

УДК 634.8.037: 581.143.6

UDC 634.8.037: 581.143.6

06.01.01 – Общее земледелие, растениеводство  
(сельскохозяйственные науки)

06.01.01 - General agriculture, crop production  
(agricultural sciences)

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ОЗДОРОВЛЕНИЯ И  
СОХРАНЕНИЯ АБОРИГЕННЫХ ДОНСКИХ  
СОРТОВ ВИНОГРАДА**

**BIOTECHNOLOGY OF IMPROVEMENT AND  
PRESERVATION OF NATIVE DON GRAPE  
VARIETIES**

Дорошенко Наталья Петровна  
д.с.-х.н., профессор, гл. научн. сотр. лаб.  
биотехнологии  
РИНЦ SPIN-code:2788-1692  
[n.doroschenko2013@yandex.ru](mailto:n.doroschenko2013@yandex.ru)

Doroshenko Natalia Petrovna  
Dr.Sci.Agr., Professor, chief scientist of the  
laboratory of biotechnology  
RSCI SPIN - code 2788-1692  
[n.doroschenko2013@yandex.ru](mailto:n.doroschenko2013@yandex.ru)

Ребров Антон Николаевич  
к.б.н., зав.лаб. биотехнологии  
РИНЦ SPIN-код: 6907-4123  
[rebrov\\_anton@mail.ru](mailto:rebrov_anton@mail.ru)  
*ФГБНУ Всероссийский НИИ виноградарства и  
виноделия им. Я.И. Потопенко филиал ФРАНЦ  
«Федеральный Ростовский аграрный научный  
центр»3346421, Ростовская область, г.  
Новочеркасск, пр. Баклановский, 16б*

Rebrov Anton Nikolaevich  
Candidate of agricultural sciences, head of  
biotechnology laboratory  
RSCI SPIN - code: 6907-4123  
[rebrov\\_anton@mail.ru](mailto:rebrov_anton@mail.ru)  
*FSBSI All-Russian Research Institute of Viticulture  
and Winemaking named after Y.I. Potapenko branch  
of the Federal Rostov Agricultural Research Center  
Novocherkassk, Russia*

Трошин Леонид Петрович  
д.б.н., профессор  
РИНЦ SPIN-код: 3386-2768  
[lpTROSHIN@mail.ru](mailto:lpTROSHIN@mail.ru)  
*Кубанский государственный аграрный  
университет, Краснодар, Россия*

Troshin Leonid Petrovich  
Doctor of biological sciences, Professor  
RSCI SPIN - code: 3386-2768  
[lpTROSHIN@mail.ru](mailto:lpTROSHIN@mail.ru)  
*Kuban State Agricultural University, Krasnodar,  
Russia*

В статье приведены результаты микрклонального размножения и оздоровления аборигенных сортов винограда, создания базисных маточников. Дополнительно к культуре апикальных меристем разработана хемотерапия с применением салициловой кислоты. Разработан способ деконтаминации растений от микоплазменной инфекции, который включает введение в питательную среду антибиотика Цефотаксим в концентрации от 50 до 450 мг/л в зависимости от степени инфицирования маточных растений. Добавление в состав питательной среды препарата Эмистим снижает гибель меристем от инфекции в 3-5 раз, улучшает их дифференциацию. Применение препарата Мелафен способствует улучшению морфогенеза и качественных характеристик растений. Отмечена высокая приживаемость мериклонов во время адаптации к нестерильным условиям. Биологическое тестирование на травянистых индикаторах показало отсутствие хронических заболеваний. Растения после адаптации к нестерильным условиям высажены, в виде вегетирующих саженцев с закрытой корневой системой, на базисном маточнике. Приживаемость растений составила 70-80%, у некоторых сортов она выше: 96,4% (Сыпун черный) - 98,6 % (Крестовский). Доказано, что

The article presents the results of microclonal reproduction and recovery of native grape varieties, the creation of basic nursery. In addition to the culture of apical meristems, we have developed a chemotherapy using salicylic acid. A method of decontamination of plants from mycoplasma infection has also been developed, which includes the introduction of the antibiotic Cefotaxim in the nutrient environment at a concentration of 50 to 450 mg/L, depending on the degree of infection of plants. Adding to the nutrient medium of the drug Emistim reduces the death of meristems from infection by 3-5 times, improves their differentiation. The use of the drug Melafen helps to improve morphogenesis and quality characteristics of plants. The high survival rate of meristems during adaptation to non-sterile conditions has been noted. Biological testing on herbaceous indicators showed no chronic diseases. Plants after adapting to non-sterile conditions are planted, in the form of vegetative seedlings with a closed rootsystem, on the basic nursery. The survival rate of plants was 70-80%, in some varieties it is higher: 96.4% (Sypun black) - 98.6% (Krestovsky). It has been proved that in vitro clonal microbreeding there is no change at the genetic level even after 8 years of cultivation, which confirms the reliability of the developed technology of reproduction and recovery of native grape varieties in vitro

при клональном микроразмножении растений *in vitro* не происходит изменений на генетическом уровне даже через 8 лет культивирования, что подтверждает надежность разработанной технологии размножения и оздоровления аборигенных сортов винограда *in vitro*

Ключевые слова: АБОРИГЕННЫЕ ДОНСКИЕ СОРТА ВИНОГРАДА, *IN VITRO*, ХЕМОТЕРАПИЯ, ЭМИСТИМ, МЕЛАФЕН, АДАПТАЦИЯ, МАТОЧНИК

Keywords: ABORIGINE DON'S VARIETIES, IN VITRO, HEMOTHERAPY, EMISTEM, MELAFEN, ADAPTATION, NURSERY

DOI: <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-154-031>

## Введение

Производство высококачественных и уникальных вин, прославивших виноградарство и виноделие Дона [1], связано с использованием аборигенных донских сортов винограда. Это известные всему миру красные вина высочайшего качества из урожая сортов Красностоп золотовский, Цимлянский черный, Плечистик, донские белые вина из урожая сортов Сибирьковый, Кумшацкий белый, Пухляковский и др. В настоящее время их площади значительно сократились, и возникла необходимость закладки новых насаждений этих ценных сортов винограда для высококачественного виноделия. Многие аборигенные донские сорта винограда представляют значительную ценность для использования в селекционной работе [2]. Их необходимо также сохранить для поддержания генетического разнообразия. Перспективные аборигенные сорта винограда до сих пор являются большим нераскрытым потенциалом производства ценной продукции виноградовинодельческой отрасли нашей страны [3]. Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ*, все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов.

Максимальная продуктивность растений может быть достигнута при отсутствии заражения их наиболее опасными вирусами, фитоплазмами, грибными, бактериальными болезнями, нематодами и

другими вредителями. Вирусным инфекциям подвержены практически все виды растений, постоянный экономический ущерб они наносят и виноградным насаждениям.

Основным методом получения безвирусного посадочного материала является культура апикальных меристем. Использование метода культуры апикальных меристем для оздоровления растений от вирусной инфекции основано на принципе отсутствия вирусных частиц в верхушке роста растений. В 1952 году Морель и Мартен [4] установили, что эффективные результаты дает культивирование меристематических верхушек в асептических условиях на искусственных средах. Авторы установили, что вирус не может существовать в клетках меристемы.

Вскоре, начиная с 50-х годов XX века, были предприняты первые успешные опыты по получению свободных от вирусов растений из точки роста [5]. С тех пор техника оздоровления растений, основанная на выделении апикальных меристем, стала интенсивно совершенствоваться.

Теоретически концепции, положенные в основу этого метода, стали уточняться в последнее время. Авторы метода Morel и Martin [4] полагали, что в больном растении вирус распространяется с отставанием от быстро растущих молодых органов, особенно в молодых недифференцированных тканях, где концентрация вируса может снижаться вплоть до полного отсутствия.

В настоящее время применение электронной микроскопии часто обнаруживает наличие вирусов в меристеме пораженных ими растений. Особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса путем быстрого транспортирования по проводящей системе, но допускает возможность медленного распространения через плазмодесмы, соединяющие меристематические клетки.

Таким образом, возможно присутствие вирусов в точке роста зараженного растения и репродукция их в меристематических тканях.

Доказательством являются исследования, выполненные в Никитском ботаническом саду [6], подтвердившие наличие вирусных частиц в апикальных и латеральных меристемах сильно пораженного вирусами сорта цимбидиума и растений гвоздики, пораженных вирусом крапчатости (CarMV).

Исходя из этого, значительный интерес в освобождении растений от вирусов представляет использование культуры апикальных меристем в сочетании с хемотерапией. Сочетая культуру верхушечных меристем с хемотерапией, можно повысить эффект оздоровления от вирусов и коэффициент размножения оздоровленных растений.

**Цель исследований** — разработать методы оздоровления аборигенных донских сортов винограда от хронических заболеваний, размножить и сохранить оздоровленные растения в коллекции *in vitro* и на базисном маточнике.

**Предметом исследования** являлись аборигенные донские сорта винограда: Варюшкин, Красностоп золотовский, Крестовский, Кукановский, Кумшацкий. Пухляковский, Сибирьковский, Сыпун черный, Цимладар, Цимлянский белый и Цимлянский черный (два клона).

### **Материалы и методы**

Исследования проводились по общепринятым в биотехнологии методикам Ф. Р. Уайт, 1949 [7], Бутенко Р.Г., 1964 [8]; Голодрига П. Я. и др., 1986 [9], Дорошенко Н.П., 1992 [10] в стационарных лабораторных условиях и на созданном базисном маточнике. За основу нами взят способ оздоровления растений при помощи культуры апикальных меристем при относительно размере эксплантов 0,1–0,2 мм, в сочетании с хемотерапией, проводимой салициловой кислотой и с антибактериальной хемотерапией, основанной на применении антибиотика Цефотаксим. Кроме этого, в изучение были включены ФАВ Эмистим и Мелафен.

**Салициловая кислота**, которую некоторые авторы относят к новому классу фитогормонов [11, 12], способна поддерживать целостность мембранных структур клеток при воздействии стрессовых факторов. Доказано [13], что в присутствии салициловой кислоты происходит ингибирование распространения вируса ВТМ, одной из причин которого является снижение проводимости плазмодесм и межклеточного транспорта вируса. М.Т. Упадышев, А.Д. Петрова [14], в процессе хемотерапии выявили антивирусную активность салициловой кислоты в отношении вирусов различной природы у ягодных и плодовых культур. Показано положительное влияние салициловой кислоты при клональном микроразмножении подвойных сортов винограда [15].

**Цефотаксим** является полусинтетическим аналогом цефалоспорины – антибиотика третьего поколения. Цефалоспорины выделяются грибами рода *Cephalosporum*. основной продуцент этого антибиотика – гриб вида *S. acremonium*. По химическому строению антибиотик принадлежит к группе лактамных соединений, близких к пенициллинам. Биологическая активность Цефотаксима связана с образованием при его разложении стимуляторов роста и морфогенеза [16].

Препарат **Эмистим** имеет широкий спектр действия. Он обладает слабой гибберелловой и цитокининовой активностью [17], положительно влияет на процессы роста и развития растений, снижает влияние неблагоприятных и стрессовых факторов, активизирует защитные механизмы против многих патогенов [18], является индуктором устойчивости к вирусным болезням [19].

**Мелафен** создан в институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦРАН, представляет собой меламиновую соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты. Мелафен обладает высокой полифункциональной физиологической активностью в низких концентрациях, рекомендован в качестве регулятора роста растений,

отвечающего современным требованиям технологий для испытания на ведущих сельскохозяйственных культурах [20]. Известно применение Мелафена в биотехнологии [21, 22, 23], а именно в способах получения алкалоидов при выращивании культуры клеток ткани, например, Раувольфии змеиной *Rauwolfia Serpentina* Benth.

Культивирование проводили в культуральной комнате при освещенности 2500 лк, температуре 25–27<sup>0</sup>С и фотопериоде 16 часов. Повторность каждого варианта трехкратная, в повторности 14 растений, в варианте 42 растения.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Салициловая кислота.** На этапе ввода в культуру *in vitro* сорта Красностоп золотовский под действием салициловой кислоты уменьшилась гибель меристем от инфекции: первый этап ввода завершило в 2,8 – 3,5 раза больше меристем, чем в контроле.

Улучшилось прохождение следующего этапа собственно микроразмножения, образование новых узлов и побегов. Наибольшее число побегов образовалось и было срезано для укоренения в варианте с концентрацией СК – 0,14 мг/л больше, чем в контроле в 2,6 раза. При повышении содержания СК в составе питательной среды на этапе ввода до 1,4 мг/л новообразование побегов снижается, но всё-таки остается выше, чем в контроле (табл. 1).

Таблица 1 - Продуктивная регенерация меристем при добавлении в состав питательной среды салициловой кислоты, Красностоп золотовский, 2006 г.

Варианты, мг/л	Завершили ввод %	Число образовавшихся побегов, шт. в пассаже								
		1	2	3	4	5	6	7	8	всего
Контроль	19,0	—	10	2	3	3	—	1	8	27
СК —0,14	47,6	3	12	4	17	9	7	6	11	69
СК —1,4	47,6	—	—	2	2	—	10	16	4	34

Салициловая кислота отрицательно повлияла на приживаемость меристем *сорта Крестовский*. Из-за отсутствия развития и последующего некроза тканей погибло 39,2 % выделенных меристем. Сохранившиеся меристемы развивались медленнее, чем в контроле. Пролиферация, образование побегов, коэффициент размножения, при введении её в питательную среду, также были намного ниже, чем в контроле (табл. 2).

Таблица 2 - Репаративная и продуктивная регенерация меристем сорта Крестовский при добавлении в питательную среду салициловой кислоты и Цефотаксима, 2009 г.

Варианты	Приживаемость меристем, %	Срезано побегов в пассаже, штук					
		1	2	3	4	5	всего
Контроль	92,9	11	11	1	1	15	39
СК —1,4	82,1	1	3	3	1	0	8
ЦФ — 200	70,6	16	23	0	7	8	54

Под действием салициловой кислоты произошло уменьшение растений со скрученными шиповатыми листьями и с тонкими корнями, то есть происходит оздоровление растений, дополняющее оздоровление апикальными меристемами.

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 способствовала улучшению качественных характеристик растений сорта Крестовский, регенерированных из меристем.

Следовательно, 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.

**Цефотаксим** в концентрациях 200, 300, 400, 500, 600 мг/л изучен на аборигенных сортах винограда Красностоп золотовский и Крестовский. При добавлении в состав питательной среды Цефотаксим способствовал повышению регенерационной способности растений сорта Красностоп золотовский. При культивировании выделился вариант с концентрацией 200 мг/л, в котором отмечена самая высокая приживаемость растений – 90,4% и увеличение скорости роста, высоты и облиственности растений. Достаточно высокие показатели ростовых процессов надземной части растений зафиксированы и при концентрациях Цефотаксима 400 и 600 мг/л.

Таблица 3 - Влияние антибиотика Цефотаксим на ростовые процессы сорта Красностоп золотовский, 2009 г.

Вариант, мг/л	Прижи- ваемость, %	Корни			Высота расте- ний, см	Число листьев, шт.	Скорость роста, см/сутки
		число, шт.	длина, см	ризоген. зона, см			
Учет через 37 дней культивирования							
Контроль	85,7	5,9	3,2	18,9	5,7	4,2	0,15
Цф - 200	<b>90,4</b>	4,6	3,6	16,6	<b>6,4</b>	<b>5,2</b>	<b>0,17</b>
Цф - 400	71,4	4,6	3,3	15,1	<b>6,3</b>	<b>5,3</b>	<b>0,17</b>
Цф - 600	73,8	3,6	3,6	13,0	<b>6,2</b>	<b>5,0</b>	<b>0,16</b>
Учет через 65 дней культивирования							
Контроль	52,3	5,6	4,1	23,0	14,3	10,3	0,22
Цф - 200	<b>76,1</b>	5,2	4,4	22,9	14,3	10,1	0,22
Цф - 400	<b>61,9</b>	5,2	4,4	22,9	<b>15,5</b>	<b>10,5</b>	<b>0,24</b>
Цф - 600	<b>71,4</b>	4,7	4,3	20,2	13,7	10,1	0,21

Анализ полученных данных показывает, что под действием антибиотика Цефотаксим снижается заражение растений бактериальной



инфекцией, что выражается в улучшении приживаемости микрочеренков и регенерации из них растений. При слабом инфицировании растений применение антибиотика улучшает регенерацию на 5,0–15,0 % по сравнению с контролем (Красностоп золотовский, Крестовский). В данном случае эффективны низкие концентрации Цефотаксима 50–250 мг/л. При заражении от 15,0 до 50,0% растений (Крестовский) эффективность применения Цефотаксима возрастает: приживаемость микрочеренков увеличивается по сравнению с контролем на 35,0–45,0%. При этом эффективны концентрации 250–450 мг/л.

**Изучение антибиотика Цефотаксим и салициловой кислоты на этапе оздоровления и ввода в культуру аборигенного донского сорта Крестовский.** Следует отметить, что в коллекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко остался единственный куст этого сорта. Куст имел признаки короткоузлия и был заражен бактериальным раком.

При учете, проведенном через 20 дней после выделения меристем, отмечено их интенсивное развитие в контроле и в варианте с Цефотаксимом, слабое развитие меристем наблюдалось в варианте с салициловой кислотой (табл. 4).

Интенсивное развитие меристем продолжалось во всех вариантах опыта в следующие десять дней. Интенсивно развивались меристемы второго варианта, на эту дату учета уже можно было пересадить 21 меристему, у которых началось разворачивание листьев. Положительным является тот факт, что тронулись в рост отстающие, мелкие меристемы.

Приведенные данные (табл. 4) указывают на то, что салициловая кислота и Цефотаксим оказали отрицательное влияние на приживаемость меристем, гибель которых во время культивирования произошла из-за отсутствия развития и последующего некроза тканей. Салициловая кислота, кроме этого, отрицательно подействовала на пролиферацию и

образование побегов. По-видимому, это связано с высокой концентрацией её в опыте.

Таблица 4 - Состояние меристем в опыте с изучением Цефотаксима и салициловой кислоты, сорт Крестовский, 2009 г.

Варианты, мг/л	Состояние меристем, шт.						К высадке
	гибель	ОР	мелкие до1 мм	средние 1-3мм	крупные больше 3 мм	разверты- вание листьев	
Учет через 20 дней после изолирования							
Контроль	1	—	8	4	15	—	15
СК — 1,4	—	11	5	9	3	—	3
ЦФ— 200	1	5	2	6	14	—	14
Учет через 30 дней после изолирования							
Контроль	1	—	2	3	—	7	7
СК — 1,4	1	—	7	4	4	9	9
ЦФ— 200	4	—	4	1	—	5	5

Антибиотик Цефотаксим положительное повлиял на пролиферацию и образование побегов (табл. 5).

Таблица 5 – Репаративная и продуктивная регенерация меристем сорта Крестовский при добавлении в питательную среду салициловой кислоты и цефотаксима, 2009 г.

Варианты	Прижива- емость меристем, %	Срезано побегов в пассаже, штук					
		1	2	3	4	5	всего
Контроль	92,9	11	11	1	1	15	39
СК —1,4	82,1	1	3	3	1	0	8
ЦФ — 200	70,6	16	23	0	7	8	54

На основании проведенных исследований разработан способ деконтаминации растений от микоплазменной инфекции при микроразмножении, который включает добавление в питательную среду антибиотика цефотаксим в концентрации от 50 до 450 мг/л в зависимости от степени инфицирования пробирочных растений.

Применение препарата **Эмистим** на этапе ввода меристем в культуру *in vitro* имеет особое значение. Меристемы, выделенные и высаженные на

питательную среду, нуждаются в защите от стресса, в стимуляции клеточного деления для их роста и усиления пролиферации на следующем этапе собственно микроразмножения. 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.

Выявлено, что адаптационные способности к условиям *in vitro* у аборигенных сортов существенно различаются. Следует отметить высокую пластичность сортов Цимлянский черный и Цимлянский белый. При вводе в культуру *in vitro* сортов Красностоп золотовский, Кумшацкий белый, Сибирьковский их культивирование было затруднено.

Добавление в состав питательной среды препарата Эмистим способствовало улучшению регенерации меристем: увеличивался их размер и ускорялась дифференциация. Лучшей концентрацией по этим показателям для сортов Красностоп золотовский и Сибирьковский явилась  $10^{-12}\%$ , а для сорта Кумшацкий —  $10^{-8}$ .

Без добавления в состав питательной среды препарата Эмистим прохождение этапа ввода ухудшается. Большое число меристем погибает от инфекции и из-за отсутствия развития. Это видно на примере клонов сорта Цимлянский черный. К прохождению следующего этапа приступило у клона 1-1-61-10-3 — 39,0 % у клона 1-3-13-2-3 — 50,0 % выделенных меристем. Таким образом, положительное влияние препарата выражалась в снижении гибели меристем от инфекции в 3–5 раз, увеличении ростовых характеристик по сравнению с контролем в 2,2 раза, ускорении перехода ко второму этапу ввода.

Не менее ответственным является следующий этап — этап собственно микроразмножения, от которого зависит успех ускоренного размножения. На этом этапе сказывается влияние предшествующих

условий культивирования. Применение препарата Эмистим улучшает репаративную и продуктивную регенерацию изолированных апексов.

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. 6).

Таблица 6 - Влияние Эмистима на продуктивную регенерацию аборигенных сортов винограда, 2007-2009 гг.

Сорт	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

Основной показатель результативности 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.

**Мелафен** исследовали на этапе микроразмножения сортов Цимладар, Пухляковский и Варюшкин. Для этого отбирали растения винограда, регенерированные из апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм и размноженные в культуре *in vitro*.

Получены четкие данные о положительном влиянии препарата Мелафен на клональное микроразмножение винограда сорта Цимладар (табл. 7). 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 7 - Результаты изучения регулятора роста Мелафен при клональном микроразмножении сорта винограда Цимладар, 2013-2014 г.

Концентрации Мелафена	Прижив. %	Корни			Высота, см	Листьев, шт.	Скор. см/сут.
		число, шт	длина, см	ризог. зона, см			
Учет через 23 дня после посадки							
0,0	96,4	3,0	3,0	9,0	2,7	3,0	0,12
$10^{-5}$	78,6	3,3	2,6	8,4	2,9	3,0	0,13
$10^{-7}$	<b>100,0</b>	<b>4,6</b>	<b>5,9</b>	<b>27,4</b>	<b>4,4</b>	<b>4,3</b>	<b>0,19</b>
$10^{-9}$	<b>100,0</b>	<b>4,3</b>	<b>3,6</b>	<b>15,2</b>	<b>4,3</b>	<b>3,8</b>	<b>0,19</b>
$10^{-11}$	<b>100,0</b>	<b>3,1</b>	<b>3,6</b>	<b>11,1</b>	<b>4,3</b>	<b>3,8</b>	<b>0,19</b>
Учет через 48 дней после посадки							
0,0	92,9	4,9	4,2	20,3	8,9	7,2	0,19
$10^{-5}$	71,4	4,2	4,7	19,7	<b>9,2</b>	7,8	0,19
$10^{-7}$	<b>100,0</b>	<b>5,5</b>	<b>5,8</b>	<b>31,9</b>	<b>10,6</b>	<b>8,9</b>	<b>0,22</b>
$10^{-9}$	<b>100,0</b>	4,6	5,5	<b>25,6</b>	<b>10,5</b>	<b>9,0</b>	<b>0,22</b>
$10^{-11}$	<b>100,0</b>	4,4	4,2	18,5	<b>10,0</b>	<b>9,7</b>	<b>0,20</b>

Результаты учета, проведенного через 3 месяца культивирования на сорте Пухляковский, подтвердили положительное влияние препарата Мелафен на ростовые процессы полученных мериклонов. При концентрации  $10^{-11}\%$ . отмечено увеличение длины и числа корней, ризогенной зоны, длины и веса побегов, числа листьев, что свидетельствует об эффективности указанной концентрации. Высокий коэффициент полярности указывает на преимущественное развитие корневой системы при этой концентрации.

У растений сорта Варюшкин через 20 дней культивирования отмечено увеличение длины корней и ризогенной зоны при всех

концентрациях, увеличение облиственности, числа корней и ризогенной зоны при концентрациях  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}\%$ , а также улучшение приживаемости по сравнению с контролем при концентрации  $10^{-9}\%$  через 54 дня культивирования.

Полученные результаты показывают, что применение препарата Мелафен в качестве регулятора роста способствует улучшению морфогенеза растений в культуре *in vitro* и повышению эффективности клонального микроразмножения винограда за счет улучшения скорости роста на первом и втором этапах культивирования и качественных характеристик растений.

Одним из наиболее узких этапов биотехнологии, как правило, называют адаптацию к нестерильным условиям. Это связано с тем, что механизмы регуляции водного обмена у пробирочных растений не приспособлены к жизни в окружающей среде. У выращиваемых *in vitro* растений устьица теряют свою способность закрываться, вследствие участия цитокининов и ауксинов в регуляции движения устьиц. Кроме этого, отсутствует либо слабо развит верхний эпикутикулярный слой эпидермиса, защищающий растения от потерь влаги (S. Koshuchova et al., 1989). При этом повышения приживаемости и улучшение темпов роста на этапе адаптации к нестерильным условиям можно добиться, только увязывая их с сортовой спецификой адаптируемых растений. Так, например, различные сорта, по нашим наблюдениям, по-разному реагируют на темпы снижения влажности воздуха, уровень освещенности, состав субстрата. Соблюдение минимальных требований сорта при адаптации к нестерильным условиям весьма способствует высокой приживаемости и нормальному развитию растений *post vitro* в дальнейшем.

Целью исследования на этом этапе являлось выявление особенности адаптации к нестерильным условиям аборигенных донских сортов

винограда, повышение их приживаемости и улучшение развития при переводе в нестерильные условия. Наблюдения за адаптацией к нестерильным условиям различных сортов винограда проводили в полупроизводственных условиях лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко в течение 10 лет.

Приживаемость во время адаптации к нестерильным условиям аборигенных донских сортов была вполне удовлетворительной и составляла в среднем 86 % (рис.).

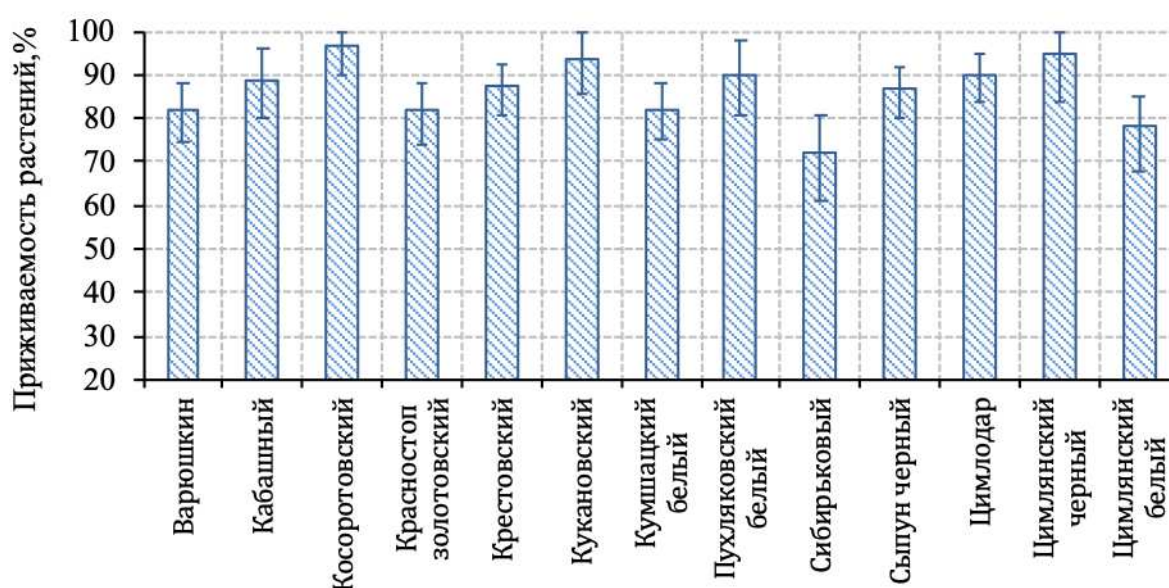


Рисунок - Приживаемость аборигенных донских сортов во время адаптации к нестерильным условиям *post vitro*, 2009-2017 гг.

Некоторые сорта значительно отличались друг от друга по уровню адаптивности к нестерильным условиям. Наилучшую приживаемость отмечали у сортов Косоротовский, Кукановский и Цимлянский черный, а наименьшую: Сибирьковский и Цимлянский белый. При этом их адаптивность, как показали наши предыдущие исследования, заметно повышалась при применении во время высадки иммуностимулирующих препаратов - лигногумата калийного, ризосферных микроорганизмов, а также при подборе наиболее подходящего субстрата.

Развитие аборигенных сортов на этапе адаптации в целом проходило удовлетворительно, но имелись отличия между различными сортами по темпам роста. Наиболее быстро развивались растения сортов: Сибирьковский, Косоротовский и Цимлянский белый, а медленнее: Пухляковский, Варюшкин, и Красностоп золотовский. Наибольшее число листьев было у сортов: Косоротовский, Сыпун черный, Сибирьковский и Цимлянский белый, а наименьшее у сортов: Кукановский, Варюшкин, Пухляковский и Крестовский.

Биологическое тестирование на травянистых индикаторах оказало отсутствие хронических заболеваний. Растения сортов Кабашный, Красностоп золотовский, Крестовский, Кумшацкий белый, Сибирьковский, Сыпун черный. Цимлянский белый, Цимлянский черный и два его клона: 1-3-13-2-3 и 1-1-61-10-3 после адаптации к нестерильным условиям были высажены, в виде вегетирующих саженцев с закрытой корневой системой, на базисном маточнике.

Приживаемость растений донских аборигенных сортов в условиях 2010 года на базисном маточнике составила 70–80 %, у некоторых сортов она была заметно выше: Сыпун черный - 96,4 %, Крестовский – 98,6 % (таблица 8).

Таблица 8 - Особенности развития маточных растений на базисном маточнике в течение первого года, 2010 г.

Сорт	Число побегов, шт.	Длина побега, см	Число узлов, шт	Площадь листьев,шт
Крестовский	1	36,6	12,9	—
Сыпун черный	1	43,1	13,3	26,5
Кумшацкий	1,3	34,6	12,2	19,2
Клон 1-1-61-10-3	<b>1,6</b>	33,6	12,3	<b>28,6</b>
Клон 1-3-13- 2-3	<b>1,6</b>	<b>60,3</b>	<b>17,0</b>	<b>29,7</b>
Кабашный	<b>1,6</b>	<b>51,8</b>	12,5	<b>40,9</b>

Как видно из представленных данных (табл. 9) развитие растений сорта Цимлянский черный на 4-й, -5-й и 6 годы в условиях песчаных почв



происходит с хорошим приростом и вызревaniem побегов.

Таблица 9 – Развитие растений сорта Цимлянский черный в условиях базисного маточника, 2009-2011 гг.

Возраст растений, лет	Побеги					Число листьев, шт.
	число, шт.	длина, см	вызревание		диаметр, см	
			см	%		
4 – 5	6,2	198,0	169,1	81,3	0,58	25,9
5 – 6	6,6	193,7	152,6	79,3	0,58	26,1

Параллельно все введенные в культуру и высаженные на маточнике сорта мы сохраняем в лабораторной коллекции *in vitro*, разрабатываем способы «минимализации» роста растений с тем, чтобы сократить число пересадок. При этом весьма важный вопрос сохранения, оздоровления и размножения ценных аборигенных донских сортов винограда при помощи методов биотехнологии не может быть решен полностью без учета генетической стабильности при культивировании *in vitro* (табл. 10).

Таблица 10 - Сравнение растений винограда после многолетнего культивирования *in vitro* с инициальными растениями по ДНК профилям

Сорт	Культивирование <i>in vitro</i> , лет	Аллели SSR-локусов, п.н.											
		VVS2		VVMD 7		VVMD 27		VVMD 5		VrZAG 62		VrZAG 79	
Сибирьковский	0	132	142	243	243	181	183	232	242	192	192	254	262
	8	132	142	243	243	181	183	232	242	192	192	254	262
Цимладар	0	136	144	243	249	191	198	242	246	192	206	254	254
	3	136	144	243	249	191	198	242	246	192	206	254	254
Кумшацкий белый	0	134	144	243	253	191	198	243	246	192	204	254	254
	7	134	144	243	253	191	198	243	246	192	204	254	254
Варюшкин	0	132	142	249	249	187	196	240	242	200	206	254	254
	4	132	142	249	249	187	196	240	242	200	206	254	254
Сыпун черный	0	142	144	243	251	196	196	236	250	198	208	252	260
	6	142	144	243	251	196	196	236	250	198	208	252	260
Красностоп золотовский	0	132	144	243	243	191	191	226	250	192	200	246	258
	7	132	144	243	243	191	191	226	250	192	200	246	258

Как показали наши совместные исследования с сотрудниками лаборатории селекции, сортоизучения и сохранения генофонда винограда

СКЗНИИСиВ [24, 25], у аборигенных донских сортов винограда *in vitro* не происходит изменений на генетическом уровне, даже через 8 лет культивирования.

Это подтверждает надежность применяемой в лаборатории технологии размножения и оздоровления *in vitro*. Созданная технологическая линия обеспечивает процесс регенерации растений «от меристемы к базисному маточнику», оздоровление, размножение и сохранение аборигенных донских сортов винограда.

### Литература

1. Алиев А.М., Кравченко Л.В., Наумова Л.Г. Происхождение донских сортов винограда [Текст] / А. М. Алиев, Л. В. Кравченко, Л. Г. Наумова // Виноделие и виноградарство. – 2005. - № 3. – С. 27-29.
2. Наумова Л.Г., Алиев А.М. Донские аборигенные сорта винограда [Текст] // Мобилизация и сохранение генетических ресурсов винограда, совершенствование методов селекционного процесса: сб. науч. ст. ГНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко Россельхозакадемии. - Новочеркасск: Изд-во ГНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, 2008. – С. 19-23.
3. Трошин Л.П. Аборигенные перспективные сорта винограда // Научный журнал КубГАУ, №56(02), 2010.
4. Morel G., Martin C., Guirisan de Dahlais atteints d'une mala a virus//Acad.Sci.- 1952.-235/21.
5. Galsy (Rose) Culture in vitro des apex de Vitis rupestris.C.R/ Acad.Sc. Paris, Serle D. 1972. 274.- PP. 210-213.
6. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова Н.П. Седошенко, Иванова Н.Н. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур // ISSN 0201-7997. Сборник научных трудов ГНБС, 2014. Том 138. — 5-57.
7. Уайт Ф.Р. Культура растительных тканей – М.: Иностранная литература, 1949. – 160 с.
8. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
9. Голодрига П.Я. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда. — Ялта: ВНИИВиПП «Магарач», 1986. — 56 с.
10. Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение и оздоровление посадочного материала винограда для создания из него сортовых маточников интенсивного типа (рекомендации) / Министерство сельского хозяйства и продовольствия РСФСР. – Москва, 1992.
11. Nayat, Q. Effect of exogenons salicylic acid under changing environment. A review/Q. Nayat, S. Nayat, M. Irfan, A. Ahmad / Environ.Exp.Bot. – 2010. – 68. – P.14-25.
12. Loake, G. Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists/G. Loake, M. Grant / Curr.Opin.Plant.Biol. – 2007. – 10. – P. 466 – 472

13. Красавина М.С., Малышенко И., Ралдигина Г.Н., Бурмистрова Н.А., Носов А.В. Может ли салициловая кислота влиять на межклеточный транспорт вируса табачной мозаики через изменение проводимости плазмодесм // Физиология растений. – 2002, том 49, № 1. – С. 71 – 77.

14. Хемотерапия вирусов плодовых и ягодных культур // М.Т. Упадышев, Ю.Н. Приходько, А.Д. Петрова. Л.В. Цубера, Н.Н.Мельникова, О.Ю. Суркова — Москва, 2009. — 71 с.

15. Дорошенко Н.П. Применение салициловой кислоты на этапе ввода в культуру *invitro* подвойных сортов винограда // Мобилизация и сохранение генетических ресурсов винограда, совершенствование методов селекционного процесса: Материалы межд. науч.-практ. конф. 13-14 августа 2008 г. - Новочеркасск, 2008. – С.162-167.

16. Данилова С.А., Долгих Ю.И. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима // Физиология растений. - 2004.- Т.51, - №4. - С.621-623.

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

18. Насырова Г.Ф., Беляева Н.В., Пономаренко С.П. Влияние эмистима на функционирование протонной помпы корневой системы кукурузы. / Элементы регуляций в растениеводстве. – Киев, 1998. - С. 41-46.

19. Рожнова Н. А., Геращенко Г.А., Янина М.М., Гилязетдинов Ш.Я. Эмистим индуктор устойчивости к вирусным болезням пасленовых. // Аграрная Россия. – 1999. - №1(2). - С.9-13.

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

21. Козлова Р.Ю., Винтер В.Г. Мелафен как регулятор синтеза фармацевтически ценных алкалоидов при биотехнологических способах их получения // Материалы Всероссийского семинара–совещания «Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста нового поколения Мелафен в сельском хозяйстве и биотехнологии». — Казань, 2006. - С. 102-114.

22. Загоскина Н.В. Алявина А.К., Гладышко Т.О. Возможность использования мелафена при культивировании клеток растений в условиях *invitro* // Материалы Всероссийского семинара – совещания «Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста нового поколения Мелафен в сельском хозяйстве и биотехнологии». — Казань, 2006. - С.114.-120.

23. Савина Т.А., Цыбулько Н.С. Применение мелафена для увеличения продуктивности клеточных культур *invitro* // Материалы Всероссийского семинара – совещания «Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста нового поколения Мелафен в сельском хозяйстве и биотехнологии». — Казань, 2006. - С. 138 – 143.

24. Ильницкая, Е.Т. Стабильность генотипов донских сортов винограда по SSR-локусам при культивировании *in vitro* / Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков, А.Н. Ребров // Виноделие и виноградарство, 2014. - № 2. - С. 24-26.

25. Ильницкая, Е.Т. Изучение стабильности генотипов сортов винограда при культивировании *invitro* на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов / Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков, А.Н. Ребров // Молекулярная диагностика. Сб. трудов. – Т. 2. – М.: ООО "Издательство МБА", 2014. – С. 418-419

### References

1. Aliev A.M., Kravchenko L.V., Naumova L.G. Proishozhdenie donskih sortov vinograda [Tekst] / A. M. Aliev, L. V. Kravchenko, L. G. Naumova // Vinodelie i vinogradarstvo. – 2005. - № 3. – S. 27-29.
2. Naumova L.G., Aliev A.M. Donskie aborigennye sorta vinograda [Tekst] // Mobilizacija i sohranenie geneticheskikh resursov vinograda, sovershenstvovanie metodov selekcionnogo processa: sb. nauch. st. GNU VNIIViV im. Ja.I. Potapenko Rossel'hozakkademii. - Novochoerkassk: Izd-vo GNU VNIIViV im. Ja.I. Potapenko, 2008. – S. 19-23.
3. Troshin L.P. Aborigennye perspektivnye sorta vinograda // Nauchnyj zhurnal KubGAU, №56(02), 2010.
4. Morel G., Martin C., Guirisan de Dahlais atteints d'une mala a virus, // Acad.Sci.-1952.-235/21.
5. Galsy (Rose) Culture in vitro des apex –de Vitis rupestris.C.R/ Acad.Sc. Paris, Serle D. 1972. 274.- PP. 210-213.
6. Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova N.P. Sedoshenko, Ivanova N.N. Primenenie biotekhnologicheskikh metodov v ozdorovlenii rastenij i razmnozhenii bezvirusnogo posadochnogo materiala perspektivnyh cvetochno-dekorativnyh kul'tur // ISSN 0201-7997. Sbornik nauchnyh trudov GNBS, 2014. Tom 138. — 5-57.
7. Uajt F.R. Kul'tura rastitel'nyh tkanej – M.: Inostrannaja literatura, 1949. – 160 s.
8. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannyh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij. – M.: Nauka, 1964. – 272 s.
9. Golodriga P.Ja. Metodicheskie rekomendacii po klonal'nomu mikrorazmnozheniju vinograda. — Jalta: VNIIViPP «Magarach», 1986. — 56 s.
10. Doroshenko N.P. Klonal'noe mikrorazmnozhenie i ozdorovlenie posadochnogo materiala vinograda dlja sozdaniya iz nego sortovyh matochnikov intensivnogo tipa (rekomendacii) / Ministerstvo sel'skogo hozjajstva i prodovol'stvija RSFSR. – Moskva, 1992.
11. Hayat, Q. Effect of exogenons salicylic acid under changing environment. A review/Q. Hayat, S. Hayat, M. Irfan, A. Ahmad / Environ.Exp.Bot. – 2010. – 68. – P.14-25.
12. Loake, G. Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists/G. Loake, M. Grant / Curr.Opin.Plant.Biol. – 2007. – 10. – P. 466 – 472
13. Krasavina M.S., Malysenko I., Raldigina G.N., Burmistrova N.A., Nosov A.V. Mozhet li salicilovaja kislota vlijat' na mezhkletochnyj transport virusa tabachnoj mozaiki cherez izmenenie provodimosti plazmodesm // Fiziologija rastenij. – 2002, tom 49, № 1. – S. 71 – 77.
14. Hemoterapija virusov plodovyh i jagodnyh kul'tur // M.T. Upadyshev, Ju.N. Prihod'ko, A.D. Petrova. L.V. Cubera, N.N.Mel'nikova, O.Ju. Surkova — Moskva, 2009. — 71 s.
15. Doroshenko N.P. Primenenie salicilovoj kisloty na jetape vvoda v kul'turu invitro podvojnnyh sortov vinograda // Mobilizacija i sohranenie geneticheskikh resursov vinograda, sovershenstvovanie metodov selekcionnogo processa: Materialy mezhd. nauch.-prakt. konf. 13-14 avgusta 2008 g. - Novochoerkassk, 2008. – S.162-167.
16. Danilova S.A., Dolgih Ju.I. Stimuljacija regeneracii rastenij v kul'ture tkanej kukuruzy pod dejstviem antibiotika cefotaksima // Fiziologija rastenij. - 2004.- T.51, - №4. - S.621-623.
17. Ponomarenko S.P., Gashnikov Z.G. Opredelenie tipa fiziologicheskoj aktivnosti jemistima s ispol'zovaniem specificheskikh biotestov // Agrarnaja Rossija. - 1999. - №1(2). - S. 15-16.

18. Nasyrova G.F., Beljaeva N.V., Ponomarenko S.P. Vlijanie jemistima na funkcionirovanie protonnoj pompy kornevoj sistemy kukuruzy. / Elementi reguljacij v roslinnictv. – Kiev, 1998. - S. 41-46.

19. Rozhnova N. A., Gerashhenkov G.A., Janina M.M., Giljazetdinov Sh.Ja. Jemistim induktor ustojchivosti k virusnym boleznyam paslenovyh. // Agrarnaja Rossija. – 1999. - №1(2). - S.9-13.

20. Fattahov S.G., Reznik V.S., Konovalov A.I. Melafen — perspektivnyj reguljator rosta rastenij dlja sel'skogo hozjajstva i biotehnologii // Materialy Vserossijskogo seminarasoveshhanija «Sostojanie issledovanij i perspektivy primenenija reguljatora rosta novogo pokolenii Melafen v sel'skom hozjajstve i biotehnologii». — Kazan', 2006. - S.3-12.

21. Kozlova R.Ju., Vinter V.G. Melafen kak reguljator sinteza farmacevticheski cennyh alkaloidov pri biotehnologicheskikh sposobah ih poluchenija // Materialy Vserossijskogo seminarasoveshhanija «Sostojanie issledovanij i perspektivy primenenija reguljatora rosta novogo pokolenii Melafen v sel'skom hozjajstve i biotehnologii». — Kazan', 2006. - S. 102-114.

22. Zagoskina N.V .Aljavina A.K., Gladyshko T.O. Vozmozhnost' ispol'zovanija melafena pri kul'tivirovanii kletok rastenij v uslovijah invitro // Materialy Vserossijskogo seminarasoveshhanija «Sostojanie issledovanij i perspektivy primenenija reguljatora rosta novogo pokolenii Melafen v sel'skom hozjajstve i biotehnologii». — Kazan', 2006. - S.114.-120.

23. Savina T.A., Cybul'ko N.S. Primenenie melafena dlja uvelichenija produktivnosti kletochnyh kul'tur invitro // Materialy Vserossijskogo seminarasoveshhanija «Sostojanie issledovanij i perspektivy primenenija reguljatora rosta novogo pokolenii Melafen v sel'skom hozjajstve i biotehnologii». — Kazan', 2006. - S. 138 – 143.

24. Il'nickaja, E.T. Stabil'nost' genotipov donskih sortov vinograda po ssr-lokusam pri kul'tivirovanii in vitro / E.T. Il'nickaja, S.V. Tokmakov, A.N. Rebrov // Vinodelie i vinogradarstvo, 2014. - № 2. - S. 24-26.

25. Il'nickaja, E.T. Izuchenie stabil'nosti genotipov sortov vinograda pri kul'tivirovanii invitro na osnove analiza polimorfizma mikrosatelitnyh lokusov / E.T. Il'nickaja, S.V. Tokmakov, A.N. Rebrov // Molekuljarnaja diagnostika. Sb.trudov. – T. 2. – M.: OOO "Izdatel'stvo MBA", 2014. – S. 418-419