

УДК 634.8.037:581.143.6

UDC 634.8.037:581.143.6

**ПРИМЕНЕНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ
КИСЛОТЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ПРЕАДАПТИВНОСТИ
ПРОБИРОЧНЫХ РАСТЕНИЙ
ВИНОГРАДА К УСЛОВИЯМ
IN VIVO**

**APPLICATION OF SALICYLIC
ACID FOR INCREASE
OF PRE ADAPTABILITY
OF TEST-TUBE'S GRAPES
PLANTS TO IN VIVO
CONDITIONS**

Ребров Антон Николаевич
канд. биол. наук

Rebrov Anton
Cand. Biol. Sci.

*Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия
имени Я.И. Потанина»,
Новочеркасск, Россия*

*Federal State Budgetary
Scientific Institution
«All-Russian Research Institute
of Viticulture and Winemaking
named after Ya.I. Potapenko»
Novocherkassk, Russia*

Цель настоящего исследования – изучение влияния салициловой кислоты, добавляемой в питательную среду, на адаптацию к нестерильным условиям растений винограда. Объектом исследований служили оздоровленные пробирочные растения винограда сортов Сибирьковский, Пино нуар и Мерло, высаживаемые в нестерильные условия после культивирования на питательных средах с различным уровнем содержания салициловой кислоты. Диапазон применяемых концентраций – от 0,14 до 14 мг/л питательной среды. При проведении исследований по адаптации к нестерильным условиям растений винограда применяли общепринятую при клональном микроразмножении *in vitro* плодовых и ягодных культур методику, модифицированную в лаборатории института. В процессе исследования установлено положительное влияние салициловой кислоты на приживаемость растений винограда, при переводе их в нестерильные условия, при этом часто отмечали торможение развития в вариантах, где применяли салициловую кислоту. Показано, что добавление салициловой кислоты в питательную среду повышает преадаптивность пробирочных растений

Objective of this research is study of influence of the salicylic acid added to a nutrient medium on adaptation to unsterile conditions of grapes plants. Object of research is the revitalized of test-tube's plants of grapes of Sibirskovy, Pino Noir and Merlots landed under the unsterile conditions after cultivation on nutrient mediums with various level of content of salicylic acid. The range of the applied concentration is 0,14 to 14 mg/l of a nutrient medium. When the research on adaptation to unsterile conditions of grapes plants are carrying out, the standard method of clonal microreproduction *in vitro*, applied for fruit and berry crops, and the technique modified in the laboratory of institute are used. During research the positive influence of salicylic acid in survival of grapes plants at their transfer to unsterile conditions is established, but the inhibition of development is often noted in the options where salicylic acid is applied. It is shown that addition of salicylic acid in a nutrient medium increase in preadaptability of the test-tube's of grapes plants to unsterile conditions. It is revealed in experiment

винограда к нестерильным условиям. Выявлено в эксперименте, что оптимальные концентрации препарата для разных сортов винограда могут отличаться. В наших опытах чаще всего наиболее эффективными были концентрации 0,14 и 0,7 мг/л. Такие концентрации, как правило, повышают приживаемость и не влияют заметно на темпы развития растений во время дорастивания. По результатам проведенных исследований установлены оптимальные концентрации салициловой кислоты в питательной среде, повышающие приживаемость растений винограда и не снижающие их ростовой активности по сравнению с контролем.

Ключевые слова: РАСТЕНИЯ ВИНОГРАДА IN VITRO, САЛИЦИЛОВАЯ КИСЛОТА, АДАПТАЦИЯ К НЕСТЕРИЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ

that optimal concentration of preparation for different grapes varieties can be differ. In our experiences the concentration of 0,14 and 0,7 mg/l were often the most effective. Such concentrations, as a rule, increase in survival ability and don't effect considerably on the rates of plants development during growing. As result of the carried out research the optimal concentration of salicylic acid in a nutrient medium which are increasing in acclimating of grapes plants and not reducing their growth activity in comparison with control.

Key words: IN VITRO GRAPES PLANTS, SALICYLIC ACID, ADAPTATION TO UNSTERILE CONDITIONS

Введение. На сегодняшний день наиболее перспективным и надежным методом оздоровления является метод выделения апикальных меристем, регенерации из них растений и дальнейшего их клонального микро-размножения в условиях стерильной культуры.

Метод основан на получении в условиях in vitro неполовым путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру. При этом процесс адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям некоторые авторы называют наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией. Это связано с тем, что при культивировании in vitro в условиях стерильности, высокой влажности воздуха и субстрата, экзогенного воздействия гормонов и получения углерода (в основном в виде сахаров) у растений формируется морфолого-анатомическое строение, не способное функционировать в естественной среде обитания [1]. В результате нарушения системы регуляции водного обмена такое растение может погибнуть уже через 5÷15 минут после попадания в естественные условия. Заметно повысить преадаптивность пробирочных растений к нестерильным условиям можно предварительно культивируя их на питательных средах, содержа-

щих вещества с иммуностимулирующей активностью, например фенолкарбоновые кислоты [2]. Одной из самых распространенных и доступных фенолкарбоновых кислот является салициловая, которую причисляют к стрессовым фитогормонам. Это хорошо известный, хотя и не универсальный индуктор синтеза защитных вторичных метаболитов в растениях [3].

Цель исследования – изучение влияния салициловой кислоты, добавляемой в питательную среду, на адаптацию к нестерильным условиям растений винограда.

Объекты и методы исследований. Объектом исследований служили оздоровленные пробирочные растения винограда сортов Сибирьковый, Пино нуар и Мерло, высаживаемые в нестерильные условия после культивирования на питательных средах с различным уровнем салициловой кислоты, диапазон концентраций от 0,14 до 14 мг/л среды. При проведении исследований по адаптации к нестерильным условиям применяли общепринятую при клональном микроразмножении *in vitro* плодовых и ягодных культур методику, модифицированную в лаборатории [4]. Исследования проводили в 2008-2010 гг. Влажность в индивидуальных камерах снижали, постепенно начиная с 10 сут. после высадки. Количество растений на вариант опыта 40, в 3-х кратной повторности. Измерение морфометрических показателей развития представлены на 2-й месяц после высадки в нестерильные условия. Статистическая обработка данных проведена при 95%-ном уровне доверительной вероятности по методике Б.А. Доспехова [5]. Доверительный интервал для морфометрических параметров развития рассчитан с 95% вероятностью при помощи программ «пакета анализа» программы Excel. Доверительный интервал по приживаемости рассчитан по методике Уилсона [6], изложенной А.М. Гржабовским [7].

Обсуждение результатов. Во время адаптации к нестерильным условиям приживаемость растений винограда сорта Сибирьковый, выросших на питательной среде с добавлением салициловой кислоты, по сравнению с

контролем была выше (рис.). Наибольшую разницу отмечали после учета на двадцатые сутки. Это объясняется тем, что этот момент, как правило, наиболее стрессовый для растений. Растения к этому моменту либо начинают приспосабливаться к новым условиям произрастания, либо погибают.

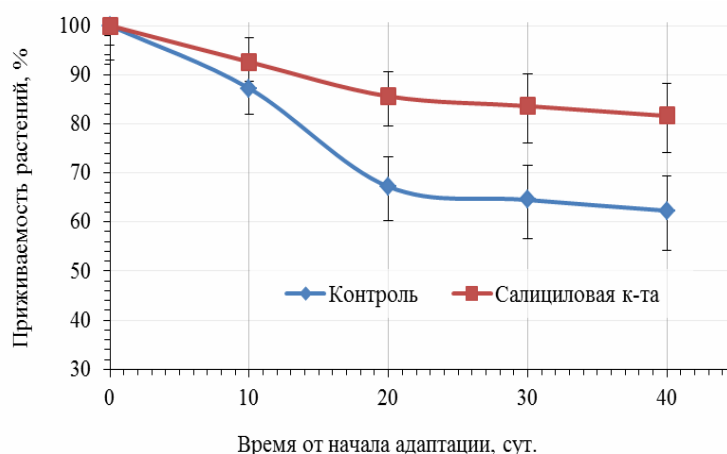


Рис. Влияние салициловой кислоты на приживаемость растений винограда во время адаптации к нестерильным условиям, сорт Сибирьковский

Отмечено, что применение салициловой кислоты способствовало увеличению у растений сорта Сибирьковский количества и общей площади листьев (табл. 1).

Таблица 1 - Влияние салициловой кислоты на адаптацию пробирочных растений к нестерильным условиям, сорт Сибирьковский, 2008-2009 гг.

Вариант	Приживаемость, %	Высота, см	Листья		
			число, шт.	площадь, см ²	
				средняя	общая
Контроль	54,0	20,1	9,0	27,7	249,3
Ск - 0,14 мг/л	75,0*	19,7	10,7*	26,5	283,6*
НСР _{0,95}	12,6	2,3	1,2	4,1	26,8

*Различия между вариантом опыта и контролем существенны с вероятностью $\geq 95\%$

Высота растений при этом имела тенденцию к снижению, однако достоверных отличий по данному показателю не установлено. Это, по нашему мнению, может быть объяснено тем, что при высадке растений на

адаптацию в варианте с салициловой кислотой они имели меньшие размеры, что и отмечали в наших предыдущих работах [8].

Увеличение числа и общей площади листьев косвенно подтверждает адаптивный эффект салициловой кислоты, так как наличие большего числа листьев связано с лучшей их адаптацией и меньшим увяданием, которое обычно отмечается во время снижения влажности воздуха. Вероятно, это происходит благодаря тому, что салициловая кислота повышает преадаптивность пробирочных растений винограда к нестерильным условиям среды. Однако, как показали наши исследования, данный эффект в сильной мере зависит от сорта, концентрации препарата, а возможно, и от других факторов. Так, например, испытывая широкий ряд концентраций на сорте Мерло, отмечена четкая тенденция снижения ростовых показателей во всех вариантах с салициловой кислотой (табл. 2). Стоит отметить, что при концентрации ее в питательной среде на уровне 0,7 мг/л и более, приживаемость повышалась, а площадь листьев была достоверно меньше.

Таблица 2 - Влияние последействия салициловой кислоты на адаптацию к нестерильным условиям среды, сорт Мерло, 2009-2010 гг.

Концентрация, Ск мг/л	Высота, см	Число листьев, шт.	Площадь, см ²		Приживаемость, % (доверительный интервал +до/-от)
			листа	листьев	
0,0	33,2±9,1	11,4±2,4	22,9±4,8	261,7±64,8	52,9 $\frac{+64,3}{-41,2}$
0,14	24,8±5,3	9,1±2,3	21,2±3,0	192,2±75,1	76,5* $\frac{+85,0}{-65,1}$
0,3	25,4±6,3	8,6±1,1	22,6±3,0	195,3±45,3	82,4* $\frac{+89,6}{-71,6}$
0,7	23,9±6,2	10,0±1,0	24,2±2,3	242,1±33,9	88,2* $\frac{+93,9}{-78,5}$

На сорте Пино нуар отмечена похожая тенденция, однако она все же имела и свои отличия (табл. 3). В диапазоне изучаемых концентраций не зафиксировано достоверного снижения изучаемых показателей развития, при этом во всех вариантах с салициловой кислотой отмечали повышение приживаемости. Отставание в развитии растений после применения сали-

салициловой кислоты отмечали в течение первых двух месяцев, в дальнейшем через 3-4 месяца показатели в разных вариантах выравнивались.

Таблица 3 - Влияние последействия салициловой кислоты на адаптацию к нестерильным условиям среды, сорт Пино нуар, 2009-2010 гг.

Концентрация салициловой кислоты, мг/л	Высота, см	Число листьев, шт.	Площадь, см		Приживаемость, % (доверительный интервал +до/-от)
			листа	листьев	
0,0	16,2±1,5	8,1±0,9	38,5±4,2	323,9±66,1	39,5 $\frac{+50,7}{-29,2}$
0,14	13,3±1,6	7,4±0,8	32,8±3,8	241,7±40,5	49,3 $\frac{+62,4}{-37,6}$
0,7	12,0±1,0*	7,6±0,7	30,1±4,0*	237,7±49,6	65,5* $\frac{+76,4}{-52,7}$
1,0	12,6±1,3*	6,8±0,6	26,0±3,3*	181,5±35,5*	66,7* $\frac{+77,8}{-53,4}$
1,4	13,8±4,0	7,6±1,5	20,2±4,8*	168,3±55,5*	58,8 $\frac{+73,6}{-42,2}$
3,5	13,6±1,9	7,4±1,4	19,7±3,0*	162,2±51,0*	76,5* $\frac{+87,6}{-60,0}$
7,0	12,4±1,6	8,1±1,0	19,7±4,1*	172,3±50,8*	82,4* $\frac{+91,7}{-66,5}$
14,0	13,1±0,9	8,0±0,9	20,0±3,4*	171,9±45,0*	88,2* $\frac{+95,3}{-73,4}$

Данный эффект от ее применения можно объяснить ингибирующими свойствами, которые часто отмечают исследователи, некоторые исследователи успешно используют это свойство салициловой кислоты для депонирования *in vitro* [9]. При этом замедление показателей роста в культуре *in vitro* в нашем случае (около 20%) способствовало получению более качественных растений с меньшей степенью витрификации.

Выводы. Установлено, что добавление салициловой кислоты повышает преадаптивность пробирочных растений винограда к нестерильным условиям среды. При этом оптимальные концентрации препарата для разных сортов могут отличаться, в нашем случае чаще всего наиболее эффективными были концентрации 0,14 и 0,7 мг/л. Такие концентрации, как пра-

вило, повышают приживаемость и не влияют заметно на темпы развития растений во время доращивания.

Литература

1. Koshuchova, S. Loss Function of guard cells in vitro-cultured plants and its restitution: avoidans of vitrification and improvement of acclimatizationcolloguia Pflanzenphysiologie "Stomala-89" / S. Koshuchova, K. Zoglauer, H. Goung // Humboldt – Universitatzu Berlin, 1989. №13. – P. 38-40.
2. Упадышев, М.Т. Салициловая кислота как регулятор ризогенеза у плодовых и ягодных культур in vitro / М.Т. Упадышев, А.В. Гуськов // Сельскохозяйственная биология.– 1998.– № 5.– С. 63–68.
3. Дубровина, А.С. Влияние трансформации клеточной культуры винограда *Vitis amurensis* Rupr. Геном rolb из *Agrobacterium rhizogenes* на биосинтез резвератрола: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2010. – 22 с.
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. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М., Агропромиздат, 1985. – 423 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.
8. Дорошенко, Н.П. Влияние салициловой кислоты на клональное микроразмножение сорта винограда Красностоп золотовский / Н.П. Дорошенко, А.Н. Ребров, А.С. Куприкова // Виноделие и виноградарство. – 2011.– № 3.– С. 12-14
9. Цупикова, Л.А. Депонирование и рекультивирование сахарной свеклы в культуре in vitro: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Рамонь, 2002. – 23 с.

References

1. Koshuchova, S. Loss Function of guard cells in vitro-cultured plants and its restitution: avoidans of vitrification and improvement of acclimatization-colloguia Pflanzenphysiologie "Stomala-89" / S. Koshuchova, K. Zoglauer, H. Goung // Humboldt – Universitatzu Berlin, 1989. №13. – P.38-40.
2. Upadyshev, M.T. Salicilovaja kislota kak reguljator rizogeneza u plodovyh i jagodnyh kul'tur invitro / M.T. Upadyshev, A.V. Gus'kov // Sel'skhozjajstvennaja biologija.– 1998.– № 5.– S. 63–68.
3. Dubrovina, A.S. Vlijanie transformacii kletочноj kul'tury vinograda *Vitis amurensis* Rupr. Genom rolb iz *Agrobacterium rhizogenes* na biosintez rezveratrola: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – Vladivostok, 2010. – 22 s.
4. Doroshenko, N.P. Sposob adaptacii rastenij k nesteril'nym uslovijam / N.P. Doroshenko, L.V. Kravchenko, A.N. Rebrov // Reshenie o vydache patenta na izobre-tenie k zajavke №2006113873/12(015078).
5. Dospehov, B.A. Metodika polevogo opyta / B.A. Dospehov. – M., Agropromizdat, 1985. – 423 s.
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. Grzhabovskij, A.M. Doveritel'nye intervaly dlja chastot i dolej / A.M. Grzhabovskij // Jekologija cheloveka, 2008. – №5. – S. 57-60.

8. Doroshenko, N.P. Vlijanie salicilovoj kisloty na klonal'noe mikroraz-mnozhenie sorta vinograda Krasnostop zolotovskij / N.P. Doroshenko, A.N. Rebrov, A.S. Kuprikova // Vinodelie i vinogradarstvo. – 2011.– № 3.– S. 12-14

9. Cupikova, L.A. Deponirovanie i rekul'tivirovanie saharnoj svekly v kul'ture in vitro: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – Ramon', 2002. – 23 s.