

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ IN VITRO НОВЫХ СОРТОВ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

Н.Л. Адаев,

*зав. кафедрой агротехнологии
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет»,
главный научный сотрудник отдела «Селекция и семеноводство»
ФГБНУ «Чеченский НИИСХ»,
г. Грозный, Чеченская республика, Российская Федерация*

А.С. Магомадов,

*д.с.-х.н., директор Агротехнологического института
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет»,
г. Грозный, Чеченская Республика, Российская Федерация*

А.Г. Амаева,

*доцент кафедры агротехнологии
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет»,
г. Грозный, Чеченская Республика, Российская Федерация*

А.Х. Занилов,

*зав. кафедрой трансфера инновационных технологий в АПК
ФГБОУ ДПО «Федеральный центр сельскохозяйственного консультирования
и переподготовки кадров АПК», МО, г.Сергиев-Посадский, Российская Федерация*

М.Х. Хамзатова,

*старший преподаватель кафедры агротехнологии
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет»,
г. Грозный, Чеченская Республика, Российская Федерация*

Аннотация. *Нормальная жизнедеятельность растительного организма, находящегося в условиях In vitro зависит от множества факторов - освещенности, температуры, состава питательной среды и пр. Каждая культура на различных этапах размножения требует особого режима произрастания. Различия в отзывчивости растений на факторы произрастания отмечаются и внутри одного вида. Каждый сорт так же требует учета их биологических особенностей, вследствие чего практически невозможно создать универсальные условия произрастания растений в культуре in vitro. Следовательно, научно-практическая значимость проводимых исследований по усовершенствованию методов микрклонального размножения продолжает сохранять свою актуальность.*

Ключевые слова: *питательная среда, in vitro, земляника, Мурасиге-Скуга.*

NUTRIENT OPTIMIZATION FOR CLONAL MICROSCRIPTION IN VITRO NEW VARIETIES OF BERRY CROPS

N.L. Adaev,

*head of agricultural department of the Chechen State University, Main Reseach
officer of the department of selective breeding and seed growing, Grozny*

A.N. Magomadov,

*doctor of agricultural sciences, head of agricultural institute of the
Chechen State University*

A.G. Amaeva,

associate professor of agrotechnology department the Chechen state university

A.H. Zanilov,

*head of the transfer of informative technologies department of industrial agroculture, Federal State
of agricultural consulting and retraining personnel of industrial agroculture, Sergiev Posadskiy*

M.H. Hamzatova,

Abstract. *The normal vital activity of a plant organism in vitro depends on many factors - illumination, temperature, composition of the nutrient medium, etc. Each culture at different stages of reproduction requires a special growth mode. Differences in plant responsiveness to growth factors are also observed within the same species. Each variety also requires consideration of their biological characteristics, as a result of which it is practically impossible to create universal conditions for the growth of plants in vitro. Therefore, the scientific and practical significance of ongoing research to improve the methods of microclonal reproduction continues to remain relevant.*

Keywords: *nutrient medium, in vitro, wild strawberry, Murashige-Skoog.*

Научный подход для решения поставленных задач с целью оптимизации основных этапов микроклонального размножения и питательных сред по минеральному, витаминному и гормональному составу предполагает проведение:

- широкого обзора литературных данных в области прикладной биотехнологии растений;

- внесение аргументированных предложений по усовершенствованию этапов размножения и модификации питательных сред на основе анализа имеющихся литературных данных и практического опыта;

- проведение экспериментальной работы с целью тестирования оптимизированных решений и оценки эффективности в практических условиях.

Для каждого этапа микроклонального размножения отмечаются свойственные им проблемы, решение которых требует перманентного усовершенствования методов. Первым этапом в биотехнологии растений, в процессе которого преследуется цель получения свободного от патогенов генетического растительного материала, является стерилизация растительных объектов. Полная стерильность первичного растительного материала - важнейшее требование дальнейшего развития эксплантов в культуре *in vitro*.

Эффективность введения в культуру зависит от многих факторов, наиболее важные из которых: тип стерилизующего вещества и время обработки; видовые и сортовые особенности растений; тип используемого экспланта; возраст и качество растительного материала; сезон проведения работ [1].

На этапе отбора растений-доноров отмечается высокая степень их инфицированности вирусными и бактериальными заболеваниями. Процесс стерилизации на этапе отбора растения-донора происходит непосредственно перед вычлениением меристемной клетки с использованием сильного стерилизующего агента, что может снижать жизнеспособность экспланта. Для предварительной стерилизации часто применяют 70% этиловый спирт, промывая в нем стерилизуемый материал (до 5 минут, в зависимости от материала). Для стерилизации растительных тканей перекисью водорода обычно используют её 10% раствор в воде.

Гипохлорит кальция (хлорная известь) применяют в виде 5–7-процентного раствора для обработки почек, завязей, цветков, семян, побегов в течение 5–8 минут. Гипохлорит натрия используют в виде 0,5-5-процентного раствора для обработки любых эксплантов в течение 1–20 минут. Время стерилизации и концентрацию подбирают экспериментально для каждого объекта. Хлорамин применяют в концентрации 1–6 %. Пыльники и молодые зародыши обычно обрабатывают в течение 1–3 минут, сухие семена — 30-60 минут, затем промывают стерильной дистиллированной водой 2–3 раза.

Для решения этой проблемы предлагается следующее. Процесс микроклонального размножения основан на создании генетически идентичных исходному экземпляру растений. В связи с этим успех в деле получения безвирусного посадочного материала с максимально благоприятными характеристиками, такими как высокая энергия роста, стрессоустойчивость и др., прямо зависит от состояния растения-донора.

На этапе отбора растений предлагается проводить предварительную обработку растений в лечебно-профилактических целях антивирусным препаратом, разработанным

специалистами Новосибирского государственного аграрного университета - Фитовирином. Продукт, представляющий собой органическую белковую, биотехнологическую конструкцию, обладающую свойствами фермента, действует непосредственно на ДНК/РНК вирусов гидролизуя их, тем самым предотвращая дальнейшее действие, в том числе распространение. Фермент полностью расходуется на разрезание ДНК и РНК вируса, не оставляя следов в растениях и плодах. Фитовирин используется исходя из расчета 67 тыс. активных единиц на 1 литр рабочего раствора. Повторность обработок - 4-кратная, с интервалом в 4 дня. Поле четвертой обработки вирус в растениях не обнаруживается. Следующим шагом является обработка обеззараженных растений стимулирующими рост и развитие комплексом гуминовых и фульвокислот – лигногуматом. Расход: 0,5 гр. на 1 литр рабочего раствора. Данный прием приведет к повышению генетической ценности отобранного для микроклонального размножения материала и получению хорошо растущей стерильной культуры. Дальнейшая стерилизация, необходимая непосредственно перед отбором клетки, может быть произведена с использованием минимальных концентраций и минимальной продолжительности по времени из допущенных интервалов.

Одной из общепринятых процедур стерилизации растительного материала земляники перед отбором генетического материала является использование стерилизующего материала с содержанием активного хлора 3%. Продолжительность стерилизации составляет 15-20 минут. Все это время емкость находится на шейкере. Предварительное полное оздоровление растительного организма противовирусным препаратом позволило нам получить стерильные экспланты, снизив при этом негативное действие стерилизующего агента. Концентрация активного хлора составила 1,5% при продолжительности воздействия 5 минут.

Микроразмножение. На данном этапе решаются две основные задачи: получение стабильно растущих клонов, устойчивых к образованию вторичных метаболитов и получение максимального числа генетически идентичных оригинальному растению клонов.

Если на этапе ввода в культуру апексы земляники не требовательны к составу питательной среды [2], то на данном этапе способность генотипа к микроразмножению, количественный показатель которого называется коэффициентом микроклонального размножения, зависит от типа и концентрации регулятора роста, введенного в питательную среду. Наиболее распространенными в биотехнологии растений являются три группы фитогормонов - ауксины, цитокинины и АКБ [3].

Цитокинины обладают уникальной особенностью, так как включают целую группу веществ, большинство из которых способны легко превращаться друг в друга. Многие из соединений данного класса гормонов обладают активностью, характерной для цитокининов (способность стимулировать деление клеток и формирование побега в культуре тканей, активировать синтез хлорофилла и задерживать его распад, поддерживать устьица в открытом состоянии, стимулировать ветвление и т.д.). [10]. В качестве цитокинина, повышающего пролиферацию растительных тканей в традиционных средах для размножения, используется 6-бензиламинопуриин (6-БАП) в дозе 0,5 мг/л.

Но использование цитокининов может сопровождаться негативными последствиями, в частности, нарушением оптимального баланса массы надземной и подземной частей растений [4].

Решение проблемы повышения коэффициента микроклонального размножения в работе происходит за счет оптимизации в первую очередь гормонального состава питательной среды, которая достигается как прямым включением заданной концентрации выбранного гормона, так и опосредованно через создание условий для его образования в растительном организме в процессе жизнедеятельности. Так, известно, что дефицит цитокининов приводит к смещению оптимального баланса между объемом надземной и подземной частей растений. В большей степени задерживается рост побега и активизируется рост корней. Это позволяет рассматривать цитокинины как "отрицательный" регулятор (ингибитор) роста корней. Следовательно, повышение 6-БАП в питательном растворе может привести еще к одному

негативному эффекту - снижению синтеза цитокининов естественным путем, основная часть которого синтезируется в корневой части. [4]. Но учитывая, что на этапе микроразмножения цитокинин необходим для увеличения выхода микрочеренков, важно подобрать оптимальную его концентрацию.

В проведенной экспериментальной работе предложено снизить концентрацию 6-БАП с общепринятой нормы 0,5 мг/л, до 0,25 мг/л. При этом часть цитокининов будет продуцироваться корневой системой.

Изменение минерального состава питательной среды с целью ее оптимизации связано также с созданием условий саморегуляции гормонального фона в растительном организме. Учитывая то, что сложно предположить, в какие сопутствующие гормоны могут трансформироваться цитокинины, мы создали условия для их образования в растениях естественным путем, в том числе посредством замены хлоридной формы кальция на нитратную, так как считается, что нитраты усиливают синтез цитокининов в корнях, которые затем поступают в побеги [11].

Количество микропобегов возможно достичь так же за счет повышения концентрации железа в питательной среде. Имеются данные, свидетельствующие об увеличении микропобегов при повышении концентрации хелата железа в 2 раза [5].

Оптимизация гормонального состава питательной среды по ауксину ИУК подразумевает включение его в концентрации 0,2 мг/л с незначительным снижением содержания углеводного компонента (сахароза) с 30 г/л до 25 г/л с одновременным насыщением питательного раствора углекислым газом.

Ауксин является одним из важнейших гормонов высших растений. Он активирует деление и растяжение клеток, необходим для формирования сосудов и боковых корней. Полярный транспорт ИУК обуславливает явление апикального доминирования и обеспечивает разметку и дифференцировку тканей в ходе онто- и морфогенеза. Из всех фитогормонов, только для активных ауксинов характерно ярко выраженное полярное передвижение по тканям. Наибольшее количество ауксина в растениях находится в конъюгированной, неактивной форме. Ауксины конъюгируют с углеводсодержащими веществами, в частности глюкозой и др. [4]. Предложенный комплекс нацелен с одной стороны на повышение содержания активных форм ауксинов посредством снижения углеводного компонента, с одновременной компенсацией углерода в питательной среде за счет включения в нее углекислого газа.

Включение в питательную среду углекислоты из расчета происходит из расчета 50 мг CO₂ на 1 литр питательной среды. Несмотря на то, что данный метод разработан для усовершенствования углеродного питания овощей защищенного грунта, эффективность самого механизма обогащения углекислотой при наличии достаточного количества фотосинтетически активной радиации (ФАР) демонстрирует универсальность, в том числе в системе микрклонального размножения по методу *in vitro*. В ходе природных фотосинтетических реакций энергия фотонов света возбуждает в молекулах хлорофилла растений атомы магния (Mg) и в клетках растений происходит взаимодействие углекислого газа с водой, в результате чего синтезируются простейшие моносахариды CH₂, которые используются для энергетического обмена в растениях и формирования клетчатки растений [6].

Авторами патента предлагается окислять воду углекислым газом и получать раствор первичных сахаров вне растения, используя для этого энергию кратковременного повышения давления и возникающих при прохождении раствора углекислого газа в воде через напорный насос кавитационных эффектов как эквивалента энергетического воздействия светового фотона на реакции фотосинтеза, проходящие в молекулах хлорофилла в растениях [7].

Адаптация и укоренение микрочеренков. На данном этапе микрклонального размножения рекомендуется использование обедненных питательных сред. При укоренении плодовых и ягодных культур используется 50% концентрации солей макроэлементов и углеводного компонента питательной среды на основе Мурасиге-Скуга. Адаптация

микрорастений на основе обедненных сред является переходным этапом для их переноса в нестерильные условия. Эффект укоренения может быть повышен и при уменьшении в питательной среде концентрации минеральных солей до 4-х раз. [8].

Важным элементом, повышающим устойчивость растений к изменившимся условиям, является включение в питательную среду витаминов: никотиновой кислоты (0,5 мг/л), пиридоксина (0,5 мг/л), тиамин (0,4 мг/л), а также включение регулятора роста ИМК в концентрации 0,5-2,0 мг/л, в зависимости от видовых и сортовых особенностей [1].

Повышение концентрации ИМК до 1 мг/л в среде укоренения способствовало повышению процента адаптации и более активному росту побегов в теплице, чем у клонов, укорененных на низких концентрациях ауксина. С высокой частотой, до 75–100 %, к нестерильным условиям адаптировались многие виды и сорта земляники, ежевики, малины, малино-ежевичных гибридов [5]. Во избежание дальнейшей пролиферации из питательной среды исключается цитокинин. В такой среде формируется нормальное растение с корнями и листьями в течение 4-6 недель. [9].

В проведенной работе предложено сохранение стандартной концентрации пиридоксина, повышение тиамин до 1,0 мг/л и включение ИМК с целью ускорения развития корней в концентрации 1,0 мг/л. Растение готово к пересадке в субстрат при достижении 2 см в высоту, с корневой системой не менее 2 см. Не рекомендуется задерживать растения в стерильной культуре, так как это отрицательно сказывается на приживаемости и дальнейшем росте регенерантов.

Доращивание. Высадка регенерантов происходит в пикировочные ящики с субстратом, обладающим большой влагоемкостью и воздухопроницаемостью. Рекомендуется использование торфа, песка и перлита в соотношении 1:1:1. Предварительная стерилизация субстрата заключается в термической обработке в течение 2 ч при температуре 85-90°C. На данном этапе растения наиболее чувствительны к переменам. Требуется подбор режимов внешних факторов под определенные сорта. Кроме этого, растения сильно уязвимы по отношению к имеющимся в открытой среде патогенам, а так же переносчикам вирусных заболеваний, присутствие которых может существенно повысить степень инфицированности растений.

На этапе укоренения в тепличных условиях до стандартных размеров с целью дальнейшей высадки в поле или реализации важное значение имеет качественно организованные агротехнические мероприятия по защите растений от переносчиков вирусных заболеваний и ограничения распространения бактериальной и грибной инфекций. Разработка интегрированной системы защиты должна в себя включать не только химические средства, но и двухуровневую систему защиты биологическими пестицидами. Она достигается сочетанием биофунгицидных и биоконтрольных средств защиты растений. В качестве биофунгицидных средств используются клетки и метаболиты бактерий рода *Bacillus subtilis* D-26 и Ч-13, а также коммерческий продукт Фитолавин на основе актиномицетов, продуцирующих природные антибиотики. Комплекс освобождает околокорневую зону культивируемых растений от почвенных патогенов. Вторым этапом в эту зону вносятся средства с биоконтрольными функциями – грибы рода *Trichoderma harzianum* и бактерии рода *Pseudomonas Asplenii*. Бактериально-грибной комплекс, полностью занимая экологическую нишу в ранее очищенной зоне, ограничивает развитие патогенной флоры за счет создания высокого конкурентного фона агрономически ценными группами микроорганизмов.

Оптимизации по минеральному, гормональному и витаминному составу питательных сред земляники были подвержены среды, используемые на двух этапах: на этапе микроклонального размножения и на этапе адаптации. На этапе ввода растений в культуру *in vitro* использовалась общепринятая питательная среда МС, так как считается, что на данном этапе апексы земляники не требовательны к составу питательной среды [2]. В связи с этим на процент выхода оздоровленных эксплантов влияет качество стерилизации растения-донора.

Состав питательной среды МС (Мурасиге-Скуга) на этапе ввода растений в культуру *in vitro*.

Состав	Мурасиге и Скуга, мг/л	Состав	Мурасиге и Скуга, мг/л
NH ₄ NO ₃	1650	К У	0,83
KNO ₃	1900	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O г/л	-
CaCL ₂ *2H ₂ O	440	NaH ₂ PO ₄	-
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	Na ₂ SO ₄	-
KH ₂ PO ₄	170	Сахароза, г/л	30
H ₃ BO ₃	6,2	Глюкоза г/л	-
MnSO ₄ *4H ₂ O	22,3	Тиамин	0,5
CoCL ₂ *6H ₂ O	0,025	Никотиновая к-та	-
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	Пиридоксин	0,5
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	Глицин	-
NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,25	Инозит	100
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8	Агар, г/л	5-8
Na ₂ EDTA	37,3		

Основным параметром на данном этапе является выход жизнеспособных оздоровленных эксплантов, способных проявлять высокий регенерационный потенциал. Для клонального размножения пригодны все меристематические ткани, характеризующиеся высокой метаболической активностью. Утвержденных единых стандартов (ГОСТ) по размеру отобранных эксплантов в биотехнологии растений не существует. Но при этом достоверно установлено и общепринято, что от размера экспланта (его параметр) зависят сопутствующие критерии - его приживаемость, чистота от вирусных болезней [9] и общий бонитет экспланта.

Чем меньше эксплант (0,1-0,2 мм), тем выше процент выхода свободных от вирусов образцов. Но при этом процент приживаемости существенно снижается и не превышает 10%. Следовательно, на этапе ввода в культуру *in vitro* весь процесс подготовки растительного материала концентрируется на подготовке растения-донора к отбору генетического материала. Повышение доли приживаемости достигается увеличением размера экспланта до 0,5 мм, а выход безвирусных образцов достигается методом, при котором происходит освобождение растения-донора от вирусной инфекции посредством обработки вегетирующего растения антивирусным препаратом.

На критерий жизнеспособности экспланта часто влияет выбранный способ стерилизации донорного участка. Работа должна быть направлена на снижение негативного действия стерилизующего вещества, посредством возможного снижения его концентрации и продолжительности воздействия. Негативное действие заключается в угнетении полиферации и регенерации ткани растения. Поэтому важным элементом технологии является предварительная подготовка растения-донора к отбору. В некоторых случаях в питательную среду добавляются антибиотики, которые могут оказывать негативное действие на развитие экспланта. Нами предлагается проведение обработки вегетирующего растения антибактериальным и биофунгицидным препаратом на основе природных антибиотиков - продуцентов актиномицетов, входящих в состав препарата.

Критерием эффективности проведенной операции по вычленению меристемы земляники и вводу ее в культуру *in vitro*, помимо чистоты от вирусов, является размер, которого достигает эксплант к началу первого пассажа. Его диаметр должен достигать 5 мм.

Мультипликация. Значительной трансформации с целью оптимизации подвергается питательная среда, используемая на этапе мультипликации растений.

Углеводсодержащие вещества, являясь одним из важнейших компонентов питательных сред, являются также субстанцией, с которыми ауксины образуют конъюгаты, что в свою очередь снижает долю активных форм ауксинов, необходимых для полноценного развития растительного организма.

Причина снижения концентрации цитокинина 6-БАП со стандартных 0,5 мг/л до 0,25 мг/л связано с необходимостью создания условий по продуцированию цитокининов самим растительным организмом. Местом его образования является корневая система. Так как известно, что цитокинины угнетают развитие корневой системы, данный прием является необходимым. Увеличение нитратных форм азота в питательной среде, по имеющимся данным, также стимулирует продуцирование цитокининов самим организмом.

Вследствие проведенного анализа получена питательная среда (табл.2) для микроклонального размножения земляники, в которой учтены множество условий для достижения поставленной цели.

Таблица 2

Состав оптимизированной питательной среды на основе МС (Мурасиге-Скуга), используемая на этапе мультипликации

Формулы питательных сред, мг/л + CO₂ (50 мг/л)			
Состав	Мг/л	Состав	Мг/л
NH ₄ NO ₃	1650	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O г/л	440
KNO ₃	1900	NaH ₂ PO ₄	-
CaCl ₂ *2H ₂ O	-	Na ₂ SO ₄	-
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	Сахароза, г/л	25
KH ₂ PO ₄	170	Глюкоза г/л	-
H ₃ BO ₃	6,2	Тиамин	1,0
MnSO ₄ *4H ₂ O	22,3	Никотиновая к-та	-
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	Пиридоксин	0,5
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	Глицин	0,05
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	Инозит	100
NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,25	Агар, г/л	5-8
FeSO ₄ *7H ₂ O	55,6	6-БАП	0,25
Na ₂ EDTA	37,3	ИУК	0,2
KУ	0,83		

На представленной в таблице 2 питательной среде проводился процесс мультипликации оздоровленных эксплантов земляники сорта «Ирма». Применялась технология черенкования пробирочных растений, общепринятая в системе микроклонального размножения [9]. Основным критерием на данном этапе принимается коэффициент размножения, который должен колебаться в пределах 10-20 клонов с каждого пассажа, продолжительность которого 28 дней.

Дорастивание. В качестве базовой формулы на этапе адаптации использовалась питательная среда Мурасиге-Скуга, обедненная в 2 раза по минеральному составу (макроэлементы) и оптимизированная по гормонам и витаминам.

Аргументация по снижению углеводного компонента и повышение дозы ауксина, отраженная на этапе приготовления питательной среды для мультипликации остается еще более актуальной на этапе дорастивания. На этапе дорастивания необходимо создать условия для роста корней и ограничения пролиферации, которая достигается полным исключением из состава питательной среды цитокинина (6-БАП).

Таблица 3

Состав оптимизированной питательной среды на основе МС (Мурасиге-Скуга) на этапе адаптации

Формулы питательных сред, мг/л + CO₂			
Состав	Мг/л	Состав	Мг/л
NH ₄ NO ₃	825	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O г/л	-
KNO ₃	950	Сахароза, г/л	25
CaCl ₂ *2H ₂ O	220	Глюкоза г/л	-
MgSO ₄ *7H ₂ O	185	Тиамин	1,0
KH ₂ PO ₄	85	Никотиновая к-та	-

H ₃ BO ₃	6,2	Пиридоксин	0,5
MnSO ₄ *4H ₂ O	22,3	Глицин	-
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	Инозит	100
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	Агар, г/л	5-8
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	ИМК	1,0
NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,25	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O г/л	-
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8	Сахароза, г/л	25
Na ₂ EDTA	37,3	Глюкоза г/л	-
KY	0,83	Тиамин	1,0

Общепринятым базовым критерием клонов, полученных к этапу адаптации в нестерильных условиях, является для земляники длина надземной части в пределах 2 см и длина корней не менее 2 см.

Выводы:

Методике достижения конечной оптимизированной среды по минеральному, гормональному и витаминному составу предшествует проведение экспериментальных наблюдений в соответствии с научным принципом единственного различия.

В качестве элементов оптимизации по минеральному составу была проведена оценка влияния замещения хлорида кальция его нитратной формой на пролиферацию на этапе мультипликации. Влияние увеличения концентрации железа в питательной среде оценивалось также по влиянию на выход побегов для дальнейшего микроразмножения.

Гормональный состав. Создание условий для поддержания способности эксплантом и далее клонами выработки гормональных веществ является очень ценным признаком, так как эта способность передается генетически идентичным оригинальному растению клонам. Подбиралась концентрация гормонов. В частности снижена доля цитокинина 6-БАП и созданы условия его продуцирования самим растительным организмом. Критерием оценки являлось влияние снижения доли 6-БАП на пролиферацию растительных тканей земляники.

На этапе доращивания проводилось повышение концентрации ауксина ИМК с целью оценки его влияния на образование корневой системы. На этом же этапе проводилась оценка влияния повышенных концентраций тиамин (1 мг/л) на приживаемость растений в нестерильных условиях.

В соответствии с полученными результатами оценки влияния каждого исследуемого компонента питательной среды на заданные критерии проводилось совмещение максимально эффективных решений и выводилась оптимизированная формула. С использованием оптимизированных питательных сред проводилась полная оценка по наблюдаемым критериям на протяжении трех пассажей и дальнейшего культивирования на субстрате.

Список использованной литературы:

1. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Размножение садовых культур *in vitro* (методические рекомендации) / Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. – Мичуринск: Научград, 2008. - 69 с.
2. Попов Ю.Г. Биологические науки. - 1976. - № 6. - с. 13-24.
3. Гормоны растений: регуляция концентрации, связь с ростом и водным обменом / Д.С. Веселов, С.Ю. Веселов, Л.Б. Высоцкая и др. - М.: Наука, 2007. - 158 с.
4. Романов Г.А., Медведев С.С. Ауксины и цитокинины в развитии растений. Последние достижения в исследовании фитогормонов. 2-й международный симпозиум. Прага, 7-12 июля, 2005 г. Физиология растений. – 2006.- Т.53. - №2.- С.309-319.
5. Шорников Д.Г., Брюхина С.А., Муратова С.А., Янковская М.Б., Папихин Р.В. Оптимизация условий культивирования *In vitro* ягодных и декоративных культур// Вестник ТГАУ. Т.15. Вып.2. - 2010. - С. 640-645.
6. Журавлева Н.А. Механизм устьичных движений, продукционный процесс и эволюция// ВО "Наука". - Новосибирск. 1992.
7. Коваленко Д.В., Смирнов А.П. Способ подкормки растений, выращиваемых в защищенном

грунте: Патент на изобретение №: RU 2527065 С2.

8. Дорошенко Н. П., Кострикин И. А. Микроклональное размножение столового винограда сорта Агат Донской // Садоводство и виноградарство. - 1989. - № 3. - С. 40.
9. Технология микроклонального размножения растений / Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая. - Киев: Наука Думка, 1992 - 212 с.
10. Mok D.W.S., Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // Annu. Rev. Plant Physiol, and Plant Mol. Biol. - 2001. - Vol. 52. - P. 89-118.
11. Sakakibara H. Nitrate specific and cytokinin-mediated nitrogen signaling pathways in plants I I J. Plant Res. - 2003. - Vol. 116. - P. 253-257.