

## **АННОТАЦИЯ**

**диссертационной работы Хасейн Алтын  
на тему «Технология оздоровления и выращивания сортов винограда на  
основе методов *in vitro*», представленной на соискание степени доктора  
философии (PhD) по образовательной программе 8D08104 –  
«Защита и карантин растений»**

**Актуальность темы исследования.** Вирусные инфекции винограда являются одним из ключевых ограничивающих факторов устойчивого развития виноградарства, поскольку приводят к снижению продуктивности насаждений, ухудшению качества урожая и сокращению срока хозяйственной эксплуатации растений. Особая опасность вирусных заболеваний обусловлена тем, что виноград преимущественно размножается вегетативно, вследствие чего вирусные патогены сохраняются и накапливаются в растительном материале, а также распространяются при использовании заражённых саженцев и маточных растений.

Исторически виноградарство в Республике Казахстан имело сформированную производственную базу, однако в последующие годы отрасль характеризовалась сокращением площадей насаждений и ослаблением системы специализированного питомниководства. В настоящее время наблюдается восстановление интереса к закладке новых виноградников и обновлению сортимента, что требует формирования устойчивой системы обеспечения отрасли качественным посадочным материалом с гарантированным фитосанитарным статусом.

Одним из основных факторов, сдерживающих развитие отрасли в Казахстане, является дефицит высококачественного посадочного материала с низкой вирусной нагрузкой. В связи с этим саженцы преимущественно импортируются из стран Европейского Союза, России и Китая. Однако многие завозимые сорта плодово-ягодных культур недостаточно адаптированы к почвенно-климатическим условиям Казахстана и могут служить источником заноса опасных заболеваний. В настоящее время известно более 600 видов фитопатогенных вирусов и бактерий, при этом продолжают выявляться новые формы патогенов. Одним из примеров является бактериальный ожог, распространение которого в республике было связано с импортируемым посадочным материалом. С момента первой регистрации данного заболевания площадь поражения плодовых культур в течение последующих семи лет увеличилась в 40 раз. Сложившаяся ситуация во многом обусловлена недостаточным развитием современных питомниководческих хозяйств, обеспечивающих производство качественного и оздоровленного посадочного материала.

Современные биотехнологические подходы, основанные на методах культуры тканей и клеток растений, позволяют эффективно решать задачи оздоровления и ускоренного размножения хозяйственно ценных сортов. Наиболее результативными направлениями считаются получение регенерантов

из апикальных меристем, применение термо- и химиотерапии в условиях *in vitro*, а также микроклональное размножение оздоровленных растений с последующим контролем их фитосанитарного статуса с использованием серологических и молекулярных методов. Внедрение подобных технологий обеспечивает получение стандартизированного вирус-свободного посадочного материала и снижает риск распространения вирусных патогенов при закладке промышленных насаждений.

В связи с этим актуальной задачей является проведение молекулярной диагностики фитосанитарного состояния растений, установление путей проникновения выявленных вирусов на территорию страны, оздоровление растений методами *in vitro*, а также оптимизация протоколов микроклонального размножения и адаптации микрорастений к условиям *ex vitro* позволяют получать жизнеспособный безвирусный посадочный материал. Полученные результаты создают научно-практическую основу для восстановления и дальнейшего развития отечественного виноградного питомниководства.

**Цель исследования** - оценка фитосанитарного состояния исследуемых сортов винограда с использованием молекулярных методов, определение путей проникновения выявленных вирусов на территорию страны, оздоровление растений на основе методов *in vitro*, введение растений в культуру *in vitro*, оптимизация протоколов микроклонального размножения и адаптации микрорастений к условиям *ex vitro* с целью получения жизнеспособных, оздоровленных саженцев винограда.

**Задачи исследования:**

- проведение диагностики вирусных инфекций в исходных растениях исследуемых сортов винограда с использованием методов ИФА (ELISA) и ПЦР.

- проведение филогенетического анализа основных вирусов винограда с целью определения путей проникновения патогенов на территорию Казахстана и оценки их генетического разнообразия.

- сравнить эффективность методов оздоровления винограда от вирусов на основе *in vitro* подходов: культура апикальной меристемы, термотерапия, химиотерапия (включая их сочетания), по показателям: выход жизнеспособных регенерантов и доля вирус-негативных растений.

- подтвердить фитосанитарный статус полученных регенерантов после оздоровления методом ИФА и ПЦР, сформировать выборку оздоровленного материала для дальнейшего размножения.

- оптимизировать протокол введения в культуру *in vitro* (стерилизация, инициация, условия культивирования) для получения первичных регенерантов для исследуемых сортов.

- оптимизировать протоколы микроклонального размножения растений с пониженной вирусной нагрузкой на основе подбора типа и концентрации фитогормонов (гиббереллинов и цитокининов) и определить режимы, обеспечивающие максимальный коэффициент размножения и нормальный морфогенез.

- оценить схему адаптации *ex vitro* микрорастений винограда и определить условия, обеспечивающие высокую приживаемость, сохранение роста и формирование физиологически полноценного растения в защищённом грунте.

**Методы исследования.** В исследовательской работе были использованы методы культивирования клеток и тканей, микроклонального размножения растений *in vitro*, выращивания апикальной меристемы (меристемной культуры), а также термотерапии, химиотерапии и методы молекулярной биологии.

**Основные положения (научно доказанные гипотезы и другие выводы, представляющие собой новые знания), выносимые на защиту:**

Проведена оценка вирусной нагрузки (заражённости) исходного растительного материала винограда методом ИФА и ПЦР по основным экономически значимым вирусам.

Проведен филогенетический анализ основных вирусов винограда с целью установления путей проникновения патогенов на территорию Республики Казахстан и оценки их генетического разнообразия.

Экспериментально установлена сравнительная эффективность комплекса *in vitro* методов оздоровления винограда (культура апикальной меристемы, термотерапия, химиотерапия и их сочетания) по показателям получения жизнеспособных регенерантов и снижения вирусной нагрузки, подтверждённой ИФА и ПЦР.

Оптимизированы протоколы введения в культуру *in vitro* и регенерации растений винограда, обеспечивающие стабильное получение первичных регенерантов, пригодных для последующего клонального размножения.

Оптимизированы протоколы микроклонального размножения регенерантов с пониженной вирусной нагрузкой на основе подбора сочетаний и концентраций фитогормонов (гибберелинов и цитокининов), обеспечивающие повышение коэффициента размножения и стабилизацию морфогенеза.

Оптимизированы способы адаптации *ex vitro* микрорастений винограда, обеспечивающие высокую приживаемость и формирование физиологически полноценных растений в условиях защищённого грунта.

**Описание основных результатов исследования.** В ходе исследования проведена оценка вирусной нагрузки исходных растений винограда, культивируемых в различных регионах, методом ИФА и ПЦР. Установлено наличие вирусных патогенов в исходном растительном материале винограда, что свидетельствует о высоком фитосанитарном риске и подтверждает необходимость разработки научно обоснованной технологии оздоровления и получения вирус-свободного посадочного материала для предотвращения распространения инфекции при размножении и закладке новых насаждений.

С целью оздоровления растений от вирусных заболеваний оптимизирован комплекс *in vitro* методов, включающий культуру апикальных меристем, термотерапию и химиотерапию, а также проведена сравнительная оценка их эффективности. После оздоровительных мероприятий регенерантные растения были повторно протестированы методом ИФА и ПЦР, по результатам чего выделены растения, полностью либо частично освобождённые от вирусных патогенов.

Оптимизирована технология получения *in vitro* - культур 15 сортов винограда и разработан протокол получения первичных регенерантных растений, характеризующихся сниженной вирусной нагрузкой и пригодных для последующего микроклонального размножения. На основе подбора концентраций и сочетаний фитогормонов (гибберелинов и цитокининов) определены наиболее эффективные способы микроклонального размножения оздоровленных регенерантов, обеспечивающие повышение коэффициента размножения и стабилизацию процессов морфогенеза.

Выявлены оптимальные условия адаптации микрорастений винограда, полученных *in vitro*, к условиям защищённого грунта (*ex vitro*), обеспечивающие высокую приживаемость и формирование физиологически полноценных растений.

Диссертационная работа посвящена разработке, научному обоснованию и оптимизации биотехнологических подходов на основе *in vitro*-технологий, направленных на оздоровление растений винограда (*Vitis vinifera* L.) от вирусных инфекций. В ходе исследования проведена молекулярная диагностика исходного растительного материала 15 сортов винограда - Победа, Ризамат, Гузал кара, Асия, Байконур, Медеу, Айсулу, Алма-Ата, Кара коз, Кызыл тан, Алиса, Аркадия, Виктория, Багровый и Алёшенькин - на наличие вирусных инфекций. Для идентифицированных вирусов осуществлён филогенетический анализ, результаты которого позволили оценить их генетическое разнообразие и установить вероятные пути проникновения патогенов на территорию Республики Казахстан. Проведена сравнительная оценка эффективности методов оздоровления, а также оптимизированы протоколы получения регенерантных растений и их последующего микроклонального размножения. Отдельное внимание уделено адаптации оздоровленных микрорастений к условиям *ex vitro* (защищённого грунта) для получения жизнеспособного посадочного материала, пригодного для дальнейшего использования в питомниководстве.

**Обоснование новизны и практическая значимость полученных результатов.**

**Научная новизна исследований.** Научная новизна работы заключается в выявлении впервые на территории Казахстана вируса кустистой карликовости малины (Raspberry bushy dwarf virus, RBDV) у сорта винограда, а также в установлении и экспериментальном обосновании эффективных режимов оздоровления данного сорта от RBDV на основе применения культуры апикальной меристемы в сочетании с термо- и химиотерапией. Впервые для исследуемых сортов винограда в условиях *in vitro* установлены генотипические особенности реакции на воздействие 6-бензиламинопурина (6-БАП) и определены его оптимальные концентрации, обеспечивающие высокий регенерационный потенциал эксплантов и снижению интенсивности каллусогенеза.

**Практическая значимость исследования.** Полученные результаты и оптимизированная комплексная технология получения безвирусных саженцев винограда (диагностика, оздоровление, микроклональное размножение *in vitro* и

адаптация *ex vitro*) могут быть внедрены в практику питомниководческих хозяйств и специализированных лабораторий для производства стандартного оздоровленного посадочного материала, предназначенного для закладки маточников и промышленных насаждений. Использование регенерантных саженцев, оздоровленных от вирусных заболеваний с помощью биотехнологических методов, позволяет повысить фитосанитарное качество посадочного материала, снизить риск распространения вирусных инфекций и способствовать устойчивому развитию виноградарства в Республике Казахстан.

**Соответствие направлениям развития науки или государственным программам.** Диссертационная работа выполнена в рамках реализации программно-целевого финансирования по проекту BR21881942 «Разработка биотехнологических подходов для контроля фитопатогенов с целью повышения продуктивности сельскохозяйственных культур» (2023–2025 гг.).

**Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации.**

Автором самостоятельно определены цель, задачи, объект и методические подходы исследования. Выполнены организация и проведение экспериментов по оздоровлению растений винограда *in vitro* с использованием культуры апикальной меристемы, термо- и химиотерапии, а также контроль фитосанитарного статуса регенерантов методами ИФА и ПЦР. Оптимизированы протоколы введения в культуру *in vitro*, микрклонального размножения и адаптации оздоровленных растений *ex vitro*. Автором проведены обработка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы и практические рекомендации. Подготовка текста диссертации, оформление результатов и публикаций по теме исследования выполнены лично автором.

*Публикация результатов диссертации.* По итогам проведённого научного исследования опубликовано 6 научных трудов, в том числе: 1 статья в журнале, входящем в базу данных Scopus с квартильным индексом Q3 (37%), 3 статьи в научных журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования при Министерстве науки и высшего образования Республики Казахстан, 2 публикации в материалах международных научных конференций. h - индекс автора -1.

**Объём и структура диссертации.** Общий объём диссертации составляет 139 страницы. Диссертация состоит из введения, 4 разделов, заключения и рекомендаций для производства. В работе представлено 43 рисунка, 14 таблиц, 6 приложений. Список использованной литературы включает 235 наименований трудов отечественных и зарубежных исследователей.