

**ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА МЕЛАФЕН,
ПРИМЕНЯЕМОГО ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO,
НА АДАПТАЦИЮ К НЕСТЕРИЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ**

**INFLUENCE OF THE AFTER-ACTION OF THE PREPARATION
MELAFEN APPLIED AT IN VITRO CULTIVATION ON ADAPTATION
TO UNSTERILE CONDITIONS**

А.Н. Ребров, Л.Н. Семенова

A.N. Rebrov, L.N. Semenova

ФГБНУ «Всероссийский
научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия
имени Я.И. Потапенко»,
г. Новочеркасск, Россия,
E-mail: ruswine@yandex.ru

FSBSI «Ya.I. Potapenko All-Russian
Research Institute for Viticulture &
Winemaking»
Novocherkassk, Russia,
E-mail: ruswine@yandex.ru

Аннотация: Представлены результаты введения препарата нового поколения мелафен в питательную среду на последующую адаптацию оздоровленных *in vitro* растений винограда к нестерильным условиям. Установлено, что применение препарата мелафен на начальном этапе адаптации (30 дней), способствует улучшению показателей приживаемости и развития растений. В дальнейшем (через 60 дней), отмечено ослабление последействия препарата и выравнивание показателей развития.

Summary: Results of studying of influence of addition of medicine of new generation мелафен are presented to a medium on the subsequent adaptation of the revitalized *in vitro* of plants of grapes to unsterile conditions. It is established that use of medicine мелафен as a part of Wednesday, at microclonal manifolding, at the initial stage of adaptation (30 days), promotes improvement of indexes of survival of plants and parameters of their development. Further (in 60 days), noted weakening of influence of an after-action of medicine and alignment of indexes of development.

Ключевые слова: растения винограда *post vitro*, мелафен, адаптация к нестерильным условиям.

Keywords: plants of grapes *post vitro*, melafen, adaptation to unsterile conditions.

Введение. К перспективным физиологически активным веществам, влияющим на гормональную регуляцию и энергетический обмен в растительной клетке, в сверхмалых концентрациях ($10^{-7} \div 10^{-8}$) – можно отнести меламинам соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты. Доказано, что данное вещество способствует повышению интенсивности и эффективности фотосинтеза [1], ускоряет развитие растений и улучшает их подготовку к неблагоприятным зимним условиям [2]. Способствует оптимизации условий размножения винограда *in vitro* [3]. Большинство же исследований по изучению эффективности препарата мелафен в сельском хозяйстве проводили только на однолетних травянистых растениях. В связи с положительным влиянием мелафена на ростовые процессы винограда в культуре *in vitro* [3], а также с тем, что адаптивность пробирочных

растений, при пересадке в нестерильные условия, может в значительной степени зависеть от добавляемых при культивировании в питательные среды препаратов (антибиотиков, салициловой кислоты, сахарозы и т.д.), считаем, что изучение последствий препарата мелафен в нестерильных условиях является весьма актуальным.

Объекты и методы исследований. Объектом исследований служили оздоровленные пробирочные растения винограда аборигенных донских сортов Варюшкин, и Пухляковский. Применяли общепринятую при клональном микроразмножении *in vitro* плодовых и ягодных культур методику, модифицированную в лаборатории ВНИИВиВ [4]. Исследования проводили в условиях СУВР в 2013-2014 гг. Изучали степень влияния на адаптацию различных концентраций препарата мелафен, применяемого при микроклональном размножении. Количество растений на вариант опыта 42 шт. Дополнительные показатели адаптивности определяли по разработанной нами методике [5]. Доверительные интервалы для морфометрических параметров развития рассчитаны с 95% вероятностью, при помощи «пакета анализа» программы Excel. Доверительные интервалы по приживаемости рассчитаны по методике Уилсона [6] применяемой в работах по биологии, изложенной А.М. Гржабовским [7].

Результаты и обсуждение. Полученные данные по приживаемости (рис. 1) не выявили достоверных отличий между вариантами опыта на сорте Варюшкин. Однако необходимо указать на тенденцию улучшения приживаемости в варианте, где применяли концентрацию препарата 10^{-7} , которая проявилась и на сорте Пухляковском. В опыте с сортом Пухляковский приживаемость под действием мелафена улучшилась, наилучшее значение, достоверно подтверждаемое, было при концентрации - 10^{-7} . Морфологическое развитие у сортов несколько отличалось (табл. 1 и 2).

На сорте Варюшкин через 30 дней не было выявлено достоверных отличий по основным показателям развития. Лишь по дополнительным показателям проявились отличия по развитию (в баллах), где основным критерием оценки является рост после высадки в нестерильные условия и образование новых листьев, а также по числу корней в верхней части емкостей для выращивания.

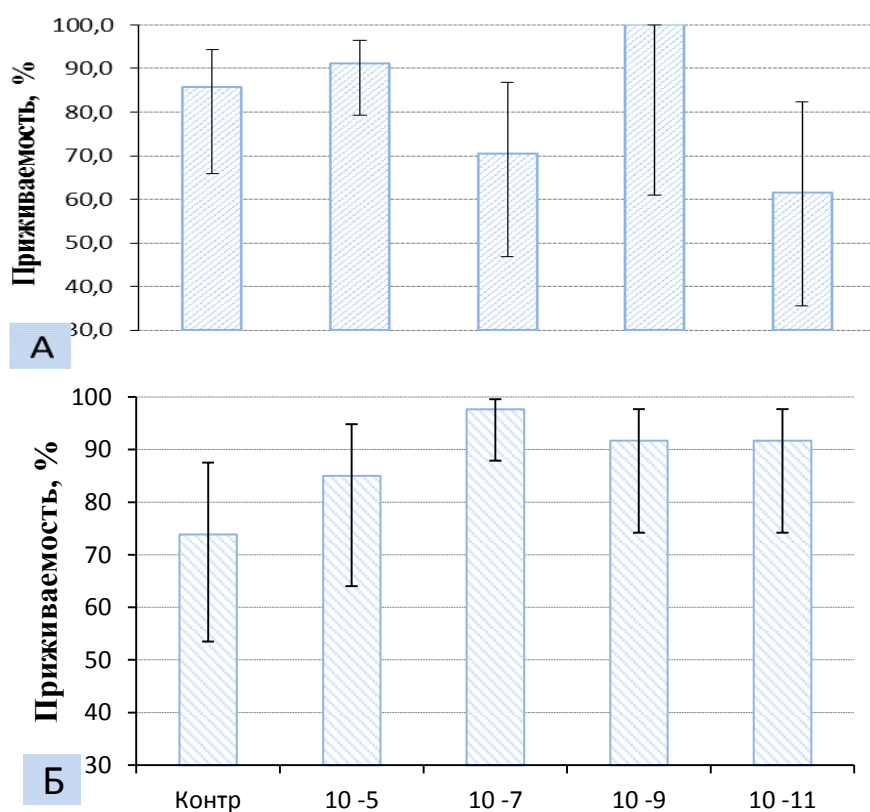


Рис. 1. Влияние мелафена добавляемого в питательную среду в предпоследнем пассаже, на приживаемость во время адаптации, сорта: А) Варюшкин; Б) Пухляковский белый

Таблица 1

Влияние последствия мелафена, на развитие растений в нестерильных условиях, 2013-2014 гг.

Концентрация мелафена в %	Высота растения, см	Число листьев, шт.	Длина междоузлия, шт.	Площадь, см ²	
				листа	листьев
сорт Варюшкин (через 30 дней)					
Контроль 0,0	10,4 ± 0,8	5,7 ± 0,6	1,4 ± 0,06	6,3 ± 0,7	36,9 ± 6,4
Мелафен 10 ⁻⁵	11,0 ± 1,0	5,5 ± 0,6	1,5 ± 0,09	5,8 ± 0,5	33,6 ± 4,8
Мелафен 10 ⁻⁷	10,8 ± 1,1	6,3 ± 0,6	1,5 ± 0,10	5,8 ± 0,7	36,9 ± 5,0
Мелафен 10 ⁻⁹	9,7 ± 0,5	5,2 ± 0,7	1,4 ± 0,09	5,4 ± 0,5	27,7 ± 3,7
Мелафен 10 ⁻¹¹	10,7 ± 0,7	5,6 ± 0,6	1,5 ± 0,05	6,1 ± 0,6	34,6 ± 4,9
сорт Варюшкин (через 60 дней)					
Контроль 0,0	14,4 ± 0,8	6,1 ± 0,3	1,7 ± 0,06	19,6 ± 1,3	132,6 ± 9,0
Мелафен 10 ⁻⁵	13,6 ± 0,9	5,8 ± 0,4	1,6 ± 0,08	16,5 ± 0,9*	104,8 ± 8,3*
Мелафен 10 ⁻⁷	12,6 ± 1,3	5,6 ± 0,5	1,6 ± 0,09	16,0 ± 1,8*	96,5 ± 12,1*
Мелафен 10 ⁻⁹	11,9 ± 0,6*	5,8 ± 0,8	1,5 ± 0,10	14,3 ± 1,7*	93,7 ± 17,3*
Мелафен 10 ⁻¹¹	12,8 ± 0,9	5,4 ± 0,8	1,7 ± 0,11	18,0 ± 3,5	101,9 ± 16,3*
сорт Пухляковский белый (через 30 дней)					
Контроль 0,0	8,0 ± 0,8	5,1 ± 0,8	1,1 ± 0,07	4,6 ± 0,5	23,6 ± 4,6
Мелафен 10 ⁻⁵	8,5 ± 0,8	5,6 ± 1,1	1,0 ± 0,05	4,2 ± 0,5	25,0 ± 6,6

Мелафен 10^{-7}	11,1 ±0,7*	8,0 ±1,0*	1,2 ±0,05	5,1 ±0,5	41,4 ±5,9*
Мелафен 10^{-9}	10,6 ±0,9*	7,5 ±1,1*	1,1 ±0,08	5,0 ±0,5	34,7 ±7,1
Мелафен 10^{-11}	10,3 ±1,0*	6,8 ±1,3	1,1 ±0,11	5,4 ±0,6	36,4 ±7,6*
сорт Пухляковский белый (через 60 дней)					
Контроль 0,0	11,39 ±1,17	6,24 ±0,45	1,14 ±0,07	33,4 ±4,9	216,3 ±42,0
Мелафен 10^{-5}	11,13 ±0,67	6,33 ±0,30	1,15 ±0,06	26,1 ±2,6	166,2 ±18,2
Мелафен 10^{-7}	13,36 ±0,62*	6,48 ±0,27	1,17 ±0,06	27,2 ±2,4	185,8 ±16,8
Мелофен 10^{-9}	13,32 ±0,93	5,50 ±0,61	1,15 ±0,07	25,4 ±3,7	142,7 ±41,4
Мелафен 10^{-11}	13,64 ±1,14	5,90 ±0,59	1,15 ±0,05	28,3 ±4,7	177,9 ±41,2

* - Здесь и далее означает, что различия между вариантом опыта и контролем существенны с вероятностью $\geq 95\%$.

Влияние мелафена на дополнительные параметры развития, 2013-2014 гг.

Концентрация мелафена в %	Адапти - вность, балл	Засохших листьев, шт.	Развитие, балл	Число корней на поверхности вазона, шт.		
				верх	середина	низ
сорт Варюшкин (через 30 дней)						
Контроль 0,0	4,1 ±0,5	2,3 ±0,5	3,4 ±0,5	0,4 ±0,2	1,5 ±0,4	0,8 ±0,3
Мелафен 10 ⁻⁵	4,3 ±0,3	3,1 ±0,5	3,8 ±0,3	0,6 ±0,3	1,9 ±0,5	0,4 ±0,2
Мелафен 10 ⁻⁷	4,4 ±0,5	2,7 ±0,6	3,7 ±0,5	0,8 ±0,3	2,7 ±0,6*	0,6 ±0,3
Мелафен 10 ⁻⁹	4,3 ±0,5	2,3 ±0,6	3,8 ±0,3	1,3 ±0,5*	2,5 ±0,8	0,7 ±0,4
Мелафен 10 ⁻¹¹	4,5 ±0,4	2,5 ±0,5	4,0 ±0,3*	0,8 ±0,5	2,9 ±0,6*	0,8 ±0,4
сорт Пухляковский белый (через 30 дней)						
Контроль 0,0	3,8 ±0,5	3,5 ±0,5	3,1 ±0,5	0,2 ±0,3	0,8 ±0,4	0,24 ±0,2
Мелафен 10 ⁻⁵	3,9 ±0,6	3,4 ±0,9	3,9 ±0,6	0,7 ±0,3	2,4 ±1,1	0,56 ±0,4
Мелафен 10 ⁻⁷	4,5 ±0,6	3,0 ±0,8	4,5 ±0,6*	1,4 ±0,3*	3,6 ±1,0*	1,03 ±0,4*
Мелафен 10 ⁻⁹	4,4 ±0,4	3,5 ±0,9	4,2 ±0,5*	1,8 ±0,6*	4,7 ±1,3*	1,19 ±0,4*
Мелафен 10 ⁻¹¹	4,3 ±0,5	4,0 ±0,9	4,3 ±0,6*	1,1 ±0,6*	3,5 ±1,5*	1,22 ±0,6*

В целом необходимо отметить лучшее развитие корневой системы в вариантах с мелафеном у обоих сортов (рис. 2).

При учете на 60 день, растения продолжали развиваться нормально, при этом площадь листовой поверхности была больше в контроле.

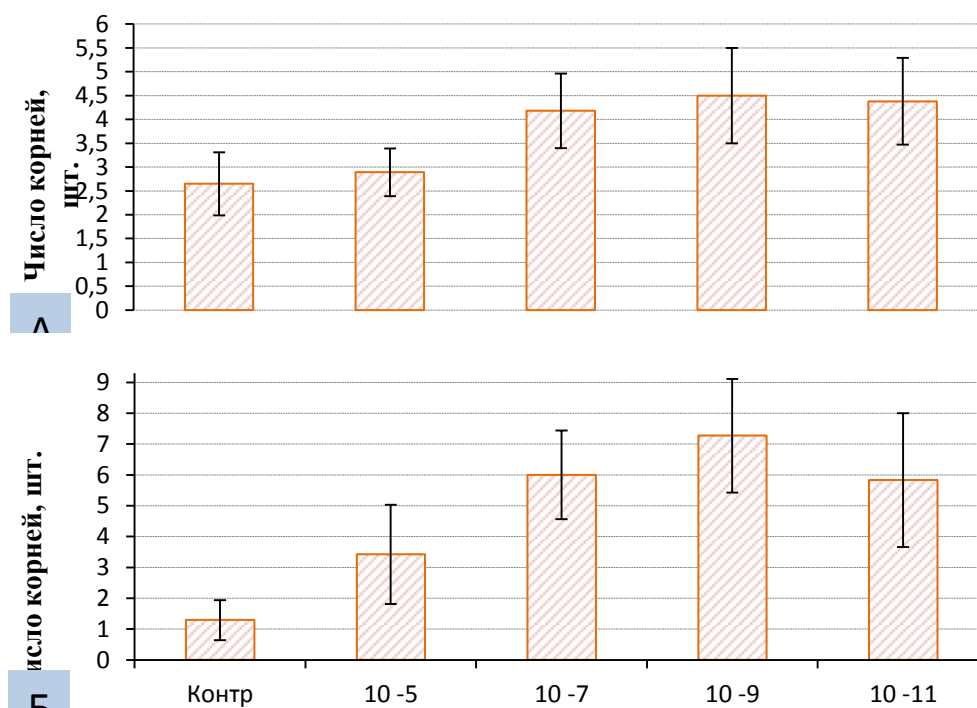


Рис. 2. Число корней наблюдаемых на стенках прозрачных пластиковых вазонов, через 30 дней после высадки на адаптацию, сорта: а) Варюшкин; б) Пухляковский белый, 2013-2014 гг.

На сорте Пухляковский рост растений на 30 день был лучше в вариантах с мелафеном - $10^{-7} \div 10^{-11}$. Эти варианты опережали контроль и по дополнительным показателям, таким как развитие (в баллах) и по числу корней (во всех слоях) наблюдаемых на прозрачных стенках вегетационных емкостей для выращивания. Кроме того, варианты с мелафеном - 10^{-7} и 10^{-9} опережали контроль, в этот период, по числу листьев, а варианты с концентрацией препарата - 10^{-7} и 10^{-11} были лучше по площади листьев.

При учете на 60 день разница между вариантами практически нивелировалась, при этом лучшим вариантом по росту был вариант, где применялся препарат в концентрации 10^{-7} .

Стоит отметить тенденцию увеличения площади листьев и облиственности в контроле и в варианте 10^{-5} , а также уменьшение числа листьев из-за засыхания и опадения в остальных вариантах. Это происходит преимущественно с нижними листьями, образовавшимися еще в пробирке. При этом лучшее развитие корневой системы в вариантах с мелафеном, по нашим наблюдениям, помогает на начальном этапе сохранить больше нижних листиков, а в дальнейшем, наоборот является причиной их отторжения растениями, как наиболее расходующих влагу. Причина этого в том, что большая часть нежных корней (в верхних слоях субстрата) в процессе доращивания отмирает из-за частого пересыхания и рыхления верхней части субстрата. Это не является критичным для развития растений, так как основная масса корней развивается в более нижних слоях, а листья отмирают те, которые развились еще при культивировании *in vitro*. Такие листья, как правило, после переноса в нестерильные условия не увеличиваются в размерах, а образующиеся новые листья, напротив, активно развиваются и увеличиваются в размерах. Так на 60 день адаптации, у растений винограда *post vitro*, около 80% составляют листья, образованные и развившиеся в нестерильных условиях. Площадь листьев к этому сроку значительно возрастает. Так на сорте Варюшкин, площадь одного листа, и общая площадь листьев, за этот период увеличилась в среднем в три раза, а на сорте Пухляковский этот показатель увеличился в шесть раз. При этом наиболее оптимальными концентрациями мелафена, по последствию на развитие растений при адаптации, были - $10^{-7} \div 10^{-9}$ %.

Выводы. Применение препарата мелафен, в составе питательной среды, при микроклональном размножении в концентрациях $10^{-7} \div 10^{-9}$ %, способствует улучшению приживаемости растений и их развитию на начальном этапе адаптации (30 дней). В дальнейшем (через 60 дней), происходит выравнивание показателей развития растений в сравнении с показателями развития растений в контроле.

Литература

1. Жигачева, И.В. Влияние фосфоорганического регулятора роста растений на транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий / И. В. Жигачева [и др.] // Доклады Академии наук. - 2009. - Т. 427, N 5, август. - С.693-695.
2. Жигачева, И.В. Антистрессовые свойства препарата мелафен / И.В. Жигачева [и др.] // Доклады Академии наук. - 2007. - Т. 414, N 2. - С. 263-265
3. Дорошенко, Н.П. Результаты исследований препарата «мелафен» в культуре винограда *in vitro*. / Н.П. Дорошенко / В сборнике: Мелафен: механизм действия и области применения Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Казань, 2014. С. 298-304.
4. Дорошенко, Н.П. Способ адаптации растений к нестерильным условиям / Н.П. Дорошенко, Л.В. Кравченко, А.Н. Ребров // Решение о выдаче патента на изобретение к заявке №2006113873/12(015078).
5. Ребров, А.Н. Метод определения потенциальной адаптивности растений винограда *in vitro* к нестерильным условиям среды / Ребров А.Н. / ФГБНУ ВНИИВиВ имени Я.И. Потопенко. – Новочеркасск: Изд-во ВНИИВиВ имени Я.И. Потопенко, 2014. – 34 с.
6. Wilson E.B. Probable inference, the Law of Succession, and statistical inference / E.B. Wilson // Journal of American Statistical Association. -1927. №22. – P.209-212
7. Гржабовский, А.М. Доверительные интервалы для частот и долей / А.М. Гржабовский // Экология человека – 2008. №5. – С.57-60.