Л. С. Ерболова1,2, Д. А. Копытина1, А. М. Касенова1, Н. А. Рябушкина1,

Г. А. Кампитова2, С. Н. Олейченко2, Н. Н. Галиакпаров1

(1РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, Алматы, Республика Казахстан,

2РГП «Казахский национальный аграрный университет», Алматы, Республика Казахстан)

Адаптация безвирусного посадочного материала винограда Vitis vinifera L. cv. Saperavi, полученного in vitro к условиям ex vitro

Аннотация. Объект исследования сорт винограда Saperavi вида Vitis vinifera L. В первой части экс-перимента весь исходный посадочный материал был протестирован на наличие особо опасных вирусов винограда: ВКУВ (вирус короткоузлия винограда), ВСЛВ (вирус скручивания листьев винограда), ВАВ (вирус А винограда) на основе обратной транскрипции и мультиплекс-ПЦР. Во второй части эксперимента безвирусный посадочный материал винограда был микроклонально размножен с помощью апексов побегов на питательной среде инициации образования меристематической массы (ИМ). В результате микроразмно-жения из одного эксплантa было получено до 20 и более укорененных растеньиц. В третьей части эксперимента все микроклонально размноженные растения были адаптированы к условиям ex vitro. Было показано влияние различных субстратов и минеральных удобрений на адаптацию растений после in vitro к ex vitro и возможность частичной адаптации растений на этапе in vitro. Растения винограда в вариантах на цеолите и цеолит+нитроаммофоска показали наименьшую приживаемость (73%). Наиболее высокая прижи-ваемость (97%) исследуемого сорта была отмечена на субстратах цеолит+торф (1:1) и цеолит+кемира Комби (NPK). За 4 недели адаптации было отмечено увеличение высоты растений в варианте цеолит+ кемира Комби (NPK), по сравнению с другими вариантами после 2-х недель – 4,13±0,4 см, а после 4 недель – 16,06±0,74 см. Минимальный прирост побегов было в варианте цеолит: после 2-х недель – 1,27±0,3 см, после 4-х недель – 7,4±1,4 см. В остальных вариантах прирост побегов после 4-х недель варьировал в пределах 8,3-9,7 см. Полученные данные свидетельствуют, что добавление кемира Комби в цеолит для культивирования растений винограда ex vitro обеспечивает более высокий уровень адаптации.

Ключевые слова: Vitis vinifera L., вирус, удобрение, субстрат, апекс побега, адаптация.

Тірек сөздер: Vitis vinifera L., вирус, тыңайтқыш, субстрат, өркен ұшы, бейімделу.

Keywords: Vitis vinifera L., virus, fertilizer, substratum, shoot apex, adaptation.

Введение. В течение последних десятилетий микроклональное размножение применяется для размножения различных видов, сортов и форм винограда. Виноград был первым из древесных растений, где для in vitro размножения различных видов и сортов использовались апексы и аксилярные почки [1]. Для винограда метод культуры тканей был первоначально использован для освобождения от вирусов [2]. Позже этот метод использовали для размножения винограда, свободного от вироидов [3] и возбудителя болезни Пирса [4].

Перевод и адаптация растений после in vitro к ex vitro является наиболее критической стадией микроклонального размножения для многих видов растений. На этапе пересадки растений в нестерильные условия возникают большие потери растений (50 и более процентов) [5].

Растеньица во время in vitro культивирования растут в специальных условиях, в таких как герметичные сосуды для выращивания, высокая интенсивность излучения и влажности воздуха. Выращивание растеньиц в закрытых сосудах в целях предотвращения микробного загрязнения уменьшается турбулентность воздуха, ограничивается приток и отток CO2, газообразных продуктов растительного происхождения из сосудов. Среда культивирования дополняется питательными элементами, чтобы обеспечивать углеводами и энергией растеньица. Ко времени переноса в субстрат растеньице должны иметь листья с функционирующими устьицами [6]. Большинство авторов рекомендуют для адаптации поддерживать влажность воздуха в пределах 95-99%, постепенно снижая ее до 50-60%, например, используя искусственный туман, пластиковые покрытия, полиэтиленовые пакеты и т.д. [7].

Еще одна проблема при пересадке растений в нестерильные условия – это недостаточно раз-витая корневая система. Слабые корни не в состоянии освоить необходимое количество воды и питательных элементов, чтобы обеспечить интенсивный рост [8].

Вопросы размножения и адаптации безвирусного посадочного материала винограда, как к нестерильным условиям, так и к условиям открытого грунта в условиях Казахстана изучены недостаточно и являются актуальными в настоящее время. Создать условия для дальнейшего роста и развития растений возможно за счет подбора субстратов. Главная цель данной работы – подбор оптимальных условий адаптации безвирусного посадочного материала Saperavi после in vitro к ex vitro на субстратах с использованием цеолита и комплексных удобрений.

Материалы и методы

Материалы. Объект исследования сорт винограда Saperavi вида Vitis vinifera L. Исходный посадочный материал для микроклонального размножения был протестирован на наличие особо опасных вирусов: ВАВ, ВСЛВ, ВКУВ на основе обратной транскрипции и мультиплекс-ПЦР. Для анализа использовались листья собранных на виноградниках ТОО «Торе-Жайлау» Енбекшика-захского района, Алматинской области.

Выделение тотальной РНК из листьев винограда. Выделение РНК проводили согласно методике [9] с модификациями. 100 мг листьев винограда гомогенизировали в жидком азоте и добавляли 1 мл буфера для экстракции (0.1M Tris-HCl; 25mM EDTA; 2M NaCl; 2% CTAB; 2% PVP). 400 мкл гомогената инкубировали при 65оС в течение 10 минут и экстрагировали равным объемом хлороформа. После инкубации центрифугировали 15500 g в течение 10 минут и водную фазу переносили в чистую пробирку. РНК осаждали 2,5 объемом 96% этанола и центрифугиро-ванием при 15500 g 10 мин. Осадок промывали 70% раствором этанола. После сушки, осадок растворяли в 40 мкл воды.

Обнаружение вирусной РНК в тотальной РНК листьев винограда. Реакцию обратной транс-крипции проводили с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы MuMLV-RT. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 25 мМ Трис-HCl, pH 8,5, 75 мМ КС1, 2,5 мМ MgC12, 2 мМ ДТТ, 1 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 10 пмоль «обратных» олигонуклеотидов (таблица 1), 1 мкг тотальной РНК [10]. Смесь прогревали при 70оС 10 мин. для разворачивания вторичной структуры РНК. Затем добавили 200 единиц MuMLV-RT и инкубировали 2 ч при 42оС. Реакционная смесь обратной транскрипции использовалась без дополнительной обработки в реакции амплификации фрагмента геномов вирусов. Состав мультиплекс ПЦР: 2,5 мкл 10X Taq буфера (750мМ Tris HCl, pH 8.8, 200 мМ (NH4)2SO4, 0.1% Tween 20); 2,5 мкл 25 мМ MgCl2,; 0,5 мкл 10 мМ дНТФ; 0,5 мкл каждого (три пары) 10 мкМ праймеров; 1,25 ед. Taq-полимеразы, 4 мкл кДНК в 25 мкл реакционной смеси. Синтез проводили в следующем температурном режиме: 2 мин 94°С; 3 цикла – 94°С 30 сек., 60°С 30 сек., 72°С 1 мин.; 30 циклов – 94°С 30 сек., 66°С 30 сек., 72°С 1 мин.; и в конце программы амплификации финальная элонгация при 72°С в течение 10 мин. Продукты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле. Наличие продуктов с размерами соответст-вующими указанными в таблице 1, свидетельствует о присутствии того или иного вируса в анали-зируемом образце.

Таблица 1 – Характеристика специфических праймеров

для выявления вирусов GVA, GLRV,GFLV методом мультиплекс ОТ-ПЦР

Вирус	Последовательность нуклеотидов	Размер ПЦР продукта (п.н)
ВАВ	5'-ACTGTGATACAGGCTATGCA-3'	350
	5'-CTCATCGTCTGAGGTTTCTA-3'	
ВСЛВ	5'-GAGAAAGATCCAGACAAGTTCTT-3'	646
	5'-TAGACCTCGAGCGTAGCTACTTCTTTTGC-3'	
ВКУВ	5’-GTTAGTGAGTGGAACGGGAC-3’	768
	5'-TTTTAACTCGAGATACCCTAGACTG-3'	

Микроклональное размножение винограда. Для размножения in vitro использовали среду инициации образования меристематической массы (ИМ) [11], содержащую помимо макро- и мик-роэлементов и органических компонентов 4.4 μM БАП, 0.05 μM нафталенуксусной кислоты (НУК), 30 г/л сахарозы, 0,6% агар. Методики микроклонального размножения растений описаны ранее [12].

Адаптация безвирусного посадочного материала винограда, полученного in vitro к ex vitro. Адаптация была проведена в лабораторных и полевых условиях. В каждом опыте были использо-ваны растения в 3-кратной повторности, по 10 растений в каждой повторности. Для стимуляции ризогенеза и более легкому переходу растений к почвенным условиям крышки баночек приоткры-вали на 3 дня, затем открыли полностью и налили дистиллированной воды, чуть выше поверхности питательной среды (рисунки 1, 2).

По достижению растениями высоты 10-12 см корни промыли от агара проточной водой и переносили на различные предварительно стерилизованные субстраты (объем 400 мл): А) цеолит; Б) смесь цеолита с биогумусом (1:1); В) смесь цеолита с торфом (1:1); Г) цеолит + удобрение кемира Комби (г/л); Д) цеолит + удобрение нитроаммофоска, г/л); Е) цеолит + удобрение супрефос (г/л); Ж) цеолит + удобрение универсал (г/л), предварительно простерилизованные в сухожаровом шкафу при 150°С три часа. Цеолиты – природные минералы из группы водных алюмосиликатов щелочных и щелочноземельных элементов с тетраэдрическим структурным каркасом, включаю-щим полости, занятые катионами и молекулами воды. Химический состав цеолитов: SiO_2 – 60-74%, Al_2O_3 – 14-15%, Fe_2O_3 – 1,4-5,83%, TiO_2 – 0,07-7%, MnO – 0,2%, MgO – 0-2%, CaO – 0,13-6,4%, NaO – 0,61-6,4%, K_2O – 0,66-4,03%, P_2O_5 – 0,1-0,2%.

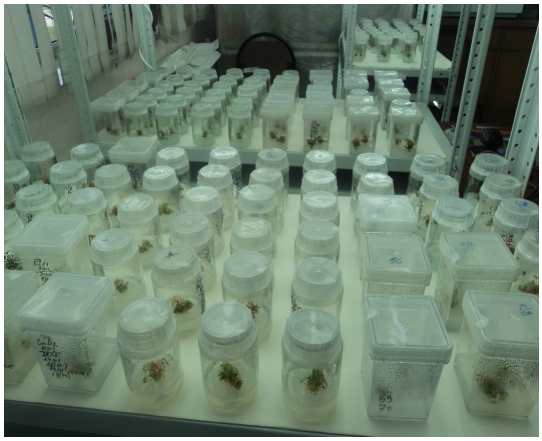

Рисунок 1 – Микроклонально размноженные растения на стеллажах

Рисунок 2 – Адаптация растений винограда к ex vitro на этапе in vitro

Все высаженные растения сверху прикрывали пластиковыми стаканчиками. Затем через 5-7 дней дно стаканчиков отрезали, через 2-3 недели их убирали. Каждую неделю растения подкармливали одним из следующих удобрений:

Кемира Комби, состав – см. таблицу 2;

Нитроаммофоска, состав: N – 15 %, P – 15 %, K – 15 %;

Супрефос, состав: S – 2-3% , P – 22-24 %, N – 12-16 %, K – 12-14 %, Mg – 2 %;

Универсал, состав – см. таблицу 3;

Биогумус «Цветение» – изготавливается по уникальной технологии методом вермикульти-вирования, с помощью технологических червей вида Eisenia foetida из отходов коневодческих и скотоводческих хозяйств. Состав биогумуса см. в таблице 4.

Таблица 2 – Состав удобрения кемира Комби

№	Питательные вещества	В весовых процентах
1	Азот, общий N	14,0 %
2	Азот, нитр NO3-N	7,7 %
3	Азот, карбамидный	6,3 %
4	Фосфор, P.	5,0 %
5	Фосфор водорастворимый, P.	5,0 %

№	Питательные вещества	В весовых процентах
11	Марганец, Mn	0.1 %
12	Цинк, Zn	0.01 %
13	Молибден, Mo	0,002 %
14	Кобальт, Co	0,001 %
15	Сера, S	1,8 %

6	P2O5	11.0 %	16	Йод, I	0.01 %
7	Калий, К.	21,0 %	17	Магний, Mg	1.4 %
8	K2O	25,0 %	18	Хром, Cr	0.01 %
9	Бор, B	0,02 %	19	Железо, Fe	0.01 %
10	Медь, Cu	0,01 %			

Таблица 3 – Состав удобрения Универсал

№	Питательные вещества	В весовых процентах
1	Общий азот	7 %
2	P2O5	7 %
3	K2O	8 %
4	MgO	1.5 %
5	P	3.0 %
6	K	6.6 %
7	Mg	0.9 %
8	Бор, B	0,02 %
9	C гум	2.6 %
10	Медь, Cu	0,01 %
11	Марганец Mn	0.07 %
12	Цинк Zn	0.01 %

Таблица 4 – Состав Биогумуса «Цветение»

№	Питательные вещества	Количество
1	Общий гумус	29,98%
2	Уровень pH	7,9
3	CO2	1,53%
4	Гидролизуемый азот	288,4 мг/кг
5	Подвижный P2O5	748 мг/кг
6	Подвижный K2O	8775 мг/кг

7	Поглощенный Ca	42/1,5 мг/мг-экв
8	Поглощенный Mg	30/1,49 мг/мг-экв

Результаты исследований и их обсуждение

Отбор безвирусных растений. Важным при работе с вирусами растений является качественно выделенный препарат тотальной РНК. На рисунке 3 четко видны два бенда, верхний является 28S, а нижний 18S рибосомальными РНК и их четкое разделение и целостность свидетельствует о высоком качестве препарата. Данная РНК была использована в реакции обратной транскрипции. Синтезированная кДНК вирусов в дальнейшем использовалась в постановке мультиплекс ПЦР.

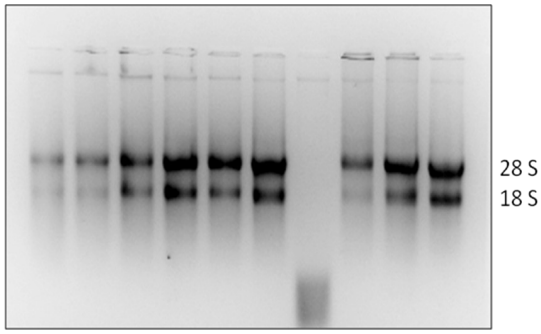

Рисунок 3 – Электрофорез тотальной РНК в агарозном геле

15 образцов были взяты по схеме: 3 образца с каждого ряда через пять кустов. С поля образцы брались с рядов с интервалом в пять рядов. Тотальная РНК выделялась по описанному в разделе «Материалы и методы» протоколу.

С помощью ПЦР все образцы были протестированы на наличие выше указанных вирусов винограда. Результаты анализа исследуемых образцов на наличие инфекции ВАВ, ВСЛВ и ВКУВ показаны в рисунке 4.

Как видно из рисунка 2, все исследуемые образцы не были заражены соответствующими виру-сами винограда.

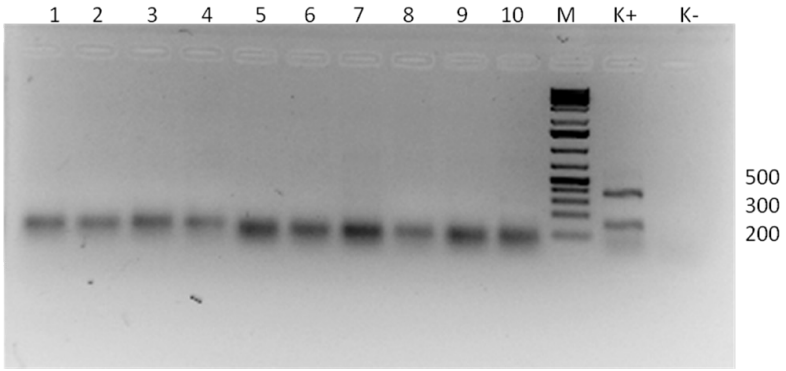

Рисунок 4 – Анализ образцов на наличие вирусов ВАВ, ВСЛВ и ВКУВ. С 1 по 10 – анализируемые образцы,

М – молекулярный маркер (пар нуклеотидов) Gene Ruler 1 kb plus (Fermentas),

К – отрицательный контроль, К+ положительный контроль (ВАВ)

Микроклональное размножение безвирусных растений и адаптация к ex vitro. В качестве эксплантa использовали апексы побегов (размером 8-10 мм) взятые из безвирусного посадочного материала. В результате микроразмножения из одного эксплантa данного сорта было получено 20 и более укорененных растеньиц.

Приживаемость и рост растеньиц во многом зависит от корневого питания, которое можно регулировать путем внесения минеральных и органических удобрений. С целью определения наиболее оптимального удобрения, укорененные in vitro растеньица высотой 9-10 см посадили в цеолит с различными удобрениями (рисунок 5).

Составы каждого удобрения приведены в материалах и методах.

Рисунок 5 – Растения в различных субстратах

Выживаемость растений на разных вариантах показаны в таблице 5. Варианты только на цеолите и цеолит+нитроаммофоска (г/л) по-казали наименьшую выживаемость (73%). Наиболее высокая приживаемость (97%) мик-рорастений винограда

исследуемого сорта

была отмечена на субстратах цеолит+торф (1:1) и цеолит+ кемира Комби (г/л) (NPK). Полученные данные свидетельствуют, что добавление кемира Комби в субстрат для культивирования растений ex vitro обеспечивает более высокий уровень приживаемости.

Таблица 5 – Выживаемость растений, выращенных на цеолите с различными удобрениями

№	Субстрат	Выживаемость
1	Цеолит (контроль)	73%
2	Цеолит+биогумус	90%
3	Цеолит+торф (К+)	97%
4	Цеолит+ кемира (г/л) (NPK)	97%
5	Цеолит+нитроаммофоска (г/л)	73%
6	Цеолит+супрефос (г/л)	87%
7	Цеолит+универсал (г/л)	90%

За время адаптации было отмечено значительное увеличение высоты подземной части растений в варианте цеолит+ кемира Комби (NPK), по сравнению с другими вариантами (см. таблицу 6), после 2-х недель – 4,13±0,4 см, а после 4 недель – 16,06±0,74 см. Минимальный прирост побега было в варианте цеолит: после 2-х недель – 1,27±0,3 см, после 4-х недель – 7,4±1,4 см. В остальных вариантах прирост побега после 4х недель варьировали в пределах 8,3-9,7 см.

Таблица 6 – Прирост побегов через 2 и 4 недели после обработки различными удобрениями

№	Субстрат	Прирост побега через 2 недели после обработки, см	Прирост побега через 4 недели после обработки, см
1	Цеолит (контроль)	1,27±0,3	7,4±1,4
2	Цеолит+биогумус	2,6±0,4	9,5±1,2
3	Цеолит+торф (К+)	2,3±1,1	8,9±0,8

4	Цеолит+ кемира Комби (NPK)	4,13±0,4	16,06±0,74
5	Цеолит+нитроаммофоска (г/л)	2,4±0,83	9,73±1,6
6	Цеолит+супрефос (г/л)	2,24±0,93	8,3±0,6
7	Цеолит+универсал (г/л)	2,46±0,44	9,3±1,04

Проведенное исследование выявило существенное влияние цеолита с различными минераль-ными и органическими удобрениями на рост и развитие растений винограда. Растения, выра-щенные на цеолитах с удобрением кемира Комби (NPK) показали наилучшие результаты. Таким образом, наиболее оптимальная среда, для адаптации микроклонально полученных растений по выживаемости и приросту побегов является цеолит с удобрением Кемира.

Все адаптированные растения были высажены в открытый грунт с капельным орошением в ТОО «Айдарбаев».

Литература

1 Gray D.J., Fischer L.C. In vitro shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars // Proc. Fla. State Hort. Soc. – 1998. – P. 172-174.

2 Galzy R. Technique de la thermotherapy des viruses de la vigne // Ann. Epiphyt. – 1964. – Vol. 15. – P. 245-256.

3 Duran-vila N., Pina J.A., Ballester J.F., Juarez J., Roistacher C.N., Rivera-Bustamante R. Semancik J.S. The citrus exocortis disease: a complex of viroid // Proceedings of the international organization of Citrus Virologists. – 1988. – Vol. 10. – P. 152-164.

4 Robacker C.D., C.J. Chang. Shoot - tip culture of muscadine grape to eliminate Pierce's disease bacteria // Horticultural Science. – 1992. – Vol. 27. – P. 449-450.

5 Kim K. Wetal. Effect of ABA and agar in preventing vertitication of carnation plantlets cultured in vitro // J. of Korean Soc. for Hort. Sci. – 1988. – Vol. 29. – P. 208-215.

6 Bengtson C. Water stress, transpiration, kinetin and ABA // Physiol Plant. – 1979. – Vol. 45. – P. 183-188.

7 Mehers O., Meireson L. et. al. Ethylene production inhibitors can improve in vitro propagation of roses // Meded. Fac. Landbouwensch. Rijksuniv. Gent. – 1984. – Vol. 49. – P. 1139-1144.

8. Bengston C., S. Falk S. Larson. Effects of kinetin on transpiration rate and abscisic acid content of water stressed young wheat leaves // Physiol. Plant. – 1979. – Vol. 45. – P. 183-188.

9. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning // A laboratory manual. – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – Vol. 3

10. Омашева М.Е., Качиева З.С., Копытина Д.А., Касенова А.М., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А., Галиакпа- ров Н.Н. Разработка диагностической тест-системы трех вирусов яблони (ACLSV, ASGV, ASPV) на основе мультиплекс ОТ-ПЦР // Поиск. – 2012. – № 2. – С. 27-34.

11. Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O., Landi L. Genetic transformation of Vitis vinifera via organogenesis // BMC Biotechnology. – 2002. – Vol. 2. – P. 18.

12. Рябушкина Н.А., Жунусова Ж.С., Ерболова Л.С., Берестнева Л.В., Галиакпаров Н.Н. Микроклональное раз-множение перспективных сортов винограда, созданных в Казахстане // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 1. – С. 41-49.

REFERENCES

1 Gray D.J., Fischer L.C. In vitro shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. Proc. Fla. State Hort. Soc. 1998. R. 172-174.

2 Galzy R. Technique de la thermotherapy des viruses de la vigne. Ann. Epiphyt. 1964. Vol. 15. P. 245-256.

3 Duran-vila N., Pina J.A., Ballester J.F., Juarez J., Roistacher C.N., Rivera-Bustamante R. Semancik J.S. The citrus exo-cortis disease: a complex of viroid. Proceedings of the international organization of Citrus Virologists. 1988. Vol. 10. P. 152-164.

4 Robacker C.D., C.J. Chang. Shoot - tip culture of muscadine grape to eliminate Pierce's disease bacteria. Horticultural Science. 1992. Vol. 27. P. 449-450.

5 Kim K. Wetal. Effect of ABA and agar in preventing vertitication of carnation plantlets cultured in vitro. J. of Korean Soc. for Hort. Sci. 1988. Vol. 29. P. 208-215.

6 Bengtson C. Water stress, transpiration, kinetin and ABA. Physiol Plant. 1979. Vol. 45. P. 183-188.

7 Mehers O., Meireson L. et. al. Ethylene production inhibitors can improve in vitro propagation of roses. Meded. Fac. Landbouwensch. Rijksuniv. Gent. 1984. Vol. 49. P. 1139-1144.

8. Bengston C., S. Falk S. Larson. Effects of kinetin on transpiration rate and abscisic acid content of water stressed young wheat leaves. Physiol. Plant. 1979. Vol. 45. P. 183-188.

9. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. Vol. 3

10. Omasheva M.E., Kachieva Z.S., Kopytina D.A., Kasenova A.M., Aubakirova K.P., Rjabushkina N.A., Galiakparov N.N. Razrabotka diagnosticheskoj test-sistemy treh virusov jabloni (ACLSV, ASGV, ASPV) na osnove mul'tipleks OT-PCR. Poisk. 2012. № 2. S. 27-34.

11. Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O., Landi L. Genetic transformation of Vitis vinifera via organogenesis. BMC Biotechnology. 2002. Vol. 2. P. 18.

12. Rjabushkina N.A., Zhunusova Zh.C., Erbolova L.S., Berestneva L.V., Galiakparov N.N. Mikroklonal'noe razmnozhenie perspektivnyh sortov vinograda, sozdannyh v Kazahstane. Biotehnologija. Teorija i praktika. 2012. № 1. S. 41-49.

Резюме

Л. С. Ерболова1,2, Д. А. Копытина1, А. М. Қасенова1, Н. А. Рябушкина1,

Г. А. Кәмпитова2, С. Н. Олейченко2, Н. Н. Ғалиақпаров1

(1ҚР БҒМ ҒК «Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты» РМК,

Алматы, Қазақстан Республикасы,

2(«Қазақ ұлттық аграрлық университеті» РМК, Алматы, Қазақстан Республикасы)

In vitro-дан алынған жүзімнің Vitis vinifera L. Saperavi сортының вируссыз

көшет материалдарын ex vitro жағдайына бейімдеу

Зерттеу объектісі жүзімнің Vitis vinifera L. түрінің Saperavi сорты. Тәжірибенің бірінші бөлімінде барлық алғашқы көшет материалдары жүзімнің қауіпті вирустарының (жүзімнің қысқа буынаралық вирусы (ЖҚБВ), жүзімнің жапырақтарының жиырылу вирусы (ЖЖЖВ), жүзімнің А вирусы (ЖАВ)) бар болуына кері транс-крипция және мультиплекс ПТР негізінде тестіленеді. Тәжірибенің екінші бөлімінде жүзімнің вируссыз кө-шет материалдары меристеманы инициациалау (МИ) қоректік ортасында микроклонды көбейтілді. Микро-клонды көбейту нәтижесінде бір эксплантан 20 және одан да көп тамырланған өсімдіктер алынды. Тәжірибенің үшінші бөлімінде барлық микроклонды көбейтілген өсімдіктер ex vitro жағдайына бейімделді. Өсімдіктердің in vitro-дан ex vitro-ға бейімделуіне әртүрлі субстраттар мен минералдық тыңайтқыштардың әсері және in vitro кезеңінде жартылай бейімдеу мүмкіндігі көрсетілді. Жүзім өсімдігі цеолит және цеолит+нитроаммофоска варианттарында ең аз ұласып өсуі көрсетілді (73%). Өсімдіктер бұл варианттарда ex vitro-ға көшірілгеннен соң 5-6 күннен кейін өліп қалды. Зерттелген сортта ең жоғарғы ұласып өсу (97%) цеолит+торф (1:1) және цеолит+ кемира Комби (г/л)

(NPK) варианттарында байқалды. 4 апталық бейімделу кезеңінен кейін басқа варианттармен салыстырғанда цеолит+ кемира Комби (NPK) вариантында өсімдік-тердің бойының өсуі байқалды, 2 аптадан кейін – 4,13±0,4 см, 4 аптадан кейін 16,06±0,74 см. Өсімдіктің сабағының ең аз өсу көрсеткіші цеолит вариантында байқалды: 2 аптадан кейін 1,27±0,3 см, 4 аптадан кейін 7,4±1,4 см. Басқа варианттарда сабақтың өсуі 4 аптадан кейін 8,3-9,7 см. аралығында болды. Жүргізілген тәжірибе цеолиттің әртүрлі минералдық тыңайтқыштармен қосындысы жүзім өсімдігінің бейімделуіне елеулі ықпал ететінін айқындады. Алынған нәтижелер цеолитке кемира комби қосу өсімдіктердің ex vitro жағ-дайына жоғары деңгейде бейімделуін қамтамасыз ететіндігін айғақтайды.

Тірек сөздер: Vitis vinifera L., вирус, тыңайтқыш, субстрат, өркен ұшы, бейімделу.

Summary

L. S. Yerbolova1,2, D. A. Kopytina1, A. M. Kassenova1, N. A. Ryabushkina1,

G. A. Kampitova2, S. N. Oleichenko2, N. N. Galiakparov1

(1RSE «Institute of Plant Biology and Biotechnology» SC MES RK, Almaty, Republic of Kazakhstan,

2RSE «Kazakh National Agrarian University», Almaty, Republic of Kazakhstan)

From in vitro to ex vitro virus-free grapevine plant material

(Vitis vinifera L. cv. Saperavi) adaptation

The object of study is Vitis vinifera L. cv. Saperavi. As the first part of experiment, all the original plant material was tested for the presence of highly dangerous grapevine viruses (grapevine leaf roll viruses (GLRV), grapevine fanleaf viruses (GFLV), grapevine virus A (GVA) with multiplex RT-PCR. Then virus-free plant materials were micropropagated by shoot apex on the medium of initiation meristematic balk IM. A result of micropropagation from one explant was obtained up to 20 and more rooted plantlets. As the final part of the experiment, all micropropagated plantlets were adapted to the ex vitro conditions. The effect of different substrates and fertilizers on adaptation of plantlets ex vitro and the possibility of partial adaptation of plantlets at the stage of in vitro was shown. The grapevine plantlets on the zeolite and zeolite + nitroammophoska (NPK) (g/L) showed the lowest survival (73%). In these variants some of plants died within 5-6 days after transplanting to ex vitro. The highest survival rate (97%) of the test variety was marked on the substrates of zeolite + peat (1:1) and zeolite + Kemira Combi (NPK). Within 4 weeks adaptation showed an increase of plant height in zeolite+Kemira Combi (NPK) compared to the other variants, after 2 weeks - 4,13±0,4 cm, after

4 weeks - 16,06±0,74 cm. The minimum growth of shoots was in a variant of zeolite: after 2 weeks-1, 27±0,3cm, after 4 weeks-7, 4±1, 4 cm. In other variants the growth of shoots after 4 weeks ranged from 8,3 to 9,7 cm. The study revealed a significant effect the combination of zeolite with different fertilizers on the adaptation of grapevine plants. The obtained data indicate that the addition of Kemira Combi to zeolite for the cultivation of grapevines in ex vitro provides a higher level of adaptation.

Keywords: Vitis vinifera L., virus, fertilizer, substratum, shoot apex, adaptation.

Поступила 04.06.2013 г.