

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ И ЦИФРОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
КАФЕДРА ИНФОРМАЦИОННЫХ И РОБОТОТЕХНИЧЕСКИХ СИСТЕМ

**Интеллектуальная поддержка процесса выбора параметров стерилизации
при размножении растений *in vitro***

Магистерская диссертация
Обучающегося по направлению подготовки
09.04.02 Информационные системы и технологии
очной формы обучения
группы 07001735
Щербининой Натальи Владимировны

Научный руководитель:
д.т.н., профессор
О.А. Иващук
Рецензент:
к.т.н.
Т.Н. Балабанова

БЕЛГОРОД 2019

РЕФЕРАТ

Интеллектуальная поддержка процесса выбора параметров стерилизации при размножении растений *in vitro* – Щербина Наталья Владимировна, магистерская диссертация, Белгород, Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»), количество страниц 73, включая 1 приложение, количество рисунков 34, количество таблиц 17, количество использованных источников 25.

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ И ИМИТАЦИОННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ, ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ.

Объектом исследования является процесс выбора оптимальных параметров этапа стерилизации микрклонального размножения растений.

Предметом исследования модели и алгоритмы, обеспечивающие оптимизацию процесса микрклонального размножения растений на этапе стерилизации растительных эксплантов.

Цель работы – совершенствование процесса микрклонального размножения растений на этапе стерилизации за счет разработки модели выбора оптимальных параметров стерилизации с использованием аппарата искусственных нейронных сетей.

Для достижения поставленной цели необходимо решение следующих задач:

- проведен анализ предметной области и существующих подходов к моделированию процессов в биотехнологии;

- проведена серия лабораторных экспериментов на этапе стерилизации и проанализированы полученные результаты;

- разработана функциональная модель модернизированного процесса микрклонального размножения;

- разработаны и исследованы нейросетевые модели идентификации этапа стерилизации;

- по результатам дискриминации нейросетевых моделей был синтезирован нейроконтроллер для управления этапом стерилизации;

- проведено имитационное моделирование, обеспечивающее реализацию оптимального стерилизующего режима для семян при введении в культуру *in vitro* редких лекарственных растений семейства губоцветные, произрастающими на территории Белгородской области.

Основные результаты выполнения исследования:

- осуществлен анализ научной проблемы, выбор методов исследования, проведены теоретические исследования подходов к построению моделей процесса микроклонального размножения растений;

- проведены экспериментальные исследования с использованием сертифицированного лабораторного оборудования на базе научно-исследовательских лабораторий НИУ «БелГУ» для получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений с подбором эффективных способов стерилизации растительных эксплантов для выращивания культуры растений в условиях *in vitro* (на примере Белгородской области). В качестве объектов исследования были выбраны растения семейства губоцветные или яснотковые (*Labiatae* Juss., *Lamiaceae* Lindl.) произрастающие во флоре Белгородской области как в дикорастущем состоянии (черноголовка крупноцветковая *Prunella grandiflora* (L.) Sholl. и иссоп меловой *Hyssopus cretaceus* Dubjan.), так и интродуцируемые виды (шалфей мускатный *Salvia sclarea* L.). *P. grandiflora* и *H. cretaceus* занесены в региональную Красную книгу Белгородской области, а *H. cretaceus* охраняется и на федеральном уровне;

- проведен анализ результатов лабораторных исследований по введению в культуру *in vitro* на этапе стерилизации растительных эксплантов как одного из важнейших и дорогостоящих этапов микроклонального размножения, от которого в значительной мере зависит качество получаемого растительного материала;

- проведено системное описание процесса микроклонального размножения редких и исчезающих лекарственных растений: разработана функциональная модель данного процесса с учетом возможности проведения имитационных экспериментов и осуществления модельных оценок, прогнозов и оптимизации его параметров; разработка теоретико-множественной модели этапа стерилизации растительных эксплантов, выявление параметров состояния данного этапа и причинно-следственных связей между ними;

- построены модели оценки и прогнозирования результатов стерилизации, реализующие предложенный метод и отражающие причинно-следственные связи между параметрами этапа стерилизации. Исследованы модели двух видов: многослойный персептрон и сеть с радиальными базисными функциями активации (RBF-сеть);

- на основе разработанных моделей проведены имитационные эксперименты по выбору оптимальных параметров этапа стерилизации для эксплантов растений, для которых не проводились лабораторные опыты.

- сформирован банк данных по результатам проведения экспериментов;

Обобщение результатов, полученных при исследовании – в виде методов, моделей, данных лабораторных и имитационных экспериментов – обеспечивает построение эффективной технологии получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений с модельной оптимизацией параметров.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1 Анализ состояний исследований в области микрклонального размножения растений	9
1.1 Аналитический обзор проблемы оптимизации процесса микрклонального размножения редких и исчезающих видов растений.....	9
1.2 Проведение лабораторных исследований для получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений с подбором эффективных способов стерилизации растительных эксплантов в условиях <i>in vitro</i> (на примере Белгородской области).....	12
1.2.1 Материалы исследования.....	12
1.2.2 Лабораторные методы исследования.....	17
1.2.3 Результаты лабораторных исследований по введению в культуру <i>in vitro</i> на этапе стерилизации растительных эксплантов.....	18
1.2.3 Анализ влияния стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов	23
1.3 Основные проблемы, возникающие при микрклональном размножении растений. Постановка задачи исследования	30
2 Системное описание технологии получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений.....	33
2.1 Разработка функциональной модели существующего процесса микрклонального размножения	33
2.2 Модернизация традиционного процесса микрклонального размножения за счет оптимизации его параметров	35
2.3 Теоретико-множественная модель этапа стерилизации	38
2.4. Выводы.....	40
3 Разработка нейросетевой модели идентификации этапа стерилизации при введении растений в культуру <i>in vitro</i>	41
3.1 Нейросетевые методы идентификации.....	41
3.2 Нейросетевые стратегии управления.....	43
3.3 Построение нейросетевой модели этапа стерилизации	45
3.4 Проверка работы нейросетевой модели этапа стерилизации.....	51
3.5 Алгоритм, реализующий метод выбора эффективного способа стерилизации растительных эксплантов	55

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	58
Список используемых источников.....	59
ПРИЛОЖЕНИЕ Регламент поиска и отчет о поиске	62

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с активной хозяйственной деятельностью человека происходит быстрое уменьшение ареалов распространения многих видов растений. Проблема сохранения биоразнообразия растений, особенно редких, исчезающих и лекарственных видов, становится актуальной [1]. Одним из результативных решений данного вопроса является применение технологии микрклонального размножения, что дает возможность сохранять ценные, редкие, исчезающие и лекарственные растения, создавая банки и коллекции в условиях *in vitro* [2-8]. Растения из таких банков можно использовать для восстановления их естественных популяций в природе или для их культивирования на специальных территориях с целью дальнейшего использования в сельском хозяйстве или фармации. Микрклональное размножение – перспективный передовой способ вегетативного размножения растений, основанный на методе культуры клеток и тканей – позволяет оздоравливать растительный посадочный материал от вирусных, бактериальных и грибковых инфекций, экономя при этом площади занятые маточными растениями [4-8]. Еще одним из его достоинств является возможность осуществления работ по размножению в течение круглого года, а также возможность получения посадочного материала растений, размножение которых затруднено обычными способами. Применение данного способа позволяет сохранить уникальные генотипы различных популяций растительных объектов, создавая генетические банки в условиях *in vitro* и криобанки меристемных культур этих видов, хранение которых возможно длительное время. Подобный криобанк позволяет в момент потери растительных организмов в популяциях вырастить и восстановить их из криоконсервированных апикальных меристем [9,10].

Процесс микрклонального размножения является многоэтапным и включает: выбор и подготовку растительных эксплантов, которыми могут выступать различные органы, ткани, клетки и семена растений; процесс

стерилизации растительных эксплантов; введение их в культуру *in vitro*; получение и культивирование асептических растений на синтетической питательной среде; микроклональное размножение растений-регенерантов; адаптация микроклонов к почвенным условиям [2-8]. Следует отметить, что выбор оптимальных параметров на каждом этапе микроклонального размножения – это процесс, занимающий много времени и трудовых ресурсов, материальных затрат, постановки лабораторных экспериментов и их значительного числа повторения. При этом происходит большой расход дорогостоящих компонентов, входящих в состав всех питательных сред, а также значительные затраты временных и людских ресурсов: на обеспечение перед каждой серией опытов стерильных инструментов, посуды, питательных сред и условий в помещении. Выбор оптимальных параметров этапов микроклонального размножения усложняется необходимостью обработки большого объема информации – разнородной и слабоструктурированной.

Таким образом, целесообразно использовать современные средства информационных технологий и методов моделирования, в том числе методы интеллектуального анализа данных, которые сегодня успешно применяются при прогнозировании и управлении процессами и объектами в различных сферах, в том числе в биотехнологии [11-18].

Следует отметить, что одним из основных, в то же время, трудоемких этапов микроклонального размножения, результаты которого являются определяющими для получения высококачественного материала, является этап стерилизации, который индивидуален для каждого вида растений. Результат формирования асептических жизнеспособных проростков напрямую зависит от правильного выбора эффективного стерилизующего агента, а также его концентрации и времени обработки растительных эксплантов.

Целью данной работы было проведение и анализ экспериментальных исследований на этапе стерилизации при введении в культуру *in vitro* представителей семейства Labiatae (Яснотковые), являющихся редкими и исчезающими лекарственными растениями, и оптимизация параметров

стерилизации методами математической оценки и прогнозирования на основе аппарата искусственных нейронных сетей.

Научная новизна работы заключается в получении следующих результатов:

- усовершенствована модель традиционного процесса микроклонального размножения растений;

- разработана нейросетевая модель идентификации этапа стерилизации и синтезирован нейроконтроллер для управления этим этапом, который позволил оптимизировать стерилизующий режим для семян при введении в культуру *in vitro* растений.

Экспериментальные исследования выполнены в рамках государственного задания в сфере научной деятельности (грант № 40.5084.2017/БЧ).

1 Анализ состояний исследований в области микрклонального размножения растений

1.1 Аналитический обзор проблемы оптимизации процесса микрклонального размножения редких и исчезающих видов растений

В современных социально-экономических и экологических условиях из-за активной хозяйственной деятельности человека происходит быстрое уменьшение ареалов обитания многих видов растений, поэтому крайне актуальна проблема сохранения биоразнообразия редких и исчезающих растений. Высокая антропогенная нагрузка на природные сообщества быстроразвивающихся регионов, от экономики которых зависит эффективное решение продовольственных задач страны в целом (таких, как Белгородская область), вызывает быстрое ухудшение экологической обстановки на их территории. Более 30 из 1400-1500 видов растений, распространенных в Белгородской области, включены в список Красной книги России, а более 200 видов растений требуют действенной охраны как редкие и исчезающие на региональном уровне. Если сейчас не найти решения данной проблемы, то экологические проблемы неизбежно превратятся в социально-экономические.

Проблема сохранения растений может быть решена путем использования технологии микрклонального размножения растений в условиях *in vitro*. Разработка технологии получения изолированной культуры растений является основой для создания банков *in vitro* редких и исчезающих видов растений, а также одним из перспективных направлений сохранения биоразнообразия в целом.

Следует отметить, что получение изолированной культуры растений дает возможность размножения и сохранения редких и исчезающих растений, размножение которых затруднено обычными способами. При этом миниатюризация процесса, приводит к экономии площадей, занятых маточными и размножающимися растениями. Технология получения

изолированной культуры растений позволяет получить более высокие коэффициенты размножения, в короткий срок – большое число трудно размножаемых или вегетативно не размножаемых растений, в том числе редких и исчезающих видов, поддерживать активно растущие растения круглый год, длительно (в течение 1-3 лет) сохранять растительный материал в условиях *in vitro* (без пассирования на свежую среду), создавать банки длительного хранения ценных форм растений и отдельных их органов.

Выше рассмотренная технология получения изолированной культуры растений редких и исчезающих видов растений основана на микроклональном размножении растений в условиях *in vitro*, где растения выращиваются на питательных средах с добавлением регуляторов роста (фитогормонов). При этом осуществляется поиск наиболее эффективных стерилизующих реагентов растительных эксплантов, подбор оптимального состава питательных сред и соотношений концентраций регуляторов роста.

В настоящее время, поиск оптимального состава питательных сред и применение на регенерантах (пробирочных растениях) регуляторов роста (фитогормонов), а также целенаправленный отбор пробирочного материала и мини-растений для размножения являются длительными процессами, требующими постановки значительного числа опытов, трудоемкими и затратными. Задачи усложняются необходимостью работы с большими объемами разнородных данных, в том числе слабоструктурированных и формализованных. Для эффективного решения данной проблемы возможно использование современных информационных технологий и методов моделирования процессов в биотехнологии растений.

В аспекте исследуемой проблемы вопросы получения растительного материала методом микроклонального размножения отражены в работах Н.М. Абраменко, А.А. Борисова, Р.Г. Бутенко, Н.А. Гринь, А.В. Милехина, Ю.Н. Приходько, Т.Б. Решетниковой, С.Л. Рубцова, Р.В. Стакановой, Н.И. Старичковой, А.В. Соловьева, И.К. Сорокиной, О.Ю. Суркова, М.Т. Упадышева, А.М. Чернеца, С.Н. Шевченко и др. Культивированием

меристематических тканей растений занимались А.П. Ермашин, Т.А. Гавриленко, В.С. Шевелуха, Г.А. Яковлева и др. Методики получения изолированной культуры высших растений отражены в работах А.И. Атанасова, Р.Г. Бутенко, Н.А. Вечерниной, П.В. Куликова, Е.Г. Филиппова и др. Р.В. Камелин для сохранения растений *ex situ* разработал методику получения культуры изолированных тканей и органов, В.А. Высоцкий предложил создание «банка» ценных форм и хранение в нем пробирочных растений. Методики микроклонального размножения растений представлены в работах В. Bhagwat, W.I. DavidLane и др. Э. Коккинг разработал ферментативный метод получения изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях, Ж. Морель разработал метод микроразмножения растений в условиях *in vitro* с использованием меристемиди культуры.

Вопросами поддержания жизнеспособности пробирочных растений или их отдельных органов в течение длительного времени занимались биотехнологи L. Guarinoetal., L.A. Withers, Р.К. Байбурина и др. К.З. Гамбург, Н.И. Рекославская, С.Г. Швецов исследовали роль фитогормонов в культурах тканей и клеток растений. Анализ научных публикаций показал, что мировыми лидерами в области микроклонального размножения растений *in vitro* являются Нидерланды, США, Индия, Израиль, Италия, Польша и другие страны. В США микроклональным размножением занимаются около 100 лабораторий, 5 из которых имеют производительность 15-20 млн. растений в год, 8-10 лабораторий – от 2-10 млн., остальные менее 1 млн. растений. Из 248 коммерческих лабораторий Западной Европы с общей годовой производительностью 212 миллионов растений только производят более 1 млн.

В российских научно-исследовательских институтах и селекционных центрах созданы лаборатории для микроклонального размножения и оздоровления селекционного материала: Институт физиологии растений (культивированию клеток и тканей растений вне организма), Институт медико-биологических проблем, Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Главный ботанический сад им. Н.В.

Цицина Российской академии наук, Тимирязевская сельскохозяйственная академия, Биологический факультет МГУ, Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха, Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Российский университет дружбы народов (РУДН).

Однако анализ научных публикаций российских и зарубежных ученых показывает, что на данный момент отсутствуют научные работы, связанные с использованием методов моделирования (в том числе интеллектуальной обработкой данных) в биотехнологии.

1.2 Проведение лабораторных исследований для получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений с подбором эффективных способов стерилизации растительных эксплантов в условиях *in vitro* (на примере Белгородской области)

1.2.1 Материалы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны растения семейства губоцветные или яснотковые (*Labiatae* Juss., *Lamiaceae* Lindl.) произрастающие во флоре Белгородской области как в дикорастущем состоянии (черноголовка крупноцветковая *Prunella grandiflora* (L.) Sholl. и иссоп меловой *Hyssopus cretaceus* Dubjan.) так и интродуцируемые виды (шалфей мускатный *Salvia sclarea* L.). *P. grandiflora* и *H. cretaceus* занесены в региональную Красную книгу Белгородской области [19], а *H. cretaceus* охраняется и на федеральном уровне. Данные представители содержат в своем составе ценные биологически активные вещества, ароматические эфирные масла, которые широко применяются в косметологии, медицине и фармации.

Prunella grandiflora (L.) Sholl. – многолетнее травянистое растение высотой 10-40 см со следующими характеристиками: прямостоячий или приподнимающийся стеблями высотой 15-60 см; длинночерешковые,

продолговатые или яйцевидно-ланцетные листьями; вишневого цвета чашечками (рисунок 1). Может размножаться семенами или вегетативно. Среда обитания: остепенённые луга, сухие склоны, среди кустарников и в светлых лесах. Отнесен к III категории в Красной книге Белгородской области. Является источником многих вторичных метаболитов, содержит тритерпеноиды (урсоловая и олеаноловая кислоты), фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды. *Pr. grandiflora* обладает гемостатическим, антимикробным, жаропонижающим, ранозаживляющим, противовоспалительным, тонизирующим, отхаркивающим и антикомплементарным действием [22].



Рисунок 1 – Общий вид цветущего растения вида *P. Grandiflora*

Hyssopus cretaceus Dubj. (рисунок 2) реликтовое растение, сохранившееся со времен третичного периода, эфирномасличное и декоративное растение, ценный вид, необходимый для фитомелиорации меловых склонов. Полукустарник от 20 до 50 см высотой с округлыми серо-зелеными стеблями и с узколинейными листьями, которые имеют 3-7 цветков, образуют рыхлое удлинённое однобокое кистевидное соцветие. Период цветения с мая по сентябрь, созревает в конце августа начале сентября. В пору цветения иссоп меловой имеет душистые цветки синего цвета; плод в виде орешка. Среда обитания: обрывы, крутые склоны, преимущественно южной экспозиции. Благодаря его воздействию происходит образование почвы за счет разрушения

материнской породы. Имеет категорию VI в Красной книге Белгородской области и статус особо ценного вида [22].



Рисунок 2 – Общий вид цветущего растения *N. cretaceus*

Salvia sclarea L. (рисунок 3) – травянистое двулетнее растение с мощными прямостоящими или слегка изогнутыми в нижних узлах стеблями; крупными, кистевидными соцветиями, длиной от 15 до 40 см, состоящими из цветоносных осей различных порядков. Период цветения с начала июня по конец июля, но иногда и до августа. Плоды *S. Sclarea* яйцевидной или эллипсоидальной формы каштанового или бурого цвета, которые созревают в августе-сентябре. Поверхность плодов гладкая, при смачивании сильно ослизняется. Данный вид является источником многих вторичных метаболитов. Химический состав *S. Sclarea* содержит следующие вещества, обладающие широким спектром биологической активности (бактерицидной, фунгицидной и противовоспалительной, гепатопротекторным эффектом (антиоксидант), гипогликемической, ингибитор интегразы в качестве ВИЧ типа I): флавоноиды; соединения фенольной природы, фенолкарбоновые кислоты. Поэтому вызывают повышенный интерес фармакологов [22].



Рисунок 3 – Общий вид цветущего растения вида *S. Sclarea* L

Bellevalia sarmatica (Georgi) Woronow (рисунок 4) – весеннее луковичное многолетнее травянистое растение высотой от 10 до 15 см от 3-7 широких, яйцевидной формы ремневидных листьев. Плод представлен виде трёхгнёздной коробочки с выраженными лопастями. Семена у *B. Sarmatica* сарматской крупные, чёрные, шаровидной формы, пророст происходит с осени до весны. Цветёт *B. Sarmatica* многоцветковой кистью с серо-бурыми цветами, период цветения с апреля по май. Размножение семенное. В культуре цветение наблюдается лишь на 5 год культивирования. Среды обитания: степи; сухие места; глинистые бугры; как сорное растение растёт на посевах [22].



Рисунок 4 – Общий вид цветущего растения *B. Sarmatica*

Echinacea Purpurea L. Moench (рисунок 5) – растение высотой 90—100 см с прямыми, шершавыми стеблями. Соцветия имеют форму корзинки; крупные,

до 15 см в диаметре (язычковые цветки пурпурово-розовые, на верхушке заостренные, до 4 см длиной; трубчатые – красновато-коричневые). Содержит биологически активные вещества, которые обладают противовирусным и антимикробным действием, способны стимулировать иммунную систему организма человека. Могут применяться при заболеваниях, связанных с приобретенным иммунодефицитом или временным ослаблением иммунитета [22].



Рисунке 5 – Общий вид цветущего растения *E. purpurea*

Nigella damascena L. (рисунок 6) – однолетнее травянистое растение высотой 15-40 см. Растение голое, с прямым, иногда слегка фиолетовым стеблем, дважды-, триждырассеченными на щетинистые сегменты листьями. Верхние листья образуют покрывало, превышающее по длине цветков и плод. Чашелистики продолговатые, с остроконечием и широкой ножкой. Верхняя губа лепестков нектарников тупойцевидная, нижняя губа вдвое длиннее верхней, с двумя линейными лопастями. Семена в виде 5 листовок, гладких, почти до верхушки сросшихся, с длинным носиком. Цветет в конце весны и все лето [22].



Рисунке 6 – Общий вид цветущего растения *N. Damascena*

1.2.2 Лабораторные методы исследования

Семена были собраны в летний период 2017 – 2018 г. на территории Белгородской области и ботанического сада НИУ «БелГУ». Все работы по сбору, сушке, хранению растительного материала проводили по общепринятым методикам [23,24].

Манипуляции по стерилизации растительных эксплантов проводили в лаборатории «Инновационных методов исследования растительных объектов» кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ» с соблюдением стандартных правил асептических условий в ламинарных боксах микробиологической безопасности Lamsystems II класса A2 типа.

На этапе стерилизации растительные экспланты обрабатывали пятью различными стерилизующими агентами: лизоформин 3000, биоцид, белизна (5-15%), хлорамин Б, нитрат серебра. При этом варьировались следующие значения параметров: концентрация стерилизатора (с, %) и время обработки (t, мин).

Стерилизация семян, используемых инструментов и оборудования проводилась согласно методикам, принятым в работе по культуре клеток и тканей [23,24]. После воздействия стерилизующих химических агентов проводили отмывание растительных эксплантов стерильной дистиллированной водой в 3-х кратной повторности по 15 минут.

Для оценки действия асептических растворов помещали растительные экспланты на питательную среду Мурасиге-Скуга без содержания гормонов [25]. Далее семена культивировали в термостате при температуре 22-24°C. Для каждого режима с учетом времени и концентрации стерилизующего агента использовали по 10 семян каждого вида. Опыт проводили в 3-х кратной повторности. Оценку влияния режима стерилизации проводили по количеству стерильных и жизнеспособных эксплантов.

1.2.3 Результаты лабораторных исследований по введению в культуру *in vitro* на этапе стерилизации растительных эксплантов

Результаты лабораторных исследований по стерилизации семян *H. cretaceus* представлены в таблице 1.

Для определения достоверности результатов лабораторных исследований использовался U-критерий Манна - Уитни, который показал, что различия между значениями параметра в выборках достоверны ($P < 0,05$), в качестве контроля выступала вода.

Таблица 1 – Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *H. cretaceus*

Вид стерилизующего агента	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Лизоформин 3000 (10%)	87,65±2,572	0,00007	0,05
Белизна (5-15%)	94,71±1,885	0,00007	0,05
Биоцид (3%)	76,36±3,799	0,00007	0,05
Хлорами Б (5%)	36,36±1,635	0,00007	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	85,45±2,266	0,00007	0,05

Из таблицы видно, что более 70% стерильных семян получилось при использовании «Лизоформина 3000», «Белизны», «Биоцида», «Нитрата

серебра». Использование стерилизующего агента 5% раствора «Хлорамин Б» при стерилизации эксплантов вида *H. Cretaceus* нецелесообразно.

Результаты лабораторных исследований по стерилизации семян *P. grandiflora*. представлены в таблице 2.

Для определения достоверности результатов лабораторных исследований использовался U-критерий Манна - Уитни, который показал, что различия между значениями параметра в выборках достоверны ($P < 0,05$), в качестве контроля выступала вода.

Таблица 2 – Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *P. Grandiflora*

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Лизоформин 3000 (10%)	94,55±2,473	0,00007	0,05
Гипохлорит натрия (5-15%)	96,364±1,521		
Биоцид (3%)	85,45±3,123		
Хлорамин Б (5%)	77,27±2,371		
Нитрат серебра (0,1%)	87,27±2,371		

Для семян вида *P. grandiflora* можно использовать все стерилизующие агенты, так как процент стерильных семян более 70%.

Результаты лабораторных исследований по стерилизации семян *S. sclarea*. представлены в таблице 3.

Для определения достоверности результатов лабораторных исследований использовался U-критерий Манна - Уитни, который показал, что различия между значениями параметра в выборках достоверны ($P < 0,05$), в качестве контроля выступала вода.

Таблица 3 – Влияние режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов вида *S. sclarea*

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Лизоформин 3000 (10%)	96,85±1,274	0,00007	0,05
Белизна (5-15%)	70,25±1,061	0,00007	0,05
Биоцид (3%)	61,13±1,346	0,00007	0,05
Хлорамин Б (5%)	59,75±1,546	0,00007	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	93,63±1,346	0,00007	0,05

Как видно из таблицы, более 70% стерильных эксплантов получено при применении 10 % раствора «Лизоформин 3000», 0,1% раствора нитрата серебра и 5-15% раствора «Белизна», поэтому их применение целесообразно.

Результаты лабораторных исследований по стерилизации семян *V. sarmatica* представлены в таблице 4.

Для определения достоверности результатов лабораторных исследований использовался U-критерий Манна - Уитни, который показал, что различия между значениями параметра в выборках достоверны ($P < 0,05$), в качестве контроля выступала вода.

Таблица 4 – Количество стерильных семян *V. sarmatica* после стерилизации в течение 20 мин.

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Лизоформин 3000 (10%)	93,33 ± 2,659	0,00003	0,05
Белизна (5-15%)	78,33 ± 3,408	0,00003	0,05
Биоцид (3%)	24,17 ± 2,729	0,00003	0,05
Хлорамин Б (5%)	48,33 ± 3,827	0,00003	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	61,67 ± 2,930	0,00003	0,05
Контроль	1,92 ± 0,563	0,00003	0,05

Как видно из статистических данных, высокий процент стерильных семян (более 70%) зарегистрирован только при применении стерилизующих агентов Лизоформин и Белизны. В связи с этим было принято решение увеличить время

стерилизации до 30 минут. Количество стерильных эксплантов *B. sarmatica* после обработки семян в течение 30 минут представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Количество стерильных семян *B. sarmatica* после стерилизации в течение 30 мин.

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни, (P)	Уровень значимости, (α)
Лизоформин 3000 (10%)	96,36±1,783	0,00004	0,05
Белизна (5-15%)	92,73±2,780	0,00004	0,05
Биоцид (3%)	73,64±3,631	0,00004	0,05
Хлорамин Б (5%)	78,18±3,090	0,00004	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	84,55±3,662	0,00004	0,05
Контроль	1,92 ± 0,563		0,05

Для определения достоверности результатов лабораторных исследований использовался U-критерий Манна - Уитни, который показал, что различия между значениями параметра в выборках достоверны ($P < 0,05$), в качестве контроля выступала вода.

Для вида *B. sarmatica* высокий процент стерильных семян (более 70%) зарегистрирован при применении всех исследуемых стерилизаторов, при времени стерилизации 30 минут.

Результаты лабораторных исследований по стерилизации семян *N. damascena* представлены в таблице 5.

Критерий Манна-Уитни показал, что различия по влиянию стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида *N. damascena* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода ($2,82 \pm 0,71$), достоверны при $P < 0,05$ для каждого из образцов. Количество стерильных эксплантов после обработки семян *N. damascena* в течение 20 минут, средняя арифметическая, проверка гипотезы по критерию Манна-Уитни, а также уровень значимости измерений представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Количество стерильных семян *N. damascena* после стерилизации

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни (Р-значение)	Уровень значимости (α)
Лизоформин 3000 (10%)	81,82 ± 3,41	0,00007	0,05
Белизна (5-15%)	92,73 ± 2,49	0,00007	0,05
Биоцид (3%)	78,19 ± 2,76	0,00007	0,05
Хлорамин Б (5%)	77,27 ± 2,49	0,00007	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	58,19 ± 3,69	0,00007	0,05
Контроль	2,82 ± 0,71		0,05

Высокий процент стерильных семян (более 70%) для вида зарегистрирован при применении в качестве стерилизаторов растворов «Лизоформин 3000», «Белизна», Биоцид и Хлорамин Б при времени стерилизации 20 минут.

Результаты лабораторных исследований по стерилизации семян *E. purpurea*. представлены в таблице 7.

Критерий Манна-Уитни показал, что различия по влиянию стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов вида *E. purpurea* по сравнению с контролем, в качестве которого выступала вода (1,25 ± 0,41), достоверны при $P < 0,05$ для каждого из образцов. Количество стерильных эксплантов после обработки семян *E. purpurea* в течение 20 минут, средняя арифметическая, проверка гипотезы по критерию Манна-Уитни, а также уровень значимости измерений представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Количество стерильных семян *E. purpurea* после стерилизации

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Критерий Манна-Уитни (Р-значение)	Уровень значимости (α)
Лизоформин 3000 (10%)	97,75 ± 1,27	0,00078	0,05
Белизна (5-15%)	91,25 ± 1,06	0,00078	0,05
Хлорамин Б (5%)	89,8 ± 1,52	0,00078	0,05
Биоцид (3%)	96,6 ± 1,84	0,00078	0,05
Нитрат серебра (0,1%)	92,6 ± 1,35	0,00078	0,05
Контроль	1,25 ± 0,41		0,05

Для вида *E. purpurea* высокий процент стерильных семян (более 70%) зарегистрирован при применении всех исследуемых стерилизаторов, при времени стерилизации 20 минут.

1.2.3 Анализ влияния стерилизующих агентов на количество жизнеспособных эксплантов

Обработка семян агрессивными стерилизующими агентами часто ведет к гибели семян, поэтому помимо необходимости получения стерильных эксплантов, важно сохранить их способность давать жизнеспособные проростки, которые в дальнейшем вводятся в культуру *in vitro*. Влияние режимов стерилизации на получение жизнеспособных проростков видов *H. cretaceus*, *P. Grandiflora*, *S. Sclarea*, *B. Sarmatica*, *N. damascena* и *E. purpurea* отражены в таблицах 8-13.

Таблица 8 – Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных проростков вида *H. cretaceus*

Стерилизующий агент	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%)	87,65±2,572	6,4±2,72
Белизна (5-15%)	94,71±1,885	4,2±1,16
Биоцид (3%)	76,36±3,799	0,0±0,00
Хлорамин Б (5%)	36,36±1,635	6,3±1,28
Нитрат серебра (0,1%)	85,45±2,266	8,2±2,22

Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *H. cretaceus* представлено на рисунке 7.

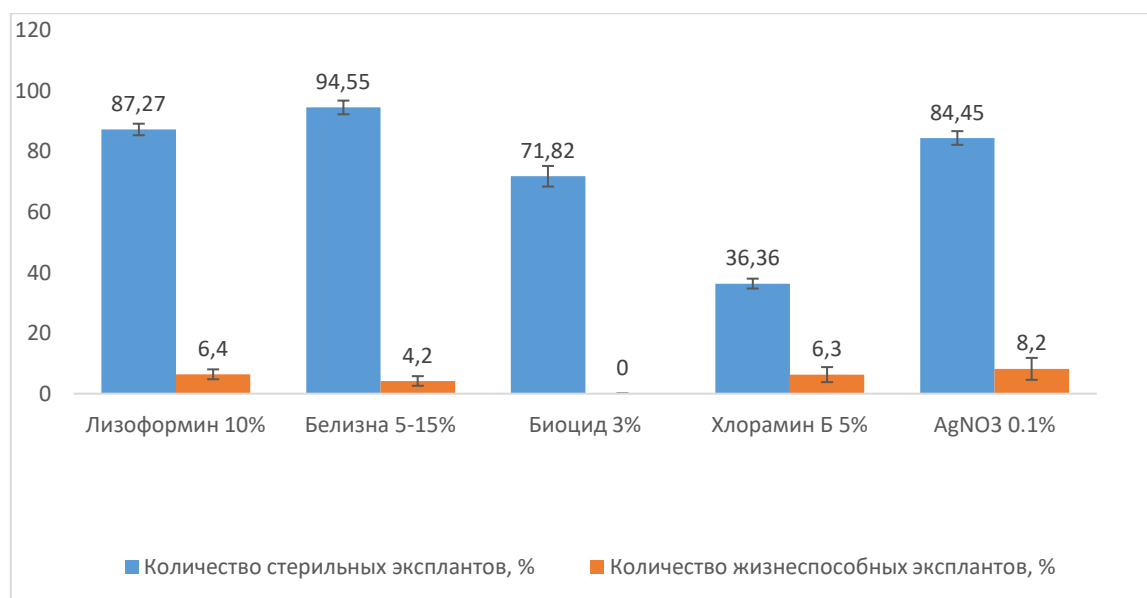


Рисунок 7 – Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *H. Cretaceus*

Оптимальное соотношение процента стерильных семян к проценту жизнеспособных для вида *H. cretaceus* получено при использовании 0,1% раствора нитрата серебра в течение 20 мин, также возможно применение в качестве стерилизующего агента 10% раствора «Лизоформин 3000». Для остальных стерилизующих агентов получен низкий процент жизнеспособных семян.

Таблица 9 – Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных проростков вида *P. grandiflora*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	94,55±2,593	0,00±0,000
Биоцид (3%-ный раствор)	96,36±3,575	11,83±3,911
Белизна (5-15%-ный раствор)	85,45±1,595	27,83±2,937
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	77,27±2,486	13,67±3,190
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	87,27±2,486	5,83±1,479

Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *P. grandiflora* отражено на рисунке 8.

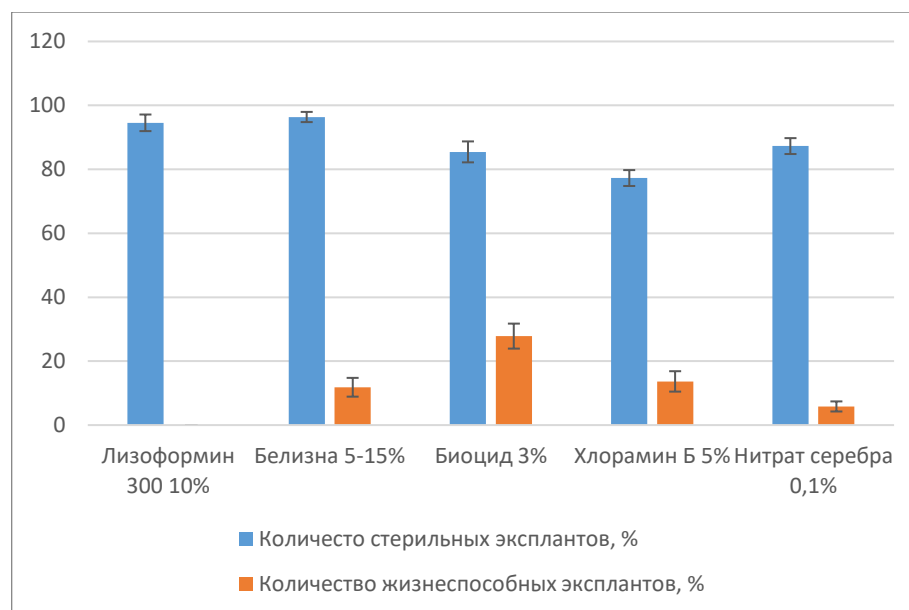


Рисунок 8 – Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *P. Grandiflora*

Оптимальным стерилизующим агентом для вида *P. grandiflora* является 3%-ный раствор Биоцида в течении 20 мин, так как получено оптимальное соотношение процента стерильных семян к проценту жизнеспособных.

Возможно применение в качестве стерилизующих агентов 5% раствора «Хлорамин Б» и 5-15% раствора «Белизна». Использование для стерилизации 10% раствора «Лизоформин 3000» и 0,1% раствора нитрата серебра не является рациональным, так процент семян жизнеспособных близок к нулю.

Таблица 10 – Влияние стерилизующих агентов на количество жизнеспособных проростков вида *S. sclarea*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	96,85±1,274	0,0±0,000
Биоцид (3%-ный раствор)	70,25±1,061	35,74±0,859
Белизна (5-15%-ный раствор)	61,13±1,346	13,50±0,922
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	59,75±1,546	24,47±0,742
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	93,63±1,346	54,25±1,066

Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *S. sclarea* отражено на рисунке 9.

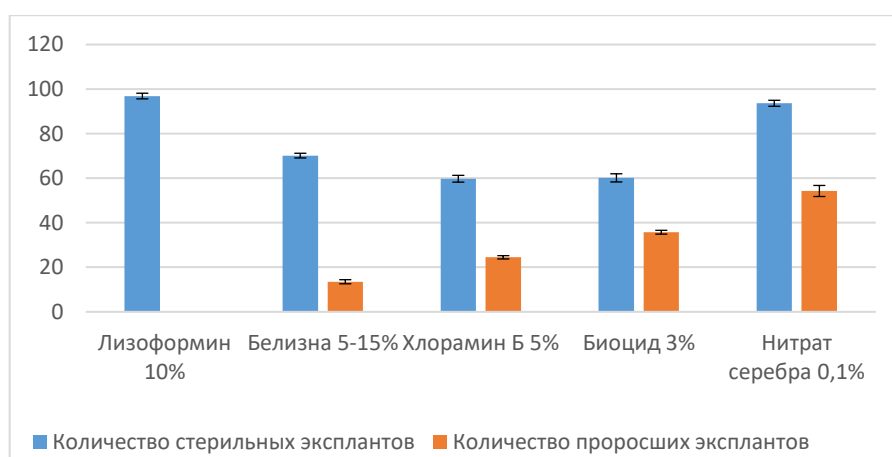


Рисунок 9 – Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных эксплантов и жизнеспособных проростков вида *S. sclarea*

Оптимальным режимом стерилизации вида *S. sclarea* является использование нитрата серебра в концентрации 0,1% в течение 20 минут, так как в данном случае получено наилучшее соотношение количество стерильных растительных эксплантов к количеству жизнеспособных семян. Применение режимов стерилизации с использованием остальных стерилизующих агентов не является целесообразным из-за их низкой эффективности.

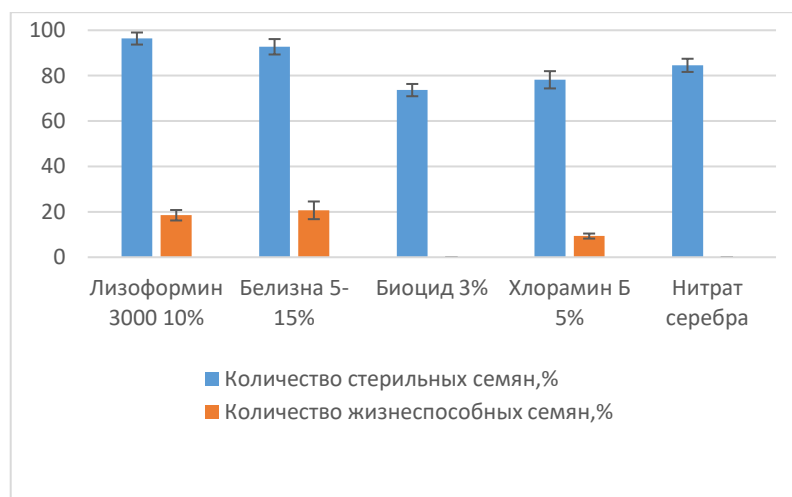


Рисунок 10 – Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *B. sarmatica*

Таблица 11 – Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *B. sarmatica*

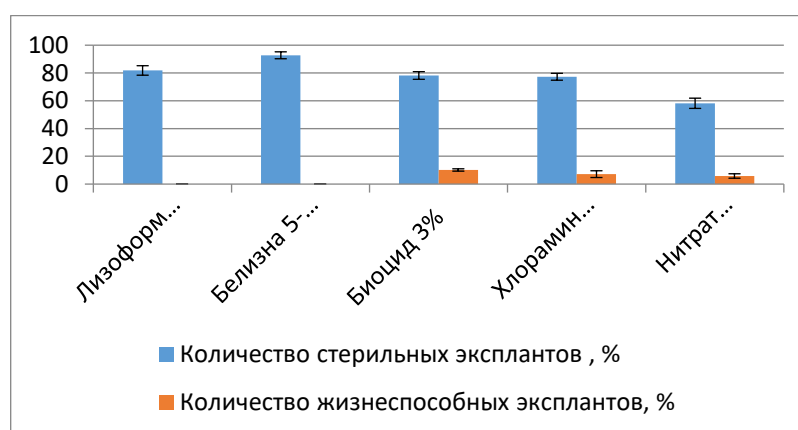
Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	96,36 ± 1,78	18,5 ± 2,56
Белизна (5-15%-ный раствор)	92,73 ± 2,78	20,67 ± 2,4
Биоцид (3%-ный раствор)	73,64 ± 3,63	0 ± 0
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	78,33 ± 3,09	9,33 ± 1,12
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	84,55 ± 3,66	0 ± 0,000

Как видно из данных, приведённых в таблице 11 и рисунке 10, оптимальным стерилизующим агентом для вида *B. sarmatica* является раствор

«Белизна» (5-15%), так как достигнуто наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов к количеству жизнеспособных. Также возможно применение в качестве стерилизующих агентов 5% раствора Хлорамина Б и 10% раствора «Лизоформин 3000», при их использовании так же достигается высокий уровень жизнеспособных эксплантов. Применение режимов стерилизации с использованием 3% раствора Биоцида и 0,1% раствора Нитрата серебра является нецелесообразным, так как жизнеспособность семян в данном случае утрачивается.

Таблица 12 – Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *N. damascena*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособны эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	81,82 ± 3,41	0
Белизна (5-15%-ный раствор)	92,73 ± 2,49	0
Биоцид (3%-ный раствор)	78,19 ± 2,77	10,17 ± 0,84
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	77,27 ± 2,49	7,17 ± 2,43
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	58,19 ± 3,69	5,83 ± 1,58



Рисунке 11 – Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *N. damascena*

Как видно из данных, приведенных в таблице 12 и на рисунке 11, оптимальным стерилизующим агентом для вида *N. damascena* является раствор

Биоцида в концентрации 3%, так как при использовании его в качестве стерилизатора достигнуто наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов к количеству жизнеспособных. Также оказалось возможным применение в качестве стерилизующих агентов 5% раствора Хлорамина Б и 0,1% раствора Нитрата серебра при их использовании так же достигается высокий уровень жизнеспособных эксплантов. Применение режимов стерилизации с использованием раствора «Белизна» и раствора «Лизоформин 3000» в концентрации 10% является нецелесообразным, так как жизнеспособность семян в данном случае утрачивается.

Таблица 13 – Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *E. purpurea*

Режим ступенчатой стерилизации	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (10%-ный раствор)	97,75 ± 1,27	0 ± 0
Белизна (5-15%-ный раствор)	91,25 ± 1,06	24,75 ± 0,86
Хлорамин Б (5%-ный раствор)	89,8 ± 1,52	15,25 ± 0,86
Биоцид (3%-ный раствор)	96,6 ± 1,84	0 ± 0
Нитрат серебра (0,1%-ный раствор)	92,6 ± 1,35	8,5 ± 0,97

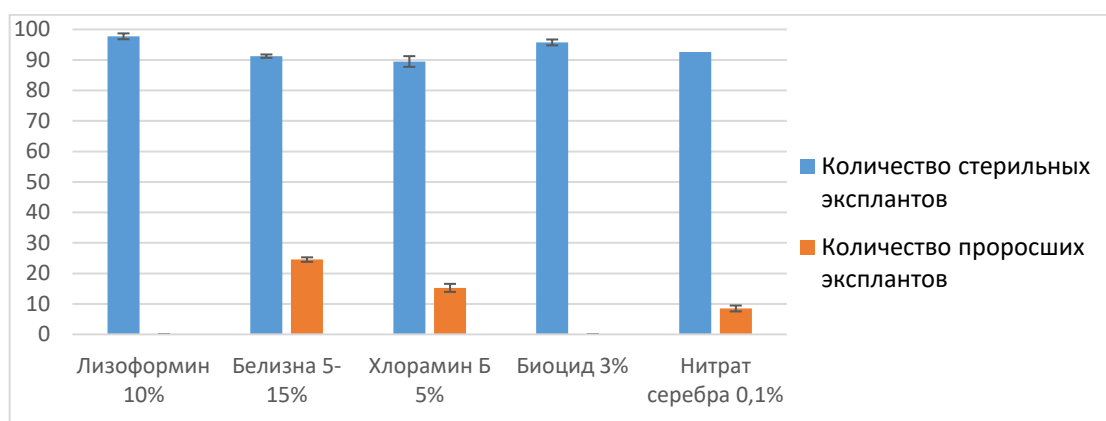


Рисунок 12 – Количество стерильных и жизнеспособных проростков вида *E. purpurea*

Оптимальным стерилизующим агентом для вида *E. purpurea* является раствор «Белизна» (5-15%), так как получено наилучшее соотношение количества стерильных растительных эксплантов к количеству жизнеспособных. Также возможно применение в качестве стерилизующих агентов раствора Хлорамина Б (5%) и Нитрата серебра (0,1%). Применение режимов стерилизации с использованием раствора Биоцида (3%) и раствора «Лизоформин-3000» в концентрации 10% является нецелесообразным, так как жизнеспособность семян в данном случае утрачивается.

Как видно из диаграмм рисунков 7-12, параметры стерилизации по-разному определяют результаты данного этапа: количественные характеристики стерильности семян не является достаточным условием обеспечения высокого процента количества асептических жизнеспособных проросших эксплантов.

1.3 Основные проблемы, возникающие при микроклональном размножении растений. Постановка задачи исследования

Для получения в условиях *in vitro* достаточного количества посадочного и безвирусного материала растений необходимо выявить оптимальные параметры стерилизации растительных эксплантов и компонентного состава питательных сред, используемых для микроклонального размножения. Данный процесс при реализации его в лабораторных условиях является длительным, трудоемким и затратным, требует проведения значительного числа опытов. Кроме того, при анализе его результатов необходимо обрабатывать значительные объёмы разнородной, иногда слабоструктурированной, информации. Традиционное использование методов статистической обработки данных не позволяет решить установленные противоречия.

Сегодня становится актуально использование современных методов и средств интеллектуального моделирования, в частности аппарата

искусственных нейронных сетей (ИНС), который позволяет разработать инструментарий для проведения необходимого количества имитационных компьютерных экспериментов. ИНС являются перспективной альтернативой классическим методам построения систем управления нелинейными стохастическими процессами, к которым относятся и процессы микроклонального размножения растений. Способность ИНС к обучению (как самостоятельно, так и с помощью «учителя» на основании соотношений «вход-выход») позволяет получить более простые решения, при этом, нейросетевые стратегии управления остаются эффективными как в условиях действия помех, так и при изменении параметров исследуемых процессов. В настоящее время при построении систем управления нелинейными процессами и объектами наибольшую популярность получили ИНС типа многослойный персептрон (МП), радиально-базисные сети (РБС). Следует особо отметить, что, благодаря способности ИНС к самообучению, для систем управления построенных на основе нейроконтроллеров, наличие большого объема априорной информации не требуется. Это позволяет использовать нейроконтроллеры в условиях существенных неопределенностей при оптимизации процессов микроклонального размножения.

Цель работы – совершенствование процесса микроклонального размножения растений на этапе стерилизации за счет разработки модели выбора оптимальных параметров стерилизации с использованием аппарата искусственных нейронных сетей.

Для достижения поставленной цели необходимо решение следующих задач:

- проведен анализ предметной области и существующих подходов к моделированию процессов в биотехнологии;
- проведена серия лабораторных экспериментов на этапе стерилизации и проанализированы полученные результаты;
- разработана функциональная модель модернизированного процесса микроклонального размножения;

разработаны и исследованы нейросетевые модели идентификации этапа стерилизации;

по результатам дискриминации нейросетевых моделей был синтезирован нейроконтроллер для управления этапом стерилизации;

- проведено имитационное моделирование, обеспечивающее реализацию оптимального стерилизующего режима для семян при введении в культуру *in vitro* редких лекарственных растений семейства губоцветные, произрастающими на территории Белгородской области.

2 Системное описание технологии получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений

2.1 Разработка функциональной модели существующего процесса микрклонального размножение

Построена функциональная модель традиционного процесса микрклонального размножения растений, с использованием графической нотации IDEF0, продемонстрированная на рисунке 13 (контекстная диаграмма «Как есть»).

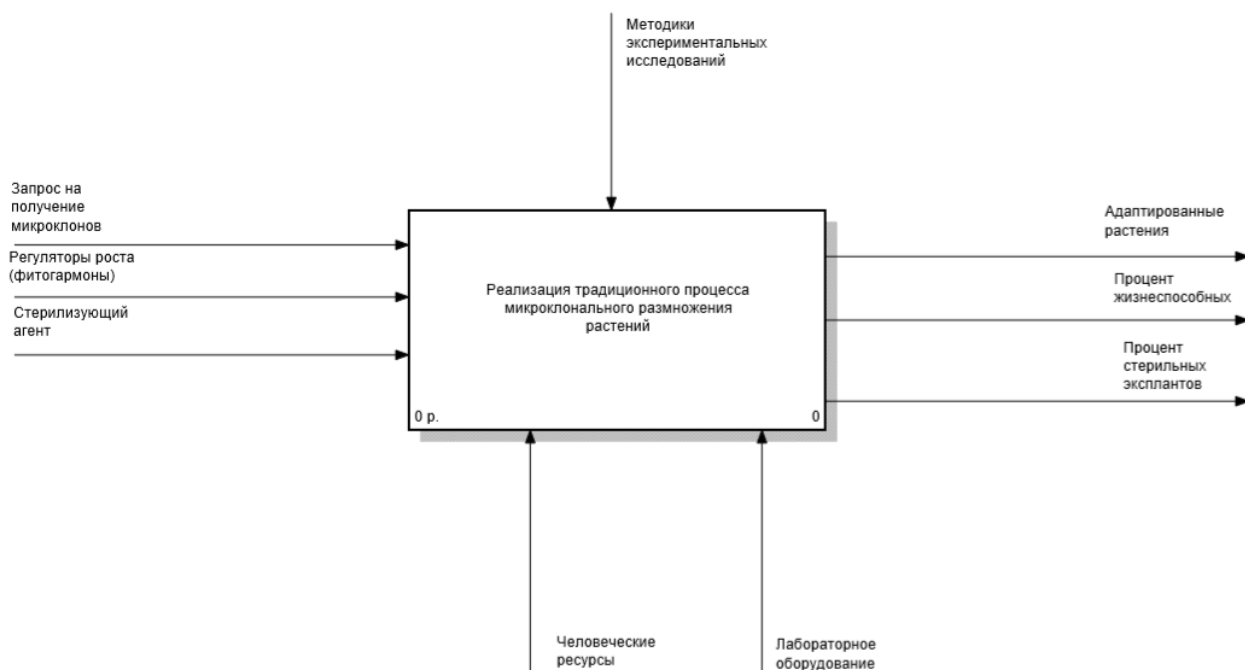


Рисунок 13 – Контекстная диаграмма традиционного процесса микрклонального размножения растений – «Как есть»

Входами для традиционного процесса микрклонального размножения растений являются: запрос на получение определённого вида и количества микрклонов; регуляторы роста (фитогормоны), которые используются для получения количества клонов; определенный стерилизующий агент, используемый на этапе стерилизации. Выходами описываемого процесса

являются: запрошенное количество адаптированных растений, процент жизнеспособных и стерильных эксплантов полученных на этапе стерилизации. Необходимыми механизмами для осуществления процесса являются лабораторное оборудование, используемое на всех этапах микрклонального размножения, и человеческие ресурсы – люди, задействованные в реализации эксперимента. Управляющий поток – методики экспериментальных исследований, регулирующие все этапы процесса.

Процесс микрклонального размножения является многоэтапным. На рисунке 14 отражена детализация традиционного процесса микрклонального размножения, выполненная в нотации IDEF0. Представленная модель демонстрирует последовательность реализации этапов, их взаимосвязь, входные, выходные и управляющие потоки для каждого этапа.

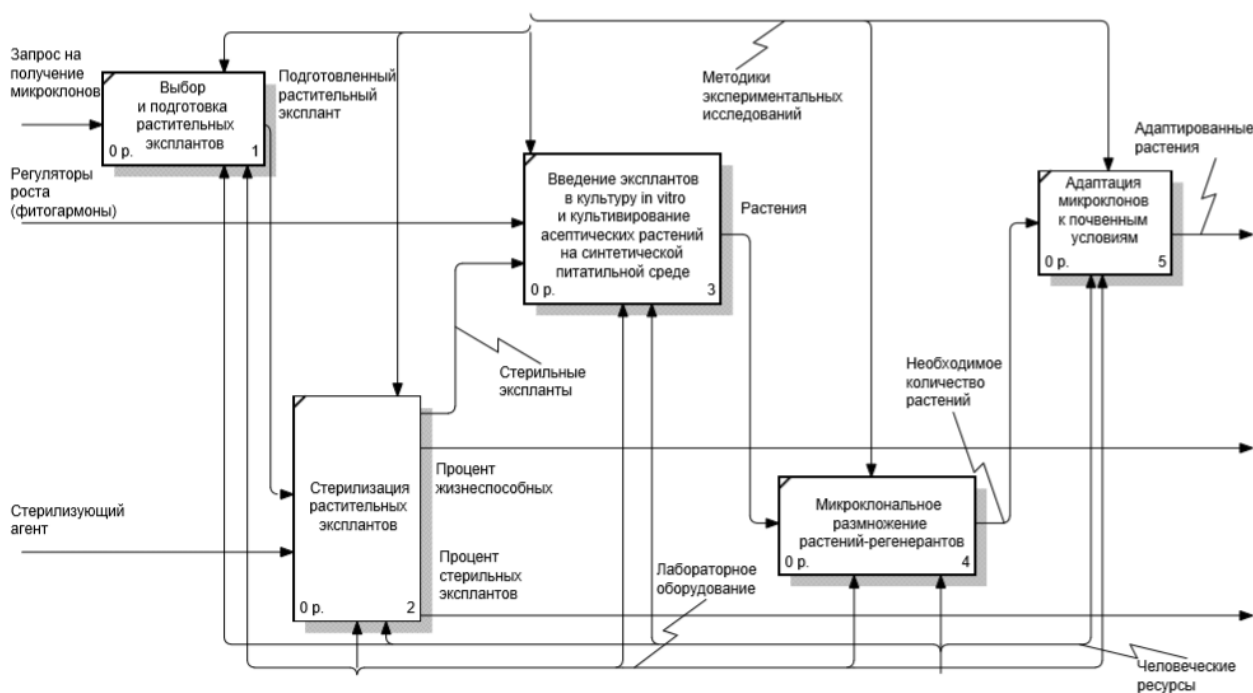


Рисунок 14 – Декомпозиция традиционного процесса микрклонального размножения растений – «Как есть»

Следует отметить, что выбор оптимальных параметров на каждом подэтапе – это длительный, трудоемкий и затратный процесс, требующий постановки и повторения значительного числа лабораторных экспериментов.

При этом происходит большой расход дорогостоящих компонентов, входящих в состав всех питательных сред, а также значительные затраты временных и людских ресурсов (на сбор материалов для опытов, обеспечение перед каждой серией опытов стерильных инструментов, посуды, питательных сред и условий в помещении и т.п.). Анализ результатов экспериментов и выявление оптимальных параметров этапов микроклонального размножения усложняется необходимостью работы с большим объемом разнородной, иногда слабоструктурированной информации.

2.2 Модернизация традиционного процесса микроклонального размножения за счет оптимизации его параметров

Предложена модернизация традиционного процесса микроклонального размножения за счет оптимизации его параметров на основе специально разработанных моделей оценок и прогнозов, проведения имитационных экспериментов. Функциональная модель предлагаемого модернизированного процесса представлена на рисунках 15,16.

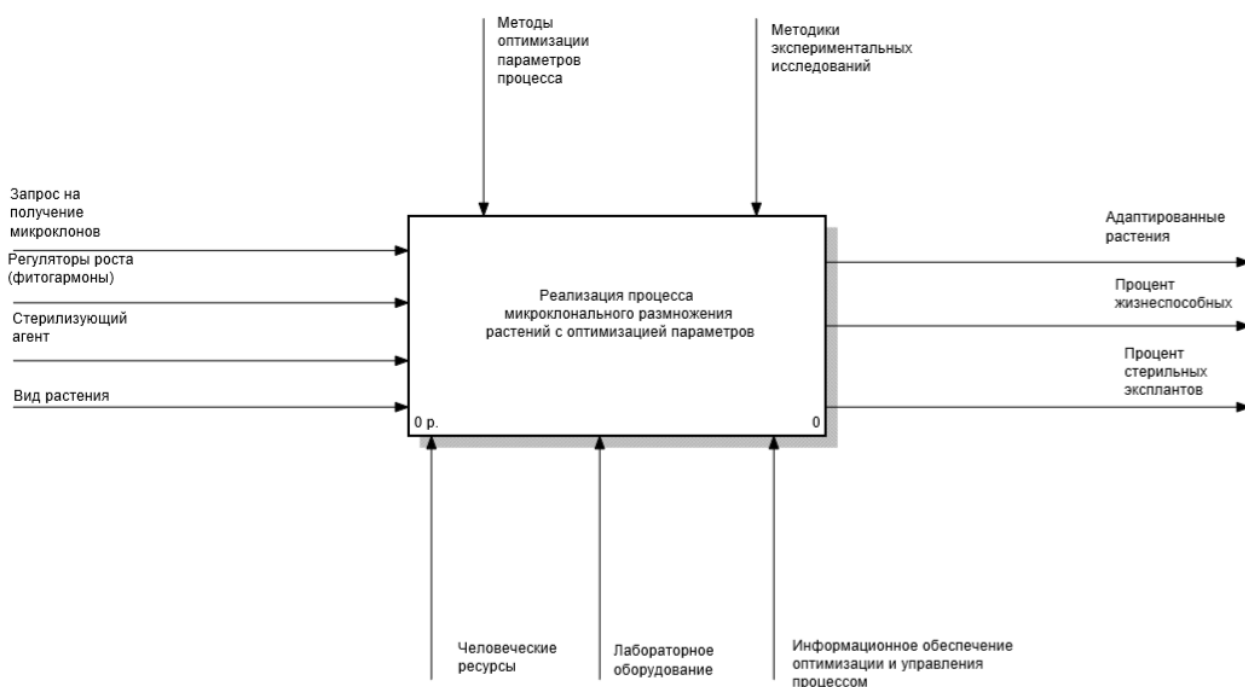


Рисунок 15 – Контекстная диаграмма модернизированного процесса микрклонального размножения растений с оптимизацией его параметров, «Как будет»

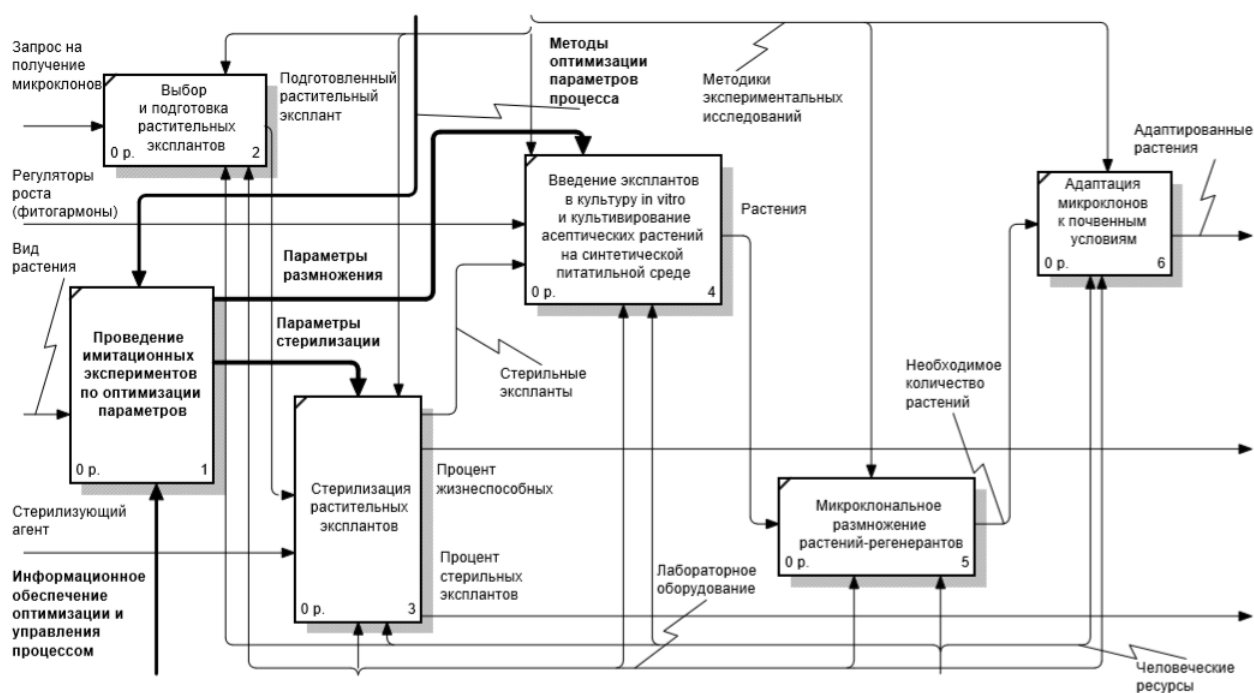


Рисунок 16 – Декомпозиция модернизированного процесса микрклонального размножения растений с оптимизацией его параметров – «Как будет»

Модернизация процесса отражена в представленной функциональной модели за счет введения новых информационных потоков и дополнительного подпроцесса. Так, на рисунках 15, 16 в качестве механизма введен дополнительный поток «Информационное обеспечение оптимизации управления процессом»; на рисунке 14 при детализации процесса вводиться подпроцесс «Проведение имитационных экспериментов», выход которого определяет информационные управляющие потоки для подпроцессов стерилизации и введения эксплантов в культуру *in vitro*. Таким образом, вводятся новые контуры управления с участием этих подпроцессов, продемонстрированные на рисунках 17,18: блок 1 - «Проведение имитационных

экспериментов по оптимизации параметров», является управляющим, а блоки 3 и 4 становятся объектами управления.

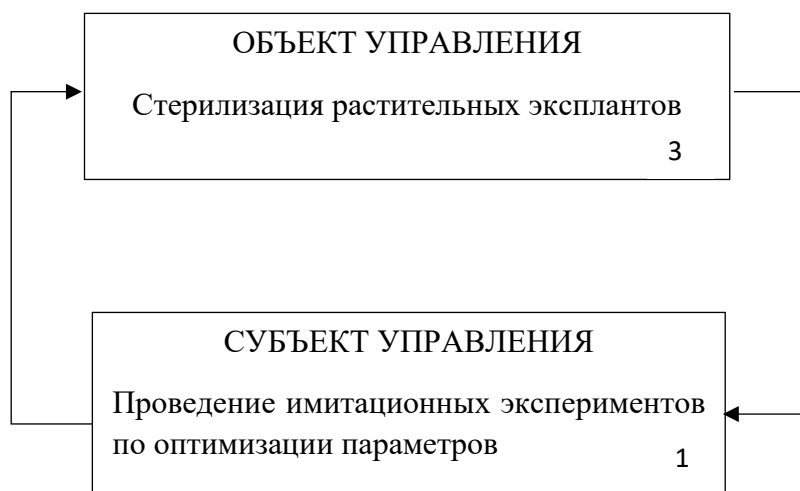


Рисунок 17 – Внутренний контур управления

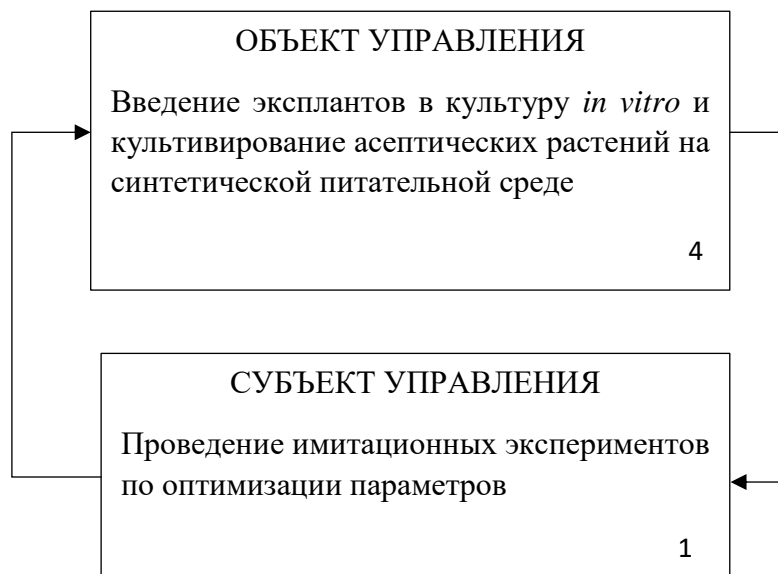


Рисунок 18 – Внутренний контур управления

Построенная функциональная модель показывает, что состояние этапа стерилизации (как одного из составляющих внутреннего контура управления введенного модернизированного процесса) определяет не только качество асептического материала, но и количество жизнеспособных стерильных проростков, что в целом определяет результат процесса микрклонального размножения. Таким образом, выявление причинно-следственной связи между

входами и выходами этапа стерилизации и оптимизация его параметров позволит повысить эффективность управления процессом микроклонального размножения.

2.3 Теоретико-множественная модель этапа стерилизации

Исходя из теоретико-множественного подхода, формально этап стерилизации растительных эксплантов предлагаемого авторами модернизированного процесса микроклонального размножения растений можно представить с помощью следующей модели:

$$ST_1 = \langle W_1, \Omega_1, X_1, Y_1, F_1, O_1 \rangle,$$

где W_1 – множество подпроцессов этапа стерилизации;

Ω_1 – множество внешних воздействий на элементы W_1 , а также заданные параметры среды и оборудования;

X_1 – множество варьируемых входных параметров, определяющих условия и результат этапа стерилизации растительных эксплантов. Проведенные в разделе 1 лабораторные исследования показали, что результат получения стерильной культуры, которая будет характеризоваться хорошим ростом, напрямую зависит от правильного выбора таких параметров, как вид стерилизующего агента (x_{11}), его концентрация (x_{12} , %), а также время обработки стерилизующим агентом растительных эксплантов (x_{13} , мин.);

Y_1 – выходные переменные модели: количество стерильных эксплантов (y_{11} , %), асептических жизнеспособных проростков (y_{12} , %);

F_1 – множество отображений осуществляемых на $W_1; \Omega_1, X_1, Y_1, F_1: (W_1, \Omega_1, X_1) \rightarrow Y_1$;

O_1 – множество отношений над элементами $W_1; \Omega_1, X_1, Y_1, O_1: (W_1^k, X_1^i, \Omega_1^l, Y_1^j)$, арности k, i, l, j зависят от лабораторных условий и вида растительных эксплантов.

Также, формально этап «Введение эксплантов в культуру *in vitro* и культивирование асептических растений на синтетической питательной среде» предлагаемого авторами модернизированного процесса микроклонального размножения растений можно представить с помощью следующей теоретика-множественной модели:

$$ST_2 = \langle W_2, \Omega_2, X_2, Y_2, F_2, O_2 \rangle,$$

где W_2 – множество подпроцессов этапа;

Ω_2 – множество внешних воздействий на элементы W_2 , а также заданные параметры среды и оборудования;

X_2 – множество варьируемых входных параметров, определяющих условия и результат этапа введения эксплантов в культуру *in vitro* и культивирования асептических растений на синтетической питательной среде. Результат получения культуры, которая будет характеризоваться хорошим ростом, напрямую зависит от правильного выбора таких параметров, как виды регуляторов роста (x_{21}), их концентрация (x_{22} , %), стерильные растительные экспланты (x_{23} , ед.);

Y_2 – выходные переменные модели: количество растений - регенератов (ед.);

F_2 – множество отображений осуществляемых на $W_2; \Omega_2, X_2, Y_2, F_2: (W_2, \Omega_2, X_2) \rightarrow Y_2$;

O_2 – множество отношений над элементами $W_2; \Omega_2, X_2, Y_2, O_2: (W_2^k, X_2^i, \Omega_2^l, Y_2^j)$, арности k, i, l, j зависят от лабораторных условий и вида растительных эксплантов.

Важнейшими составляющими множеств отображений F являются функциональные зависимости, отражающие причинно-следственные связи между входными и выходными параметрами этапа «Стерилизация растительных эксплантов»: $y_{11} = F_{11}(x_{11}, x_{12}, x_{13}), y_{12} = F_{12}(x_{11}, x_{12}, x_{13}), y_{12} = F_{13}(y_{11})$ при определенных условиях Ω_1 и этапа «Введение эксплантов в

культуру *in vitro* и культивирование асептических растений на синтетической питательной среде»: $Y_2 = F_2(x_{21}, x_{22}, x_{23})$ при определенных условиях Ω_2 . Для построения соответствующих моделей, на основе которых будут проводиться имитационные эксперименты, авторами использовался аппарат ИНС, важным свойством которых является возможность параллельной обработки информации одновременно всеми нейронами. На основе подобных имитационных моделей возможно проведение имитационных экспериментов с изменением одновременно нескольких (в том числе, всех) параметров.

2.4. Выводы

Проведено системное описание технологии получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений, построена соответствующая функциональная модель «Как есть», с использованием нотации IDEF0, проведена детализация функциональной модели, демонстрирующая все подэтапы процесса и их взаимосвязи.

Осуществлено моделирование модернизированного процесса микроклонального размножения «Как будет», с использованием нотации IDEF0, обеспечивающего возможность выбор оптимальных параметров. В модернизированный процесс введен дополнительный управляющий поток и механизм реализации.

3 Разработка нейросетевой модели идентификации этапа стерилизации при введении растений в культуру *in vitro*.

3.1 Нейросетевые методы идентификации

В данной работе использовалась последовательно-параллельная модель, значение сигнала на выходе которой $\hat{y}(k+1)$ рассчитывается на основании значений входных $u(k), u(k-1), \dots$ и выходных сигналов объекта $y(k), y(k-1), \dots$ согласно уравнению:

$$\hat{y}(k+1) = f(y(k), y(k-1), \dots, u(k), u(k-1), \dots). \quad (1)$$

Последовательно-параллельная модель позволяет предсказывать поведение объекта на любое количество тактов вперед, благодаря чему она получила наибольшее распространение при решении задач идентификации.

Для построения нейросетевой модели процесса микрклонального размножения в работе применены ИНС типа МП, которые способны аппроксимировать с любой заданной точностью любую непрерывную функцию [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Нелинейный оператор объекта (2) аппроксимируется сетью некоторой системой базисных функций $\{\Phi_i(u)\}$, реализуемой нейронами, образующими слой сети. При этом задача идентификации сводится к обучению сети, то есть настройке параметров сети на основе предъявления обучающей выборки, в состав которой входят измеряемые значения входных и соответствующих выходных переменных.

$$\hat{y}(k) = \sum_{i=1}^N w_i \Phi_i(u(k)), \quad (2)$$

где w_i – весовые параметры сети;

$$u(k) = (y(k-1), \dots, y(k-m), u(k-1), \dots, u(k-n))^T.$$

При построении МП использовались сигмоидальные функции активации в скрытом слое:

- логистическая (униполярная)

$$f_{\log}(u) = \frac{1}{1 + e^{-\alpha u}};$$
$$\frac{d}{du} f_{\log}(u) = \alpha f_{\log}(u)(1 - f_{\log}(u)),$$
(3)

- гиперболический тангенс (биполярная)

$$f_{th}(u) = \tanh(\alpha u) = \frac{e^{\alpha u} - e^{-\alpha u}}{e^{\alpha u} + e^{-\alpha u}};$$
$$\frac{d}{du} f_{th}(u) = 1 - \tanh^2(\alpha u).$$
(4)

и линейные функции активации в выходном слое.

Для настройки весовых коэффициентов нейросетевых моделей процесса микроклонального размножения использовался один из наиболее эффективных алгоритмов обучения МП – модификация метода Ньютона –метод Левенберга-Марквардта **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**, в котором к аппроксимирующей функции добавляется квадратичный штраф за отклонение от точки w_k , а новая точка w_{k+1} определяется из условия минимума функции $f_k(w) + \alpha_k / 2 \|w - w_k\|^2$, что приводит к итерационной формуле

$$w_{k+1} = w_k - [G_k(w_k) + \alpha_k I]^{-1} \nabla f(w_k).$$
(5)

Точность результата на каждой итерации оценивается с использованием

функции ошибки E

$$E = \sum_{p=1}^P E_p, \quad (6)$$

где E_p – частичный вклад образца p в полную сетевую ошибку E .

Выбор функции ошибки имеет столь же существенное влияние на эффективность МП, как и выбор алгоритма обучения. Для оценки точности нейросетевой модели процесса микроклонального размножения была использована среднеквадратичная функция ошибки:

$$E = \frac{1}{2PN^L} \sum_{p=1}^P \sum_{i=1}^{N^L} (t_{i,p} - y_{i,p}^L)^2, \quad (7)$$

поскольку она нечувствительна как к числу образцов в наборе обучения, так и к числу нейронов в выходном слое сети, что позволяет использовать ее для сравнения различных конфигураций сетей. Обучение МП считалось успешным, когда сетевая ошибка достигала допустимого значения.

3.2 Нейросетевые стратегии управления

Для управления сложными процессами и реальными объектами, включая задачу оптимизации процесса микроклонального размножения, применяются различные архитектуры нейронных сетей. Однако наибольшее распространение получили системы, построенные на основе сетей персептронного типа, что обусловлено рядом причин:

1. Такие сети представляют собой структуры с прямыми связями, что эквивалентно традиционному представлению процессов и объектов управления в терминах вход-выход.

2. При построении нейрорегулятора достаточно использовать всего один скрытый слой с сигмоидальными функциями активации, для того чтобы реализовать любое нелинейное отображение между двумя конечными пространствами. Это свойство позволяет использовать МП для управления существенно нелинейными процессами.

3. Эквивалентность представления модели процесса или объекта МП и традиционного представления позволяет использовать для обучения сети хорошо развитые методы оценивания, используемые при традиционном подходе.

В работе использован непрямой метод нейросетевого управления, при реализации которого сначала строится нейросетевая модель объекта путем его идентификации по данным о входных и выходных сигналах, а затем выбирается алгоритм обучения нейроконтроллера, основанный на полученной нейросетевой модели.

Для оптимизации процесса микроклонального размножения нейронная сеть реализует отображение обратное закону функционирования объекта – реализует инверсно-прямое управление. Целью обучения сети при этом является минимизация функционала ошибки управления. Обучение сети прекращается, если ошибка становится близкой к нулю, что дает основание считать, что ИНС реализует инверсную динамику процесса управления. В работе была использована схема инверсно-динамического нейроуправления [Ошибка! Источник ссылки не найден.] (рисунок 19).

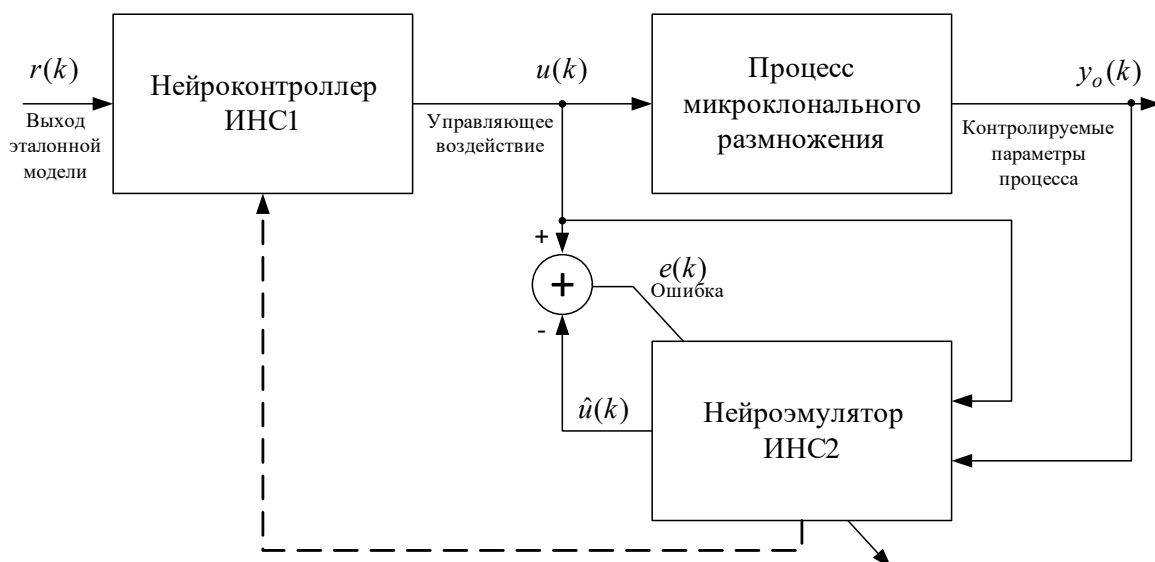


Рисунок 19 – Схема обратного отображения

Здесь нейроэмулятор ИНС2 обучается на инверсной модели процесса микрклонального размножения, а нейроконтроллер ИНС1 является копией сети ИНС2. Процедура копирования математической модели ИНС2 происходит после завершения ее обучения. Обучение ИНС2 инверсному отображению выполняется в автономном режиме.

3.3 Построение нейросетевой модели этапа стерилизации

Для разработки и оценки адекватности моделей были сформированы обучающие и тестовые выборки по результатам лабораторных опытов по стерилизации семян трех видов растений семейства губоцветные семейства: *V. Sarmatica*, *N. Damascena*, *E. Purpurea*. Данные опыты проводились с использованием различных стерилизаторов (Лизоформин 3000, Биоцид, Белизна (5-15%), Хлорамин Б, Нитрат серебра). Для каждого вида проводилось изменение концентрации стерилизатора (%) и времени обработки (мин), таблица 14. Для построения, обучения и проверки на адекватность моделей было проведено 585 экспериментов: по 195 экспериментов с каждым видом растений. Полученные результаты были разбиты на обучающую (450 экспериментов) и тестовую (135 экспериментов) выборки.

Таблица 14 – Изменение параметров стерилизации при проведении лабораторных опытов

№	Стерилизатор	Пределы изменения концентрации, шаг, %	Пределы изменения времени обработки, шаг, мин
1	Лизоформин 3000	[5;15], 5	[10;30], 10
2	Биоцид	[1;5], 2	[10;30], 10
3	Белизна (5-15%)	[50;100], 50	[10;30], 10
4	Хлорамин Б	[1;10], 5	[10;30], 10
5	Нитрат серебра	[0,05; 0,1], 0,05	[10;30], 10

Процессы построения и исследования моделей, а также осуществления имитационных экспериментов проводились с помощью пакета прикладных программ и функций Neural Network Toolbox компьютерной системы MATLAB. Процесс создания моделей изображен на рисунке 20

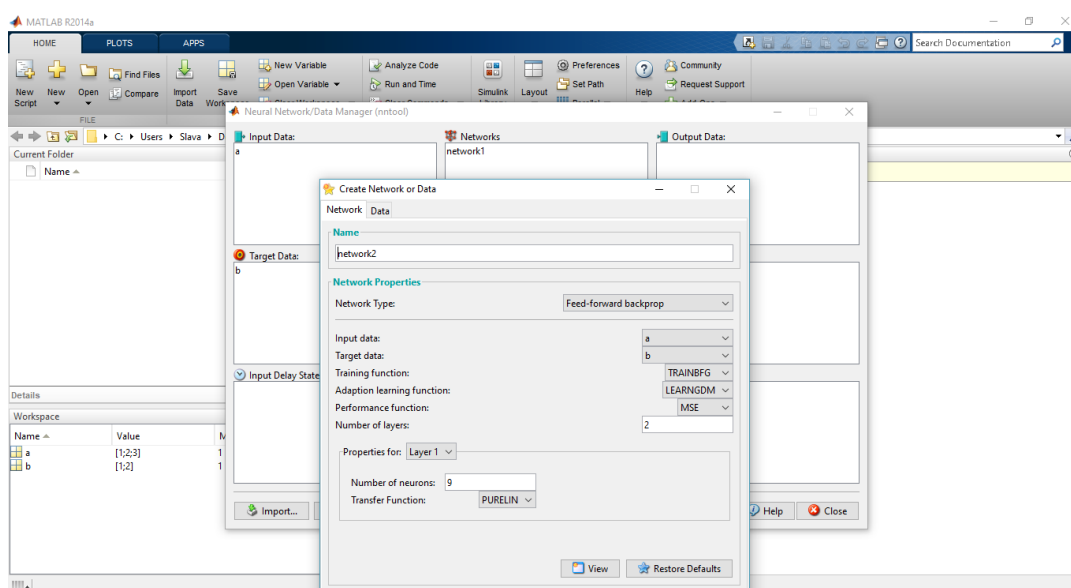


Рисунок 20 – Процесс создания моделей в среде MATLAB

В результате исследования и оценки адекватности ИНС различных структур получено, что лучшими прогностическими способностями обладает RBF-сеть с 143 нейронами в скрытом слое и радиально-базисными функциями активации. Для данной ИНС среднеквадратичная ошибка обучения $mse = 10^{-6}$;

коэффициент детерминации $R^2 = 99,89$; средние ошибки аппроксимации на обучающей и тестовой выборках: $\bar{A}_{об.} = 0,86\%$, $\bar{A}_{прог.} = 0,98\%$. В таблице 15 показаны результаты оценки адекватности ИНС с другими структурами, также показавшие хорошие результаты аппроксимации. Структуры ИНС изображены на рисунках 21-29.

Таблица 15 – Результаты экспериментов для подбора характеристик ИНС

Топология сети	Количество нейронов в скрытом слое	Функция активация нейронов скрытого слоя	mse, 10^{-5}	$R^2, \%$	$\bar{A}_{об.} \%$	$\bar{A}_{пр.} \%$
RBF	143	Радиально - базисная	0,1	99,89	0,86	0,98
Персептрон	9	Линейная	0,18	99,72	0,92	2,36
Персептрон	11	Линейная	0,14	99,87	0,77	4,64
Персептрон	15	Линейная	0,15	99,82	0,82	3,12
Персептрон	17	Линейная	0,19	99,75	0,88	4,18
Персептрон	19	Линейная	0,2	99,58	0,97	3,48
Персептрон	8	Сигмоидная	0,16	99,88	0,33	1,35
Персептрон	12	Сигмоидная	0,12	99,86	0,61	2,44
Персептрон	13	Сигмоидная	0,14	99,88	0,42	1,39
Персептрон	15	Сигмоидная	0,17	99,85	0,55	1,6

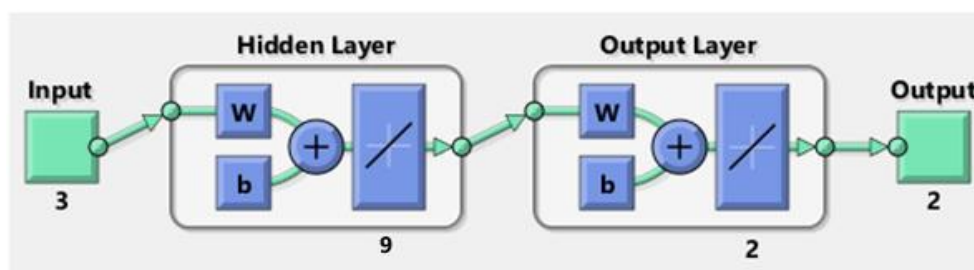


Рисунок 21 – Структура многослойного персептрона с 9 нейронами в скрытом слое и линейной функцией активации

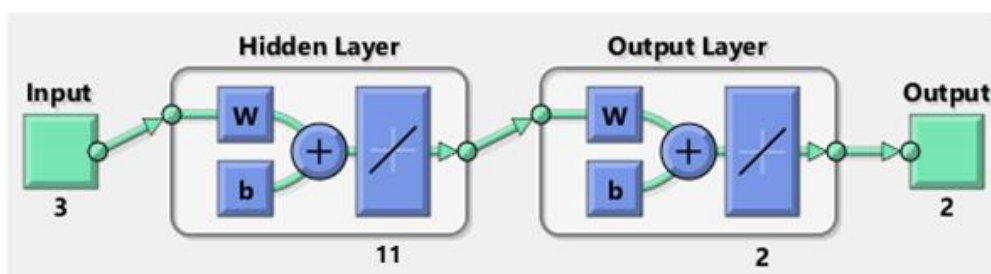


Рисунок 22 – Структура многослойного персептрона с 11 нейронами в скрытом слое и линейной функцией активации

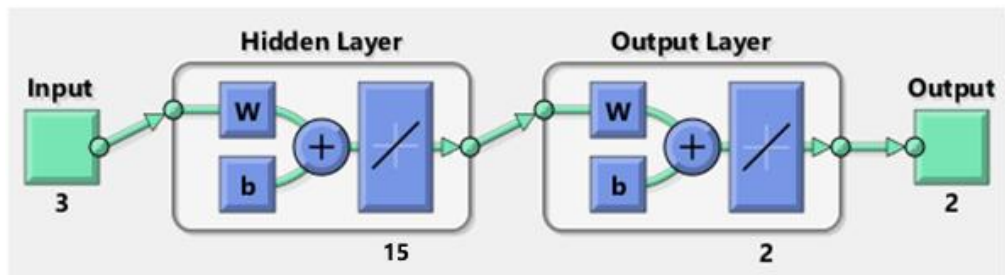


Рисунок 23 – Структура многослойного персептрона с 15 нейронами в скрытом слое и линейной функцией активации

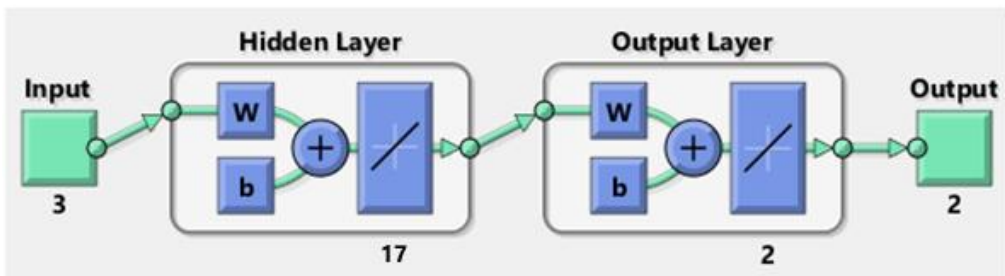


Рисунок 24 – Структура многослойного персептрона с 17 нейронами в скрытом слое и линейной функцией активации

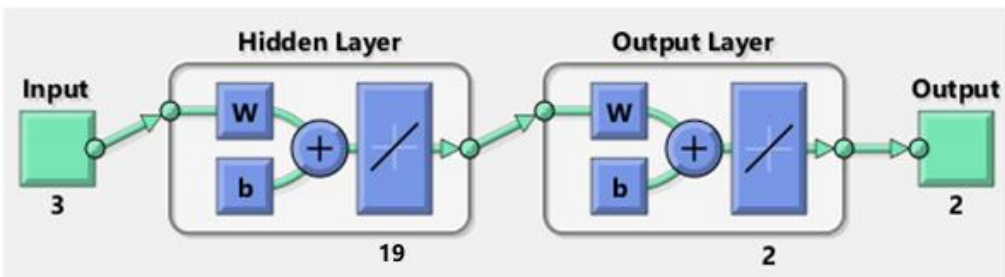


Рисунок 25 – Структура многослойного персептрона с 19 нейронами в скрытом слое и линейной функцией активации

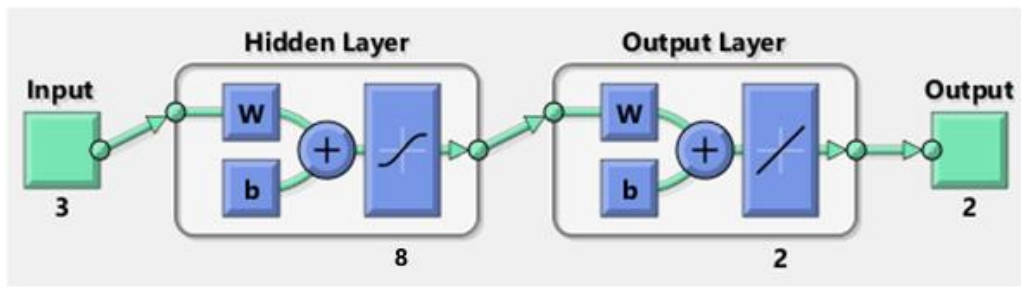


Рисунок 26 – Структура многослойного персептрона с 8 нейронами в скрытом слое и сигмоидной функцией активации

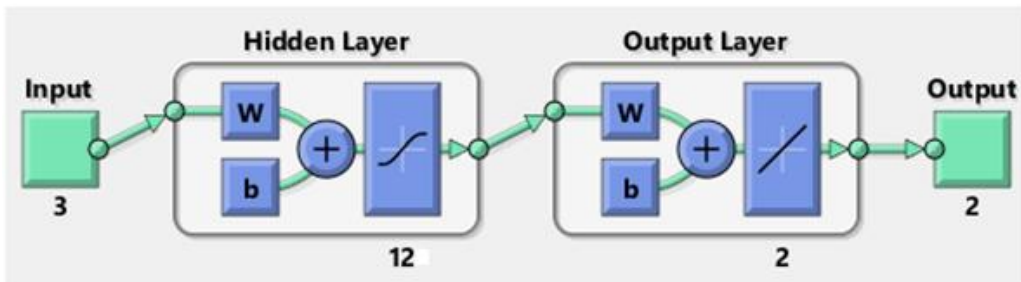


Рисунок 27 – Структура многослойного персептрона с 12 нейронами в скрытом слое и сигмоидной функцией активации

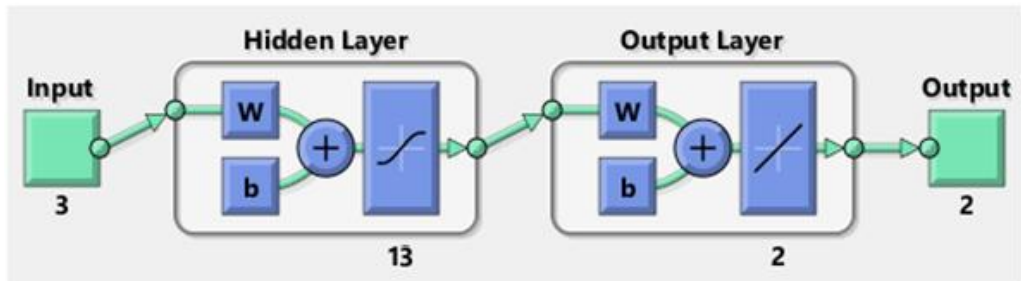


Рисунок 28 – Структура многослойного персептрона с 13 нейронами в скрытом слое и сигмоидной функцией активации

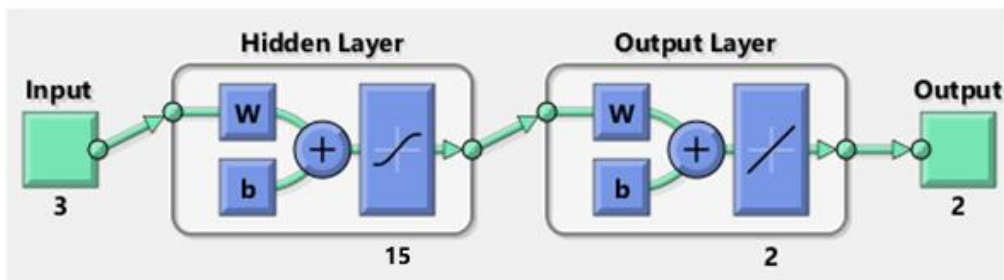


Рисунок 29 – Структура многослойного персептрона с 15 нейронами в скрытом слое и сигмоидной функцией активации

На рисунке 30 представлена структура выбранной модели для оценки, прогнозирования и оптимизации результатов стерилизации семян растений семейства губоцветных при введении их в культуру *in vitro*, которая реализована в системе компьютерной математики MATLAB.

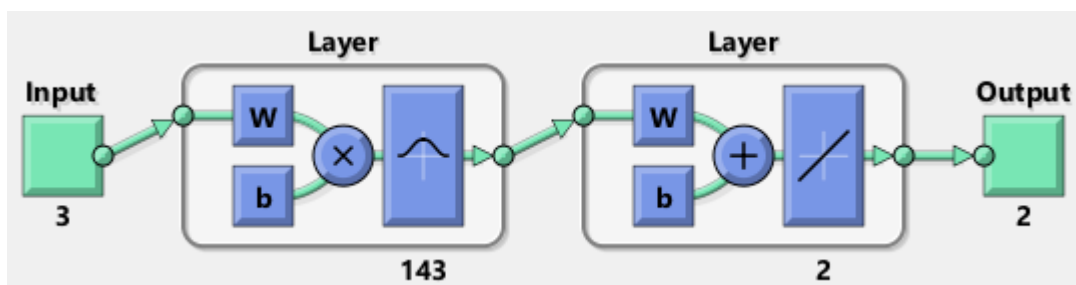


Рисунок 30 – Структура RBF сети для моделирования стерилизации растительных эксплантов, реализованная в системе MATLAB

Входами сети являются параметры $x_{11}, x_{12}, x_{13} \in X_1$, выходами параметры $y_{11}, y_{12} \in Y_1$.

Разработанная модель была использована для проведения имитационных экспериментов по выбору оптимальных параметров стерилизации семян при введении в культуру *in vitro* для растений *H. Cretaceus*, *P. Grandiflora*, *S. Sclarea*, относящихся к семейству губоцветные, произрастающих на территории Белгородской области и не входящие в обучающую и тестовые выборки используемые при построении модели. В рамках экспериментов на вход моделей подавались все возможные комбинации входных параметров (вид стерилизующего агента, концентрация стерилизующего агента и время стерилизации) с изменением концентрации стерилизующего агента от 1 до 100 % с шагом 0,01% и времени стерилизации от 1 до 30 минут с шагом 1 минута. Полученные результаты представлены в таблице 16. Процесс проведения имитационного эксперимента в среде MATLAB изображен на рисунке 31.

Таблица 16 – Оптимальные параметры этапа стерилизации, полученные на основе имитационных экспериментов

Вид растения	Стерилизующий агент X_1	Время стерилизации X_3 , мин	Концентрация стерилизующего агента X_2 , %	Количество стерильных эксплантов Y_1 , %	Количество жизнеспособных эксплантов Y_2 , %
<i>H. cretaceus</i>	Лизоформин 3000	9	7,12	74,2	15,9
<i>P. grandiflora</i>	Белизна (5-15%)	16	77,1	79,3	32,1
<i>S. sclarea</i>	Нитрат серебра	18	0,12	94,3	55,3

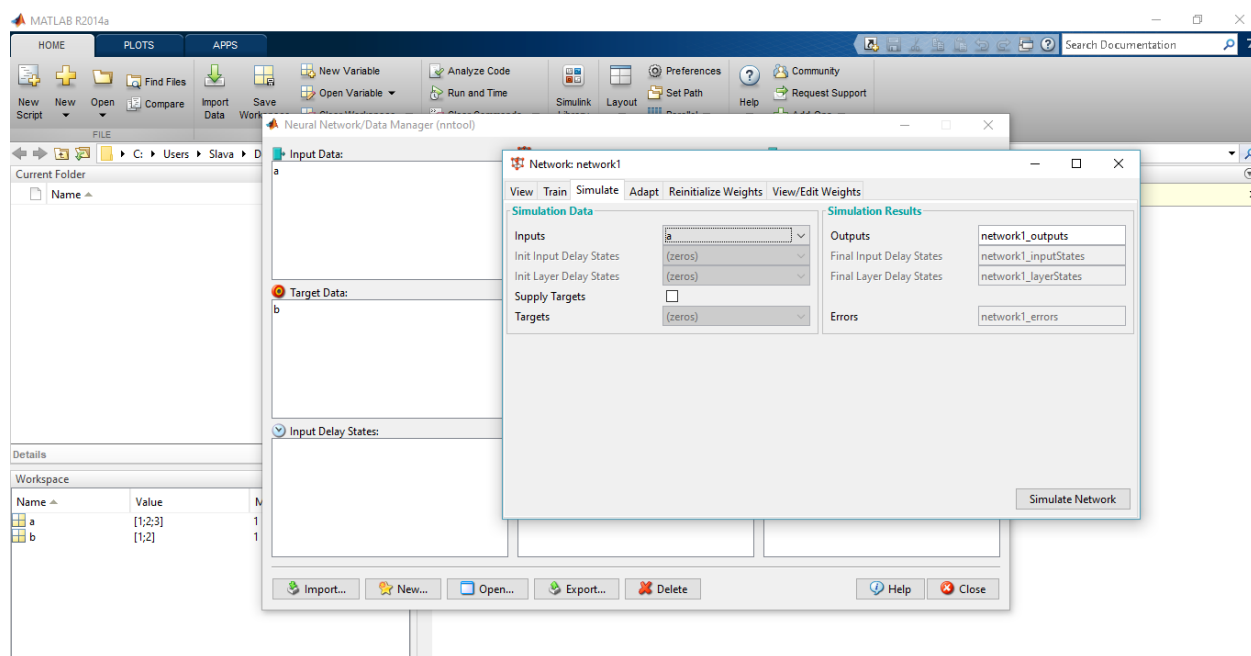
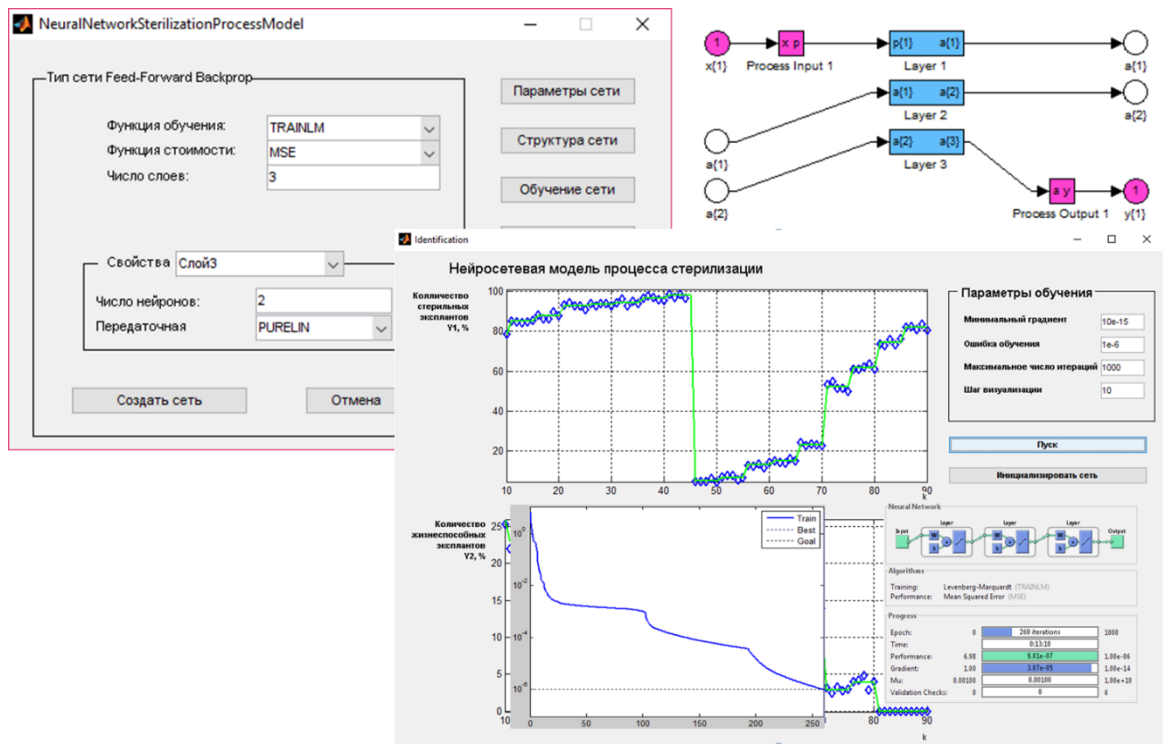


Рисунок 31 – Проведение имитационного эксперимента в среде MATLAB

3.4 Проверка работы нейросетевой модели этапа стерилизации

В ходе выполнения работы для проверки разработанной модели было проведено имитационное моделирование и были получены данные по действию наиболее эффективного стерилизующего агента, его концентрации и времени для шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.) (рисунок 32).



15

Рисунок 32 – Проведение имитационного эксперимента в среде MATLAB

Результаты лабораторных исследований, а именно влияние стерилизующих агентов на получение стерильных и жизнеспособных эксплантов при стерилизации семян представлено в таблице 17 и на рисунке 33. Таблица 17 Влияние стерилизующих агентов при стерилизации семян вида *S. pratensis*

Стерилизующий агент, его концентрация в растворе (%) и время стерилизации, мин.	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
Лизоформин 3000 (3), 10	60,00±1,83	16,67±1,05
Лизоформин 3000 (3), 20	96,67±1,05	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (3), 30	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5), 10	61,67±1,39	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5), 20	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (5), 30	96,67±1,05	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10), 10	96,67±1,05	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10), 20	100,0±0,0	0,0±0,0
Лизоформин 3000 (10), 30	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (3), 10	80,0±0,9	43,3±1,0
Биоцид (3), 20	96,67±1,05	20,0±1,8
Биоцид (3), 30	100,0±0,0	20,0±1,8
Биоцид (5), 10	96,67±1,05	20,0±1,8
Биоцид (5), 20	100,0±0,0	0,0±0,0

Биоцид (5), 30	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (10), 10	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (10), 20	100,0±0,0	0,0±0,0
Биоцид (10), 30	100,0±0,0	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (5-15), 10	96,67±1,05	20,0±1,8
Гипохлорит натрия (5-15), 20	100,0±0,0	20,0±1,8
Гипохлорит натрия (5-15), 30	96,67±1,05	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5), 10	81,67±0,53	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5), 20	96,67±1,05	0,0±0,0
Гипохлорит натрия (2,5-7,5), 30	100,0±0,0	0,0±0,0
Хлорамин Б (5), 10	96,67±1,05	20,00±0,35
Хлорамин Б (5), 20	100,0±0,0	20,00±0,35
Хлорамин Б (5), 30	96,67±1,05	20,00±0,35
Хлорамин Б (10), 10	100,0±0,0	30,00±0,37
Хлорамин Б (10), 20	100,0±0,0	20,00±0,35
Хлорамин Б (10), 30	96,67±1,05	20,00±0,35
Нитрат серебра (0,1), 10	96,67±1,05	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1), 20	96,67±1,05	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,1), 30	96,67±1,05	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5), 10	100,0±0,0	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5), 20	96,67±1,05	0,0±0,0
Нитрат серебра (0,5), 30	100,0±0,0	0,0±0,0
Контроль (дистиллированная вода), 30	6,67±1,05	0,0±0,0

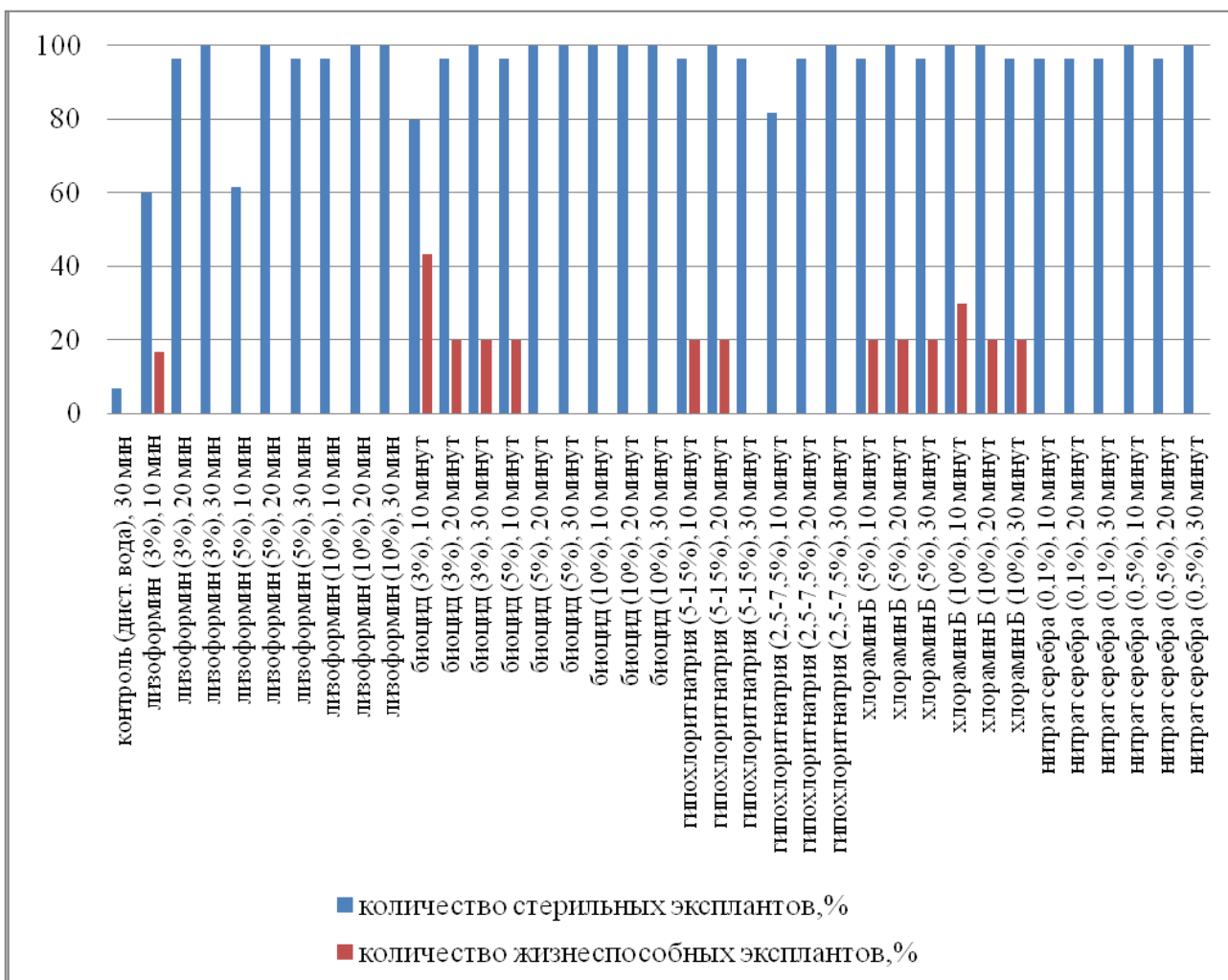


Рисунок 33 – Влияние стерилизующих агентов на количество стерильных и жизнеспособных эксплантов вида *S. Pratensis*

Как видно из таблицы 1 и рисунка 2 оптимальными стерилизующими агентами для семян вида *S. pratensis* являются 3%-ный раствор биоцида при его действии в течение 10 минут и 10%-ный раствор хлорамина Б при его действии в течение 10 минут, так как при таком способе стерилизации получено наиболее оптимальное соотношение количества стерильных растительных эксплантов (80% и 100%) к количеству жизнеспособных семян (42% и 25% соответственно). Так же возможно использование в качестве стерилизующих агентов лизоформин 3% в течение 10 минут; гипохлорит натрия – 10 минут; хлорамин 5% – 10 минут. Использование 3% биоцида в течении 20 и 30 минут действует более губительно на жизнеспособность растительных эксплантов

(20%) по сравнению с действием 3% биоцида в течение 10 минут (42%), поэтому наиболее эффективен режим 3%-го раствора биоцида при его действии в течение 10 минут. Использование гипохлорида натрия в течение 10 и 20 минут дает одинаковые результаты по влиянию на прорастание растительных эксплантов (20% в обоих вариантах), поэтому целесообразно использовать стерилизацию данным стерилизующим агентом в течение 10 минут. Результаты стерилизации хлорамином Б показывают достаточно высокую ее эффективность при использовании всех ее вариантов. В ходе лабораторных исследований были получены одинаковые результаты (20%) при оценке жизнеспособности растительных эксплантов, как при действии 5% хлорамина Б в течение 10, 20 и 30 минут, так и 10% хлорамина Б в течение 20 и 30 минут. И только лишь 10% хлорамин Б в течение 10 минут подействовал более эффективно (30%), именно его и рекомендуется использовать.

Применение всех остальных режимов стерилизации с использованием лизоформина и нитрата серебра в различных концентрациях и времени воздействия не является целесообразным, так как при их использовании процент жизнеспособных семян близок к нулю.

3.5 Алгоритм, реализующий метод выбора эффективного способа стерилизации растительных эксплантов

На рисунке 34 представлен алгоритм реализации комплексной оценки как текущего, так и прогнозного состояния культивируемого растения в условиях *in vitro*, реализующий предложенный и описанный выше метод и позволяющий сделать научно-обоснованный вывод о параметрах оптимального способа стерилизации.



Рисунок 34 – Алгоритм реализации комплексной оценки текущего/прогнозного состояния культивируемого растения в условиях *in vitro*, определяющий выбор эффективного способа стерилизации

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Теоретические и экспериментальные исследования, выполненные в рамках данного исследования, позволили получить новые знания, обеспечивающие построение перспективной технологии получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений с использованием современных информационных технологий и нейросетевого подхода.

Основные результаты выполнения исследования заключаются в следующем:

– Аналитический отчет и отчет о патентных исследованиях, позволяющие провести обоснование и выбор методов исследования, подходов к построению моделей процесса микроклонального размножения растений.

– Научно-методические и концептуальные подходы к построению эффективной технологии получения изолированной культуры редких и исчезающих видов растений (на примере Белгородской области).

– Выбор оптимальных параметров процесса стерилизации (вида стерилизующего агента, его концентрации и времени обработки растительных эксплантов стерилизующим агентом) и оценки его результатов (количество стерильных эксплантов и количество жизнеспособных проростков) на основе применения аппарата искусственных нейронных сетей.

- Теоретико-множественная модели исследуемого процесса.

- Имитационная модель этапа стерилизации процесса микроклонального размножения растений.

Анализ полученных результатов исследований позволяет утверждать, что задачи, сформулированные в исследовании, решены в полном объеме.

Результаты исследования позволят селекционным организациям и агропромышленным комплексам применять экономически целесообразные современные методы моделирования процессов в биотехнологии. Результаты также предназначены для научных и научно-производственных организаций и высших учебных заведений.

Список используемых источников

1. Флинт, В.Е. Сохранение и восстановление биоразнообразия: серия учебных пособий / В.Е. Флинт. – М.: Издательство Научного и учебно-методического центра, 2002. – 286 с.
2. Kikowska M., Thiem B., Sliwinska E., Rewers M., Kowalczyk M., Stochmal A., Długaszewska J. Micropropagation of *eryngium campestre* l. via shoot culture provides valuable uniform plant material with enhanced content of phenolic acids and antimicrobial activity/Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 2016. T. 58. № 1. С. 43-56.
3. Żebrowska J.I. Effect of quantitative plant traits on the efficiency of in vitro cloning of strawberry (*fragaria × ananassa* duch)/ Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2015. T. 90. № 4. С. 407-412.
4. Wu Y., Wu R., Zhang B., Jiang T., Li N., Qian K., Liu B., Zhang J. Epigenetic instability in genetically stable micropropagated plants of *gardenia jasminoides* ellis/Plant Growth Regulation. 2012. T. 66. № 2. С. 137-143.
5. Sudharsan C., Jibi S., Al-sabah L., AShkanani J., Al-melhem S. Plant micropropagation in desert rehabilitation - a success story/Biotechnology Program, Environment and Life Sciences Research Center, Kuwait Institute for Scientific Research, 2016.
6. Молканова О. И., Васильева О. Г., Коновалова Л. Н. Научные основы сохранения и воспроизводства генофонда ценных и редких видов растений в культуре *in vitro*/Бюллетень главного ботанического сада Издательство: Издательство "Научтехлитиздат" (Москва), №2(201), 2015. Стр. 78-82
7. Маслова Е.В., Гуля Н.И. Определение наиболее эффективного режима стерилизации растительных эксплантов редкого вида *Astragalus albicaulis* DS (Fabaceae) во флоре Белгородской области для получения его в культуре *in vitro* / Материалы сборника научных работ II-го Международного молодежного конкурса «Молодежь в науке: Новые аргументы». Отв. ред. А.В. Горбенко. – 2015. – С. 48-50.

8. Гуля Н.И., Маслова Е.В., Петрова И.В. Основные этапы клонального микроразмножения в условиях *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов растений / Сборник тезисов 20-я Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – 2016. – С.221.
9. Тимофеева, О.А. Культура клеток и тканей растений / О.А. Тимофеева, Н.И. Румянцева. – Казань: Казанский университет, 2012. – 88 с.
10. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева. – М.: «Высшая школа», 2008. – 710 с.
11. Gago J., Gallego P.P., Landín M. A neurofuzzy logic approach for modeling plant processes: a practical case of *in vitro* direct rooting and acclimatization of *vitis vinifera* L/Plant science. Издательство: Elsevier Science Publishing Company, Inc., №3, 2010, 241-249.
12. Pedro P. Gallego, Jorge Gago and Mariana Landín. Artificial neural networks technology to model and predict plant biology process/ World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher, 2011.
13. Frossyniotis, D.; Anthopoulos, Y.; Kintzios, S.; Moschopoulou, G. & Yialouris, C.P. Artificial neural network selection for the detection of plant viruses/ World Journal of Agricultural Sciences, 4, 1, 2008, 114-120.
14. Gago, J. Biotecnología de *Vitis vinifera* L.: Modelización mediante Inteligencia Artificial/ Doctoral Thesis, Universidade de Vigo, Vigo, Spain, 2009.
15. Gago, J.; Martínez-Núñez, L.; Landín, M. & Gallego, P.P. Artificial neural networks as an alternative to the traditional statistical methodology in plant research/ Journal of Plant Physiology, 167, 2010, 23-27.
16. Gago, J.; Landín, M. & Gallego, P.P. Artificial neural networks modeling the *in vitro* rhizogenesis and acclimatization of *Vitis vinifera* L/ Journal of Plant Physiology, 167, 2010, 1226-1231.
17. Gago, J.; Martínez-Núñez, L.; Landín, M. & Gallego, P.P. Strengths of artificial neural networks in modelling complex plant processes. Plant Signaling and Behavior 5, 6, 2010, 1-3.

18. Gago, J.; Landín, M. & Gallego, P.P. A neurofuzzy logic approach for modeling plant processes: a practical case of in vitro direct rooting and acclimatization of *Vitisvinifera* L/ *Plant Science*, 179, 2010, 241-249.
19. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание / Общ. науч. ред. А.В. Присный. – Белгород, 2004. – 532 с.
20. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003 – 58 с.
21. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: «Высшая школа», 2008. – 710 с.
22. Зыбкина Д. Р. Введение в культуру некоторых редких и лекарственных растений семейства *Lamiaceae* (губоцветные). Выпускная квалификационная работа. – Белгород, 2017 – 68 с.
<https://nauchkor.ru/uploads/documents/5b888ac37966e1073081baae.pdf>
23. Калинин Ф. Л., Сариацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений — Киев: Наук. думка, 1980 — 488 с.
24. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б. Основы биотехнологии растений. – Саратов: Издательство СГУ, 2002. – 34 с.
25. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and with tobacco tissue cultures / *Physiologia Plantarum*. – 1962. – №15. – 473-397 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Регламент поиска и отчет о поиске

Наименование работы (темы) «Исследование методов и моделирование процессов в биотехнологии и систематике растений»

Цель поиска информации (в зависимости от задач патентных исследований, указанных в задании) проведение патентного поиска о наличии выданных на территории РФ и ведущих стран мира патентов по теме «Микроклональное размножение»

Обоснование регламента поиска: Необходимо проведение поиска по патентной и научно-технической документации ведущих стран по классификационным рубрикам МПК, за период до 10 лет для выявления технических решений наиболее высокого уровня в данной области.

Начало поиска 15.03.2017

Окончание поиска 05.04.2017

Предмет поиска (объект исследования, его составные части, товар)	Страна поиска	Источники информации, по которым будет проводиться поиск								Ретро-спективность	Наименование информационной базы (фонда)	
		патентные		НТИ*		конъюнктуры		другие				
		Наименование	Классификационные рубрики: МПК (МКИ)*, МКПО*, НКИ* и другие	Наименование	Рубрики УДК* и другие	Наименование	Код товара : ГС*, СМТК*, БТН*	Наименование	Классификационные индексы			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Микроклональное размножение	РФ, ЕС	Полнотекстовые БД по изобретениям и ПМ Роспатента Поисковые БД ЕПВ в интернете	A01N4/00									БД Роспатента http://www.fips.ru БД ЕПВ http://ep.espacenet

ОТЧЕТ О ПОИСКЕ

В.1 Поиск проведен в соответствии с заданием.

В.2 Этап работы

В.3 Начало поиска 15.03.2017 Окончание поиска 05.04.2017

В.4 Поиск выполнен в соответствии с регламентом от 15.03.2017

В.5 Предложения по дальнейшему проведению поиска и патентных исследований: Направления дальнейших патентных исследований должны уточняться в соответствии с развитием прикладных исследований

В 6 Материалы, отобранные для последующего анализа.

Таблица В.6.1. Патентная документация

Предмет поиска (объект исследования, его составные части)	Страна выдачи, вид и номер охранного документа. Классификационный индекс*	Заявитель (патентообладатель), страна. Номер заявки, дата приоритета, конвенционный приоритет, дата публикации*	Название изобретения (полной модели, образца)	Сведения о действии охранного документа или причина его аннулирования
1	2	3	4	5
Микроклональное размножение in vitro	Россия Свидетельство о регистрации БД № 2016621625	федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет» (RU) заявка 2016621313 дата подачи заявки 05.10.2016 Опубликовано: 20.12.2016	«Кадастр оригинального семенного материала картофеля в Алтайском центре прикладной биотехнологии (на основе меристемной культуры in vitro)»	

	Россия Свидетельство о регистрации БД № 2017620325	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства"(RU) Заявка 2016621688 дата подачи заявки 20.12.2016 Опубликовано 17.03.2017	База данных физиолого-биохимических параметров органов и тканей сливы домашней при культивировании in vitro в контролируемых условиях и in vivo в неконтролируемых условиях на фоне вирусной инфекции на различных питательных средах	
Микроклональное размножение	Россия Заявка на изобретение № 96 116 371 МПК А01Н 4/00 (1995.01)	Коломиец Т.М., Мохно В.С. (SU) Заявка 96116371/13, дата подачи 08.08.1996 Дата публикации заявки: 20.11.1998	СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОЦЕННЫХ РАСТЕНИЙ И МИКРОЛУКОВИЧЕК ТЮЛЬПАНОВ ИЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ	
	Россия Патент на изобретение № 2 525 676 МПК А01Н 4/00 (2006.01)	Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный университет" (RU), Общество с ограниченной ответственностью ООО "Биолит" (RU) Заявка: 2012124353/10 Дата подачи заявки: 13.06.2012 Опубликовано: 20.08.2014	СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛАПЧАТКИ БЕЛОЙ (Potentilla alba)	
	Россия	Заявитель(и):	ПИТАТЕЛЬНАЯ	

<p>Заявка на изобретение №96116750 МПК А01Н 4/00 (1995.01)</p>	<p>Горский государственный аграрный университет Дата подачи заявки: 09.08.1996 Дата публикации заявки: 10.01.1999</p>	<p>СРЕДА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ ИЗ СЕМЯДОЛЕЙ</p>	
<p>Россия Заявка на изобретение № 93032551 МПК А01Н 4/00 (1995.01)</p>	<p>Заявитель(и): Ботанический институт им.В.Л.Комарова РАН, Санкт-Петербургский химико-фармацевтический институт Дата подачи заявки: 22.06.1993 Дата публикации заявки: 10.03.1996</p>	<p>СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ РАУВОЛЬФИИ РВОТНОЙ RAUWOLFIA VOMITORIA AFZ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ</p>	
<p>Россия Заявка на изобретение №94026958 МПК А01Н 4/00 (1995.01)</p>	<p>Заявитель(и): Красноярская государственная технологическая академия Дата подачи заявки: 15.07.1994 Дата публикации заявки: 10.06.1996</p>	<p>ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ТКАНИ СІLYCCYNІLA URALENSIS - ПРОДУЦЕНТА САПОНІНОВ</p>	
<p>Россия Заявка на изобретение №2012137582 МПК А01G 1/00 (2006.01) А01Н 4/00 (2006.01)</p>	<p>Заявитель(и): Общество с ограниченной ответственностью "ИНВИТРО" (RU) Дата подачи заявки: 04.09.2012 Дата публикации заявки: 10.03.2014</p>	<p>СПОСОБ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ КИЗИЛЬНИКА ДАММЕРА IN VITRO</p>	
<p>Россия Патент на изобретение №2 553 545 МПК А01Н 4/00 (2006.01)</p>	<p>Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва" Заявка: 2014115085/10 Дата подачи заявки:</p>	<p>СПОСОБ РАЗМНОЖЕНИЯ ГВОЗДИКИ IN VITRO</p>	

		15.04.2014		
	Россия Заявка на изобретение №96 112 871 МПК A01H 4/00 (1995.01)	Заявитель(и): Всероссийский научно-исследовательский институт льна Дата подачи заявки: 27.06.1996 Дата публикации заявки: 27.10.1998	ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ ЛЬНА	
	Россия Заявка на изобретение № 95119784 МПК A01H 4/00 (1995.01) C12N 5/00 (1995.01)	Заявитель(и): Кольцов Ю.В., Королев В.Н., Кусакин С.А., Золотарев В.Г. Дата подачи заявки: 21.11.1995 Дата публикации заявки: 20.10.1997	СПОСОБ ВЫРАЩИВАНИЯ БИОМАССЫ ЖЕНЬШЕНЯ	
	Россия Заявка на изобретение №94 025 958 МПК A01H 4/00 (1995.01)	Заявитель(и): Санкт-Петербургский химико-фармацевтический институт, Малое предприятие "Биоком"	ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ РАУВОЛЬФИИ ПРОДУЦЕНТА АЛКАЛОИДОВ	
	Россия Заявка на изобретение №2013 107 238 МПК A01H 4/00 (2006.01) B82B 1/00 (2006.01)	Заявитель(и): Республика Саха (Якутия), от имени которой выступает уполномоченное государственным комитетом Республики Саха (Якутия) по инновационной политике и науке лицо - Государственное бюджетное учреждение "Академия наук Республика Саха (Якутия)" (ГБУ АН РС(Я)) (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук" (ИБПК СО РАН)	СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА ЛЮЦЕРНЫ IN VITRO	

		Дата подачи заявки: 20.02.2013 Дата публикации заявки: 27.08.2014		
	Россия Патент на изобретение №2 547 593 МПК A01H 4/00 (2006.01)	Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный университет" (RU) Заявка: 2013138105/10 Дата подачи заявки: 14.08.2013 Опубликовано: 10.04.2015	СПОСОБ РАЗМНОЖЕНИЯ КОПЕЕЧНИКА ЧАЙНОГО (HEDYSARUM THEINUM KRASNOB.)	
	Россия Патент на изобретение №2 580 033 МПК A01H 4/00 (2006.01) •	Патентообладатель(и): Государственное научное учреждение Всероссийский научно- исследовательский институт цветоводства и субтропических культур Российской академии сельскохозяйственных наук (RU) Заявка: 2014120524/10 Дата подачи заявки: 21.05.2014 Опубликовано: 10.04.2016	СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИ Я ЛИМОНА in vitro	
	Россия Патент на изобретение №2 570 623 МПК A01H 4/00 (2006.01) •	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный университет" (RU) Заявка: 2014133881/10 Дата подачи заявки: 18.08.2014 Опубликовано: 10.12.2015	СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЛАПЧАТКИ БЕЛОЙ (Potentilla alba L.) В УСЛОВИЯХ ГИДРОПОНИКИ	

	<p>Россия Патент на изобретение №2 529 837 МПК A01H 4/00 (2006.01)</p>	<p>Патентообладатель(и): НИКИТСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД - НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР (RU) Заявка: 2014132464/93 Дата подачи заявки: 19.06.2014 Дата приоритета: 12.08.2003 Патент № 68595 (UA) (45) Опубликовано: 27.09.2014</p>	<p>СПОСОБ РЕГЕНЕРАЦИИ МИКРОПОБЕГОВ HYSSOPUS OFFICINALIS L. В УСЛОВИЯХ IN VITRO</p>	
	<p>Россия Патент на изобретение №2 506 741 МПК A01H 4/00 (2006.01)</p>	<p>Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный машиностроительный университет (МАМИ)" (RU) Заявка: 2012151194/10 Дата подачи заявки: 29.11.2012 Опубликовано: 20.02.2014</p>	<p>СПОСОБ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК ЛЬНА МНОГОЛЕТНЕГО</p>	
	<p>Россия Патент на изобретение №2 479 992 МПК A01H 4/00 (2006.01)</p>	<p>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Алтайский государственный университет" (RU) Дата подачи заявки: 25.10.2011 Опубликовано: 27.04.2013</p>	<p>СПОСОБ МИКРОКЛОНАЛЬНО ГО РАЗМНОЖЕНИЯ ИРИСА СИБИРСКОГО (I.SIBIRICA L.)</p>	

	<p>Россия Патент на изобретение №2 584 581 МПК A01H 4/00 (2006.01)</p>	<p>Патентообладатель(и): Эрст Анна Алексеевна (RU), Кульханова Динара Серыкбаевна (RU) Заявка: 2014127352/10 Дата подачи заявки: 06.07.2014 Опубликовано: 20.05.2016</p>	<p>СПОСОБ РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ ФРИТИЛЛЯРИЙ МЕТОДОМ КУЛЬТУРЫ in vitro</p>	
	<p>Россия Авторское свидетельство на изобретение №1 761 057 МПК A01H 4/00 (1990.01) C12N 5/04 (1990.01)</p>	<p>Заявитель(и): ЛЕНИНГРАДСКИЙ НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА Заявка: 90 4846701, Дата подачи заявки: 09.07.1990</p>	<p>СПОСОБ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ ИН ВИТРО</p>	
	<p>Россия Патент на изобретение №2 515 385 МПК A01H 4/00 (2006.01) A01G 7/00 (2006.01) A01G 23/00 (2006.01)</p>	<p>Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Воронежская государственная лесотехническая академия" (RU) Заявка: 2012153026/13 Дата подачи заявки: 07.12.2012 Опубликовано: 10.05.2014</p>	<p>СПОСОБ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ОЛЬХИ ЧЕРНОЙ IN VITRO</p>	

	Россия Патент на изобретение №2 111 652 МПК A01H 4/00 (1995.01)	Патентообладатель(и): Горский государственный аграрный университет Заявка: 96116869/13 Дата подачи заявки: 09.08.1996 Опубликовано: 27.05.1998	ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ	
	Россия Патент на изобретение №2 123 256 МПК A01H 4/00 (1995.01)	Патентообладатель(и): Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур Заявка: 96116371/13 Дата подачи заявки: 08.08.1996 Опубликовано: 20.12.1998	СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОЛУКОВИЦ ТЮЛЬПАНОВ ИЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ IN VITRO	
	Россия Авторское свидетельство на изобретение №1 807 844 МПК A01H 4/00 (1990.01)	Патентообладатель(и): ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ИМ.К.А.ТИМИРЯЗЕВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК Заявка: 91 4954420 Дата подачи заявки: 14.05.1991	СПОСОБ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ШАФРАНА ПОСЕВНОГО (CROCUS SATIVUS L.)	
	Молдавия MD605 МПК A01H4/00; A01H5/04	Патентообладатель(и): INST DE GENETICA SI FIZIOL A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE STIINTE A MOLDOVEI [MD] Заявка:MD2012S000098 Дата подачи заявки: 20120709 Опубликовано: 2013-03-31	Process for microclonal propagation of Actinidia arguta plants in vitro Процесс микроклонального размножения растений Actinidia arguta in vitro	
	Украина Патент UA65665 МПК A01H4/00	ЧЕРНОВЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ЮРИЯ ФЕДЬКОВИЧА (UA) Заявка	METHOD FOR MICROCLONAL PROPAGATION OF SPECIES OF SAUSSUREA DISCKOLOR	

		UA2011201106608U Дата подачи заявки: 2011.05.26 Опубликовано: 2011-12-12	(WILLD.) DC. AND SAUSSUREA PORCII DEGEN СПОСОБ МИКРОКЛОНАЛЬНО ГО РАСПРОСТРАНЕНИ Я ВИДОВ ДИСККОЛОРА SAUSSUREA (WILLD.) DC. И SAUSSUREA PORCII DEGEN	
	Украина Патент UA62089 МПК A01H4/00	НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ БИОРЕСУРСОВ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВА НИЯ УКРАИНЫ (UA) Заявка UA2011201101016U Дата подачи заявки: 2011.01.31 Опубликовано: 2011-08-10	METHOD FOR MICROCLONAL PROPAGATION AND ADAPTATION OF PROPAGATION MATERIAL OF HYBRID OF GRAY POPLAR AND WHITE POPLAR (POPULUS CANESCENS SM. X POPULUS ALBA L.) СПОСОБ МИКРОКЛОНАЛЬНО ГО РАСПРОСТРАНЕНИ Я И АДАПТАЦИИ РАСПРОСТРАНЕНН ОГО МАТЕРИАЛА ГИБРИДА СЕРЕБРЯНОГО ТОПОЛЯ И БЕЛОГО ТОПОЛЯ (ПОПУЛЯЦИОННЫЕ КАНЕСЫ СМ. X POPULUS ALBA L.)	

Таблица В.6.2. Научно-техническая, конъюнктурная, нормативная документация и материалы государственной регистрации (отчеты о научно-исследовательских работах)

Предмет поиска	Наименование источника информации с указанием страницы источника	Автор, фирма (держатель) технической документации	Год, место и орган издания (утверждения, депонирования источника)
Микроклональное размножение	A neurofuzzy logic approach for modeling plant processes: a practical case of in vitro direct rooting and acclimatization of vitis vinifera L.	Gago J., Gallego P.P., Landín M.	Plant science Elsevier Science Publishing Company, Inc., №3, 2010, 241-249
	Pedro P. Gallego, Jorge Gago and Mariana Landín.	Artificial neural networks technology to model and predict plant biology process	World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher, 2011.
	Роговая В.В., Гвоздев М.А.	Особенности микроклонального размножения косточковых	Известия Российского государственного педагогического

		культур в условиях in vitro	университета им. А.И. Герцена. – 2005. – №13. – 291- 301 с
	Гранда Роберто	Микроклонально е размножение хризантем	Известия Тимирязевской сельскохозяйственно й академии. 2009. № 1. С. 145-148.