше, чем в контроле). В расчете на одну выделенную меристему число срезанных побегов составило 16,7 штук, что в 4,4 раза больше чем в контроле. У сорта Дружба наибольшее число побегов – 216 шт. было срезано в варианте с концентрацией эмистима 10^{-11} % (в 3,5 раза больше чем в контроле).

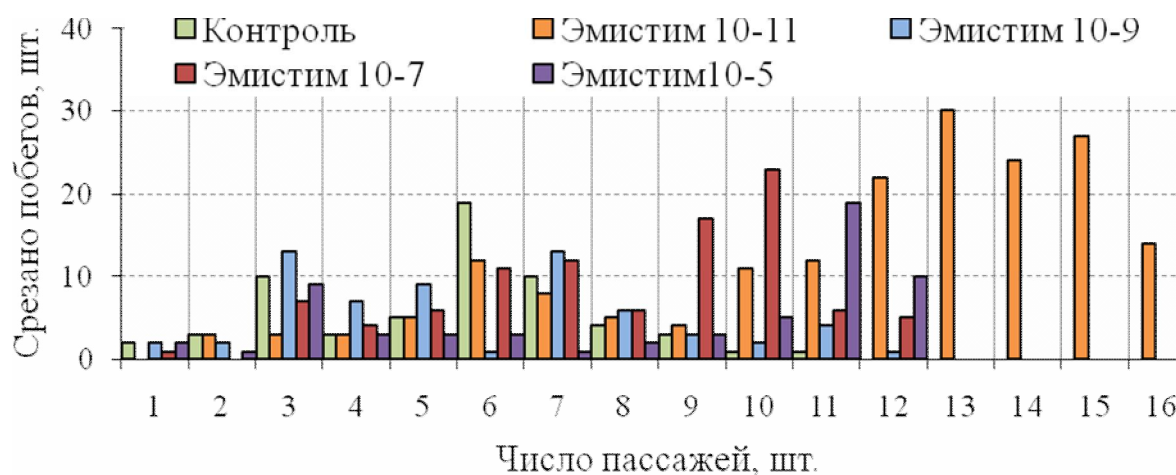


Рисунок 3 - Влияние препарата эмистим на репродуктивную регенерацию меристем у сорта винограда Дружба

На втором месте по отзывчивости находился сорт Платовский. При концентрации 10^{-5} % продолжительность этапа пролиферации увеличилась по сравнению с контролем \approx на 30 дней, более чем в 2 раза увеличилось число продуктивных пассажиров, в 2,8 раза возросло число срезанных побегов в расчете на один продуктивный пассаж и в 3,6 раза в расчете на одну выделенную меристему. Эффективным (рис.4) оказалось применение более высоких концентраций этого препарата 10^{-5} - 10^{-6} %. Число срезанных побегов увеличилось по сравнению с контролем у сорта Платовский в 3,5 раза.

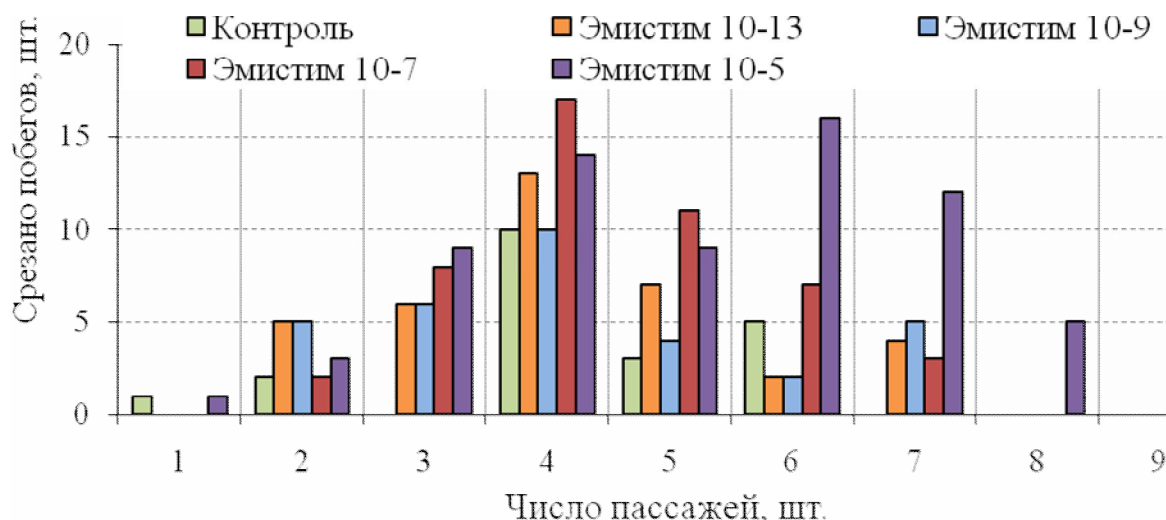


Рисунок 4 - Влияние препарата эмистим на репродуктивную регенерацию меристем у сорта винограда Платовский.

Для сорта Каберне северный (рис.5) оптимальная концентрация эмистима находилась в пределах $10^{-9} - 10^{-11}\%$, при которых срезка побегов продолжалась в течение 3-х лет без дополнительного ввода и составила 915 – 984 штук. Общее число срезанных побегов, число срезанных побегов в расчете на одну выделенную меристему, на один пассаж увеличилось при этой концентрации в 1,3-1,4 раза. При концентрациях препарата 10^{-13} и 10^{-5} мл/л наблюдалось угнетение продуктивной регенерации меристем.

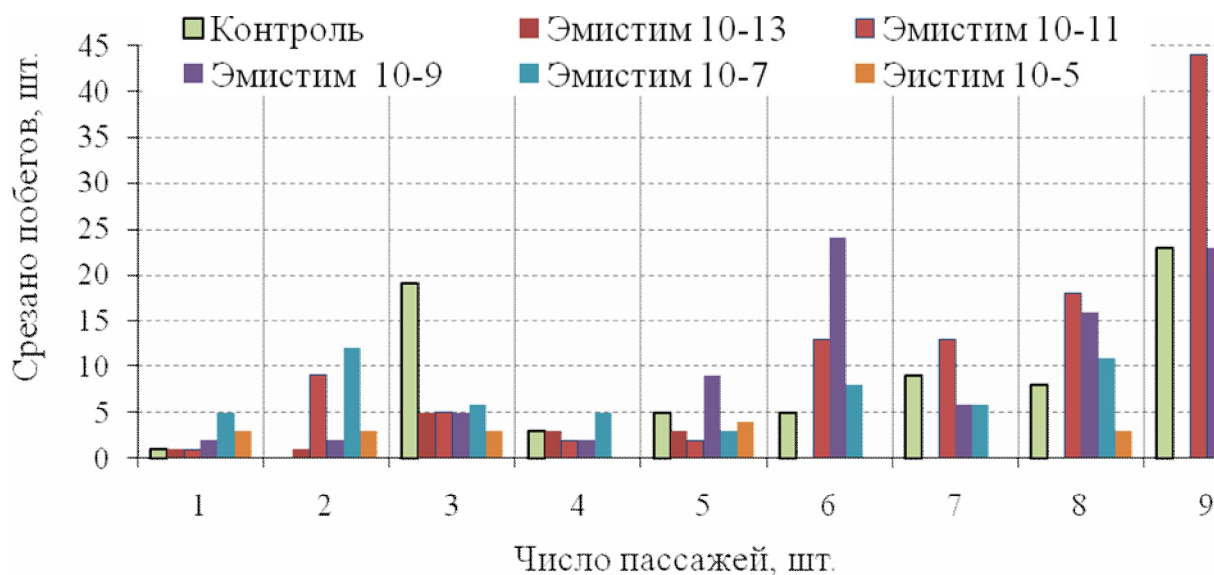


Рисунок 5 - Влияние препарата эмистим на репродуктивную регенерацию меристем у сорта винограда Каберне северный.

Следующим важным этапом процесса микроразмножения является индукция корней у размноженных побегов. На сортах винограда Каберне северный и Платовский исследовали возможность применения эмистима в качестве дополнительного индуктора корнеобразования размноженных побегов. У сорта Каберне северный при добавлении в питательную среду препарата эмистим в концентрации 10^{-8} и 10^{-6} % значительно (в 1,8 – 2 раза) увеличивалось число образовавшихся корней. Несмотря на то, что длина корней уменьшилась, величина ризогенной зоны при этих концентрациях намного больше, чем в контроле. Особенно это относится к варианту с концентрацией эмистима 10^{-8} %.

При микрочеренковании пробирочные растения испытывают стресс и нуждаются в защите от этого неблагоприятного фактора. В связи с этим проведено испытание эмистима на этапе микрочеренкования растений винограда, оздоровленных от вирусной инфекции методом апикальных меристем.

Поставленная цель достигалась тем, что проводилось микрочеренкование пробирочных растений с 8-10 междоузлиями на фрагменты длиной 10-12 мм с глазком и листом и высадка их в пробирки на жидкую питательную среду Мурасиге Скуга. с уменьшенным количеством макроэлементов и витаминов и добавлением в её состав препарата эмистим в концентрации $10^{-7} \div 10^{-10}$ %.

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.



а)

б)

Рисунок 6 - Растения винограда на этапе микрочеренкования: а) укоренение микрочеренка и пробуждение точки роста, б) рост побегов

Результаты изучения препарата эмистим на этапе микрочеренкования сорта Каберне северный отражены в таблицах 1, 2 и 3..

Добавление в питательную среду для культивирования сорта Каберне северный эмистима оказало влияние, как на образование корней, так и на их длину и, соответственно, на величину ризогенной зоны. Отмечено увеличение числа корней в течение всего периода культивирования, особенно в вариантах с концентрацией препарата 10^{-8} и 10^{-10} %. Возросла и длина корней. Более значительное увеличение происходило в вариантах с повышенной концентрацией препарата.

Величина ризогенной зоны зависела, в первую очередь, от числа корней и была наибольшей при концентрации эмистина 10^{-8} и, особенно, 10^{-10} %.

Таблица 1 — Динамика развития корневой системы у пробирочных растений сорта Каберне северный под влиянием эмистина, 2002—2004 гг.

Варианты	Число корней, шт.				Длина корней, мм				Длина ризогенной зоны, мм			
	дни культивирования											
	15	34	49	63	15	34	49	63	15	34	49	63
Контроль	0,6	2,0	3,7	4,6	2,0	3,4	7,6	16,6	1,2	6,8	37,2	76,3
ЭМИСТИМ 10^{-10}	4,3	5,2	7,6	8,3	3,6	8,1	14,9	22,0	15,4	42,1	113,2	182,6
ЭМИСТИМ 10^{-9}	4,2	4,8	6,4	7,5	4,1	8,1	15,8	24,1	17,2	38,8	101,1	180,7
ЭМИСТИМ 10^{-8}	4,2	4,4	5,2	6,2	4,6	8,2	16,8	26,1	19,3	36,0	87,3	161,8
ЭМИСТИМ 10^{-7}	2,0	3,4	3,8	4,3	4,7	8,7	17,9	26,2	9,4	27,2	68,0	112,6

Эмистим в концентрации 10^{-8} и 10^{-10} % способствовал улучшению роста растений, образованию большего числа листьев.

Таблица 2 — Особенности развития надземной массы пробирочных растений сорта Каберне северный под влиянием эмистина, 2002 — 2004гг.

Варианты	Высота растений, мм				Число листьев штук				Коэффициент полярности			
	дни культивирования											
	15	34	49	63	15	34	49	63	15	34	49	63
Контроль	2,5	6,5	26,0	51,0	0,6	0,7	3,3	5,0	0,4	1,0	1,4	1,4
ЭМИСТИМ 10^{-10}	0,3	15,8	44,7	92,0	0,04	1,0	3,1	6,9	51,3	2,6	2,5	2,0
ЭМИСТИМ 10^{-9}	0,4	15,6	42,5	84,6	0,04	1,0	3,3	6,0	0,4	2,4	2,3	2,1
ЭМИСТИМ 10^{-8}	0,6	15,6	36,3	77,2	0,06	1,2	3,0	6,2	3,2	2,3	2,4	2,0
ЭМИСТИМ. 10^{-7}	0,8	12,8	32,2	50,0	0,07	0,9	2,7	5,8	11,8	2,1	2,1	2,2

Таблица 3 — Ход развития пробирочных растений сорта Каберне северный при применении эмистима, 2002 — 2004 гг.

Варианты	Отсутствие роста								Выход растений, %
	корней, шт. на день				побегов шт. на день				
	15	34	49	63	15	34	49	63	
Контроль	25	22	22	21	21	24	23	21	25,0
Эмистим 10^{-10}	12	5	8	7	27	15	11	9	67,8
Эмистим 10^{-9}	25	18	8	6	26	15	10	8	77,2
Эмистим 10^{-8}	13	8	8	6	28	15	10	7	75,0
Эмистим 10^{-7}	14	15	11	12	26	17	13	14	50,0

Как следует из приведенных данных, эмистим оказал положительное влияние на образование и рост корней, рост побегов и образование листьев. Наиболее существенное улучшение отмечено при концентрации эмистима 10^{-8} и 10^{-10} мг/л. Благодаря этому, образование растений из микрочеренков увеличилось с 25,0% в контроле до 67,8-75,0% в этих вариантах.

Анализ применения эмистима при микрочеренковании 5 – ти сортов винограда: Дружба, Каберне северный, Цветочный, Кобер 5ББ, Рупестрис дю Ло показал, что препарат эмистим способствует улучшению приживаемости микрочеренков, более быстрому образованию и росту корней, побегов и листьев, что обеспечивает ускорение процесса клонального микроразмножения более чем на две недели и, как следствие, повышение его эффективности.

Стимулирование развития корней и побегов отмечено у всех сортов и подвоев, но концентрации, обеспечивающие стимулирование, были различными для каждого сорта. У сорта Дружба, подвоя Кобер5ББ, лучшее развитие растений происходило при разведении эмистима 10^{-7} - 10^{-8} мл/л, у сорта Цветочный при разведении 10^{-10} .

Добавление препарата эмистим в питательную среду на этапе микрочеренкования, помимо вышеизложенного, способствует улучшению процесса адаптации растений к нестерильным условиям, благодаря чему при высадке пробирочных растений в торфоперегнойные горшочки практически отсутствует их гибель и выход растений составляет 99,0-100%.

Большое значение имеет правильно подобранная концентрация препарата, так как помимо стимулирующего эффекта может наблюдаться и ингибирование, чрезмерное развитие ризогенной зоны, тормозящее развитие побегов и образование листьев, что ведет к снижению коэффициента размножения.

Таким образом, установлено положительное влияние эмистима на повышение приживаемости меристем на этапе ввода, повышение регенерационной способности их на этапе собственно микроразмножения, улучшение ризогенеза, стимулирование роста растений на этапе микрочеренкования. В связи с тем, что оздоровление от вирусов происходит при изолировании апикальных меристем размером 0,1-0,2 мм, а регенерационная способность таких меристем очень низкая (не более 10,0%), улучшение регенерационной способности меристем, выхода и качественных характеристик оздоровленных растений способствует повышению эффективности клонального микроразмножения винограда.

Литература

1.Абрашева. П. Краткие сведения о физиологическом воздействии вирусных болезней на рост и плодоношение виноградной лозы//Физиология винограда и основы его возделывания. Т.2,София.1983. С.227-236.

2.. Barlass. M. and Skene, K. G. M. Clonal propogation through tissue culture. Austral Grapegrower and Winemaker. 1979. 16 / 191 p. 12 – 13

3. Monette P. L. Use of grapevine shoot tip cultures for detection of fanleak virus by enzyme – linked, immunosorbent – assay // Canadion Journal of Plant Science. 1985. 65. pp 977 – 980 .

4.Дорошенко Н.П. Биотехнологические методы формирования банка оздоровленных растений и сохранения генофонда винограда *in vitro*/. Дорошенко Н.П., Соболев А.А /Современные достижения биотехнологии в виноградарстве и других

отраслях сельского хозяйства — Материалы конференции, — Новочеркасск, 2005, — с.23-32.

5. Лохматова И.Т. Индукция устойчивости растений к вирусам биологически активными веществами (иммунизация). // Сельскохозяйственная биология. 1992. 3. С. 13-21.

6. Озерцовская О.Л. Индуцирование устойчивости растений биогенными элементами фитопатогенов. (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 1994. 30. С. 25-32.

7. Озерцовская О.Л. Индуктор устойчивости пасленовых к возбудителям вирусных болезней. / Трофимец Л. Н., Озерцовская О.Л. и др. 1997. Патент №2072779.

8. Кульнев А. И Многоцелевые стимуляторы защитных реакций роста и развития растений. / Кульнев А. И., Соколова Е. А. 1997. Пущино.

9. Пономаренко С.П. Определение типа физиологической активности эмистина с использованием специфических биотестов /. Пономаренко С.П., Гашников З.Г. // Аграрная Россия. 1999. №1 (2). С. 15-16.