

УДК 634.8.
МРНТИ 62.33.29, 68.03.03

DOI 10.52578/2305-9397-2024-4-2-19-29

Хасейн А., PhD докторант КазНАИУ¹, старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0002-5196-6898>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет» Казахстан, г. Алматы, ул. Абая 8, 050010

Институт молекулярной биологии и биохимии им М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы, ул. Досмухамедова 80, 050012, leogold24@mail.ru

Тезекбаева Б.К., PhD докторант КазНАИУ¹, старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений², <https://orcid.org/0000-0003-2313-9737>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет» Казахстан, г. Алматы, ул. Абая 8, 050010

Институт молекулярной биологии и биохимии им М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы, ул. Досмухамедова 80, 050012, bota151283@mail.ru

Малахова Н. П., ассоциированный профессор, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биоинженерии растений, <https://orcid.org/0000-0001-5312-9674>

Институт молекулярной биологии и биохимии им М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы, ул. Досмухамедова 80, 050012, tasha_malakhova@mail.ru

Сулейманова Г. А., PhD, ассоциированный профессор кафедры «Плодоовощеводство, защита растений и карантин», <https://orcid.org/0000-0002-2322-6155>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет» Казахстан, г. Алматы, ул. Абая 8, 050010, gulnur.suleimanova@kaznaru.edu.kz

Khassein A., PhD student at KazNARU, senior researcher at the at the Plant Bioengineering Laboratory, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0002-5196-6898>

NJSS «Kazakh National Agrarian Research University» Kazakhstan, Almaty, Abay St. 8, 050010

M.A. Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry Kazakhstan, Almaty, Dosmukhamedova st. 80, leogold24@mail.ru

Tezekbayeva B. K., PhD student at KazNARU¹, senior researcher at the Plant Bioengineering Laboratory, <https://orcid.org/0000-0003-2313-9737>

NJSS «Kazakh National Agrarian Research University» Kazakhstan, Almaty, Abay St. 8, 050010

M.A. Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry Kazakhstan, Almaty, Dosmukhamedova st. 80, bota151283@mail.ru

Malakhova N. P., Associate professor, Candidate of Biological Sciences, Head of the Plant Bioengineering Laboratory, <https://orcid.org/0000-0001-5312-9674>

M.A. Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry Kazakhstan, Almaty, Dosmukhamedova st. 80, tel.: 87717540274, tasha_malakhova@mail.ru

Suleimanova G. A., PhD, Associate Professor of the Department of Fruit and Vegetable Growing, Plant Protection and Quarantine, <https://orcid.org/0000-0002-2322-6155>

NJSS «Kazakh National Agrarian Research University» Kazakhstan, Almaty, Abay St. 8, 050010, gulnur.suleimanova@kaznaru.edu.kz

**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ БЕЗВИРУСНЫХ РАСТЕНИЙ СОРТОВ
ВИНОГРАДА СВЕРХРАННЕГО И РАННЕГО СРОКОВ СОЗРЕВАНИЯ (V. VINIFERA L)
MICROCLONAL PROPAGATION OF VIRUS-FREE PLANTS OF GRAPE VARIETIES OF
VERY EARLY AND EARLY RIPENING PERIODS (V. VINIFERA L)**

Аннотация

В статье представлены результаты экспериментов по введению в культуру *in vitro* и микроклонального размножения местных сортов сверхраннего и раннего сроков созревания винограда (*V. vinifera* L.) казахстанской селекции Алма-Ата, Айсулу, Медео. В ходе исследования разработан протокол стерилизации растительного материала для введения в культуру *in vitro*, определен состав сред для культивирования в этих условиях, а также оптимизирован метод микроклонирования трех сортов винограда с целью увеличения

коэффициента размножения растений. Стерилизация растительного материала проводилась с применением химических агентов, включая обработку эксплантов мыльным раствором, 70% раствором этанола и «Доместос» в различных соотношениях. Установлено, что при экспозиции в мыльном растворе в течение 30 минут выход стерильных эксплантов составляет 70 - 80%. Определены оптимальные концентрации фитогормонов в питательной среде для получения максимального количества регенерантов, пригодных к укоренению. В качестве модифицирующих среду веществ были использованы ГК (гибберелловая кислота), 6-БАП (6-бензиламинопурин) и Fe - хелат. Оптимальной питательной средой для культивирования эксплантов в условиях *in vitro* и для микроклонального размножения является среда Мурасиге-Скуга ($1/2$) с добавлением 0,1 мг/л Fe – хелат, обеспечивающая выживаемость эксплантов винограда в эксперименте от 70% до 80%.

ANNOTATION

The article presents the results of experiments on the introduction into *in vitro* culture and microclonal propagation of local varieties of very early and early ripening grapes (*V. vinifera* L.) of Kazakh selection Alma-Ata, Aisulu, Medeo. In the course of the study, a protocol for sterilization of plant material for introduction into *in vitro* culture was developed, the composition of the media for cultivation under these conditions was determined, and the method of microcloning of three grape varieties was optimized in order to increase the plant propagation coefficient. Sterilization of plant material was carried out using chemical agents, including the treatment of explants with a soap solution, 70% ethanol solution and Domestos in various proportions. It was found that when exposed to a soap solution for 30 minutes, the yield of sterile explants is 70 - 80%. Optimum concentrations of phytohormones in a nutrient medium were determined to obtain the maximum number of regenerants suitable for rooting. GA₃ (gibberellic acid), 6-BAP (6-benzylaminopurine) and Fe-chelate were used as medium-modifying substances. The optimal nutrient medium for culturing explants *in vitro* and for microclonal propagation is Murashige-Skoog medium ($1/2$) with the addition of 0.1 mg/l Fe-chelate, which ensures the survival of grape explants in the experiment from 70% to 80%.

Ключевые слова: виноград, стерилизующие агенты, экспланты, культура *in vitro*, микроклональное размножение.

Key words: grapes, sterilizing agents, explants, *in vitro* culture, micropropagation.

Введение. Виноград (*Vitis spp.*) является одной из наиболее широко выращиваемых плодовых культур в мире, что показывает его большое экономическое значение [1]. Каждый год в мире производится более 70 миллионов тонн винограда, родиной которого считается Ближний Восток [2]. Согласно данным Международной организации по виноградарству и виноделию (OIV), в 2022 году Казахстан произвел 82 727 тонн свежего винограда [3]. Виноград считается полезным фруктом, богатым витаминами, минералами и антиоксидантами. Он служит отличным источником витамина С, витамина К и калия, а также содержит множество фитонутриентов, способствующих его многочисленным полезным свойствам для здоровья человека [4].

Казахстан имеет значительный потенциал для производства винограда и его переработанных продуктов, однако площадь виноградников в стране уменьшилась более чем в два раза по сравнению с 80-ми годами прошлого века. Промышленное виноградарство Республики Казахстан расположено в Алматинской, Жамбылской и Южно-Казахстанской областях, меньшая их часть находится в Жетысуской и Кызылординской областях. Небольшие площади, в общей сложности около 200 га, находятся в Западно-Казахстанской, Актюбинской, Абайской и Атырауской областях. Генетический фонд винограда в Казахстане составляет свыше 500 сортов, собранных практически из всех винодельческих регионов мира. В 2023 году для винограда в Казахстане, сложилась неблагоприятная погода: суровая зима и холодные заморозки в начале мая нанесли вред завязавшимся кистям. Кроме того, болезни и вредители также постепенно способствуют снижению урожая винограда [5].

В настоящее время значительная часть рынка Казахстана заполнена виноградом, импортируемым из дальнего и ближнего зарубежья, в том числе сортов с ранним сроком созревания. В этой связи актуальной задачей является создание конкурентоспособных местных

сортов сверхраннего и раннего сроков созревания. В качестве исходных форм для селекции сортов раннего срока созревания вовлечены 18 интродуцированных сортов. Новые сорта и гибридные формы, полученные в Казахском научно-исследовательском институте плодовоовощеводства (такие как Каракоз, Медео, Алма-Ата, Кызыл Тан, Айсулу, Кишмиш Алма-Атинский, Мускат Казахстанский и другие), намного опережают стандартные сорта по срокам созревания в южных и юго-восточных регионах Казахстана [6].

Высокий спрос на посадочный материал винограда не может быть удовлетворен полностью из-за низкой продуктивности метода черенкования, который является основным способом размножения винограда как одревесневшими, так и зелеными черенками [7]. Для ускоренного производства посадочного материала сортов винограда сверхраннего и раннего сроков созревания особо эффективен метод микроклонального размножения *in vitro*. Этот метод обладает высокой скоростью размножения и дает возможность выращивать растения в контролируемых условиях в любое время года, что позволяет планировать производство и быстро адаптироваться к изменениям рыночного спроса [8,9].

Этап ввода винограда в культуру *in vitro* является решающим моментом в процессе клонального микроразмножения, и его целью является получение наибольшего количества стерильных и жизнеспособных растений-регенерантов. Современные сорта винограда представляют собой гибриды, полученные от основных видов *Vitis vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. amurensis*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* и *V. lincecumii*. Для их успешного культивирования необходимо тщательно подбирать оптимальные условия, включая сроки введения в культуру, концентрацию и длительность воздействия стерилизующих агентов, состав минеральных и гормональных компонентов питательных сред, а также применение дополнительных биологически активных веществ для улучшения регенерационных процессов [10, 11].

Анализ собранных литературных источников показал, что применение технологии микроклонального размножения мериклонов винограда способствует сокращению сроков внедрения новых сортов в производство по сравнению с традиционными методами, а также ускоряет переход растений от ювенильной к репродуктивной фазе их развития. Данная технология позволяет выполнять работы в течение всего года и сокращает сроки размножения новых сортов в 4-5 раз по сравнению с традиционными методами. Закладка промышленных виноградников оздоровленным материалом позволяет продлить продуктивную эксплуатацию насаждений и повысить урожайность на 30–40%.

Важно отметить, что для выращивания эксплантов в условиях *in vitro* на каждом этапе требуется использование специализированных питательных сред. Также стоит подчеркнуть, что способность сортов винограда к размножению на искусственных средах *in vitro* зависит от индивидуальных характеристик каждого исследуемого генотипа [12,13,14]. Поиск методов оптимизации питательной среды для увеличения размножения виноградных сортов в условиях *in vitro* является важным направлением современной научной деятельности, так как это может привести к повышению эффективности получения качественного посадочного материала, особенно для сверхранних и ранних сортов [15].

Цель работы заключается в улучшении методов введения и размножения сортов винограда Алма-Ата, Айсулу и Медео в условиях *in vitro*.

Материалы и методы исследований. Исследование проводилось в Лаборатории биоинженерии растений Института Молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина, в период 2023-2024 гг.

В качестве объектов исследования были использованы три районированных сорта винограда (*V. vinifera* L.) казахстанской селекции - Алма-Ата, Айсулу, Медео, полученных из регионального филиала «Сарыагаш» Казахского научно-исследовательского института плодовоовощеводства.

Сорт Алма-ата выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства В.П. Пономарчуком при скрещивании сортов Дружба (среднеазиатская) × Ризамат, столовый сорт винограда раннесреднего срока созревания, с низкой зимостойкостью, устойчивостью к болезням и вредителям. Урожайность сорта высокая. Гроздь очень крупная, до 1000 г, ветвистой формы, ягоды очень крупные, продолговатые, черные.

Сорт Айсулу - столовый сорт среднего срока созревания. Предлагается как столовый сорт для потребления в свежем виде. Гроздь крупной величины, конической формы, средней плотности, длина ножки 3 см. средний вес гроздей 420 гр., ягоды крупные, овальной формы, окраска ягод белая. Кожица нежная, консистенция мякоти мясисто-сочная, сок не окрашен, вкус приятный, аромат мускатный, средняя урожайность 154 ц/га.

Сорт Медео - столовый сорт, который выведен казахстанскими селекционерами ТОО «Казахского научно-исследовательского института плодовоовощеводства». Сорт винограда «Медео» создан методом гибридизации сортов Дружба X Победа и последующего индивидуального отбора. Сорт среднего срока созревания, имеет высокие вкусовые и товарные качества. Грозди крупные, до 700 г, конические и цилиндрические, средне-рыхлые. Урожайность высокая 160-200 ц/га., устойчивость к болезням посредственная.

В качестве эксплантов использовали пазушные почки, выделенные из побегов ветки. Стерилизацию растительного материала проводили в трех вариантах с использованием 70% этанола, мыла с триклозаном и бытового моющего средства «Доместос» (в качестве действующего вещества средство содержит гипохлорит натрия) в различных временных выдержках. Этапы стерилизации состояли из обработки в 70% этаноле в течение 10, 15 и 20 секунд, после чего экспланты помещались в 1% раствор «Доместос» на 10 и 20 минут, 30 минут мыльным раствором.

На этапе введения в культуру *in vitro* использовалась универсальная питательная среда Мурасиге – Скуга (МС_{1/2}) [16] с добавлением различных комбинаций фитогормонов. В состав среды входили БАП (6-бензиламинопурин) в концентрациях 0,1, 0,5 и 1,0 мг/л, сахара в концентрации 30 г/л. Для приготовления полутвердой питательной среды использовали агар-агар в концентрации 6-8 г/л.

Для микроклонального размножения микропобегов винограда, полученных в условиях *in vitro*, сегменты длиной от 5 до 10 мм были разделены и пересажены на новую питательную среду. Для их культивирования применяли питательную среду МС (1/2) с добавлением различных концентраций фитогормонов. В частности, в среду добавляли 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л, а также гибберелловую кислоту (ГКЗ) в концентрациях 0,1 и 0,5 мг/л. В качестве источника железа использовался Fe – хелат в концентрациях 0,1 мг/л. Культивирование эксплантов осуществляли при температуре воздуха 24-26°C и освещенности 3000 люкс на стеллажах с лампами дневного света в светокультуральной комнате с фотопериодом 18/6 [9,17]. Эксперименты проводились в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение. Жизнеспособность эксплантов зависит от правильного выбора оптимальной схемы стерилизации, которая позволяет избежать повреждения растительных тканей и минимизирует уровень их загрязнения. Эффективность стерилизации определяется не только типом стерилизующего агента, но также множеством факторов, включая сортовые характеристики, сроки изоляции, а также тип и размер эксплантов [18, 19].

В наших экспериментах оптимальный метод стерилизации эксплантов винограда был выбран из трех вариантов, в которых переменными факторами выступали стерилизующие вещества: мыла с триклозаном, хлорсодержащий отбеливатель «Доместос», 70% этиловый спирт, их комбинации, а также продолжительность этапов стерилизации. Для этого однолетние побеги обрезали, убрали листья, а затем нарезали на сегменты с одной почкой. Первый этап обработки включает перемешивание эксплантов в растворе стерилизующего агента на лабораторном шейкере в течение 30 минут. Затем экспланты промывали под проточной водой в течение того же времени. Всего проведено 3 варианта стерилизации:

1 вариант: 30 минут в мыльном растворе, 5 минут в слабом растворе перманганата калия, 30 минут - промывание под проточной водой, 10 секунд в 70% этаноле, 1 минута - промывание дистиллированной водой, 15 минут в 1% растворе хлорсодержащего отбеливателя «Доместос», затем трёхкратное промывание дистиллированной водой в течение 5 минут.

2 вариант: 20 минут в 1% растворе хлорсодержащего отбеливателя «Доместос», 5 минут в слабом растворе перманганата калия, 30 минут - промывание под проточной водой, 15 секунд в 70% этаноле, трёхкратное промывание дистиллированной водой в течение 5 минут.

3 вариант: экспланты промывались под проточной водой в течение 30 минут, обрабатывались 70% этиловым спиртом в течение 1 минуты, затем проводилась обработка в 1%

растворе хлорсодержащего отбеливателя «Доместос» в течение 10 минут с последующим трёхкратным промыванием дистиллированной водой по 5 минут.

В ходе проведенных экспериментов было выяснено, что в 1-м варианте, где основным стерилизатором являлось мыло с триклозаном (время выдержки 30 минут), выход стерильных эксплантов был выше и составил 82,5% процента для сорта Айсулу, 71,4% процента для сорта Алма-Ата и 70,6% процента для сорта Медео (рисунок 1).

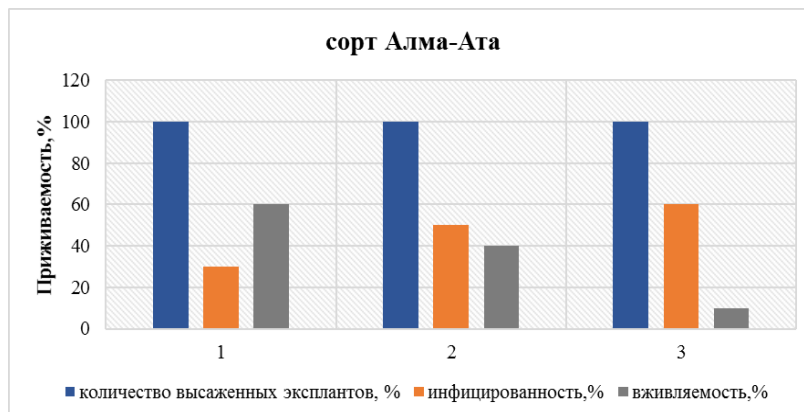


Рисунок 1 – Степень приживаемости и инфицирования пазушных почек сорта Алма-Ата на разных вариантах стерилизующих агентов

Во 2-м варианте, где основным стерилизатором был хлорсодержащий отбеливатель «Доместос», выход стерильных эксплантов составил - 45,2 % для сорта Айсулу, 33,1 % для сортов Алма-Ата и 31,4 % для сорта Медео (рисунок 2, 3).

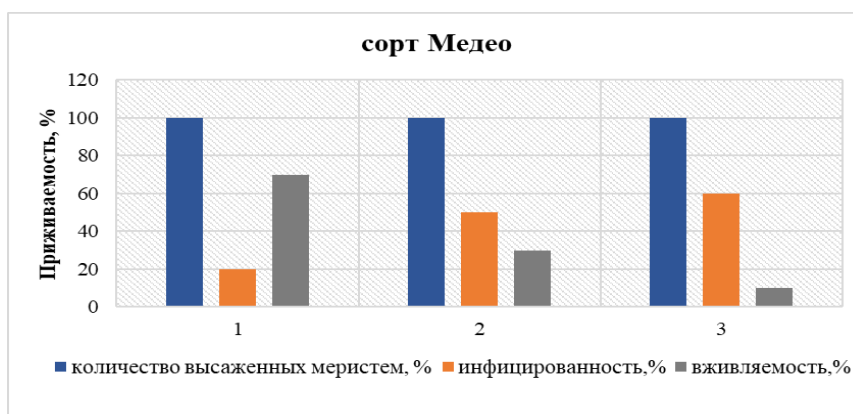


Рисунок 2 – Степень приживаемости и инфицирования пазушных почек сорта Медео на разных вариантах стерилизующих агентов

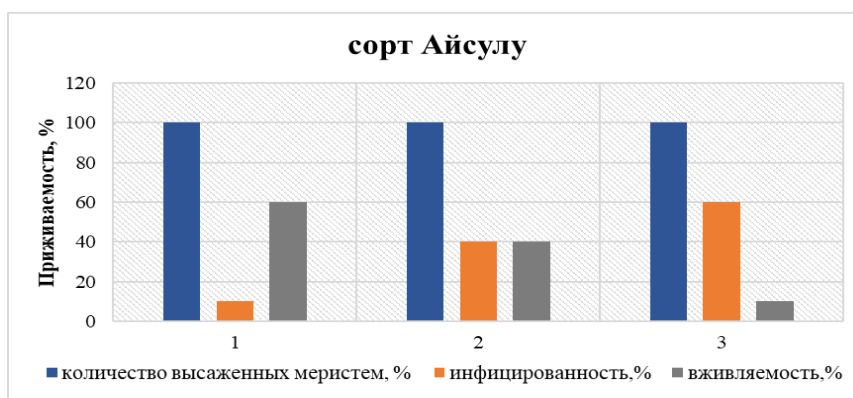
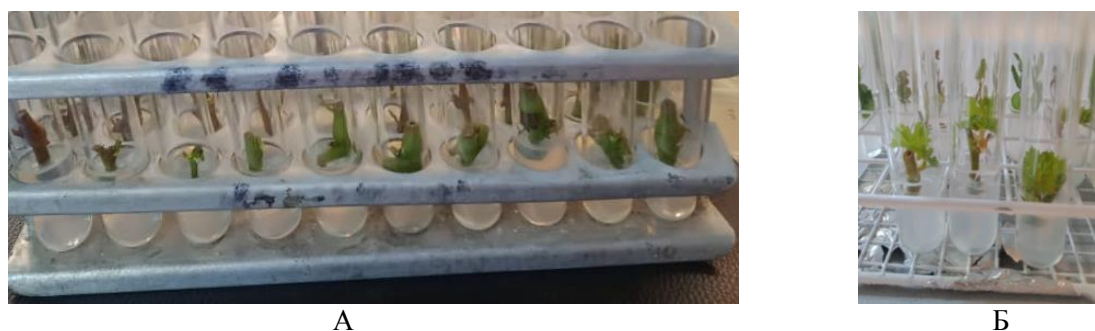


Рисунок 3 – Степень приживаемости и инфицирования пазушных почек сорта Айсулу на разных вариантах стерилизующих агентов

Третий вариант стерилизации оказался наиболее непригодным, выживаемость эксплантов составила всего 11,7 % для всех сортов винограда. Ясно, что длительное и интенсивное воздействие стерилизующих агентов привело к отмиранию тканей эксплантов. По результатам исследований, первый способ стерилизации был использован в дальнейшем для стерилизации растительных эксплантов винограда

Для введения эксплантов в культуру *in vitro* подбирали оптимальный состав питательной среды. В работе Н. Медведевой и Kizi D. N. E. лучшие результаты регенерации эксплантов наблюдались на агаризованных средах с $\frac{1}{2}$ или $\frac{3}{4}$ концентрации макро- и микроэлементов МС и повышенной концентрацией витаминов (тиамин HCl – 10 мг/л, никотиновая кислота – 4 мг/л) [20, 21]. Зарубежные исследователи также отметили эффективность среды МС с уменьшенной концентрацией солей: до $\frac{1}{2}$ от всей концентрации солей МС [22] или лишь до $\frac{1}{2}$ концентрации KNO_3 и NH_4NO_3 [23]. Zhang с коллегами определили, что для инициации эксплантов *V. piasezkii* var. *Pagnucii* была оптимальной среда $\frac{1}{2}$ МС, на которой развитие побегов проходило на 6 дней раньше, чем на среде МС с полным набором макро- и микросолей. Кроме того, на $\frac{1}{2}$ МС среде формировалось больше листовых пластинок, чем на других средах [24]. В работе С. Казыбаевой и др. аналогичные результаты по микроклональному размножения сорта Айсулу были получены на $\frac{1}{2}$ концентрации среды МС содержащей 0,5-1 мг/л БАП в сочетании с 0,1-0,5 мг/л ИМК и на $\frac{1}{2}$ концентрации среды МС с 0,5 мг/л 2iP в сочетании с 0,5 мг/л ГК [25].

В ходе нашего исследования аналогичные результаты по развитию эксплантов винограда были получены на универсальной агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (МС $\frac{1}{2}$) с добавлением фитогормонов в различных комбинациях (рисунок 4).



А

Б

Рисунок 4 – Введение в культуру *in vitro* эксплантов винограда

А-высаженные экспланты винограда; Б- экспланты винограда через 15 дней культивирования

Для ведения в культуру *in vitro* наиболее часто применяют БАП в качестве цитокинина. Исследования А. Батукаева и Waad S. Faizu и др. показали, что низкие концентрации БАП (0,01–0,1 мг/л) слабо стимулируют процессы органогенеза эксплантов, тогда как высокие концентрации (5 мг/л) имеют негативное воздействие на развитие микропобегов [26, 27]. В нашей работе нашей задачей является выбрать оптимальную концентрацию фитогормона, учитывая генотип сорта. В нашей работе было протестировано три варианта питательных сред для регенерации пазушных почек:

Вариант 1. МС ($\frac{1}{2}$) – 2,15 г/л, витамины 1 мл/л (В1, В2, В6, РР), сахара 30 г/л, БАП (6-бензиламинопурин) – 0,5 мг/л - 0,2 мг/л, агар – 6,5 г/л, рН=6,4.

Вариант 2. МС ($\frac{1}{2}$) – 2,15 г/л, витамины 1 мл/л (В1, В2, В6, РР), сахара 30 г/л, БАП (6-бензиламинопурин) – 1,0 мг/л, агар – 6,5 г/л, рН=6,4.

Вариант 3. МС ($\frac{1}{2}$)– 2,15 г/л, витамины 1 мл/л (В1, В2, В6, РР), сахара 30 г/л, БАП (6-бензиламинопурин) – 0,1 мг/л агар – 6,5 г/л, рН=6,4.

Результаты исследований показали, что у сортов Айсулу и Алма-Ата наиболее ранняя регенерация пазушных почек на питательной среде МС с добавлением 0,5 мг/л БАП происходила на 8-9 сутки, а у сорта Медео — на 11-12 сутки. В то же время, в эксперименте с концентрацией БАП 0,1 мг/л первичная регенерация почек была отмечена лишь на 19-20 сутки у всех сортов. В условиях второго варианта питательной среды, содержащей фитогормон БАП в концентрации 1,0 мг/л, у большинства виноградных эксплантов наблюдалось образование

каллуса, что говорит о непригодности данной концентрации БАП для регенерации пазушных почек.

Регуляторы роста так же значительно влияют на приживаемость эксплантов винограда. В первом экспериментальном варианте (В-1) наблюдалась повышенная приживаемость эксплантов *in vitro* у сортов винограда Айсулу и Алма-Ата, которая составила 84,6% и 84,2%, что значительно превышает результаты, полученные в других вариантах исследования. Для сорта Медео уровень приживаемости составил 75,1%. Во втором варианте опыта (В-2) приживаемость эксплантов оказалась ниже: для сорта винограда Айсулу она составила 52,3%, для сорта Алма-Ата — 42,4%, а для сорта Медео — 41,2%. В третьем варианте (В-3) питательной среды приживаемость эксплантов оказалась наименьшей: 21,1% для сорта Айсулу, 22,3% для сорта Алма-Ата и 13,2% для сорта Медео (рисунок 5).

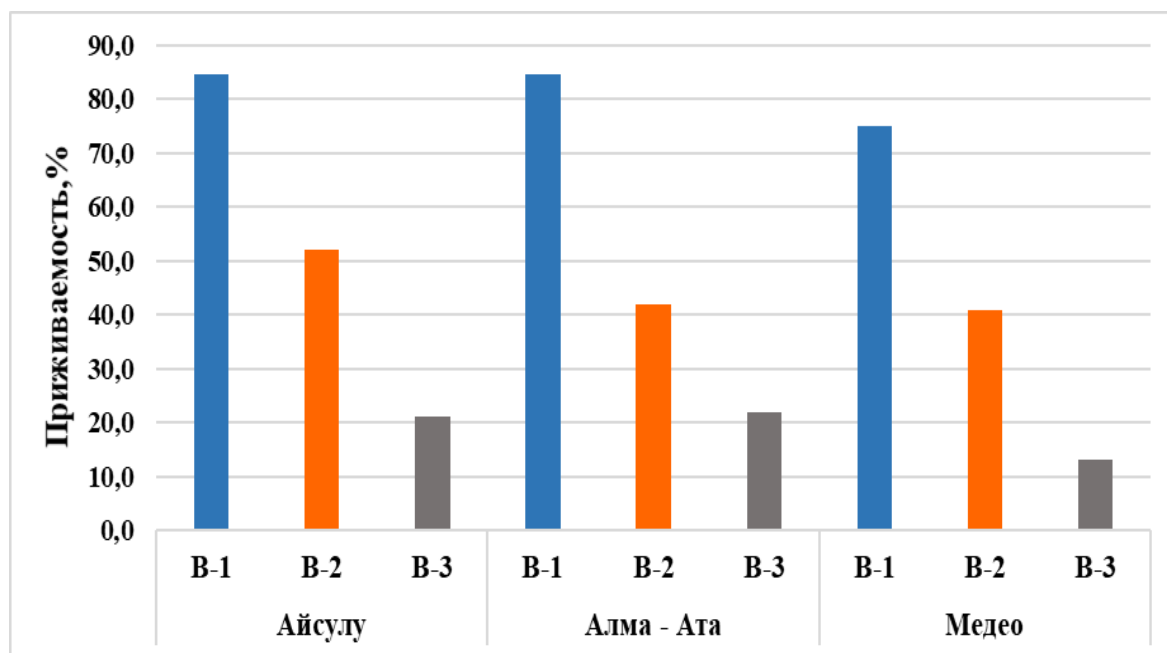


Рисунок 5 – Влияние регуляторов роста на приживаемость эксплантов винограда

На основе полученных результатов, было определено, что наилучшим вариантом для введения эксплантов винограда в культуру *in vitro* является питательная среда МС ($\frac{1}{2}$) с добавлением 0,5 мг/л БАП. На данной среде первая регенерация пазушных почек у всех сортов винограда была зафиксирована на 8-9 сутки. В то же время, на этой среде приживаемость эксплантов была высокой для всех исследуемых сортов и варьировала от 75,1% до 84,6%.

Следующим этапом в культивировании винограда *in vitro* является микрочлониальное размножение. Эффективность клонального микроразмножения определяется множеством факторов, включая состав культуральной среды, размер и тип вводимых эксплантов, условия культивирования, а также генотипа. Состав питательной среды является одной из ключевых составляющих оптимизации протокола микроразмножения. В совместном исследовании ученых Эфиопии и Швеции была проведена оптимизация протокола микроразмножения трех сортов винограда *Chenin blanc*, *Ugni blanc* и *Canonannon*. Исследование вели на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), дополненной пятью различными концентрациями 6-Бензиламинопурина (6-БАП) самостоятельно или в сочетании с разными концентрациями гибберелловой кислоты (ГК) [28]. В нашем исследовании аналогичные результаты по развитию микрочеренков были получены при использовании сред с концентрациями БАП 0,5 мг/л и ГК 0,1 мг/л.

Согласно нашим экспериментальным данным, процесс микрочлониального размножения изучаемых сортов винограда можно начинать через 21-28 дней после эксплантации почек. За этот период, в среднем, формируется 1–2 побега длиной 20–30 мм. Через 3–4 недели после формирования культур побегов *in vitro* здоровые побеги были собраны и разделены на микрочеренки длиной 1,0–1,5 см, каждый из которых включал пазушную почку. Для подбора

состава оптимальной питательной среды для микроклонирования эти микрочеренки винограда культивировали на универсальной агаризованной питательной среде Мурасиге - Скуга ($\frac{1}{2}$) с добавлением фитогормонов в разных комбинациях. В общей сложности было протестировано 3 различных варианта питательных сред:

Вариант 1. МС ($\frac{1}{2}$) – 2,15 г/л, витамины 5 мг/л (В1, В2, В6, РР), сахароза 30 г/л, гибберелловая кислота – 0,1 мг/л, БАП 0,5 мг/л, агар – 6,3 г/л, рН=5,7.

Вариант 2. МС ($\frac{1}{2}$) – 2,15 г/л, витамины 5 мг/л (В1, В2, В6, РР), сахароза 30 г/л, гибберелловая кислота – 0,5 мг/л, БАП 1,0 мг/л, агар – 6,3 г/л, рН=5,7.

Вариант 3. МС ($\frac{1}{2}$) – 2,15 г/л, витамины 5 мг/л (В1, В2, В6, РР), сахароза 30 г/л, Fe – хелат – 0,1 мг/л, агар – 6,3 г/л, рН=5,7.

Выявлено, что самые ранние сроки регенерации микрочеренков отмечены на питательной среде с добавлением 0,1 мг/л Fe – хелат: на 14-16 сутки для сорта Айсулу и на 20-21 сутки для сортов Алма-Ата и Медео. Тогда как в 1-м варианте, где концентрация гибберелловой кислоты составила 0,1 мг/л и 0,5 мг/л БАП, первичная регенерация микрочеренков была отмечена только на 21-22 сутки для сорта Айсулу и на 23-24 сутки для сортов Алма-Ата и Медео. Во 2-м варианте питательной среды, содержащей 0,5 мг/л гибберелловой кислоты и 1,0 мг/л БАП, не было отмечено значительного влияния на регенерацию микрочеренков. На рисунке 6 изображен этап размножения винограда в тканевой культуре.

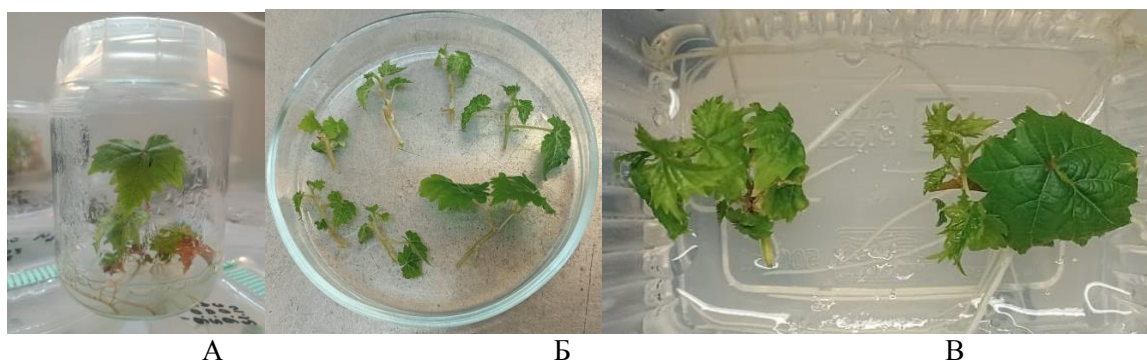


Рисунок 7 - Микроклональное размножение растений винограда

А – готовое к черенкованию микрорастение; Б – микрочеренки перед высадкой; В - микрорастения через 20-21 дней на среде МС ($\frac{1}{2}$) с добавлением 0,1 мг/л Fe - хелат

Процесс укоренения является важным моментом на этапе микроразмножения. При анализе способности сортов винограда к укоренению выявлено что наиболее успешное корнеобразование шло на среде МС ($\frac{1}{2}$) – 2,15 г/л, содержащей витамины 5 мг/л (В1, В2, В6, РР), сахарозу 30 г/л, Fe - хелат – 0,1 мг/л, где укоренилось 80% исследуемых растений. Низкую укореняемость показали растения на среде МС ($\frac{1}{2}$) + гибберелловая кислота (0,1 мг/л) и МС ($\frac{1}{2}$) + 6-БАП (0,5 мг/л)

Таким образом 2 вариант среды, включающий Fe - хелат в концентрации 0,1 мг/л, оказался наиболее оптимальным для увеличения коэффициента размножения, а также для укоренения винограда *in vitro*. При использовании данной концентрации, через 4-5 недели культивирования получали достаточно крупные жизнеспособные микропобеги длиной 4 – 6 см с хорошо развитыми корнями.

Закключение. В результате проведенных исследований был подобран оптимальный вариант протокола стерилизации растительного материала для введения в культуру *in vitro*, а также определен наиболее эффективный состав питательных сред для проведения этапов введения и культивирования эксплантов винограда в культуре *in vitro*, и микроклонального размножения растений винограда сорта Алма-Ата, Айсулу, Медео.

Наиболее эффективным методом стерилизации растительных эксплантов винограда является процедура, при которой экспозиция в мыльном растворе составляет 30 минут, и затем, слабом растворе перманганата калия 5 минут. Выход стерильных эксплантов был выше и составил 82,5% для сорта Айсулу, 71,4% для сорта Алма-Ата и 70,6% для сорта Медео.

Оптимальной питательной средой для введения пазушных почек винограда в культуру *in vitro* оказалась среда МС (½) с добавлением 0,1 мг/л гибберелловой кислоты. В этом экспериментальном варианте (В-1) наблюдалась повышенная приживаемость эксплантов *in vitro* у сортов винограда Айсулу и Алма-Ата, которая составила 84,6% и 84,2%, для сорта Медео уровень приживаемости составил 75,1%. Среда МС (½) с концентрацией Fe - хелата 0,1 мг/л оказалась наилучшей для увеличения коэффициента размножения и укоренения винограда *in vitro*. При использовании данной концентрации через 4-5 недель культивирования получены достаточно крупные микропобеги длиной 4-6 см с хорошо развитыми корнями.

Результаты данного исследования являются новыми и обладают значительной практической ценностью, поскольку проведены на ранее не исследованных аспектах оптимизации условий введения в культуру *in vitro* и эффективного микроклонального размножения местных сортов винограда с сверххранимыми и ранними сроками созревания.

Благодарность

Исследование проводилось в рамках научно-технической программы ИРН: BR21881942 «Разработка биотехнологических подходов для контроля фитопатогенов с целью повышения продуктивности сельскохозяйственных культур».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Reynolds, A. G. (2017). The Grapevine, Viticulture, and Winemaking: A Brief Introduction. In Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management (pp. 3-29). Springer, Cham.
- 2 <https://www.fao.org/faostat/>
- 3 <https://www.oiv.int/ru>
- 4 Bob Whitley. Grapes: Important Facts, Health Benefits, and Recipes. 6/1/2023 <https://www.relish.com/about>.
- 5 Жоров, Н. «Аграрный сектор» №2 (56) за июль-август 2023 года.
- 6 Маденов, Э.Д. (2007) Высокопродуктивные сорта и интенсивная технология виноградарства в Казахстане [Текст] / Э. Д. Маденов //
- 7 Батукаев, Э.А. Оптимизация основных элементов размножения винограда биотехнологическим методом. Монография. [Текст] / Э.А. Батукаев // Грозный – 2019. Стр. 35.
- 8 Долгих, С.Г. Перспективы производства сертифицированного посадочного материала плодовых культур в Казахстане [Текст] / С.Г. Долгих// Журнал КазНАУ, «Ізденістер, нәтижелер – Исследования, результаты». - 2023. – №2 (98). - С. 133-143.
- 9 Долгих, С.Г. Технология производства безвирусного посадочного материала плодовых, ягодных культур и винограда [Текст] / С.Г. Долгих // (Рекомендации). – 2020.- 57 с.
- 10 Красинская, Т. А. Введение в культуру *in vitro* различных генотипов рода *Vitis L.*, свободных от основных вирусов винограда [Текст] / Т. А. Красинская // Актуал. биотехнология. – 2017. – № 2 (21). – С. 174–175.
- 11 Кузнецова, И.Б. Особенности клонального микроразмножения культурного винограда (*Vitis vinifera L.*) на этапах «введение в культуру» и «собственно микроразмножение» [Текст] / И.Б. Кузнецова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2021. № 4 (90) doi: 10.37670/2073-0853-2021-90-4-72-75.
- 12 Собралиева, Э.А. Состояние изученности микроклонального размножения плодовых культур и винограда (обзор литературы) [Текст] / Э.А. Собралиева // Инновационная деятельность как фактор развития агропромышленного комплекса в современных условиях: мат-лы II Междунар. науч. конф., посвящ. 75-летию ФГБНУ «Чеченский НИИСХ». Грозный, 2020. С. 100–118.
- 13 Адаев, Н.Л. Оптимизация питательных сред для клонального микроразмножения *in vitro* новых сортов ягодных культур [Текст] / Н.Л. Адаев // Инновационная деятельность как фактор развития агропромышленного комплекса в современных условиях: мат-лы II Междунар. науч. конф., посвящ. 75-летию ФГБНУ «Чеченский НИИСХ». Грозный, 2020. С. 83–91.
- 14 Соболев, В.И. Проявление сортовой специфичности в культуре апикальных меристем винограда, адаптированного на юге Красноярского края [Текст] / В.И. Соболев // Вестник КрасГАУ. 2020. № 7 (160). С. 31–37.

- 15 Себет, О.Л. Использование биологических методов при микроклональном размножении культурного винограда [Текст] / О.Л. Себет // Вестник КрасГАУ. 2021. № 1 70 DOI: 10.36718/1819-4036-2021-1-70-76.
- 16 Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. [Текст] / T. Murashige // Annual Review of Plant Physiology, 25(1), 135-166.
- 17 Kornatskiy, S. A. New approaches to micropropagation of raspberry. [Текст] / S. A. Kornatskiy // Acta Horticulturae - July 2020. P. 113-116.
- 18 Kryukov, L. A., Vodolazhsky D. I. and Kamenetsky-Goldstein R. (2022). Micropropagation of Grapevine and Strawberry from South Russia: Rapid Production and Genetic Uniformity. Agronomy, 12, 308. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020308>.
- 19 Sammona, O. S. (2022). Micropropagation of grapevine (*vitis vinifera* l.) cvs. Red globee and Superior. Iraqi Journal of Agricultural Sciences:53(4):833–849. DOI: <https://doi.org/10.36103/ijas.v53i4.1596>.
- 20 Медведева, Н. И. Методические рекомендации по микроклональному размножению винограда *in vitro* / Н. И. Медведева, Н. В. Поливар, Л. П. Трошин // Науч. журн. КубГАУ. – 2010. – № 62 (08). – С. 1–13.
- 21 Kizi, D. N. E., J. S. Turdiqulovich and I. M. H.kizi, (2022). Effect of bap concentration and content of food environment on “in vitro” regeneration of rizamat (*Vitis Vinifera* L) cultivar. European Journal of Agricultural and Rural Education (EJARE). Vol. 3 No.2.
- 22 Poudel P. R. Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes / P. R. Poudel, I. Kataoka, R. Mochioka // Plant cell, tissue and organ culture. – 2008. – Vol. 92, № 2. – P. 147–153. J. L.
- 23 Mukherjee P. et al. *In vitro* propagation of a grape rootstock, de Grasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium compositions and plant growth regulators / // Scientia Horticulturae. – 2010. – Vol. 126, № 1. – P. 13–19.
- 24 Zhang J. L. et al. Factors affecting *in vitro* propagation of a Chinese wild g rape (*Vitis piasezkii* var. *pagnucii*): shoot production and rhizogenesis // New Zealand J. of Crop & Horticultural Sci. – 2006. – Vol. 34, iss. 3. – P. 217–223.
- 25 Kazybayeva S. et al., Micropropagation of some grape varieties in Kazakhstan. BIO Web of Conferences 25, 05003 (2020).
- 26 Batukaev A., Sobralieva E. and Palaeva D. (2021). Optimization studies of culture media for in-vitro clonal micropropagation of new grape varieties. International research conference on Challenges and Advances in Farming, Food Manufacturing, Agricultural Research and Education, KnE Life Sciences, pages 757–764. DOI: 10.18502/cls.v0i0.9013.
- 27 Waad S. Faizy, Ammar Z. A. Kassab Bashi, Rafail S. Toma. In Vitro Propagation of Two Grapes, *Vitis Vinifera* L. cvs. Superior And Red Globe. NTU Journal of Agricultural and Veterinary Sciences (2024) 4 (2): 99-107 DOI: <https://doi.org/10.56286/ntujavs.v2i2>.
- 28 Kinfе B. In vitro micropropagation of grape vine (*Vitis Vinifera* L.) from nodal culture / B. Kinfе, T. Feyssa, G.Bedada // African Journal of Biotechnology. – 2017. – Vol. 16(43). – P. 2083–2091, DOI: 10.5897/AJB2016.15803.).

ТҮЙІН

Мақалада жүзімнің (*V. vinifera* L.) қазақстандық селекцияның өте ерте және ерте пісетін жергілікті Алма-Ата, Айсұлу, Медеу сорттарын *in vitro* және микроклональды көбейту бойынша культураға енгізу тәжірибесінің нәтижелері берілген. Зерттеу барысында *in vitro* культурасына енгізу үшін өсімдік материалын зарарсыздандыру хаттамасы әзірленді, *in vitro* жағдайларда өсіруге арналған қоректік орталардың құрамы анықталды. Сонымен қатар өсімдіктердің көбею жылдамдығын арттыру мақсатында жүзімнің үш сортын микроклондау әдісі оңтайландырылды. Экспланттарды стерилизациялау химиялық агенттерді қолдану арқылы жүзеге асырылды, оның ішінде экспланттарды сабын ерітіндісімен, 70% этанол ерітіндісімен және Domestos ертіндісімен әр түрлі қатынаста өңдеу. Сабын ертіндісімен 30 минут әсер еткенде стерильді экспланттардың шығымы 70 - 80% болатыны анықталды. Тамырлануға жарамды регенеранттардың максималды мөлшерін алу үшін қоректік ортадағы фитогормондардың оңтайлы концентрациялары анықталды. Қоректік ортаны түрлендіретін

заттар ретінде ГҚ (гибберел қышқылы), 6-БАП (6-бензиламинопурин) фитогормондары және Fe - хелаты пайдаланылды. Экспланттарды *in vitro* жағдайында өсіру және микроклондық көбейту үшін тәжірибеде жүзім экспланттарының тірі қалуын 70%-дан 80%-ға дейін қамтамасыз еткен оңтайлы қоректік орта 0,1 мг/л Fe - хелаты қосылған Мурасиге-Скуг ортасы (½) болып табылды.

УДК 631.6 (574.1)

DOI 10.52578/2305-9397-2024-4-2-29-37

МРНТИ 68.31.21; 68.35.47; 68.31.02; 70.21.41

Онаев М. Қ., кандидат технических наук, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0001-5584-1948>

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, maratonaev@mail.ru

Джапаров Р. Ш., доктор PhD, <https://orcid.org/0000-0003-1945-5825>

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, dzhaparovr84@mail.ru

Денизбаев С. Е., магистр сельскохозяйственных наук, <https://orcid.org/0000-0001-8696-0288>

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, serik.edres.denizbaev69@mail.ru

Аюпов Е. Е., доктор PhD, <https://orcid.org/0000-0001-6357-2522>

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, ergalib@mail.ru

Умбеткалиев Н. М., магистр биологии, <https://orcid.org/0000-0002-5175-2195>

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, nurlan-72kzt@mail.ru

Асқар Б. Н., магистрант, НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, bagdat.askar07@inbox.ru

Өтембет Е. М., магистрант, НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, yotembet@bk.ru

Ongayev M.K., Candidate of Technical Sciences, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0001-5584-1948>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, maratonaev@mail.ru

Japarov R.Sh., PhD, <https://orcid.org/0000-0003-1945-5825>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, dzhaparovr84@mail.ru

Denizbayev S.E., Master of Agricultural Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-8696-0288>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, serik.edres.denizbaev69@mail.ru

Ayupov Y.E., PhD, <https://orcid.org/0000-0001-6357-2522>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, ergalib@mail.ru

Umbetkaliev N.M., Master of Biological Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-5175-2195>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, nurlan-72kzt@mail.ru

Askar B.N., master's student, NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, bagdat.askar07@inbox.ru

Otembet Y.M., master's student, NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, yotembet@bk.ru