

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ *IN VITRO*А.Н. ЕСАУЛКО¹, А.К. РАДЖАБОВ², Т.С. АЙСАНОВ¹, В.Ю. ВЕЛИЧКО¹,
С.В. АКИМОВА², Е.А. НИНУЛИНА^{3,4}, А.Е. МАЦНЕВА²

¹ ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»;
Российский государственный аграрный университет –МСХА имени К.А. Тимирязева;
³ ФГБУ Институт химических реактивов и особо чистых химических веществ
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»;
⁴ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»)

Тенденции развития отрасли садоводства показали, что для удовлетворения потребности населения России плодами и ягодами необходимо расширение насаждений этих культур. Клональное микроразмножение – современный способ массового ускоренного вегетативного размножения растений, который широко применяется при производстве отечественного посадочного материала садовых растений. Однако с учетом того, что большинство применяемых сегодня в практике клонального микроразмножения питательных сред было создано в 70–80-е гг. XX в., возникает необходимость совершенствования оптимального состава питательной среды. В связи с этим целью работы заключалась в исследовании влияния замены неорганических солей всех микроэлементов, входящих в состав питательной среды, на комплексоны микроэлементов с карбоксилсодержащим лигандом – EDTA. Сравнительная оценка изучаемых питательных сред показала значительное преимущество регенерационной способности растений всех сортов земляники на модифицированной питательной среде № 1, где отклонение коэффициентов размножения опытных вариантов от контроля составило 0,6–1,8 ед. на втором пассаже и 0,9–2,9 ед. – на третьем. На этапе ризогенеза у опытных микрорастений земляники четко прослеживалась большая чувствительность к питательной среде, и на 28-е сутки субкультивирования укореняемость микророзеток превышала аналогичные показатели контроля на 6,2–25,0%.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, *in vitro*, земляника садовая, питательная среда, интенсивность образования точек роста.

Введение

Земляника садовая – одна из наиболее распространенных ягодных культур в России, что обуславливается ее высокими вкусовыми качествами, богатым биохимическим составом и лечебными свойствами. Площади данной культуры в мире и в нашей стране свидетельствуют о ежегодной положительной динамике [1–5]. Расширение объемов производства данной ягодной культуры рождает необходимость увеличения объема производства высококачественного посадочного материала, свободного от вирусов, фитоплазменных патогенов, которые в значительной степени снижают урожайность и качество выращенной продукции на 20–60% [6, 7]. Одним из способов решения данной задачи является применение технологии клонального микроразмножения, которая позволяет в 2–3 раза сократить процесс выращивания посадочного материала садовых растений [8–11].

В целом методика клонального микроразмножения земляники садовой достаточно отработана и используется уже на протяжении многих лет [6, 7, 12]. Несмотря на это требуется постоянное совершенствование технологии, связанное с меняющимся сортиментом садовых растений, так как генотипические особенности новых сортов при выращивании в условиях *in vitro* еще неизвестны [13, 14]. Кроме того, меняется состав питательных сред. Учитывая, что большинство применяемых сегодня в практике клонального микроразмножения питательных сред было создано в 70–80-е гг. XX в., возникает необходимость совершенствования имеющихся технологических этапов, а также пересмотра концентрации применяемых компонентов [15]. В этой связи для успешного размножения растений в культуре *in vitro* важное значение имеет подбор оптимального состава питательной среды, в том числе трейсовых элементов. При этом важную роль играют не только количество питательных веществ, но и само фактическое питание, связанное с доступностью необходимых питательных элементов, химическое взаимодействие компонентов в питательной среде, эффекты антагонизма или синергизма при поглощении элементов тканями растений [16–20].

Несмотря на то, что минеральное питание является одним из важнейших факторов микроразмножения растений, его влияние на морфогенез изучено слабо [19, 20]. В связи с этим при разработке подходящего состава питательных сред обычно модифицируют регуляторы роста растений без изменения минеральных питательных веществ [22, 28]. Однако многие размножаемые в стерильных условиях виды и сорта плодовых растений не всегда поддаются классическому оптимизационному подходу путем тестирования гормональных компонентов роста растений [22–31].

В последнее десятилетие в литературе появляется все больше сведений о критическом влиянии оптимальных значений мезо- и микроэлементов на лучшую регенерацию микропобегов и укоренение микрорастений плодовых культур методами *in vitro*. Наиболее важными микроэлементами являются железо и медь, так как они участвуют в регуляторных процессах и окислительно-восстановительных превращениях, входят в состав важных коферментов. Далее следуют марганец, цинк, молибден, кобальт и бор, которые выполняют структурную функцию [18, 22, 32–34].

На практике в питательные среды для клонального микроразмножения железа, как правило, вводится в форме $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ совместно с дизамещенной натриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na_2EDTA) [21].

Среди опубликованных данных крайне мало сведений, посвященных изучению модификаций питательных сред хелатными формами микроэлементов. Практически все они касаются улучшения питания растений-регенерантов отдельных культур железом за счет замены $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{EDTA}$ в среде на комплекс FeEDDHA [23–27]. Кроме железа, хелатная форма поглощения также присуща и другим микроэлементам, но в питательных средах они используются в форме простых неорганических солей [21, 35]. Однако применение хелатных форм микроэлементов сопряжено с рядом аспектов, требующих детального изучения влияния лигандов на рост и развитие растений-регенерантов. В связи с этим цель работы заключалась в исследовании влияния замены неорганических солей всех микроэлементов, входящих в состав питательной среды, на хелатные формы последних, на мультипликацию и ризогенез *in vitro* микрорастений земляники садовой.

Материал и методика исследований

Исследования проводили в условиях научно-производственного центра питомниководства плодовых и ягодных культур, расположенного в условиях учебно-опытного хозяйства ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» в 2021–2022 гг.

Объектом исследований служили сорта земляники садовой Азия, Априка, Альбион, Брайтон, Сирия и Фортунa.

При введении в культуру *in vitro* отбор вегетативных побегов земляники для получения эксплантов производили из исходных растений, высаженных в пластиковые контейнеры. Согласно плану научных исследований в качестве эксплантов использовали меристематические верхушки розеток. Стерилизацию растительного материала осуществляли путем обработки 96%-ным раствором этилового спирта в течение 10–20 с, затем – 0,01–0,1%-ным раствором перманганата калия в течение 20 мин. После стерилизации материал трижды, каждый раз на протяжении 5 мин, промывали в трех порциях стерильной дистиллированной воды.

Затем меристематические верхушки помещали в пробирки на агаризованную питательную среду с минеральными солями по прописи Мурасига и Скуга (MS) [36], обогащенную такими веществами, мг/л, как тиамин (В1); пиридоксин (В6); никотиновая кислота (РР) по 0,5; инозитол – 100; 6-БАП –1; сахараза – 30000; агар-агар – 7000.

Пробирки с эксплантами инкубировали в культуральной комнате при интенсивности освещенности 2000–2500 Лк, температуре +22...+24 С° и 16-часовом световом дне. Ежедневно на протяжении 3 мес. производили учет количества инфицированных, окисленных, стерильных и жизнеспособных, активно регенерирующих растений. Затем осуществляли три последовательных пассажа на этап мультипликации на опытную питательную среду № 1 с минеральными солями по прописи MS, которую модифицировали карбоксилсодержащими хелатными комплексами микроэлементов с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA). Контролем служила питательная среда MS с минеральными макро- и микроэлементами. Контроль и опытную питательную среду № 1 обогащали такими веществами, мг/л, как витамины В1, В6, РР по 0,5; глицин – 1; мезоинозитол – 100; сахараза – 30000; агар-агар – 7000; 6-БАП 0,2. Микрочеренкование производили в стеклянные культуральные сосуды объемом 200 мл по 5 шт. в каждый, длительность субкультивирования на каждом пассаже составляла 60 сут.

После 2 мес. субкультивирования микрорастения переносили на опытную среду № 2 для этапа ризогенеза, которую модифицировали карбоксилсодержащими хелатными комплексами микроэлементов с EDTA, редуцировали наполовину по содержанию минеральных макроэлементов (½ MS). Контролем служила питательная среда MS с минеральными микро- и ½ макроэлементами (½ MS). И контроль, и опытную питательную среду № 2 обогащали следующими веществами, мг/л: витамины В1, В6, РР по 0,5; сахараза – 15000; агар-агар – 7000; ИМК – 0,3. Микрочеренкование производили в полипропиленовые контейнеры объемом 200 мл по 15 шт. в каждый, длительность субкультивирования составила 60 сут.

На этапах мультипликации и ризогенеза растения-регенеранты инкубировали в культуральной комнате при интенсивности освещенности 2000–2500 Лк, температуре +22...+24 С° и 16-часовом световом дне.

В ходе исследований каждые 7 дней проводили учеты интенсивности закладки пазушных почек у микрорастений, а в конце периода наблюдений определяли длину прироста вегетативных частей микрорастений. При изучении питательной среды для укоренения производили оценку их влияния на укореняемость микрочеренков, учет количества сформировавшихся корней и их среднюю длину согласно ГОСТ 54051–2010 [37].

Повторность опытов на каждом этапе – трехкратная, по 50 растений-регенерантов в повторности. Статистическую обработку результатов произвели согласно Б.А. Доспехову [38] и А.В. Исачкину [39] с применением компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007, STATISTICA_10.0.1011. Их использование подтвердило подлинность полученных результатов исследований.

Результаты и их обсуждение

Модификация питательной среды с минеральными макросолями по прописи MS и хелатными микроэлементами с карбоксилсодержащим лигандом привела к значительному повышению эффективности фазы мультипликации исследуемых сортов земляники. Анализ полученных данных указывает на значительную вариабельность коэффициента размножения у рассматриваемых вариантов по пассажам в зависимости от питательной среды.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о положительном влиянии разработанной питательной среды № 1 на регенерационную способность микрорастений исследуемых сортов земляники.

При первом пассаже коэффициент размножения у вариантов со средой № 1 в среднем по сортам составил 2,1–2,8 ед. по сравнению с 1,6–2,1 ед. в контроле. При этом отклонение коэффициентов размножения опытных вариантов от контроля в среднем составило 0,1–0,7 ед.

При последующих пассажах коэффициент размножения у всех сортов в опытных вариантах со средой № 1 значительно вырос (до 6,2–7,5 ед. на втором пассаже и до 7,5–7,9 ед. – на третьем) по сравнению с 5,1–6,3 ед. в контрольных вариантах. Отклонение коэффициентов размножения опытных вариантов от контроля сохранилось и составило 0,6–1,8 ед. на втором пассаже и 0,9–2,9 ед. – на третьем.

Анализ динамики коэффициента размножения рассматриваемых питательных сред показал, что у всех вариантов изучаемый показатель значительно повышался на втором пассаже в сравнении с результатами первого пассажа. Дальнейший тренд показателей изучаемых питательных сред показал устойчивую эффективность результатов контрольной питательной среды у всех исследуемых сортов земляники, тогда как применение опытной питательной среды № 1 стимулировало более активную регенерационную способность размножаемых микрорастений, устойчиво повышая коэффициент размножения с каждым последующим пассажем.

Сравнительная оценка отзывчивости рассматриваемых сортов на модификацию применяемой питательной среды показала, что при первом пассаже наибольший коэффициент размножения отмечался у сорта Фортуна, достоверно превышавшего показатели остальных сортов в среднем по опыту на 0,4–0,8 ед. Анализ результатов по второму и третьему пассажам показал, что наибольшая регенеративная способность выявлена у сортов Сирия и Фортуна, показавших существенное преимущество относительно показателей остальных сортов (табл. 1).

В технологии клонального микроразмножения большое значение имеют питательные среды для этапа ризогенеза микрочеренков размножаемых культур. На стадии ризогенеза у опытных микрорастений земляники садовой четко прослеживалась большая чувствительность к модифицированной питательной среде комплексонатами микроэлементов с карбоксилсодержащим лигандом EDTA.

В течение первой недели субкультивирования на этапе ризогенеза в ходе проведения исследований было установлено, что независимо от состава питательной среды во всех вариантах опыта формирование корней отмечено не было.

При учете на 14-е сутки субкультивирования выявлено начало образования корневой системы у микрорастений во всех рассматриваемых вариантах эксперимента. Оценка эффективности изучаемых питательных сред показала, что у всех сортов земляники, кроме сорта Фортуна, на 14-е сутки учета укореняемость была одинаковой и составляла 6,3%.

При учетах, проведенных на 21-е сутки этапа ризогенеза, значительно возросла укореняемость микрочеренков. В опытных вариантах с модификацией питательной

среды хелатными комплексами микроэлементов с EDTA (опытная среда № 2) лучшая укореняемость микророзеток отмечена у сортов Априка и Сирия, составив 37,5% по сравнению с 12,5–18,8% в контроле.

Таблица 1

Влияние состава питательной среды на этапе мультипликации на интенсивность образования точек ветвления у сортов земляники, 2021–2022 гг.

Сорт, фактор а	Вариант опытной питательной среды, фактор b	Коэффициент размножения, ед.		
		первый пассаж	второй пассаж	третий пассаж
Азия	MS (контроль)	1,8	5,9	5,1
	среда № 1	2,1	7,1	7,8
Априка	MS (контроль)	1,8	5,8	5,3
	среда № 1	2,4	7,4	7,7
Альбион	MS (контроль)	1,6	5,4	5,0
	среда № 1	2,0	7,2	7,9
Брайтон	MS (контроль)	1,6	5,6	5,7
	среда № 1	1,7	6,2	7,5
Сирия	MS (контроль)	1,7	6,2	6,9
	среда № 1	2,0	7,8	7,8
Фортуна	MS (контроль)	2,1	6,3	6,2
	среда № 1	2,8	7,5	7,9
НСР ₀₅ а		0,2	0,2	0,3
НСР ₀₅ b		0,2	0,5	0,4
НСР ₀₅ ab		0,3	0,6	0,6

В целом можно сказать, что у всех исследуемых сортов земляники укореняемость микророзеток на фоне опытной среды № 2 превышала аналогичные показатели контрольной питательной среды 1/2 MS на 0,2–25,0%.

На 28-е сутки субкультивирования анализ динамики укоренения размножаемых микрочеренков показал значительный скачок укореняемости у всех опытных сортов, и лучшая укореняемость микророзеток выявлена на фоне опытной среды 2, превышавшей аналогичные показатели контроля на 6,2–25,0%. У всех исследуемых сортов земляники, за исключением сорта Фортуна, в вариантах с модификацией питательной среды хелатами микроэлементов на основе EDTA укореняемость микророзеток колебалась в пределах 75,0–87,5% по сравнению с 56,3–68,8% в контроле.

В среднем по сравниваемым питательным средам из рассматриваемых сортов земляники наибольшее количество корней формировалось у сортов Азия и Альбион,

достоверно превосходивших показатели остальных сортов в опыте на 0,7–1,4 шт. Наименьшее количество корней в опыте было сформировано у сортов Сирия и Фортуна.

Сравнительная оценка изучаемых питательных сред показала преимущество в количестве образовавшихся корней у всех рассматриваемых сортов. Преимущество опытной среды № 2 относительно аналогичных показателей контрольной питательной среды в среднем по опыту составляло 0,1–1,3 шт. на растение.

Наибольшее количество корней в опыте зафиксировано у сорта Азия при укоренении на опытной питательной среде № 2, превосходившее результаты стальных вариантов опыта на 0,4–2,3 шт., причем относительно показателя сорта Альбион на опытной среде № 2 преимущество лидера находилось в пределах ошибки опыта.

Вероятно, химическая форма комплексонов микроэлементов с карбоксилсодержащим лигандом в более полной мере обеспечивает их доступность при поглощении тканями микрорастений, что приводит к улучшению показателей укореняемости и биометрических показателей развития микророзеток исследуемых сортов земляники садовой.

Таблица 2

Влияние состава питательной среды на этапе ризогенеза на укореняемость микророзеток сортов земляники, среднее за 2021–2022 гг.

Сорт, фактор а	Вариант опытной питательной среды, фактор b	Укореняемость, %			Среднее число корней (28-е сутки), шт.
		14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	
Азия	½ MS (контроль)	6,3	12,5	68,8	4,2
	среда № 2	6,3	18,8	81,3	5,5
Априка	½ MS (контроль)	6,3	18,8	56,3	3,7
	среда № 2	6,3	37,5	81,3	4,2
Альбион	½ MS (контроль)	6,3	12,5	62,5	4,4
	среда № 2	6,3	18,3	87,5	5,1
Брайтон	½ MS (контроль)	6,3	12,5	68,8	4,0
	среда № 2	6,3	18,8	75,0	4,2
Сирия	½ MS (контроль)	6,3	12,5	62,5	3,4
	среда № 2	6,3	37,5	81,3	3,5
Фортуна	½ MS (контроль)	6,3	12,5	43,8	3,2
	среда № 2	12,5	12,7	50,0	3,7
HCP ₀₅ a		0,4	1,1	3,4	0,3
HCP ₀₅ b		0,4	0,9	3,7	0,3
HCP ₀₅ ab		0,8	1,9	6,9	0,5

Выводы

Качественное улучшение доступности и поглощения трейсовых элементов за счет непосредственной замены минеральных солей микроэлементов на хелатные формы с EDTA в питательных средах на этапах мультпликации и ризогенеза позволило в значительной мере повысить физиологический статус растений-регенерантов земляники садовой.

В результате исследований было установлено, что разработанные питательные среды оказывали положительное влияние на регенеративную способность растений всех рассматриваемых сортов земляники. У всех сортов на фоне разработанной питательной среды № 1 коэффициент размножения был выше, чем на контрольной питательной среде. Анализ динамики коэффициентов размножения в опыте показал, что в среднем по сортам земляники на втором пассаже показатель значительно увеличился относительно показателей первого пассажа. К третьему пассажиру в контрольных вариантах коэффициент размножения показал устойчивое снижение, тогда как на разработанной питательной среде № 1 продолжал увеличиваться.

На основе полученных результатов можно сделать вывод о том, что применение разработанной питательной среды № 1 инициировало более активную закладку точек роста по сравнению с контрольной питательной средой, а также значительное увеличение коэффициента размножения.

На этапе ризогенеза у опытных микрорастений земляники четко прослеживалась большая чувствительность к питательной среде, модифицированной комплексами микроэлементов с карбоксилсодержащим лигандом – EDTA. На 28-е сутки субкультивирования у всех исследуемых сортов земляники в вариантах с модификацией питательной среды хелатными комплексами микроэлементов укореняемость микророзеток превышала аналогичные показатели контроля на 6,2–25,0%.

Большое практическое значение имеют дальнейшие исследования в данном направлении с расширением возможных объектов исследований. Подобным образом модифицированные питательные среды способны обеспечить технологичность процесса клонального микроразмножения земляники садовой и повысить рентабельность эффективности производства.

Финансирование: Данное исследование финансировалось программой развития Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева «Агропрорыв-2030» в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Библиографический список

1. *Высоцкий В.А.* Биотехнологические методы в современном садоводстве // Плодоводство и ягодоводство России. – Т. XXVI. – Изд-во ВСТИСП, 2011. – С. 3–10.
2. *Карпушина М.В., Винтер М.А.* Микрклональное размножение земляники садовой // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2021. – Т. 31. – С. 108–113.
3. *Семенов С.Э., Кухарчик Н.В.* Методика клонального микроразмножения сортов земляники // Плодоводство: Сборник научных трудов Белорусского НИИП. – Т. XIII. – Самохваловичи, 2000. – С. 138–145.
4. *Яковенко В.В., Лапшин В.И.* Сорта земляники для экологического изучения в зоне Северного Кавказа // Научные труды СКФНЦСВВ. – Т. 14. – Краснодар: СКФНЦСВВ, 2018. – С. 147–154.
5. *Козий И.И.* Производство ягод в России в цифрах // Ягоды России. – 2020. – № 1. – С. 3–4.

6. Мацнева О.В., Таиматова Л.В., Орлова Н.Ю., Шахов В.В. Микрклональное размножение земляники садовой // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2017. – Т. 4, № 1–2. – С. 93–96.
7. Мацнева О.В., Таиматова Л.В., Джафарова В.Е. Проллиферативная активность сортов земляники садовой в культуре *in vitro* // Современное садоводство. – 2016. – № 1. – [Электронный ресурс]. – URL: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2016/1/12.pdf>.
8. Баматов И.М., Адаев Н.Л., Цагараяева Э.А., Таймасханов Х.Э., Амаева А.Г. Повышение эффективности технологии оздоровления и первичного размножения земляники садовой в культуре *in vitro* // Известия Горского государственного аграрного университета. – 2020. – Т. 57, № 4. – С. 183–191.
9. Белошапкина О.О., Батрак Е.Р., Ханжиян И.И. Здоровый посадочный материал земляники – основы успеха // Защита и карантин растений. – 2001. – № 8. – С. 23.
10. Московенко Н.В., Тихонов С.Л., Степанов В.В. Сравнительная характеристика показателей качества клубники, выращенной в естественных условиях и при микрклональном культивировании // Товаровед продовольственных товаров. – 2013. – № 11. – С. 4–10.
11. Акимова С.В., Викулина А.Н., Буянов И.Н., Глинушкин А.П. Совершенствование способов подготовки микрорастений малины к адаптации // Плодоводство и ягодоводство России. – 2014. – Т. 39. – С. 16–19
12. Джигаadlo Е.Н., Джигаadlo М.И., Гольшикина А.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. – Орел: ВНИИСПК, 2005. – 49 с.
13. Апрощенко Г.П., Костицын В.В., Неделюев А.А. Рекомендации по производству оздоровленного посадочного материала земляники. – СПб., 2001. – 14 с.
14. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонального микроразмножения яблони и груши: Методические рекомендации. – Мичуринск-наукоград РФ, 2008. – 32 с.
15. Кухарчик Н.В. Размножение плодовых растений в культуре *in vitro* / Под общ. ред. Н.В. Кухарчик. – Минск: Беларуская навука, 2016. – 208 с.
16. Mayer N.A., Bianchi V.J., Feldberg N.P., Morini S. Rev. Bras. Frutic. V. 39, n 4. Advances in peach, nectarine and plum propagation p. 355 Mayer N.A. Advances in peach, nectarine and plum propagation // Rev. Bras. Frutic. – 2017. – V. 39. – № 4. – Pp. 355.
17. Niedz R.P., Evens T.J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition // In Vitro Cell Dev Biol-Plant. – 2007. – V. 43. – Pp. 370–381.
18. Reed B.M., Wada S., DeNoma J., Niedz R.P. Mineral nutrition influences physiological responses of pear *in vitro* // In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant. – 2013. – V. 49. – Pp. 699–709.
19. Ramage C.M., Williams R.R., Mineral nutrition and plant morphogenesis / C.M. Ramage, R.R. Williams // In Vitro Cell Dev Biol-Plant. – V. 38. – Pp. 116–124.
20. Greenway M.B. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro* / M.B. Greenway, I.C. Phillips, M.N. Lloyd, J.F. Hubstenberger, G.C. Phillips // In Vitro Cell Dev Biol-Plant. – 2012. – V. 48. – P. 403–410.
21. George E.F. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients / E.F. George, M.A. Hall, De Klerk (Eds.) // Plant Propagation by Tissue Culture., 3rd ed. Springer. – New York, ГОД. – Pp. 65–113.
22. Hand C. Minor nutrients are critical for the improved growth of *Corylus avellana* shoot cultures / C. Hand, B.M. Reed // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2014. – V. 119. – Pp. 427–439.
23. Garrison W. Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2-hydroxy-phenylacetic acid (Fe-EDDHA) / W. Garrison, A. Dale, P. Saxena // Can. J. Plant Sci. – 2013. – 93:511–521.

24. *Jolley V.D.* Plant Physiological Responses for Genotypic Evaluation of Iron Efficiency in Strategy I and Strategy II Plants-A Review / V.D. Jolley, K.A. Cook, N.C. Hansen, W.B. Stevens // *Journal of plant nutrition.* – 1996. – V. 19. – Pp. 1241–1255.
25. *Molassiotis A.N.* Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus 9 P. persica*) explants in vitro / A.N. Molassiotis, K. Dimassi, I. Therios, G. Diamantidis // *Biol. Plant.* – 20004. – V. 1. – Pp. 141–144.
26. *Padmanabhan P.* Iron supplementation promotes in vitro shoot induction and multiplication of *Baptisia australis* / P. Padmanabhan, M.R. Shukla, J.A. Sullivan, P.K. Saxena // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2017. – V. 129. – Pp. 145–152.
27. Van der Salm T.P.M. Importance of the iron chelate for micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Moneyway' / Van der Salm T.P.M., Van der Toorn C.J.G., Hanish ten Cate C.H., Dubois L.A.M., De Vries D.P., Dons H.J.M. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1994. – V. 37. – Pp. 73–77.
28. *Andres H.* Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and other developmental processes / H. Andres, B. Fernandez, R. Rodriguez, A. Rodriguez // *Plant Cell Tiss Organ Cult* 70. – 2002. – Pp. 173–180.
29. *Perez-Tornero O.* Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino / O. Perez-Tornero J.M. Lopez, J. Egea, L. Burgos // *Journal of Horticultural Science & Biotechnology.* – 2000. – V. 75 (3). – Pp. 283–286.
30. *Damiano C.* Propagation of *Prunus* and *Malus* by temporary immersion / C. Damiano, La Starza S.R., Monticelli S., Gentile A., Caboni E., Frattarelli A. // HVOSLEF-EI-DE A.K. AND PREIL W. (Ed.). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation.* – Netherlands: Springer, 2005. – Pp. 243–251.
31. *Zawadzka M.* Fruit ornamental Plant Res Factors modifying regeneration in vitro of adventitious shoots in five red raspberry cultivars / M. Zawadzka, T. Orlikowska. – 2006. – Vol. 14. – Pp. 105–115.
32. *Wada S.* Mesos components (CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄) are critical for improving pear micropropagation / S. Wada, R.P. Niedz, J. DeNoma B.M. Reed // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2013. – V. 49 – Pp. 356–365.
33. *Poothonga S.* Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries / S. Poothonga, B.M. Reed // *Scientia Horticulturae.* – 2014. – V. 165. – Pp. 132–141.
34. *Carvalho A.A.* Mesos components (CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄) induced changes in growth and ascaridole content of *Dysphania ambrosioides* L. in vitro / A.A. Carvalho S.K.V.B. Bertoluccia G.M. Silva S.H.B. Cunha H.L.H.R. Rozaa S. Aazzab J.E.B.P Pinto // *Industrial Crops & Products.* – 2018. – V. 122. – Pp. 28–36.
35. *Бутюцкий Н.П.* Микроэлементы высших растений. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского университета, 2011. – 368 с.
36. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – Pp. 437–497.
37. ГОСТ Р 54051–2010 «Плодовые и ягодные культуры. Стерильные культуры и адаптированные микрорастения. Технические условия». – 15 с.
38. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований): Учебник для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по агрономическим специальностям. – Изд. 6-е, стер., перепеч. с 5-го изд. 1985 г. – М.: Альянс, 2011. – 350 с.
39. *Исачкин А.В., Крючкова В.А.* Основы научных исследований в садоводстве: Учебник для вузов / Под ред. А.В. Исачкина. – СПб.: Лань, 2020. – 420 с.

STUDY OF THE EFFICIENCY OF NEW NUTRIENT MEDIA FOR THE PRODUCTION OF IMPROVED STRAWBERRY SEEDLINGS BY *IN VITRO*

A.N. ESAULKO¹, A.K. RADZHABOV², T.S. AYSANOV¹, V.YU. VELICHKO¹,
S.V. AKIMOVA², E.A. NINULINA^{3,4}, A.E. MATSNEVA²

(¹ Stavropol State Agrarian University,

² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,

³ Institute of Chemical Reagents and High Purity Chemical Substances
of National Research Center “Kurchatov Institute”,

⁴ National Research Center “Kurchatov Institute”)

Current trends in the development of the horticulture industry have shown that in order to meet the needs of the Russian population for fruits and berries, it is necessary to expand the plantations of these crops. Clonal micropropagation is a modern method of mass, accelerated vegetative propagation of plants, which is widely used in the production of domestic planting material for garden plants. However, given that most of the nutrient media used today in the practice of clonal micropropagation were created in 70–80 years of XX century, there is a need to improve its optimal composition. In this regard, the purpose of this work was to study the effect of replacing inorganic salts of all microelements that are part of the nutrient medium with complexonates of microelements with a carboxyl-containing ligand – EDTA. A comparative evaluation of the studied nutrient media revealed a significant advantage in plant regeneration ability in all strawberry cultivars on modified nutrient medium No. 1, where the deviation of the multiplier coefficients of the experimental variants from the control was 0.6–1.8 units on the second passage and 0.9–2.9 units on the third. At the stage of rhizogenesis, the experimental strawberry microplants were highly sensitive to the nutrient media, and the rooting of microrosettes exceeded that of the control by 6.2–25.0% on the 28th day of subcultivation.

Key words: *clonal micropropagation, in vitro, garden strawberry, nutrient medium, intensity of formation of growth points.*

References

1. *Vysotskiy V.A.* Biotekhnologicheskie metody v sovremennom sadovodstve [Biotechnological methods in modern horticulture]. Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii. Izd-vo VSTISP. 2011; XXVI: 3–10. (In Rus.)
2. *Karpushina M.V., Vinter M.A.* Mikroklonal'noe razmnozhenie zemlyaniki sadovoy [Micropropagation of garden strawberry]. Nauchnye trudy Severo-Kavkazskogo federal'nogo nauchnogo tsentra sadovodstva, vinogradarstva, vinodeliya. 2021; 31: 108–113. (In Rus.)
3. *Semenas S.E., Kukharchik N.V.* Metodika klonal'nogo mikrorazmnozheniya sortov zemlyaniki [Method of clonal micropropagation of strawberry cultivars]. Plodovodstvo: sbornik nauchnykh trudov Belorusskogo NIIP. Samokhvalovichi. 2000; XIII: 138–145. (In Rus.)
4. *Yakovenko V.V., Lapshin V.I.* Sorta zemlyaniki dlya ekologicheskogo izucheniya v zone Severnogo Kavkaza [Cultivars of strawberries for ecological study in the zone of the North Caucasus]. Nauchnye trudy SKFNTSSVV. Krasnodar: SKFNTSSVV. 2018; 14: 147–154. (In Rus.)
5. *Koziy I.I.* Proizvodstvo yagod v Rossii v tsifrakh [Berry production in Russia in numbers]. Yagody Rossii. 2020; 1: 3–4. (In Rus.)
6. *Matsneva O.V., Tashmatova L.V., Orlova N.Yu., Shakhov V.V.* Mikroklonal'noe razmnozhenie zemlyaniki sadovoy [Micropropagation of garden strawberry]. Seleksiya i sortorazvedenie sadovykh kul'tur. 2017; 4 (1–2): 93–96. (In Rus.)

7. *Matsneva O.V., Tashmatova L.V., Dzhafarova V.E.* Proliferativnaya aktivnost' sortov zemlyaniki sadovoy v kul'ture in vitro [Proliferative activity of garden strawberry cultivars in culture in vitro]. *Sovremennoe sadovodstvo*. 2016; 1. [Electronic source]. URL: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2016/1/12.pdf> (In Rus.)

8. *Bamatov I.M., Adaev N.L., Tsagaraeva E.A., Taymaskhanov Kh.E., Amaeva A.G.* Povyshenie effektivnosti tekhnologii ozdorovleniya i pervichnogo razmnozheniya zemlyaniki sadovoy v kul'ture in vitro [Improving the efficiency of technology for the improvement and primary propagation of garden strawberries in culture in vitro]. *Izvestiya Gorskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2020; 57 (4): 183–191. (In Rus.)

9. *Beloshapkina O.O., Batrak E.R., Khanzhiyan I.I.* Zdoroviy posadochniy material zemlyaniki – osnovy uspekha [Healthy strawberry planting material – the basis of success]. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2001; 8: 23. (In Rus.)

10. *Moskovenko N.V., Tikhonov S.L., Stepanov V.V.* Sravnitel'naya kharakteristika pokazateley kachestva klubniki, vyrashchennoy v estestvennykh usloviyakh i pri mikroklonal'nom kul'tivirovanii [Comparative characteristics of quality indicators of strawberries grown under natural conditions and with microclonal cultivation]. *Tovaroved prodovol'stvennykh tovarov*. 2013; 11: 4–10. (In Rus.)

11. *Akimova S.V., Vikulina A.N., Buyanov I.N., Glinushkin A.P.* Sovershenstvovanie sposobov podgotovki mikrorasteniy maliny k adaptatsii [Improving the ways of preparing raspberry microplants for adaptation]. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii*. 2014; 39: 16–19. (In Rus.)

12. *Dzhigadlo E.N., Dzhigadlo M.I., Golysheva A.V.* Metodicheskie rekomendatsii po ispol'zovaniyu biotekhnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, yagodnymi i dekorativnymi kul'turami [Guidelines for the use of biotechnological methods in the work with fruit, berry and ornamental crops]. Orel: VNIISPK, 2005: 49. (In Rus.)

13. *Atroshchenko G.P., Kostitsyn V.V., Nedelyuev A.A.* Rekomendatsii po proizvodstvu ozdorovlennogo posadochnogo materiala zemlyaniki [Recommendations for the production of improved strawberry planting material]. S – P., 2001: 14. (In Rus.)

14. *Matushkina O.V., Pronina I.N.* Tekhnologiya klonal'nogo mikrorazmnozheniya yabloni i grushi (metodicheskie rekomendatsii) [Technology of clonal micropropagation of apple and pear (guidelines)]. Michurinsk – naukograd RF, 2008: 32. (In Rus.)

15. *Kukharchik N.V.* Razmnozhenie plodovykh rasteniy v kul'ture in vitro [Reproduction of fruit plants in culture in vitro]. Minsk: Belaruskaya navuka, 2016: 208. (In Rus.)

16. *Mayer N.A., Bianchi V.J., Feldberg N.P., Morini S.* Advances in peach, nectarine and plum propagation. *Rev. Bras. Frutic*. 2017; 39 (4): 355.

17. *Niedz R.P., Evens T.J.* Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant*. 2007; 43: 370–381.

18. *Reed B.M., Wada S., DeNoma J., Niedz R.P.* Mineral nutrition influences physiological responses of pear in vitro. *In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant*. 2013; 49: 699–709.

19. *Ramage C.M., Williams R.R.* Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 2002; 38: 116–124.

20. *Greenway M.B., Phillips I.C., Lloyd M.N., Hubstenberger J.F., Phillips G.C.* A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species in vitro. *In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant*. 2012; 48: 403–410.

21. *George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J.* The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. *Plant Propagation by Tissue Culture*. New York: Springer. 2007; 3: 65–113.

22. *Hand C., Reed B.M.* Minor nutrients are critical for the improved growth of *Corylus avellana* shoot cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2014; 119: 427–439.

23. *Garrison W., Dale A., Saxena P.* Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2-hydroxy-phenylacetic acid (Fe-EDDHA). *Can. J. Plant Sci.* 2013; 93: 511–521.
24. *Jolley V.D., Cook K.A., Hansen N.C., Stevens W.B.* Plant Physiological Responses for Genotypic Evaluation of Iron Efficiency in Strategy I and Strategy II Plants – A Review. *Journal of plant nutrition.* 1996; 19: 1241–1255.
25. *Molassiotis A.N., Dimassi K., Therios I., Diamantidis G.* Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* 9 P. *persica*) explants in vitro. *Biol. Plant.* 2004; 1: 141–144.
26. *Padmanabhan P., Shukla M.R., Sullivan J.A., Saxena P.K.* Iron supplementation promotes in vitro shoot induction and multiplication of *Baptisia australis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2017; 129: 145–152.
27. *Van der Salm T.P.M., Van der Toorn C.J.G., Hanish ten Cate C.H., Dubois L.A.M., De Vries D.P., Dons H.J.M.* Importance of the iron chelate for micropropagation of *Rosa hybrida* L. ‘Moneyway’. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1994; 37: 73–77.
28. *Andres H., Fernandez B., Rodriguez R., Rodriguez A.* Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and other developmental processes. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 70. 2002: 173–180.
29. *Perez-Tornero O., Lopez J.M., Egea J., Burgos L.* Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology.* 2000; 75 (3): 283–286.
30. *Damiano C., La Starza S.R., Monticelli S., Gentile A., Caboni E., Frattarelli A.* Propagation of *Prunus* and *Malus* by temporary immersion. HVOSLEF-EIDE A.K. AND PREIL W. (Ed.). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation.* Netherlands: Springer. 2005: 243–251.
31. *Zawadzka M., Orlikowska T.* Fruit ornamental Plant Res Factors modifying regeneration in vitro of adventitious shoots in five red raspberry cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.* 2006; 14: 105–115.
32. *Wada S., Niedz R.P., DeNoma J., Reed B.M.* Mesos components (CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄) are critical for improving pear micropropagation. *In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant.* 2013; 49: 356–365.
33. *Poothonga S., Reed B.M.* Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. *Scientia Horticulturae.* 2014; 165: 132–141.
34. *Carvalho A.A., Bertoluccia S.K.V.B., Silva G.M., Cunha S.H.B., Rozza H.L.H.R., Azzab S., J Pinto.E.B.P* Mesos components (CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄) induced changes in growth and ascaridole content of *Dysphania ambrosioides* L. in vitro. *Industrial Crops & Products.* 2018; 122: 28–36.
35. *Bityutskiy N.P.* Mikroelementy vysshikh rasteniy [Trace elements of higher plants]. SPb: Izd-vo SPb. un-ta, 2011: 368. (In Rus.)
36. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15: 437–497.
37. GOST R54051–2010 Natsional’niy standart Rossiyskoy Federatsii. Plodovye i yagodnye kul’tury. Steril’nye kul’tury i adaptirovannye mikrorasteniya. Tekhnicheskie usloviya [Fruit and berry cultures. Sterile cultures and adapted microplants. Specification]. Approved by Order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology of the Russian Federation dated November 30, 2010. No. 669-st. (In Rus.)
38. *Dospekhov B.A.* Metodika polevogo opyta: (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul’tatov issledovaniy): uchebnik dlya studentov vysshikh sel’skokhozyaystvennykh

uchebnykh zavedeniy po agronomicheskim spetsial'nostyam [Methods of field experience: (with the basics of statistical processing of research results): a textbook for students of higher agricultural educational institutions in agronomic specialties]. 6th edition revised and enlarged. M: Al'yans, 2011: 350. (In Rus.)

39. *Isachkin A.V., Kryuchkova V.A.* Osnovy nauchnykh issledovaniy v sadovodstve: uchebnyk dlya vuzov [Fundamentals of scientific research in horticulture: a textbook for universities]. Sankt-Peterburg: Lan', 2020: 420. (In Rus.)

Есаулко Александр Николаевич, декан факультетов агробиологии и земельных ресурсов, экологии и ландшафтной архитектуры, доктор сельскохозяйственных наук, профессор РАН. ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ (355017, Российская Федерация, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, дом 12; e-mail: aesaulko@yandex.ru; тел.: (962) 400–41–95)

Раджабов Агагомед Курбанович, директор института Садоводства и ландшафтной архитектуры, доктор сельскохозяйственных наук, профессор. ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127434, Российская федерация, город Москва, улица Тимирязевская, дом 49; e-mail: plod@rgau-msha.ru)

Айсанов Тимур Солтанович, доцент кафедры производства и переработки продуктов питания из растительного сырья, кандидат сельскохозяйственных наук, ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ (355017, Российская Федерация, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, дом 12; e-mail: aysanov_timur@mail.ru; тел.: (988) 629–63–77)

Величко Виталий Юрьевич, заведующий лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии, кандидат биологических наук. ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ (355017, Российская Федерация, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, дом 12; e-mail: vit-velichko@yandex.ru; тел.: (918) 801–14–50)

Акимова Светлана Владимировна, доцент кафедры плодоводства, виноградарства и виноделия, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент. ФГБОУ ВО Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127434, Российская федерация, город Москва, улица Тимирязевская, дом 49. e-mail: akimova@rgau-msha.ru)

Никулина Елена Аркадьевна, заместитель начальника лаборатории заказного органического синтеза, ФГБУ институт химических реактивов и особо чистых химических веществ, НИЦ «Курчатовский институт» 107076, город Москва, улица Богородский вал, д.3, e-mail: nikulina@irea.org.ru)

Мацнева Анна Евгеньевна, заведующая отделом биотехнологии и ягодных культур учебно-научно-производственного центра садоводства и овощеводства имени В.И. Эдельштейна ФГБОУ ВО Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127434, Российская федерация, город Москва, улица Тимирязевская, дом 49. e-mail: matsneva@rgau-msha.ru)

Aleksandr N. Esaulko, DSc (Ag), Professor of the Russian Academy of Sciences, Dean of the Faculties of Agrobiology and Land Resources, Ecology and Landscape Architecture, Stavropol State Agrarian University (12 Zootekhnicheskii Lane, Stavropol, 355017, Russian Federation; phone: (962) 400–41–95; E-mail: aesaulko@yandex.ru)

Agagamomed K. Radzhabov, DSc (Ag), Professor, Director of the Institute of Horticulture and Landscape Architecture, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: plod@rgau-msha.ru)

Timur S. Aysanov, PhD (Ag), Associate Professor of the Department of Production and Processing of Foodstuffs from Vegetable Raw Materials, Stavropol State Agrarian University (12 Zootekhnicheskiy Lane, Stavropol, 355017, Russian Federation; phone: (988) 629–63–77; E-mail: aysanov_timur@mail.ru)

Vitaliy Yu. Velichko, PhD (Bio), Head of the Laboratory of Agricultural Biotechnology, Stavropol State Agrarian University (12 Zootekhnicheskiy Lane, Stavropol, 355017, Russian Federation; phone: (918) 801–14–50; E-mail: vit-velichko@yandex.ru)

Svetlana V. Akimova, PhD (Ag), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Fruit Growing, Viticulture and Winemaking, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: akimova@rgau-msha.ru)

Elena A. Nikulina, Deputy Head of the Laboratory of Custom Organic Synthesis, Institute of Chemical Reagents and High Purity Chemical Substances of National Research Center “Kurchatov Institute”, National Research Center “Kurchatov Institute” (3 Bogorodsky Val Str., Moscow, 107076, Russian Federation; E-mail: nikulina@irea.org.ru)

Anna E. Matsneva, Head of the Department of Biotechnology and Berry Crops of the Research and Production Centre for Horticulture and Vegetable Growing named after V.I. Edelstein, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; E-mail: matsneva@rgau-msha.ru)