

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

НУБІП України

06.07. – МР. 216 «С». 2023.02.15. 12 ТЗ

НУБІП України

СОКІЛ ЄЛИЗАВЕТА ВАДИМІВНА

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

НУБІП України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 57.085.23

НУБІП України

ПОРОДЖЕНО ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Декан факультету Завідувача кафедри

захисту рослин, біотехнологій та

екобіотехнології та біорізноманіття

екології

НУБІП України

Коломієць Ю.В. Кваско О.Ю.

2023 р. « » 2023 р.

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на

тему

НУБІП України

«Мікроклональне розмноження промислово цінних ягідних культур»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

НУБІП України

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

НУБІП України

НУБІП України

Гарант освітньої програми

Д. С.-Г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання) (підпис)

Лісовий М.М.

(ПІБ)

НУБІП України

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи

К.б. н.

(науковий ступінь та вчене звання) (підпис)

Кваско. О.Ю.

(ПІБ)

НУБІП України

Виконав

(підпис)

Сокіл Є.В.

(ПІБ студента)

НУБІП України

КИЇВ-2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

НУБІП України

Завідувач кафедри

“ ”

2023 р.

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

НУБІП України

Сокіл Єлизавети Вадимівни
(прізвище, ім'я по-батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Мікроклональне розмноження промислово цінних ягідних кудьтур»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 15.02.2023 р. №216 «С»
Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.
Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи регулятори росту, живильні середовища, вихідні рослини ожини

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Оптимізація отримання асептичних пагонів ожини
2. Аналіз впливу компонентів живильного середовища на мікроклональне розмноження пагонів ожини
3. Дослідження умов укорінення пагонів ожини *in vitro*
4. Акліматизація утворених пагонів ожини

Перелік графічного матеріалу: 56 сторінок, 6 таблиць, 12 рисунків, 99 літературних джерел.
Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ 6

НУБІП України

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1 Мікроклональне розмноження як метод біотехнології рослин.....	9
1.2 Промислово цінні ягідні культури в Україні.....	26
1.3 Рослини ожини як об'єкт біотехнологічних досліджень.....	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	38
2.1 Вихідний матеріал та отримання асептичних рослин ожини.....	38
2.2 Мікроклональне розмноження рослин ожини.....	38
2.3 Укорінення отриманих пагонів рослин ожини.....	39
2.4 Акліматизація отриманих пагонів ожини.....	39
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	41
3.1 Отримання асептичних рослин ожини.....	41
3.2 Вплив екзогенних регуляторів росту на мікроклональне розмноження рослин ожини.....	43
3.3 Вплив складу живильного середовища на укорінення пагонів ожини <i>in vitro</i>	46
3.4 Акліматизація вкорінених пагонів ожини.....	49
ВИСНОВКИ.....	51
Список використаної літератури.....	52

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РЕФЕРАТ

Дипломна робота була виконана протягом 2022-2023 рр. в Національному університеті біоресурсів і природокористування України. Складається з вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел.

Мета дипломного проекту: оптимізація умов отримання асептичних рослин ожини та їх мікроклонального розмноження.

Завдання досліджень:

1. Оптимізувати отримання асептичних пагонів ожини.
2. Проаналізувати вплив компонентів живильного середовища на мікроклональне розмноження пагонів ожини.
3. Дослідити умови укорінення пагонів ожини *in vitro*.
4. Дослідити акліматизацію утворених пагонів ожини.

Об'єкт досліджень: отримання асептичної культури рослин *in vitro* з експлантів ожини (*Rubus fruticosus* L.) сорту "Рубен".

Предмет досліджень: рослини ожини (*Rubus fruticosus* L.) сорту "Рубен".

Методи дослідження: біотехнологічні методи, зокрема, культивування рослин *in vitro*, статистичні методи.

ВСТУП

Культивування *in vitro*, також відоме як культура тканин, є потужною технікою, яка використовується для розмноження, збереження та генетичного вдосконалення видів рослин. Ця техніка передбачає вирощування рослин у контрольованому лабораторному середовищі в асептичних умовах з використанням культуральних середовищ, доповнених основними поживними речовинами та регуляторами росту.

На сьогоднішній основним комерційним застосуванням культури клітин і тканин є розмноження рослин. Крім того, культура тканин пропонує додаткові можливості для швидкого розповсюдження нових сортів рослин. Крім того, рослини можна вирощувати протягом усього року, а не в обмежений період.

Ожина - це різноманітна група видів та гібридів роду *Rubus*. Вони належать до родини Розові (*Rosaceae*). *Rubus* - один з найрізноманітніших родів квіткових рослин різноманітних родів квіткових рослин у світі і пристосовані до широкого діапазону середовищ. Ожина родом з Азії, Європи, Північної та Південної Америки. Однак, ожина, що вирощується в певних регіонах здебільшого походить від видів, що ростуть у цьому регіоні. Ожину використовували в їжу, в лікувальних цілях і як живопліт для захисту від мародерів. На південному сході США *Rubus* sp. використовувався для надання стійкості до низьких температур і хвороб сортів, таких як Brazos, а пізніше Turu [71].

Розмноження відводками вимагає значної площі для грядки для відводків, на одну рослину припадає небагато корінців, і боротьба з бур'янами між відводками є проблемою. Розмноження стебловими живцями листяних порід просте, але укорінення не завжди не завжди задовільне. Живці хвойних порід легко вкорінюються, але вимагають значно більшого догляду для успішного вирощування рослин.

Використання рослин, вирощених з культури тканин може вирішити проблему дефіциту площі для відводок та пришвидшити терміни розмноження такої цінної ягідної культури як ожина. На сьогоднішній день культура тканин *in vitro*

використовується для розмноження рослин, забезпечуючи тисячі безвірусних і генетично однорідних рослин, причому за скорочений час.

Враховуючи вище зазначене метою роботи було оптимізація мікроклонального розмноження рослин ожини з подальшої їх акліматизацією.

В роботі використовувались методи біотехнології рослин, зокрема, методи культивування рослин *in vitro*, а також статистичні методи.

Практична значущість роботи полягає в розробленні рекомендацій щодо ефективного мікроклонального розмноження рослин ожини з отриманням великої кількості посадкового матеріалу.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

1.1 Мікроклональне розмноження як метод біотехнології рослин.

Людство з давніх часів використовувало дикоростучі рослини для їжі, лікування, на корм тваринам, для отримання тепла та побудови житла, і інших господарчих потреб. Прадавні люди перейшли від збирання дикоростучих рослин до їх цілеспрямованого вирощування. У теперішній час людство використовує для своїх потреб безліч видів рослин, з яких більше 1500 видів складають культурні рослини.

Культурною є рослина, яка цілеспрямовано висівається або висаджується у відкритий чи закритий (тепличний) ґрунт, вирощується та від якої отримують врожай. Врожаєм можуть бути окремі частини рослини – насіння, ягоди, листки, пагони, стебла, паростки, корені, бруньки, квітки, суцвіття тощо, або цілі рослини, які після збору використовують для різних потреб [88].

За напрямками використання рослини поділяються на:

- харчові – використовуються в харчуванні людини;
- кормові – використовуються в годівлі тварин;
- лікарські – використовуються в медицині, косметичі, ветеринарії;
- декоративні – використовуються для озеленення, оздоблення;
- технічні – використовуються для виробничих потреб як сировина, допоміжні матеріали, засоби виробництва та у господарській діяльності.

Вирощуючи певний вид рослини люди працювали над поліпшенням самої рослини, намагалися підібрати умови, які б забезпечили найкраще її культивування, отримання врожаю необхідної кількості та якості. Відповідно виникли дві сфери діяльності людини – селекція рослин та рослинництво, які у наш час є науковими напрямками підвищення ефективності сільського та лісового господарства, біотехнологічних виробництв [71].

Біотехнологія рослин – це наука про використання рослинних організмів, клітин, тканин та органів рослин, субклітинних, молекулярних структур та метаболітів

рослинної клітини для створення біотехнологічних продуктів. Біотехнологія рослин як окрема галузь біотехнології виникла за поєднання результатів розробок фізіології, генетики та щитоембріології рослин. Основою біотехнології рослин є метод культивування ізольованих клітин, тканин та органів *in vitro*. Він дозволяє використовуючи ізольований стан об'єктів культивування в умовах *in vitro* керувати диференціацією та морфогенезом рослини, спрямовувати їх на досягнення визначених цілей, проводити генетичну трансформацію [88].

Промислова біотехнологія рослин забезпечує випуск промислових продуктів – рослинної біомаси та рослинних метаболітів для подальшого використання у медицині і ветеринарії, фармації, косметології, харчовій та хімічній промисловості.

Мікроклональне розмноження – важливий біотехнологічний напрям, який дозволяє проводити масове розмноження рослин в асептичній культурі.

Такий підхід є продуктивним для масового, швидкого розмноження цінних, унікальних відселектованих генотипів або рідкісних, зникаючих видів та сортів, для розмноження видів рослин або унікальних рослинних особин, для яких відтворення в природі як насіннєвим шляхом, так і вегетативно є ускладненим. Для певних видів рослин застосування мікроклонального розмноження є корисним для закріплення гетерозису, для швидкого розмноження садивного матеріалу, звільненого від вірусних, бактеріальних та грибних патогенів, та в інших випадках. Дуже важливим є створення в процесі мікророзмноження багаточисленних нащадків, які за генотипом не відрізняються від батьківської особини.

Мікроклональне розмноження проводиться в культурі *in vitro* і передбачає використання експлантів різних типів з обов'язковою регенерацією великої кількості рослин. Для різних культур використовують різні підходи та способи мікроклонального розмноження. У теперішній час методи мікроклонального розмноження ро-

зроблені та використовуються в технологіях вирощування садових та лісових деревних культур, таких як ягідних культур, як смородина, малина, агрус, полуниця, нових культур – лохини, ожини, для яких важливо отримати клони нових сортів [89].

Пошук шляхів прискореного розмноження рослин завжди був актуальним, а тому дослідження в цьому напрямі продовжуються й досі. Основою для їх проведення було бажання мати якнайбільшу кількість рослин, ідентичних клону, який виділюється за комплексом агрономічних ознак у природних умовах.

Переваги прискореного розмноження рослин *in vitro* нині зводяться до можливості:

1. використання мінімальної кількості вихідного матеріалу;
2. отримання генетично однорідного матеріалу;
3. накопичення садивного матеріалу у рослин, які мають низький коефіцієнт розмноження, високо цінних або рідкісних у природному середовищі;
4. підтримання генотипів, які характеризуються генетичною стерильністю;
5. збереження в штучних умовах видів, для яких складаються вкрай несприятливі зовнішні умови в процесі вирощування, тобто які зникають із лиця Землі;
6. підтримання і збереження колекційних зразків впродовж тривалого часу;
7. швидкого збільшення площ, зайнятих новими сортами, гібридами;
8. накопичення садивного матеріалу впродовж року і планування необхідного його обсягу до певного строку використання;
9. отримання великої кількості матеріалу на малій лабораторній площі;
10. переривання періоду спокою органів рослин;
11. автоматизація процесів вирощування рослин;
12. виділення форм із зміненою сладкістю;
13. із залученням інших методів отримання оздоровленого садивного матеріалу від патогенної інфекції тощо.

Біотехнологічні методи в насінництві, розсадництві – один з найбільш перспективних сучасних напрямів сільськогосподарського, декоративного і лісового виробництва. Розмноження рослин *in vitro*, оздоровлення їх від патогенних мікроорганізмів, зокрема, вірусів, створення генетично змінених форм рослин, формування банків сортів і видів рослин та їх збереження і підтримування *in vitro* – це реальні здобутки біотехнології рослин, які щорічно збільшують масштаби її застосування [70].

Використовуючи умови *in vitro*, можна досягти коефіцієнту розмноження міскантусу за рік 1: 1 000 000, цукрових буряків за шість місяців 1: 5 000, картоплі за 8-10 місяців 1: 20 000, чого не можна досягти застосуванням будь-яких інших методів.

Цінність МКРР полягає в можливості поєднання з іншими методами, наприклад, з оздоровленням рослин від інфекції, зокрема вірусної, позбутися якої іншими методами дотепер не вдавалося, в той момент як втрати врожаю від її поширення надзвичайно великі [90].

Стерильність культури *in vitro* дозволяє використовувати пробірковий матеріал для біотехнологічних, генетичних, фізіологічних, мікробіологічних та інших досліджень.

Крім дотримання загальних біотехнологічних вимог, успіх МКРР залежить і від специфічних чинників: фізіолого-біохімічного стану експланта, складу живильного середовища, умов культивування та інших [90].

Культура рослинних тканин (КРТ) - це культура *in vitro* рослинних клітин, тканин, органів, насіння, протопластів або ембріонів на живильному середовищі в асептичних умовах, де температура, фотоперіод, вологість, світло та компоненти середовища забезпечують ідеальне, контрольоване середовище для вирощування [8]. КРТ, як найважливіший компонент біотехнології рослин, був і залишається одним з оптимальних підходів, який може бути застосований для подолання

багатьох проблем (таких як глобальне потепління, зміна клімату, посуха, засоленість ґрунту, глобальна водна криза), з якими стикається сільське господарство та садівниче виробництво [38,63]. За даними Організації Об'єднаних Націй, до 2050

року населення світу збільшиться до 9,9 мільярдів, отже, виробництво продуктів харчування має зрости на 50%, щоб прогодувати ще мільярди людей. КРТ може

гарантувати безперервність виробничих систем незалежно від екологічних чи географічних обмежень, щоб задовольнити потреби зростаючого населення в продуктах харчування, кормах, клітковині та енергоносіях [38]. Наразі використовується кі-

лька перспективних методів таких як мікророзмноження *in vitro*, органогенез і соматичний ембріогенез [7]. КРТ також має багато переваг, таких як отримання рос-

лин, вільних від патогенів [44,46]; соматична гібридизація [29,65]; швидке розмноження рослин, особливо тих видів рослин, що важко розмножуються [42]; покращення генетики комерційних рослин [36]; збереження рідкісних і зникаючих видів

рослин [16]; створення різних сортів, стійких до абіотичних стресів, таких як посуха, засоленість ґрунту та спека [27,54]; та отримання біологічно активних сполук

або вторинних метаболітів, особливо за допомогою культури суспензій рослинних клітин [22,30]. Також вважається основою садівничих розсадників, які можуть бути використані для розмноження рослин лісових, овочевих, плодкових та декоративних

видів [46]. Ці розсадники мають величезне економічне значення для багатьох систем садівничого виробництва, наприклад, виробництво саджанців для програм вирощування дерев [24]; наявність високоякісного садивного матеріалу дерев [16];

скрінінг хвороб та виявлення нових патогенів рослин для підтримки здорового стану розсадників [33], з метою виробництва високоякісних, продуктивних та віль-

них від патогенів рослин та/або дерев. Однак існує багато перешкод, які можуть призвести до втрати рослин в розсадниках і лабораторіях культури *in vitro*, такі як забруднення культур [49], гібридизація культур [49], побуріння тканин [41], некроз

культури [49], побуріння тканин [41], некроз

культури [49], побуріння тканин [41], некроз

кінчиків пагонів [59], затримка субкультури, сомоклональні варіації [43,45], затвердіння коренів загартовування коренів [49], а також невдача акліматизація або обмежена посадка [60].

Крім того, технологія мікророзмноження є дорожчою, ніж традиційні методи розмноження рослин, це капітало-, трудо- та енергоємна галузь, в той час як питома вартість однієї рослини в деяких випадках стає недоступною. До того ж, такий вид діяльності вимагає багато видів технічних навичок. У багатьох країнах, що розвиваються, часто нелегко отримати фінансові ресурси на обладнання, приміщення для культивування тканин і кваліфікований персонал. Також існує проблема з енергією, необхідною для технології культури тканин, зокрема електроенергією, яка важлива для контролю умов навколишнього середовища, таких як температура, тривалість дня і відносна вологість, а також чиста вода, які є дорогими [21].

Велика і постійно зростаюча кількість літератури присвячена різним проблемам мікророзмноження та його труднощів у лабораторіях.

До проблем, пов'язаних з мікророзмноженням рослин відноситься те, що будь-яка лабораторія потребує певного базового обладнання та умов, без яких неможливо виробляти будь-які матеріали для мікророзмноження. До них відносяться повна інфраструктура та кваліфіковані працівники для створення належних контрольованих умов [31].

В мікроклональному розмноженні рослин наявні і ті проблеми, що виникли з технічних причин, наприклад контамінація культур рослинних тканин.

Забруднення рослин *in vitro* вважається найбільшою перешкодою, яка запобігає успішному протоколу мікророзмноження. Забруднення може включати багато мікроорганізмів, таких як бактерії, гриби, плісняві гриби та дріжджі. Це забруднення є основним фактором втрати часу і зусиль, пов'язаних з мікроклональним розмноженням рослин, що збільшує собівартість продукції [21]. Зовнішнє забруд-

нення є результатом діяльності лабораторій та використовуваних матеріалів (поживні середовища; скляний посуд; культуральне середовище, інструменти, експлантати), тоді як внутрішня контамінація пов'язана з ендоситичними мікроорганізмами в материнських рослинах [23]. Для виключення та усунення внутрішньої контамінації можуть бути використані методи поверхневої стерилізації (Таблиця 1.1.1), такі як хімічні агенти (антисептичні засоби, рідкі миючі засоби, хлорид ртуті або гіпохлорит натрію), ультрафіолетової (УФ) стерилізації, автоклавування поживних середовищ та інструментів, а також поліпшення культуральних практик або маніпуляцій [49]. Таким чином, поверхневу стерилізацію обладнання та рослинних матеріалів слід застосовувати для покращення ефективності роботи лабораторій і, таким чином, в подальшому мати змогу отримувати асептичні культури [23].

Було проведено дослідження в якому пазушні пагони банана, контаміновані внутрішніми бактеріями, культивували на середовищі МС з додаванням різних стерилізованих на фільтрі антибіотиків (ампіцилін, пеніцилін, тикарцилін), доданих окремо в різних концентраціях (25, 50, 100, 200 мг/л). Результати цього дослідження показали, що досліджувані антибіотики зафіксували нульове забруднення при 100 та 200 мг/л, проте також було відмічено зниження параметрів розмноження пагонів. Найбільш ефективною концентрацією одного доданого антибіотика для усунення бактеріального забруднення була концентрація 100 мг/л [19].

Таблиця 1.1.1.
Методи поверхневої стерилізації від зовнішнього забруднення, що використовуються в лабораторіях культури тканин.

Досліджувані рослини	Методи поверхневої стерилізації та стерилізовані об'єкти	Основні результати дослідження
----------------------	--	--------------------------------

<p>Картопля (<i>Solanum tuberosum</i> L.)</p>	<p>Ультрафіолетове випромінювання експлантів протягом 10 хв</p>	<p>Зовнішнє забруднення експлантів зменшено.</p>
<p>Шовковиця (<i>Morus alba</i> L.)</p>	<p>Хлорид ртуті 0,2% протягом 10 хв на кінчики пагонів та допоміжні бруньки</p>	<p>Мінімальний відсоток зараження і високій відсоток виживання в кореляції з розвитком пагонів були відмічені для всіх досліджуваних сортів шовковиці.</p>
<p>Гуаяса (<i>Ilex guayusa</i> Loes.)</p>	<p>70% етанол на 2 хв + 2,5% натрію гіпохлориту + п'ять крапель Tween-20 на 25 хв на апікальний сегмент стебла.</p>	<p>Поверхнева стерилізація етанолом та гіпохлоритом натрію призвела до 100% стерилізації поверхнево стерилізованих частин.</p>
<p>Евкалипт (<i>Eucalyptus obliqua</i>)</p>	<p>Активний хлор, доданий до живильного середовища у концентрації 0,005% для укорінення та 0,003% для розмноження та подовження пагонів.</p>	<p>Активний хлор у концентрації 0,005% призводить до найнижчого рівня грибкового забруднення на стадії укорінення, та 0,003% призвело до максимальної кількості пагонів на експлантат і найбільшу</p>

<p>НУБІП УКРАЇНИ</p> <p><i>Rosmarinus officinalis L.</i></p>	<p>Біосинтез наночастинок срібла за допомогою <i>Rubia tinctorum</i></p>	<p>довжину пагонів на стадії розмноження. Відсоток стерильних експлантів варіював від 40 до 97%, по-</p>
<p>НУБІП УКРАЇНИ</p>	<p><i>L.</i> з використанням культури клітин були застосовані для поверхневої стерилізації стеблових експлантів</p>	<p>буріння не спостерігалося. Цей метод може використовуватися для</p>
<p>НУБІП УКРАЇНИ</p>	<p>поверхневої стерилізації експлантів, які мають проблему побуріння, спричинену вмістом фенольних сполук.</p>	<p>поверхневої стерилізації експлантів, які мають проблему побуріння, спричинену вмістом фенольних сполук.</p>
<p>НУБІП УКРАЇНИ</p> <p><i>Sargassum fusiforme</i></p>	<p>Неочищений екстракт лікарської трави рослини естрагон (<i>Artemisia dracunculus</i>)</p>	<p>Неочищений екстракт <i>A. dracunculus</i> показав високий мікробний стерилізуючий ефект (90, 80 та 20%)</p>
<p>НУБІП УКРАЇНИ</p>	<p>може використовуватися для поверхневої стерилізації експлантів (листоків, черешків та</p>	<p>для листків, прилистків та стелонів, відповідно. Він має дуже низьку токсичність для рослинних тканин порівняно з</p>
<p>НУБІП УКРАЇНИ</p>	<p>стелонів) культивованих <i>in vitro</i>.</p>	<p>хімічними стерилізаторами.</p>

НУБІП УКРАЇНИ

<p>Чорноплідна горобина (<i>Melia azedarach L.</i>)</p>	<p>Занурення листових експлантів у (2г/л) беноміл на 2 год + 7% водню пероксиду (H_2O_2) на 10хв + 2%-й NaOCl на 12 хв для поверхневої стерилізації.</p>	<p>Найнижчий відсоток забруднення експлантів і побуріння, а також найвищий відсоток індукції та росту калюсу.</p>
<p>Гвоздика (<i>Dianthus caryophyllus</i>)</p>	<p>Дихлорізоціанурат натрію застосовували як середовище стерилізатора до живильного середовища замість автоклаву.</p>	<p>Зафіксовано рівень забруднення нижче 5%, ізоціанурат натрію має потенціал заміни автоклавовання середовища в культурах рослинних тканин.</p>
<p>Метеликовий горошок <i>Clitoria ternatea</i></p>	<p>0,1% розчин бавістину + 70% етанол, та 0,1% $HgCl_2$ використовували</p>	<p>Було спостережено усунення мікробних забруднень, і додатково поверхнево стерилізували</p>

НУБІП	для поверхневої стерилізації вузлових експлантів.	вузлові експланти.
НУБІП (<i>Angraecum rutenbergianum</i> Kraenzl)	0,5% розчин дихлорізоціанурату натрію + 2 мл/л суміш рослинних консервантів використовували для поверхневої стерилізації насінневих капсул.	87,5% від загальної кількості капсул було продезинфіковано, насіння було чистим після 3-х місяців культивування. Як дихлорізоціанурат натрію, так і суміш рослинних консервантів були необхідні для пригнічення росту мікроорганізмів.

Зовнішнє забруднення епіфітними мікроорганізмами може бути пригнічене поверхневою стерилізацією поверхні проточною водою з/без миючого засобу, хімічними речовинами (етанол, хлорид ртуті, гіпохлорит натрію) [53]. Однак існують деякі матеріали, які можна додавати до поживних середовищ, щоб пригнічувати зовнішнє забруднення, наприклад, суміші рослинних консервантів [53] та фунгіцид беноміл [3]. Ендофітні мікроби, присутні в експлантах, вважаються основною перешкодою для приживлення та росту рослин, що культивуються в тканинах, оскільки їх важче видалити звичайною поверхневою стерилізацією. Однак, внутрішнє бактеріальне забруднення можна усунути, додаючи в живильне середовище різні речо-

вини (Таблиця 1.1.2), наприклад, антибіотики [1,50], сульфат міді [2,50] або фунгіциди [47]. Після ідентифікації забруднювачів слід обрати антибіотик з низькою фітотоксичністю [47].

Таблиця 1.1.2.

Антисептичні речовини, що використовуються для усунення ендofітного забруднення рослинних тканин культур.

Речовина, що застосовується (назва та концентрація)	Вид рослини / сорт	Успіх знезараження
Канаміцин та стрептоміцин сульфат по 10 г/л додавали для розмноження пагонів у середовище +2 мг/л бензиламінопурину +10 мг/л аденіну сульфату.	<i>Guadua angustifolia</i> Kunth	Ріст бактерій було пригнічено та виявлено інтенсивне утворення високоякісних пагонів.
Антибіотики тиментин по 150 мг/л + генгаміцин по 30 мг/л додавали до живильного середовища.	<i>Camellia sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	Виявилися ефективними для усунення бактеріального ендofіту до 24 днів з 0% забруднення.
Антибіотик, цефотаксим у дозі 62,5 мг/л додавався до 1/2 середовища Мурасіге і Скуга (МС), для культивування.	Топінамбур (<i>Helianthus tuberosus</i> L.)	Зафіксовано 0% контамінації, 100% виживання стеблових вузлів культури.

<p>Сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) у кілько- еті 60 мг/л додано в се- редовище MC +3 мг/л бензиладенін + 1 мг/л кінетин для розмно- ження пагонів</p>	<p>Банан (<i>Musa sp.</i>)</p>	<p>Ріст ендоефітних бактерій пригнічувався, було зафіксовано 0% забруднення.</p>
<p>Сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в концен- трації 70 мг/л додавали в середовище MC + 5 мг/л бензиладенін для розмноження пагонів</p>	<p>Філодендрон селлум</p>	<p>Дозволяє усунути ендогенну бактеріальну забрудненість, бактері- альне обсіменіння до 0%, без зниження росту пагонів пагонів <i>in vitro</i>.</p>

Метод мікроклонального розмноження має багато переваг, найважливішим з яких є те, що метод дозволяє отримати ідентичні за типом саджанці, які є генетично та фізіологічно однорідними в генетичному та фізіологічному відношенні. Ці рослинні матеріали можуть бути використані при виробництві декількох рослин, наприклад таких як огірок (*Cucumis sativus L.*), оливкові дерева (*Olea europaea L.*), суниця (*Fragaria ananassa Duchesne*), кардамон (*Elettaria cardamomum Maton*). Протокол розмноження *in vitro* включає певні етапи: етап попереднього культивування, етап культивування, етап розмноження, етап укорінення та етап акліматизації [4,20,28,35,47,52]. Однак, при великому обсязі роботи у лабораторіях, нестачі приміщень та обмеженій кількості експертних працівників і технічних спеціалістів безумовно відбувається затримка субкультури. Ця затримка призводить до великих втрат та збитків у виробництві саджанців *in vitro*, навіть у підтримці маточних ку-

льтур. Загалом, вплив часу субкультування на швидкість пагоноутворення культур *in vitro* варіюється від виду досліджуваного експланта [64]. У зв'язку з цим тривалий період інкубації на живильному середовищі з постійним гормональним складом негативно впливає на швидкість розмноження деяких видів рослин, наприклад на шість декоративних видів і сортів родини *Rosaceae* [40] та для двох сортів *Dasiphora fruticosa* (L.) Rydb. [48], але було виявлено, що при довшому інкубаційному періоді (75 діб) пагонів ананаса (*Ananas comosus* L. Merr.) на живильному середовищі, вищим буде коефіцієнт розмноження та загальної кількості пагонів, ніж при коротшому інкубаційному періоді (30 днів) [25].

Обгорілі проростки є дуже поширеним явищем під час роботи *in vitro*, що є наслідком використання гарячих інструментів для посадки (переважно пінцетів і скальпелів) під час перенесення саджанців. Цієї проблеми можна уникнути, якщо працівники лабораторії пройшли відповідну підготовку та мають достатній досвід у цій галузі.

Нерідко під час роботи з культурами рослин повстають проблеми що виникли з фізіологічних причин. Частим прикладом таких проблем є побуріння експлантів. Це явище, яке є природним результатом ферментативного окислення поліфенольних сполук. Феноли, що вивільняються з травмованих або зрізаних експлантів, потім окислюються поліфенолоксидазами та пероксидазами до хінонів, що спричиняє побуріння тканин і середовища [53]. Хінони зв'язуються з клітинними білками або полімеризуються шляхом дегідратації, спричиняючи порушення клітинного метаболізму, пригнічення росту і зрештою, загибель експлантів [67]. Побуріння тканин можна зменшити, якщо правильно підібрати час збору експлантів, доповнення живильного середовища антиоксидантами, такими як лимонна кислота, аскорбінова кислота, активоване вугілля та полівінілпіролідин, окремо чи в комбінації, або з використанням рідкої культури чи мікроприщеплення [17,18,57]. Було прове-

дено порівняльне дослідження трьох інгібіторів побуріння, які додавали до середовища індукції калюсу бамбука (*Dendrocalamus sinicus* L.C. Chia та J.L. Sun) для запобігання побуріння [67]. Ці інгібітори побуріння стерилізували і додавали в середовище в різних концентраціях: лимонну кислоту (200-600 мг/л), вітамін С (100-300 мг/л) та активоване вугілля (400-1200 мг/л). Лимонна кислота (C₆H₈O₇) у дозі 400 мг/л виявилася найкращим інгібітором, значно пригнічуючи та зменшуючи калусне побуріння до 17,59%.

Також виникають труднощі з укоріненням *in vitro* та невдачі подальшої акліматизації. Успішний протокол мікророзмноження вимагає відповідних умов для коренеутворення та розвитку регенерованих пагонів. Здорові, вкорінені мікропагони можуть бути успішно акліматизовані та укорінені в ґрунті. При досліджуванні пост-ефекту цитокініну у середовищі для пагонотворення та подальшої укорінюваності мікропагонів було виявлено, що тип і концентрація цитокініну доданих до середовища сильно впливають на подальшу стадію вкорінення, де частота вкорінення була знижена у багатьох видів при додаванні тїдіазурону або бензиладеніну до середовища для розмноження пагонів [15, 32].

Тип ауксину, що додається до середовища для вкорінення, в основному залежить від декількох факторів; найважливішим з них є протокол, що використовується для мікроклонального розмноження. Також оптимальний для вкорінення ауксин залежить від виду рослини. Тому вибір ауксину є дуже важливим питанням для деревних рослин, які демонструють труднощі з укоріненням *in vitro*. Було виявлено, що найчастіше використовують індол-3-масляну кислоту (ІМК), а не індол-3-оцтову кислоту (ІОК), як найбільш ефективний ауксин для індукції коренеутворення у деревних видів, наприклад таких як яблуня. У зв'язку з цим, ІМК виявився найефективнішим серед інших ауксинів, протестованих на індукцію коренеутворення з пагонів деяких орхідних (*Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum*,

Dendrobium moschatum, та *Cattleya Hybrid*) [14,37]. Крім того, ІМК може бути ефективнішим для ініціації коренеутворення *in vitro*. Було зафіксовано, що пагони можна культивувати безпосередньо на живильному середовищі з додаванням ІМК або занурювати в стерилізовані розчини з фільтром ІМК, а потім культивувати на живильному середовищі МС для індукції вкорінення. Встановлено, що пагони нуту (*Cicer arietinum* L.) *Giza40 in vitro* мали найвищий потенціал укорінення, відсоток укорінення, кількість коренів і довжину коренів, при занурюванні пагонів в ІМК і культивуванні їх в рідкому середовищі [6].

Активоване вугілля як органічну сполуку можна використовувати для збільшення довжини коренів, якщо додати його до середовища. Ці фактори слід брати до уваги під час вкорінення *in vitro*, особливо для тих видів рослин, які важко вкорінюються, наприклад таких як деревні рослини.

Під час роботи з експлантами було виявлено багато причин, таких як низька вологість, високий рівень опромінення, низьке поглинання води корінням, швидке висихання проростків та їх легке зараження грибовими та бактеріальними захворюваннями, внаслідок чого рослини можуть не вкоренитися при перенесенні в ґрунт. Щоб подолати ці перешкоди, рослини *in vitro* слід підтримувати поступово, дотримуючись правильної стратегії акліматизації та правильного вибору середовища [13]. Таким чином, кінцевий успіх мікророзмноження рослин *in vitro* залежить від успішного укорінення проростків у ґрунті в процесі акліматизації [58]. Доведено, що застосування біостимуляторів відіграє значну роль для успішної акліматизації. Гриб *Piriformospora indica* був використаний як біологічний стимулятор для посилення росту рослин і розвитку коренів під час процесу акліматизації рослин, які важко вкорінюються в пробірці, наприклад, орхідеї, і дають більше шансів на виживання при перенесенні рослин в польові умови [54]. Інший мікроорганізм, що стимулює ріст рослин (*Pseudomonas oryzae*) був застосований до вкорінених

in vitro саджанців груші для підвищення ефективності росту в ґрунті [9]. Фізіологічні аспекти вкорінення рослин банана (*Musa sp.*) в умовах *in vitro* були покращені шляхом інокуляції *Buttiauxella agrestis* та *Bacillus thuringiensis* (бактерій, що стимулюють ріст рослин і виробляють ауксини) в кореневу систему банана на етапі акліматизації. Таким чином, було отримано саджанці високої якості [11].

Культура рослинних тканин розглядається як важливий елемент для мікроклонального розмноження, збереження та генетичного покращення видів рослин у селекційних програмах. Однак, техніка мікророзмноження, може ускладнюватись через деякі порушення та аномалії.

Одним із прикладів є некроз кінчика пагона - визначається як фізіологічний стан, що призводить до загибелі кінчика пагона в культурі *in vitro* і спричинений умовами культивування [59]. Некроз кінчика пагона призводить до опіку, травмування або відмирання пагона [59]. Некроз кінчика пагона може виникати, коли кінчик пагона має деякі аномальні особливості, наприклад, на стадії подовження та/або вкорінення, або побуління і відмирання під час розмноження, хоча при вирощуванні саджанців може виглядати як ідеальний експлант для розмноження *in vitro*. Некроз кінчика пагона також може проявлятися у деяких рослин, зокрема, у деревних кущів і дерев з частотою 21,9% і 58,9%, відповідно [59]. Необхідно більших досліджень для вивчення умов некрозу кінчика пагона, так як цей фізіологічний стан потребує подальшого з'ясування, але деякі причини вже були вивчені, наприклад такі як дефіцит деяких мінералів (наприклад, Ca, Mg, K, B або NO₃-), дисбаланс поживних речовин, накопичення фенольних сполук у кінчиках пагонів, нестача антиоксидантів, низький рівень Ca²⁺ або вид і концентрація цитокінінів у середовищі [56].

Некроз кінчика пагона може спричинити серйозні втрати при мікроклональному розмноженні багатьох видів дерев, таких як яблуня (*Malus domestica* Borkh.) [26], виноград (*Vitis sp.*) [5], фісташка (*Pistacia vera* L.) [39] та вишня (*Prunus yedoensis*)

[10]. Для усунення некрозу кінчика пагона використовують певні заходи, а саме додавання 50-100 мг/л хлориду кальцію до середовища МС, що дозволяє відновлювати до 90% пагонів бананів і подорожників (*Musa spp.*) [94], або додавання 0,50 мл фруктози + 1,0 мл хлориду кальцію до живильного середовища, що дало 100% успіх у боротьбі з некрозом кінчика пагона у сливи (*Prunus salicina L.*) [61].

Мікророзмноження рослин є одним з оптимальних біотехнологічних підходів для подолання багатьох глобальних проблем таких як посуха, засоленість ґрунту зміна клімату та глобальна водна криза. Прикладна біотехнологія рослин через мікророзмноження розглядається як частина сталого рішення досягнення мети "нульового голоду" шляхом підвищення продовольчої безпеки [55,66]

1.2 Промислово цінні ягідні культури в Україні.

Україна посідає провідні позиції на світовому ринку продовольства, має величезний потенціал і сприятливі умови для вирощування фруктів та ягід на своїй території. Водночас ягідний ринок в Україні перебуває на стадії формування. У бізнесі задіяні дрібні фермери, великі агрокомпанії, підприємці без відповідного досвіду, що прийшли з інших сфер. Як результат – урожайність ягідних культур в Україні на 7-20% нижче, ніж у схожій за кліматичними умовами Польщі [79].

В Україні органічне сільське господарство, зокрема ягідівництво, вирощування нішевих культур відіграє роль катализатора в процесі переходу до «зеленої» економіки за допомогою розвитку фермерського та продовольчого сектора економіки. Трендом вирощування так званих нішевих ягід стали дохина і чорниця, ожина, журавлина, кизил, брусниця тощо; пропозиція цих ягід не встигає рости за попитом, тому прихід нових виробників на ринок нішевих ягід є очікуваним [93].

Новинкою в ягідництві України з недавнього часу стали чорниця (Рис.1.2.1) та дохина високоросла (Рис.1.2.2). Згідно таксономічної класифікації чорниця та дохина високоросла відносяться до родини Верескових (*Ericaceae*) роду Вакциніум (*Vaccinium*), а також ще на початку минулого століття в Північній Америці була

проведена селекційна робота з лохиною високорослою (*Vaccinium corymbosum*), в результаті якої з'явилися культурні сорти, що вирізнялися покращеними господарськими ознаками та підвищеною продуктивністю [89].



Рис. 1.2.1 Чорниця звичайна



Рис. 1.2.2 Лохина високоросла

Лохина – багаторічний кущ, що має добре розгалужену кореневу систему, яка, в основному, розміщується в шарі ґрунту глибиною 30-40 см. Коренева система пристосована до існування у кислому (рН 3,8 – 5,5, не вище), вологому субстраті з високим вмістом органічної речовини та, на відміну від більшості інших рослин, не має кореневих волосків, що відіграють важливу роль у живленні та водопостачанні більшості рослин [94]

Рослина лохини має 15-18 пагонів, що відходять від коронки (кореневої шийки). Урожай формується на бруньках, що заклались в попередньому сезоні. Плоди – різновеликі ягоди. Розмір ягід залежить від розміщення в суцвітті та терміну достигання. Перші ягоди мають середню масу в межах 2,5-3,2 г, останні достиглі ягоди – 1,1-1,4 г. Забарвлення шкірки – від світло до темно блакитного з густим сизим нальотом, м'якуш безбарвний. За формою ягоди округлі, округло-

сплюснуті і п'ятигранні. Достигають в кінці липня — на початку серпня не одночасно, тому збір урожаю проводять в декілька термінів[92].

Лохина буває низькоросла, середньо росла та високоросла. Зимостійкі сорти можуть переносити зниження температури до $-24-30^{\circ}\text{C}$ (а окремі сорти – до -40°C).

Проте при цьому має значення вологість та дозрівання молодих пагонів осінню[69].

Пагони лохини можуть бути прямостоячі чи дещо пониклі – це залежить від сорту та визначає придатність останнього до механізованого збирання.

Найпопулярніший сорт лохини Блюкроп (*Bluecrop*) має відмінний декоративний вигляд, заввишки досягає до 2м, відноситься до категорії морозостійких сортів

(-39°C), а також стійкий до посухи і багатьох захворювань. Завдяки міцній шкірці ягоди придатні до транспортування, навіть на довгі відстані, також відомі своїми розмірами (2,0мм). Врожайність близько 6-9кг з куща. Розповсюджений в північній частині України, ґрунт - торф, чорнозем, пісок, рН переважно 3,5-5,0.

Ще одним морозостійким сортом є Дюк (*Duke*), взимку витримують температуру до -28°C . До відмінностей цього сорту відносять великі плоди ягід, в період дозрівання гілки можуть обламуватись під вагою врожаю, з одного куща збори варіюються від 6 до 8кг. Сорт чудово підходить для транспортування. Зазвичай кущі розростаються висотою до 1,8м, поширені на середній і північній смугах України.

Для посадки бажано обирати пухкий, піщано торф'яний ґрунт, кислотність 4,3-4,38[69].

До популярних, високоякісних сортів лохини відносять і Нортленд (*Northland*). Є одним із найморозостійкіших сортів з-поміж інших (-37°C). Вважається низькорослим оскільки висота дорослого куща близько 1,0-1,2м. Стиглі ягоди

схильні осипатися, тому збір врожаю проводять вчасно та регулярно, хоча плоди і мають ніжну шкірку також відзначаються своєю високою транспортабельністю. До

переваг сорту відносять стійкість до сильних морозів, компактність кущів, високу продуктивність протягом довгих років, врожайність з 1 куща від 4,5 до 8 кг. Регіон

продуктивності протягом довгих років, врожайність з 1 куща від 4,5 до 8 кг. Регіон

- північна і середня смуга України. Лохина досить невибаглива рослина, але вимагає особливої підготовки при виборі місця посадки і субстрату. Для Нортленду підійде легкий і багатий субстрат, добре зволожений і дренажний, верхової і перехідний торф суміші на його основі. Кислотність – 4,5-4,8.

В загальному обсязі з дворічного саджанця перший урожай отримують зазвичай на третій рік після посадки (близько 0,5 кг з куща), така рослина вступає в повне плодоношення на 5-6 років (24 кг ягід з куща в залежності від сорту). Довговічність плантації визначається рівнем догляду та зазвичай становить 30-40 років, хоча в США існують високопродуктивні насадження, яким зараз більше 60 років.

У ягодах міститься до 8 % цукрів, близько 3 % органічних кислот (яблучної, лимонної, шавлевої) [79]. Є джерелом багатьох макро- і мікроелементів. Поживні речовини - вітаміни А, В1, В2, С, крім вітамінів, плоди багаті на мінеральні солі, органічні кислоти, пектини, фенольні сполуки, залізо, кальцій, калій а також фосфор і клітковину[94].

Сприяють зниженню вмісту цукру в крові, корисні при колітах, гастритах, циститах. Також має жовчогінну, кардіотонічну, гіпотензивну, протизапальну, протисклеротичну властивості. Ягоди лохини нормалізують функції підшлункової залози, кишечника та серця. Завдяки великому вмісту вітаміну С лохину використовують, а також рекомендують при проблемах із зором, глаукомі та за наявності ризику варикозного розширення вен[98].

Сік лохини проявляє антиоксидантні властивості і цих речовин в соку лохини більше, ніж в соках інших ягід. Антиоксиданти запобігають утворенню різного роду онкологічних, шкірних, очних, серцево – судинних, та ниркових захворювань. Лохина покращує пам'ять та підвищує концентрацію уваги, має протисклеротичну, капіляроукріплюючу, протизапальну, жарознижувальну дію[99].

Придатні для споживання свіжими, замороженими, для виготовлення різних продуктів переробки.

Чорниця - низькорослий чагарник з родини вересових. Ягоди соковиті кулясті чорного кольору вкриті нальотом. В Україні росте у Карпатах, на Поліссі, зрідка - у східній частині Лівобережного Лісостепу [92].

Основні діючі речовини: вітаміни А, С, В₁, В₂, В₃, В₆, РР, флавоноїди, вуглеводи, макро- і мікроелементи, органічні кислоти, гіперин, астрагалін, кверцитрин, ізокверцитрин, рутин, антоціани, феноло-кислоти, феноли і їхні похідні, дубильні речовини, ефірна олія, сполуки марганцю і заліза.

У листках: вітамін С, вітаміни групи В, дубильні речовини, флавоноїди, три-терпеноїди, каротиноїди, антоціани, фенолокислоти, феноли і їхні похідні, макро- і мікроелементи [94].

Споживають у сирову вигляді, заморожують, сушать, готують морси, соки, сироп, варення, джем, желе, сиропи, тощо.

Оскільки асортимент ягідної продукції на ринку зростає і нові сорти та сучасні технології вирощування дедалі ефективніші та стають все більш прибутковими ще однією популярною ягідною культурою є ожина (Рис. 1.2.3).



Рис. 1.2.3 Ожина сиза (звичайна)

Тривалий час поширення ожини стримувалося через труднощі збору плодів, причиною чого були масові колючки на пагонах [98]. На сьогодні одним з основних напрямків селекції залишається створення безколючкових сортів. Проте слід зазначити, що колючки на пагонах не є причиною для відмови від цієї унікальної культури [92].

Ожина відноситься до роду Рубус (*Rubus*) родини Розові (*Rosaceae*). За морфологією культурні сорти ожини (*Rubus fruticosus*) поділяють на дві групи: куманіка – це пряморослі кущі, які утворюють міцні стебла і не потребують шпалери, однак при укладанні стебел під час укриття на зиму, часто зламуються в основі кореня; росяніка – сланкі стебла, що стеляться по поверхні ґрунту і вимагають опори для вирощування. Прямостоячі сорти ожини вважаються культурнішою формою цієї рослини. Вони більш вимогливі до ґрунтово-кліматичних умов вирощування, ніж сланкі сорти [95].

За своєю зимостійкістю сорти ожини значно відрізняються між собою. Для більшості її сортів характерна сильне пошкодження при морозах $-18-25^{\circ}\text{C}$. До зимостійких сортів відносять: Агавам (плодові бруньки пошкоджуються при -27°C , а коріння і стебла витримують холоди до -40°C), Полар (не потребують зимового укриття), Валдо, Торнфрі [97].

Маса ягоди є одним з визначальних чинників якості врожаю та поширенню сорту у виробництві. Великоплідні сорти мають більший попит у споживачів. Великоплідними сортами є Тріпл Краун, Арапахо, а ягоди сорту Карака Блек можуть сягати від 20 до 30 грамів. Решта сортів характеризується плодами середнього розміру, маса яких коливається в межах 6-8 г. Дрібні ягоди зафіксовано в сорту Рубен та Дох Тей [97].

Ягоди ожини мають прекрасний смак та аромат, лікувальні та дієтичні властивості. Відмічено що дуже корисним для серця є наявність у ягодах нікотинової

кислоти. Ожина багата на вітамін С, а вітамін К в складі є незамінним для здоров'я кісток. При дефіциті цього вітаміну кісткова тканина виснажується і зростає ризик переломів. Також ягода є однією з рекордсменів за вмістом рослинних волокон, дефіцит яких підвищує ризик серцево-судинних захворювань. Ожина може похвалитися великою кількістю біофлавоноїдів - сполук, які мають сильні протизапальні і бактерицидні властивості, що вважається чудовою підтримкою для імунітету. Також ці ягоди допомагають в профілактиці онкозахворювань: уповільнюють розвиток ракових пухлин і різних новоутворень. Антиоксиданти, якими багата ожина, допомагають боротися з вільними радикалами і зменшити запалення мозку, яке може призвести до когнітивних проблем, типових для старіння.

Переважна частина ягідної продукції споживається у свіжому вигляді, значна заморожується для подальшої реалізації через торгівлю та використання у кондитерській і молокопереробній галузях переважно для наповнювачів, решта переробляється у харчовій промисловості на концентрати, джеми, желе, цукати, дропси, напої та інше.

1.3 Рослини ожини як об'єкт біотехнологічних досліджень.

Останнім часом все сильніше посилюється інтерес до нетрадиційних видів культур як ожина чи наприклад малиново-ожинні гібриди. Великих інтерес до насадження цих культур обумовлюються великою урожайністю, а самі ягоди характеризуються високими смаковими властивостями і на відміну від поширеної в Україні малини менш вразливі до хвороб.

Rubus fruticosus L. (Rosaceae) - чагарник, відомий своїми плодами, які називають ожиною, що торгується по всьому світу завдяки своєму вишуканому смаку, приємному аромату та поживним властивостям. Чагарник походить з Вірменії, а зараз поширений по всій Європі, Азії, Океанії та Північній та Південній Америці [78]. У дикому вигляді він росте в північних районах Пакистану, де вона відома під

місцевою назвою Баганрра [82]. Родина розоцвітих — це 19-та за чисельністю родина рослин. Рід Рубус (*Rubus*), що налічує майже 700 видів, є найбільшим родом цієї родини. Рубус складається з 12 підродів, з невеликою кількістю одомашнених видів [80].

Кущі ожини можуть запобігати ерозії ґрунту на неродючих, порушених ділянках. Стародавні британці використовували колючі стебла як межу або бар'єр, як сучасні люди використовують колючий дріт. З плодів отримують барвник від фіолетового до тьмяно-синього кольору. Волокно отримують зі стебла і використовують для виготовлення шпагату [68].

Плоди витягують зі стебла і використовують для виготовлення шпагату. Плоди мають лікувальну, косметичну та поживну цінність. Це концентроване джерело цінних поживних речовин, а також біологічно активних компонентів, що мають терапевтичне значення, що підкреслює його важливість як функціональної їжі [74]. Він також використовується як інгредієнт у приготованих стравах, салатах та хлібобулочних виробах, таких як хлібобулочних виробів, таких як джеми, закуски, десерти та фрукти. *Rubus fruticosus* містить вітаміни, стероїди та вітаміни, стероїди та ліпіди в насінній олії [84], а також мінерали. Плоди ягід багаті на фенольні сполуки, такі як фенольними сполуками, такими як фенольні кислоти, антоціани,

флавоноли, еллагітаніни, галлотаніни та проантоціанідини [85]. Які демонструють значні антиоксидантні властивості. Флавоноїди та фенольні сполуки в ягодах є антиканцерогенами і мають антинейродегенеративну та протизапальну дію [81]. Успішні протоколи мікророзмноження вже були для різних видів *Rubus*, висаджуючи садивний матеріал ожини таких сортів, як Marion, Блек Satin, Thornless Evergreen, Loch Ness та Casanska bestina, які виробляються у великих масштабах за допомогою розмноження in vitro. У більшості випадків велика кількість нових рослин ожини може бути отримана легко, за короткий проміжок часу [86]. Індукція

качосу і регенерація рослин з адвентивних бруньок можна легко отримати з декількох видів, наприклад, цукрових буряків [87]. Нижчі темпи регенерації спостерігалися у деревних порід. Нещодавні дослідження були зосереджені на ідентифікації фенольних компонентів листя *Rubus*, а також визначення їхньої антиоксидантної активності [73], ці сполуки були підтверджено значну інгібуючу активність щодо оксидантів та бактерій, що свідчать про їх потенціал у захисті харчових продуктів [70].

В якості прикладу ожина звичайна розмножується верхівковими відводами, відприсками, корінними і зеленими черенками, розділенням куща [95]. Всі ці наведені методи мають низький коефіцієнт розмноження що виключає можливість усунення вірусної інфекції у рослини. Натомість сучасні методи біотехнології дозволяють прискорити розмноження нових форм, сортів та навіть поодиноких екземплярів рослин, які характеризуються цінними ознаками, і допомагають отримати оздоровлений посадковий матеріал. Мікроклональне розмноження широко застосовується для масового розмноження багатьох цінних плодово-декоративних видів: вишні, черешні, мигдаля, малини, грецького горіха та ін [96].

Згідно з висновками багатьох дослідників, успіх мікроклонального розмноження багато в чому залежить від першого етапу відбору експланта і введення його в культуру, тобто правильного вибору вихідної рослини-донора, відбору експлантів та їх стерилізації, а також підбору та оптимізації складу живильного середовища, що забезпечує найвищий ріст і розвиток експлантів [91].

Відомо, що при виборі материнської донорної рослини необхідно враховувати її фізіологічні, сортові та видові особливості. Вихідні рослини мають бути здоровими, не ураженими грибовими, бактеріальними та вірусними хворобами, перебувати в стані інтенсивного росту. При виборі експланта враховують його вік, будову та походження.

Найкращий період для ізоляції експлантів – це пробудження бруньок. За візуальними ознаками, а за потреби інструментальним аналізом, відбирають кущі, вільні від вірусних хвороб. Відібрані рослини відмивають від субстрату, ізолюють шматки пагонів із бруньками[78].

Варіант стерилізації підбирається індивідуально для кожної культури і залежить від особливостей експланта. Зазвичай стерилізація складається з декількох етапів, що включають промивання мильним розчином, обробку хінозолом, фундазолом чи хорусом, розчином білизни, сулеми, різними засобами побутової хімії у різноманітних співвідношеннях. Успіх вибраної методики стерилізації визначається кількістю отриманого життєздатного матеріалу, придатного для подальшого мікророзмноження.

Живильне середовище для культивування також підбирають індивідуально. У літературних джерелах описано досвід використання середовища Гамборга В5, QL, Андерсена для розмноження плодово-декоративних культур. Однак найбільш широко застосовується середовище Мураєге і Скуга (МС) в стандартній або половинній концентрації солей. У живильне середовище на кожному етапі культивування вводяться різні фітогормони, і таким чином вдається досягти оптимальної швидкості вирощування і якості отриманих рослин[75].

Для мікроклонального розмноження Ожини звичайної найчастіше використовують фітогормон ІОК в концентрації 0,5–3 мг/л (ауксин) та 6-БАПВ в концентрації 0,5–5 мг/л (цитокінін). Залежно від поставленої мети багато вчених рекомендують використовувати живильне середовище МС з невеликими модифікаціями співвідношення ауксин/цитокініни. Незважаючи на популярність методу мікроклонального розмноження, не існує універсальної схеми культивування *in vitro* для Ожини звичайної сорту Торнфрі, немає єдиної думки щодо оптимальних схем стерилізації ініціальних експлантів, щодо впливу живильних середовищ. На сьогоднішній день

все ще залишається потреба у розробці конкретних методик розмноження для певних видів та сортів рослин із врахуванням особливостей їх росту та метаболізму. У сучасних дослідженнях з мікроклонального розмноження Ожини звичайної не вивчався детально вплив консистенції живильного середовища на етапі введення ожини в культуру *in vitro*, та індукції множинних пагонів. Пошук та вирішення проблеми оптимальної схеми стерилізації рослинного матеріалу, консистенції живильного середовища є актуальним.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

2.1 Вихідний матеріал та отримання асептичних рослин ожини.

Вихідним матеріалом для досліджень були рослини ожини (*Rubus fruticosus* L.) сорту “Рубен”, що є безколючковим, напівпрямостоячим та потребує 500-800 прохолодних годин, щоб досягти максимального рівня продуктивності плодоношення [77]. Для отримання асептичних рослин використовували однорічні пагони, які обрізали видаляючи міжвузля. Рослинний матеріал промивали водопровідною водою протягом однієї години. Для стерилізації експланти витримували у 30% та 40% (v/v) у гіпохлориті натрію протягом 20 та 30 хвилин для визначення оптимальної концентрації стерилізуючого реагенту, а потім 5 разів промивали стерильною дистильованою водою для видалення слідів гіпохлориту натрію з експлантів. Стерилізовані експланти культивували на живильному безгормональному середовищі Мурасиге та Скуга (МС) для оцінки відсотку виживання та отримання асептичної культури для наступних етапів процесу мікророзмноження.

2.2 Мікроклональне розмноження рослин ожини.

Асептичні експланти культивували на модифікованому середовищі Мурасиге та Скуга (МС) для розмноження та визначення найкращого середовища для вегетативного росту. Середовища містили різні концентрації регуляторів росту, зокрема, бензиладенін (БА) - 0,0, 0,5, 1,0 та 2,0 мг/л; ізопентиладеніну (2ІР) - 0,0, 0,5, 1,0 та 2,0 мг/л, нафтилоцтової кислоти (НОК) - 0,0, 0,5 і 1,0 мг/л. Регулятори росту додавали до середовища МС окремо або в комбінації.

Живильне середовище МС для культивування готували з використанням макро- і мікроелементів та вітамінів за Murashige та Skoog (1962) [83]. Додавали сахарозу (30,0 г/л) і значення рН на рівні 5,7-5,8 за допомогою NaOH (0,1 н) та HCl (0,1 н) перед розподілом. Середовище було розподілено у скляні банки об'ємом 350 мл (50 мл середовища/банку) з поліпропіленовими кришками, а потім ав-

токлавувано при 121 °С протягом 20 хвилин. Експланти було поділено на мікроживці довжиною 2 см (5 експлантів/банку). Мікроживці культивували в інкубаційній кімнаті при штучному освітленні, що забезпечується флуоресцентними лампами (120 см, 2400 Lux) протягом 16-годинного фотоперіоду при температурі 24-26 °С. Банки були розміщені лише на одному рівні на полиці. Після 6 циклів розмноження циклів розмноження тривалістю 2 місяці кожен, було досліджено коефіцієнти розмноження з урахуванням пагонів та фрагментів пагонів довжиною 2 см.

2.3 Укорінення отриманих пагонів рослин ожини.

Отримані в результаті мікроклонального розмноження пагони ожини довжиною 3-5 см переносили на живильне середовище для укорінення. Такі середовища містили:

1. Середовище МС
2. Середовище зі зменшеним двічі вмістом макроелементів (1/2 МС)
3. Середовище зі зменшеним вчетверо вмістом макроелементів (1/4 МС)
4. Середовище із додаванням НОК у концентраціях 0,5 мг/л
5. Середовища із додаванням індолілмасляної кислоти (ІМК) у концентраціях 1,0 та 2,0 мг/л.

Пагони ожини культивували в інкубаційній кімнаті при штучному освітленні, що забезпечується флуоресцентними лампами (120 см, 2400 Люкс) протягом 16-годинного фотоперіоду при температурі 24-26 °С. Банки були розміщені лише на одному рівні на полиці та вирощувались до вкорінення.

2.4 Акліматизація отриманих пагонів ожини.

Укорінені пагони було перенесено на загартування перед акліматизацією в теплиці. Ці саджанці добре промивали водою, щоб видалити желатуючий матеріал з коренів, а потім обробляли протигрибковим препаратом перед перенесенням в культуру ботів *ex vitro* в суміш кислий торф + перліт + пісок 1:1:1 (за об'єму) у плас-

тикові лотки та зволожували водою. Значення рН цієї суміші регулювали за допомогою 1,0 N HCl або 1,0 N NaOH до 5,7-5,8. Рослини культивували в невеликих човниках, обертали поліетиленовими пакетами та інкубували в ростовому інкубаторі з світлом близько 50 днів, а потім переносили в теплицю. Експеримент був поставлений у вигляді факторного експерименту в розщепленому варіанті з п'ятьма повтореннями. Всі отримані дані були зведені в таблиці та статистично проаналізовані.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

3.1 Отримання асептичних рослин ожини.

Експлантами для отримання асептичних рослин слугували апікальні меристеми та сегменти пагонів. Стерилізовані експланти культивували на середовищі Мурасиге та Скуга (МС) та інкубували в ростовій камері для оцінки відсотку виживання.

Таблиця 3.1.1.

Вплив процесу стерилізації на відсоток виживаності пагонів ожини

Умови стерилізації (концентрація/ тривалість)	Виживаність експлантів після стерилізації		Відсоток сформованих пагонів	
	Апікальні меристеми, %	Сегменти пагонів, %	Апікальні меристеми, %	Сегменти пагонів, %
30%/20	66,6 ±5,87	70,0± 3,21	75,0±1,22	83,0±2,11
30%/30 ХВ	66,6 ±2,85	65,0± 2,11	75,0±1,09	84,6±1,25
40%/20	60,0 ±4,38	80,0 ±1,02	100±0,29	87,5±2,65
40%/30 ХВ	90,0 ±4,31	90,0± 2,01	88,8±1,25	82,3±1,98

Дані, наведені в таблиці 3.1.1. та рисунку 3.1.1. свідчать про те, що найкращий відсоток виживаності становив 90 % у випадку використання як експлантів і апікальних меристем, і сегментів стебла за умов обробки 40% розчином гіпохлориту натрію протягом 30 хвилин. Разом з тим, найвищий відсоток сформованих пагонів серед культивованих експлантів для апікальних меристем та сегментів стебла становив 100 % та 87,5 % за умов використання 40% гіпохлориту натрію протягом 20 хв. Зниження концентрації стерилізуючого агента призводило до зниження виживаності експлантів та відсотку сформованих пагонів.



Рис. 3.1.1. Асептичні рослини ожини після стерилізації 40%-ним розчином гіпохлориту натрію протягом 30 хв.

Таким чином, для отримання асептичних рослин ожини необхідно використовувати в якості експлантів апікальні меристеми однорічних пагонів та витримувати їх у 40% розчині гіпохлориту натрію протягом 30 хв.

3.2 Вплив екзогенних регуляторів росту на мікроклональне розмноження рослини ожини.

Для визначення впливу екзогенних регуляторів росту на мікроклональне розмноження пагонів ожини було проаналізовано живильні середовища МС із додаванням БА та 2ІР у різних концентраціях та їх комбінаціях. У таблиці 3.2.1. та на рисунку 3.2.1. показано вплив цитокинінів (БА та 2ІР) на розмноження експлантів ожини *in vitro*. Різні концентрації БА (0,0; 1,0 та 2,0 мг/л) поєднували з 2ІР у концентраціях (0,0; 0,5 та 1,0 мг/л), щоб оцінити їхній вплив на проліферацію пагонів. Було виявлено, що додавання досліджуваних регуляторів та їх концентрація суттєво впливає на коефіцієнт розмноження пагонів ожини. Було показано, що найкращою комбінацією регуляторів росту для мікроклонального розмноження рослин *R. fruticosus* є 2,0 мг/л БА з 0,5 мг/л 2ІР, що сприяло утворенню 7,78 пагонів/експлант. Дещо менших показників (7,11 пагонів/експлант) вдалося досягти додаванням 1,0 мг/л БА з 0,5 мг/л 2ІР (таблиця 3.2.1.).

Таблиця 3.2.1.

Вплив бензиладеніну (БА) та ізопентеніл-аденіну (2ір) на розмноження пагонів ожини *in vitro*.

Регулятор росту, мг/л	Кількість пагонів, шт	Довжина пагонів, см
БА, 0,0 мг/л	2,94 ± 0,12	2,22 ± 0,09
БА, 1,0 мг/л	5,10 ± 0,41	5,09 ± 0,06
БА, 2,0 мг/л	6,09 ± 1,12	10,37 ± 0,12
2ір, 0 мг/л	3,50 ± 0,87	7,79 ± 0,08
2ір, 0,5 мг/л	6,07 ± 1,15	5,46 ± 0,09
2ір, 1,0 мг/л	4,57 ± 0,98	4,43 ± 0,06
БАx2ір, 0,0 x 0,0	2,50 ± 0,54	1,84 ± 0,01
БАx2ір, 0,0 x 0,5	3,33 ± 0,96	2,50 ± 0,01

БАх2ір, 0,0 x 1,0	$3,00 \pm 0,44$	$2,33 \pm 0,02$
БАх2ір, 1,0 x 0,0	$3,00 \pm 0,38$	$5,33 \pm 0,09$
БАх2ір, 1,0 x 0,5	$7,11 \pm 1,26$	$5,84 \pm 0,12$
БАх2ір, 1,0 x 1,0	$5,20 \pm 0,08$	$4,11 \pm 0,52$
БАх2ір, 2,0 x 0,0	$5,00 \pm 0,07$	$16,20 \pm 1,23$
БАх2ір, 2,0 x 0,5	$7,78 \pm 0,04$	$8,05 \pm 0,95$
БАх2ір, 2,0 x 1,0	$5,50 \pm 0,06$	$6,86 \pm 0,22$

Проаналізувавши показники довжини пагонів ожини, що утворились на середовищах із додаванням різних регуляторів росту, можна сказати, що найбільша довжина пагона становила 16,2 см за умов вирощування на живильному середовищі з додаванням 2,0 мг/л БА, дещо менших значень (8,05 та 6,86 см) даний показник сягав за умов вирощування на середовищі з 2,0 мг БА, 0,5 мг/л 2ІР та 2,0 мг БА, 1,0 мг/л відповідно. Варто зазначити, що при культивуванні пагонів на середовищі без додавання регуляторів росту показник кількості пагонів на експланті та довжини пагонів виявив найнижчі значення.



Рис. 3.2.1. Вплив БА та 2ір на розмноження пагонів ожини in vitro

Отримані нами результати узгоджують з даними інших дослідників [79]. Зокрема, Figa та ін. [75] для мікроклонального розмноження ожини з використанням живильного середовища з додаванням БА, що показало найвищі показники кількості пагонів та експлант.

Наступним етапом дослідження було проаналізувати вплив таких комбінацій регуляторів росту як БА та НОК на ефективність мікроклонального розмноження ожини *in vitro* (таблиця 3.2.2).

Таблиця 3.2.2

Вплив бензил-аденину (БА) та α -нафтилоцтової кислоти (НОК) на

розмноження пагонів ожини *in vitro*

Регулятор росту, мг/л	Кількість пагонів/експлант	Довжина пагонів, см
БА, 0,5 мг/л	2,46±0,09	4,76±0,02
БА, 1,0 мг/л	3,56±0,07	5,56±0,02
НОК, 0,0 мг/л	1,96±0,05	4,61±0,04
НОК, 0,1 мг/л	3,18±0,02	5,36±0,03
НОК, 0,5 мг/л	4,16±0,03	5,31±0,08
НОК, 1,0 мг/л	2,75±0,01	6,04±0,07
БАxНОК, 0,5 x 0,0	1,71±0,05	3,44±0,02
БАxНОК, 0,5 x 0,1	1,93±0,01	4,33±0,01
БАxНОК, 0,5 x 0,5	4,21±0,02	4,61±0,01
БАxНОК, 0,5 x 1,0	2,00±0,02	6,64±0,06
БАxНОК, 1,0 x 0,0	2,20±0,03	5,77±0,07

БАxНОК, 1,0 x 0,1	4,42±0,05	6,39±0,02
БАxНОК, 1,0 x 0,5	4,11±0,04	6,00±0,02
БАxНОК, 1,0 x 1,0	3,50±0,02	5,43±0,07

Як видно з даних таблиці, додавання в середовище БА та НОК впливає на розмноження та довжину пагонів ожини *in vitro*. Так, найвищого значення 4,42 пагін/експлант, кількість пагонів на експлант сягало за присутності в живильному середовищі 1,0 мг БА в поєднанні з 0,1 мг NAA. Дещо менше значення - 4,21 та 4,11 пагонів/експлантат — фіксували при використанні середовища з додаванням (0,5 БА + 0,5 NAA мг/л) та (1,0 0,5 БА + 0,5 NAA мг/л) відповідно, а найнижче значення - 1,71 пагін/експлант — спостерігали за умов культивування на середовищі з 0,5 мг/л БА та без додавання НОК.

Крім того, визначали довжину пагонів ожини при вирощуванні на середовищах різного складу. Так, найвищого значення довжина пагона досягала при вирощуванні на середовищі МС доповненому 0,5 мг БА + 1,0 мг/л НОК та становила 6,64 см/пагін. Дещо нижчих показників - 6,39 см та 6,0 см — довжина пагонів ожини сягала при культивуванні на середовищі з додаванням (1,0 мг БА + 0,1 мг NAA /л) та (1,0 мг БА + 0,5 мг NAA /л) відповідно.

Отже, як видно з таблиці 3.2.1., додавання в живильне середовища МС 0,1 мг/л НОК в поєднанні з 1,0 мг/л БА сприяло найвищому коефіцієнту розмноження пагонів ожини та формуванню пагонів максимальної довжини - 6,64 см. Розмножені у такий спосіб пагони було перенесено на живильні середовища для укорінення через 60 днів культивування.

3.3 Вплив складу живильного середовища на укорінення пагонів ожини *in vitro*.

Для визначення впливу компонентів живильного середовища (мінеральних речовин та регуляторів росту) пагони, що було отримано в результаті

мікроклонального розмноження розділяли на поодинокі пагони або групи по 2-3 пагони та культивували на живильному середовищі для укорінення протягом 45-60 діб. Результати проведеного дослідження представлено в таблиці 3.3.1.

Як видно з даних таблиці, відсоток укорінення коливався від 43,75 до 87,50%, причому найвищого значення (75 та 87,5 %) даний показник сягав за умов використання середовища МС з повним вмістом мінеральних речовин. В той же час використання середовища 1/4МС виявилось більш ефективним для укорінення пагонів ожини, ніж 1/2 МС. Так, при вирощуванні пагонів ожини на середовищі 1/4 МС відсоток укорінення складав 68,75 %, тоді як на середовищі 1/2МС — 62,5 та 43,75 %. Визначення кількості коренів на пагін показало, що найбільше значення (5,0 коренів на пагін) даний показник мав при використанні середовища 1/2МС та 1/4МС, проте коріння було тонким ниткоподібним, що робило його не придатним для перенесення в умови теплиці для акліматизації. В цей же час на середовищі МС формувалось товсте розгалужене коріння у дещо меншій кількості, ніж на середовищі 1/2МС та 1/4МС (3,75 та 4,38 коренів на пагін). Щодо довжини коренів, найбільша довжина коренів 18,4 см була відмічена при культивуванні на середовищі МС, що містило 0,5 НОК + 2,0 ІМК мг/л; дещо менше значення - 18,0 см — на середовищі МС з 0,5 НОК+1,0 мг/л ІМК.

Таблиця 3.3.1.

Вплив індоліл-3-масляної кислоти (ІМК) та нафтилпоцтової кислоти (НОК) на укорінення пагонів ожини.

<i>Варіанти середовища</i>	<i>Коефіцієнт укорінення, %</i>	<i>Відсутність коренів/пагін</i>	<i>Довжина кореня, см</i>
МС+ІМК+Н ОК, 1,0мг/л+0,5 мг/л	68,75	3,98	15,20

MC+IMK+H OK, 2,0 мг/л+0,5 мг/л	66,67	4,79	14,38
MC	81,25	4,07	18,20
1/2MC	53,13	5,00	12,59
1/4MC	68,75	4,09	13,59
MC+1,0 мг/л IMK	75,00	3,75	18,00
1/2 MC+1,0 мг/л IMK	62,50	5,00	12,60
1/4 MC+1,0 мг/л IMK	68,75	3,18	15,00
MC+1,0 мг/л IMK	87,50	4,38	18,40
1/2 MC+2,0 мг/л IMK	43,75	5,00	12,57
1/4 MC+2,0 мг/л IMK	68,75	5,00	12,18

Незважаючи на позитивний ефект нафтилоцтової кислоти та індол-3-оцтової кислоти і той факт, що комбінація цих речовин призвела до повного вкорінення культивованих пагонів *Rubus fruticosus*, більш доцільним для укорінення є використання середовища MC, оскільки за даних умов утворювались товсті розгалужені корені, занурені у живильне середовище, тоді як на середовищі 1/2 MC та 1/4 MC корені були тонкими, слабкорозгалужені, які знаходились на поверхні живильного середовища. Крім того, процес укорінення був тривалішим на середовищах 1/2MC

та 1/4 МС ніж на середовищах МС. Такі результати підтверджуються ранніми дослідженнями [69,72,76].

3.4 Акліматизація вкоріненню пагонів ожини.

Акліматизацію в твердому субстраті проводили в пластикових лотках з кришками з використанням суміші торф+перліт+пісок у співвідношенні пісок у співвідношенні 1:1 (V:V:V).



Рис. 3.4.1 Укорінені саджанці перед процесом акліматизації.



Рис 3.4.2. Акліматизація вкоріненних пагонів ожини в суміші

торф+перліт+пісок

За результатами акліматизації було отримано життєздатні саджанці ожини з потужною кореневою системою, причому відсоток приживлюваності сягає 80 % (рис.3.4.1, рис. 3.4.2.).

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

1. Показано, що для отримання асептичних рослин ожини необхідно використовувати в якості експлантів апікальні меристеми однорічних пагонів та витримувати їх у 40% розчині гіпохлориту натрію протягом 30 хв.

2. Визначено, що оптимальним середовищем для мікроклонального розмноження рослин ожини є середовище Мурасиге та Скуга з 2,0 мг/л 6-бензиламінопурину.

3. Показано, що для укорінення пагонів рослин ожини доцільно використовувати живильне середовище Мурасиге та Скуга з повним вмістом мінеральних елементів з додаванням 2,0 мг/л ІМК та 0,5 мг/л ЦОК.

4. Досліджено, що акліматизація вкорінених пагонів ожини ефективно відбувається з використанням суміші торфу + перліту + піску у співвідношенні 1:1:1 за об'ємом.

Список використаної літератури

1. Abdalla, N.A.; Ragab, M.E.; El-Miniawy, S.M.; Arafa, N.M.; Taha, H.S. A New Aspect for In vitro Propagation of Jerusalem Artichoke and Molecular Assessment Using RAPD, ISSR and SCoT Marker Techniques. *Egypt. J. Bot.* **2021**, *61*, 203–218. [[CrossRef](#)]
2. Abou Elyazid, D.M.A.; Salama, A.-M.; Zanaty, A.M.E.; Abdalla, N. In Vitro Propagation and Acclimatization of Banana Plants: Antioxidant Enzymes, Chemical Assessments and Genetic Stability of Regenerates as a Response to Copper Sulphate. *Plants* **2021**, *10*, 1853. [[CrossRef](#)]
3. Ahmadpoor, F.; Zare, N.; Asghari, R.; Sheikhzadeh, P. Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in in vitro cultures *Melia azedarach* L. *AMB Express* **2022**, *12*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Alagarsamy, K.; Shamata, L.F.; Wei, S. Influence of media supplements on inhibition of oxidative browning and bacterial endophytes of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *3 Biotech* **2018**, *8*, 356. [[CrossRef](#)]
5. Al-Aizari, A.A.; Al-Obeed, R.S.; Mohamed, M.A.H. Improving micropropagation of some grape cultivars via boron, calcium and phosphate. *Electron. J. Biotechnol.* **2020**, *48*, 95–100. [[CrossRef](#)]
6. Alghamdi, S.S.; Dewir, Y.H.; Khan, M.A.; Migdadi, H.; EL-Harty, E.H.; Aldubai, A.A.; Al-Aizari, A.A. Micropropagation and germplasm conservation of four chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Chil. J. Agric. Res.* **2020**, *80*, 487–495. [[CrossRef](#)]
7. Bidabadi, S.S.; Jain, S.M. Cellular, Molecular and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants* **2020**, *9*, 702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Bridgen, M.; Van Houtven, W.; Eeckhaut, T. Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. In *Ornamental Crops, Handbook of Plant Breeding*; Van Huylenbroeck, J., Ed.; Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, 2018; pp. 127–144.

9. Cantabella, D.; Dolcet-Sanjuan, R.; Casanovas, M.; Solsona, C.; Torres, R.; Teixido, N. Inoculation of in vitro cultures with rhizosphere microorganisms improve plant development and acclimatization during immature embryo rescue in nectarine and pear breeding programs. *Sci. Hortic.* **2020**, *273*, 109643.

[CrossRef]

10. Cheong, E.J.; Na, M.; Jeong, U. The effect of endophytic bacteria on in vitro shoot growth of *Prunus yedoensis* and its identification and elimination. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **2020**, *56*, 200–206. [CrossRef]

11. De Araújo, R.C.; Rodrigues, F.A.; Nadal, M.C.; Ribeiro, M.D.; Antonio, C.A.C.; Rodrigues, V.A.; de Souza, A.C.; Pasqual, M.; Doria, J. Acclimatization of *Musa* spp. seedlings using endophytic *Bacillus* spp. and *Buttiauxella agrestis* strains. *Microbiol. Res.* **2021**, *248*, 126750. [CrossRef]

12. Degrande, A.; Tadjou, P.; Takoutsing, B.; Asaah, E.; Tsobeng, A.; Zaccoundjeu, Z. Getting Trees In to Farmers' Fields: Success of Rural Nurseries in Distributing High Quality Planting Material in Cameroon. *Small-Scale For.* **2013**, *12*, 403–420. [CrossRef]

13. Dev, R.; Singh, S.K.; Dayal, V.; Kumar, K.; Singh, T. Standardization of in vitro Hardening Strategies for Tissue Cultured Wine Grape (*Vitis vinifera* L) Genotypes. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2019**, *8*, 2108–2117. [CrossRef]

14. Dewir, Y.H.; El-Mahrouk, M.E.; Murthy, H.N.; Yocup, H.P. Micropropagation of *Cattleya*: Improved in vitro rooting and acclimatization. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **2015**, *56*, 89–93. [CrossRef]

15. Dewir, Y.H.; Murthy, H.N.; Ammar, M.H.; Alghamdi, S.S.; Al-Suhailani, N.A.; Alsadon, A.A.; Paek, K.Y. *In vitro* Rooting of Leguminous Plants: Difficulties, Alternatives, and Strategies for Improvement. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **2016**, *57*, 311–322. [[CrossRef](#)]

16. Dhiman, K.M.; Sharma, L.; Singh, A.; Sharma, M.M. Ex situ Conservation Using *In vitro* Methods of an Endangered Plant *Sterculia urens* Roxb.: A High Volume Trade Plant for Gum/Ind. *Crops Prod.* **2020**, *158*, 113015. [[CrossRef](#)]

17. Dobranszki, J.; Jambor-Benczur, E.; Hudak, I.; Magyar-Tabori, K. Model experiments for establishment of *in vitro* culture by micrografting in apple. *Int. J. Hort. Sci.* **2005**, *1*, 47–49. [[CrossRef](#)]

18. Dobranszki, J.; Teixeira da Silva, J.A. Micropropagation of apple—A review. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 462–488. [[CrossRef](#)]

19. El-Banna, A.N.; El-Mahrouk, M.E.; Dewir, Y.H.; Farid, M.A.; Abou Elyazid, D.M.; Schumacher, H.M. Endophytic Bacteria in Banana *In Vitro* Cultures: Molecular Identification, Antibiotic Susceptibility, and Plant Survival. *Horticulturae* **2021**, *7*, 526. [[CrossRef](#)]

20. El-Mahrouk, M.E.; El-Shereif, A.R.; Hafez, Y.M.; Abdelaal, K.A.; El-Hendawy, A.S.; Migdadi, H.; Al-Obeed, R.S. Micropropagation of Banana: Reversion, Rooting, and Acclimatization of Hyperhydric Shoots. *Plant Science* **2019**, *54*, 1384–1390. [[CrossRef](#)]

21. FAO/IAEA. Low-Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries. In Proceedings of the Technical Meeting Organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria, 26–30 August 2002;

22. Fertiri, E.A.; Batista, D.S.; Mamedes-Rodrigues, I.C.; Felipe, S.H.S.; Correia, L.N.F.; Chagas, K.; Silva, P.O.; Rocha, D.I.; Otoni, W.C. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in

Vernonia condensata grown in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2021**, 144, 593–605. [[CrossRef](#)]

23. Gangopadhyay, M.; Nandi, S.; Roy, S.K.B. An efficient explant sterilization protocol for reducing microbial contamination of *Solanum tuberosum* CV. 'Kufri jyoti' for establishing micropropagation in rainy season. *J. Basic Appl. Plant Sci.* **2017**, 1, 25. [[PubMed](#)]

24. Gregorio, N.; Herbohn, J.; Harrison, S. Small-scale Forestry Development in Leyte, Philippines: The Central Role of Nurseries. *Small-Scale For.* **2004**, 3, 337–351. [[CrossRef](#)]

25. Hamad, A.M.; Faha, R.M. Effect of sequential subcultures on in vitro proliferation capacity and shoot formation pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Sci. Hortic.* **2008**, 117, 329–334. [[CrossRef](#)]

26. Kabyzbekova, B.; Kovalchuk, I.; Mukhitdinova, Z.; Turdiyev, T.; Kairova, G.; Madiyeva, G.; Reed, B.M. Reduced major minerals and increased minor nutrients improve micropropagation in three apple cultivars. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **2020**, 56, 335–349. [[CrossRef](#)]

27. Karakas, F.P.; Bozat, B.G. Fluctuation in secondary metabolite production and antioxidant defense enzymes in in vitro callus cultures of goat's rue (*Galega officinalis*) under different abiotic stress treatments. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2020**, 142, 401–414. [[CrossRef](#)]

28. Khamushi, M.; Ardakani, M.D.; Zarei, A.; Aliabad, K.K. An efficient protocol for micropropagation of old cypress of Abarkuh (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* [Mill.]) under in vitro condition. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2019**, 138, 597–601. [[CrossRef](#)]

29. Kumar, M.K.; Sandeep, B.V.; Rao, S.P. Development of salt tolerant callus cultures by somatic hybridization between *Oryza sativa* and mangrove grass *Myriostachya wightiana*. *Ann. Agrar. Sci.* **2018**, *16*, 396–404. [[CrossRef](#)]

30. Kyzioł, A.; Łukasiewicz, S.; Sebastian, V.; Kustrowski, P.; Koziel, M.; Majda, D.; Cierniak, A. Towards plant-mediated chemistry— Au nanoparticles obtained using aqueous extract of *Rosa damascena* and their biological activity in vitro. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *214*, 11–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Loyola-Vargas, V.M.; Ochoa-Alejo, N. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*; Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo, N., Eds.; Springer Nature: New York, NY, USA, 2018; Volume 1815, pp. 3–13.

32. Magyar-Tábori, K.; Dobránszki, J.; Hudák, J. Effect of cytokinin content of the regeneration media on in vitro rooting ability of adventitious apple shoots. *Sci. Hortic.* **2011**, *129*, 910–913. [[CrossRef](#)]

33. Marshall, M.; Sutherland, R.; Hulme, P.E. Assessing the role of plant trade networks in the vulnerability of forest nurseries to plant pathogens. *Australas. Plant Pathol.* **2021**, *50*, 671–681. [[CrossRef](#)]

34. Martin, K.P.; Zhang, C.L.; Slater, A.; Madassery, J. Control of shoot necrosis and plant death during micro-propagation of banana and plantains (*Musa* spp.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2007**, *88*, 51–59. [[CrossRef](#)]

35. Mendonça, E.G.; Batista, T.R.; Stein, V.C.; Balieiro, F.P.; de Abreu, R.J.; Pires, M.F.; de Souza, P.A.; Paiva, L.V. In vitro serial subculture to improve rooting of *Eucalyptus urophylla*. *New Forest* **2020**, *51*, 801–816. [[CrossRef](#)]

36. Naing, A.H.; Adedeji, O.S.; Kim, C.K. Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement. *Sci. Hortic.* **2021**, *283*, 110043. [[CrossRef](#)]

37. Nayak, N.R.; Rath, S.P.; Patnaik, S. In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.), Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Sci. Hort.* **1997**, *71*, 243–250. [[CrossRef](#)]

38. Neumann, K.-H.; Kumar, A.; Imani, J. *Plant Cell and Tissue Culture—A Tool in Biotechnology Basics and Application*, 2nd ed.; Springer Nature Switzerland AG: Cham, Switzerland, 2020; pp. 1–11.

39. Nezami-Alanagh, E.; Garoosi, G.A.; Landin, M.; Gallego, P.P. Computer-based tools provide new insight into the key factors that cause physiological disorders of pistachio rootstocks cultured in vitro. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Norton, M.E.; Norton, C.R. Change in shoot proliferation with repeated in vitro subculture of shoots of woody species of Rosaceae. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1986**, *5*, 187–197. [[CrossRef](#)]

41. Pandey, S.; Sundararajan, S.; Ramalingam, S.; Pant, B. Effects of sodium nitroprusside and growth regulators on callus, multiple shoot induction and tissue browning in commercially important *Valeriana jatamansi* Jones. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2020**, *142*, 653–660. [[CrossRef](#)]

42. Park, S. *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*, 5th ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA; Elsevier Inc.: London, UK, 2021; pp. 1–23.

43. Pawełkowicz, M.E.; Skarzynska, A.; Mróz, T.; Bystrzycki, E.; Pla der, W. Molecular insight into somaclonal variation phenomena from transcriptome profiling of cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2021**, *145*, 239–259. [[CrossRef](#)]

44. Pe, P.P.W.; Naing, A.H.; Soe, M.T.; Kang, H.; Park, K.I.; Kim, C.K. Establishment of meristem culture for virus-free and genetically stable production of the endangered plant *Hosta capitata*. *Sci. Hortic.* **2020**, *272*, 109591. [[CrossRef](#)]

45. Ranghoo-Sanmukhiya, V.M. Somaclonal Variation and Methods Used for Its Detection. In *Propagation and Genetic Manipulation of Plants*; Siddique, I., Ed.; Springer Nature: Singapore, 2021; pp. 1–18.

46. Rari, A.; Donovan, N.; Mantria, N. Review: The future of plant pathogen diagnostics in a nursery production system. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *145*, 111631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Ray, S.S.; Ali, N. Biotic Contamination and Possible Ways of Sterilization: A Review with Reference to Bamboo Micropropagation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2016**, *59*, e160485. [[CrossRef](#)]

48. Remphrey, W.R.; Palmer, C.E.; Blouw, M.J. In vitro branching in relation to repeated subculture in two cultivars of *Potentilla fruticosa*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1993**, *32*, 235–240. [[CrossRef](#)]

49. Selim, M.K.; Abdalla, N.A.; El-Ramady, H.R. Response of Phalaenopsis Orchid to Selenium and Bio-NanoSelenium: In Vitro Rooting and Acclimatization. *Env. Biodiv. Soil Secur.* **2020**, *4*, 277–290. [[CrossRef](#)]

50. Selim, M.K.; El-Mahrouk, M.E.; El-Banna, A.N.; Hafez, Y.M.; Dewir, Y.H. Micropropagation of *Philodendron selloum*: Influence of copper sulfate on endophytic bacterial contamination, antioxidant enzyme activity, electrolyte leakage, and plant survival. *S. Afr. J. Bot.* **2021**, *139*, 230–240. [[CrossRef](#)]

51. Shah, S.; Thapa, B.B.; Chanda, K.; Pradhan, S.; Singh, A.; Varma, A.; Thakur, L.S.; Joshi, P.; Pant, B. *Piriformospora indica* promotes the growth of the in-vitro-raised *Cymbidium aloifolium* plantlet and their acclimatization. *Plant Signal. Behav.* **2019**, *14*, e1596716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Siddique, I.; Javed, S.B.; Al-Othman, M.R.; Anis, M. Stimulation of *in vitro* organogenesis from epicotyl explants and successive micropropagation round in *Cassia angustifolia* Vahl.: An important source of sennosides. *Agrofor. Syst.* 2013, 87, 583–590. [CrossRef]

53. Singh, C.R. Review on problems and its remedy in plant tissue culture. *Asian J. Biol. Sci.* 2018, 11, 165–172. [CrossRef]

54. Sleiman, S.H.; Bernard, E.; Amini, M.; Khavari-Nezhad, R.A. Cadmium accumulation and alkaloid production of *Narcissus tazetta* plants grown under *in vitro* condition with cadmium stress. *Plant Physiol. Rep.* 2020, 25, 51–57. [CrossRef]

55. Sudheer, W.N.; Thiruvengadam, M.; Nagella, P. A comprehensive review on tissue culture studies and secondary metabolite production in *Bacopa monnieri* L. Pennell: A nootropic plant. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2022, 12, 1–15. [Cross-Ref] [PubMed]

56. Surakshitha, N.C.; Soorianathasundaram, K.; Ganga, M.; Ravceendran, M. Alleviating shoot tip necrosis during *in vitro* propagation of grape cv. Red Globe. *Sci. Hortic.* 2019, 248, 118–125. [CrossRef]

57. Teixeira da Silva, J.A.; Guly, A.; Magyar-Tabori, K.; Wang, M.R.; Wang, Q.-W.; Dobránszki, J. *In vitro* tissue culture of apple and other *Malus* species: Recent advances and applications. *Planta* 2019, 249, 975–1006. [CrossRef]

58. Teixeira da Silva, J.A.; Hossain, M.M.; Sharma, M.; Dobránszki, J.; Cardoso, J.C.; Songjun, Z. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Hortic. Plant J.* 2017, 3, 110–124. [CrossRef]

59. Teixeira da Silva, J.A.; Nezamif-Alanagh, E.; Barreal, M.E.; Kher, M.M.; Wicaksono, A.; Gulyás, A.; Hidvégi, N.; Magyar-Tabori, K.; Mender-Drienyovszki, N.; Márton, L.; et al. Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: A reappraisal of possible causes and solutions. *Planta* 2020, 252, 47. [CrossRef]

60. Thakur, M.; Rakshandha; Sharma, V.; Chauhan, A. Genetic fidelity assessment of long term in vitro shoot cultures and regenerated plants in Japanese plum cvs Santa Rosa and Frontier through RAPD, ISSR and SCoT markers. *S. Afr. J. Bot.* **2020**, *140*, 428–433. [[CrossRef](#)]

61. Thakur, M.; Sharma, V.; Luharch, R. Propagation of plum (*Prunus salicina* L.) cultivar Frontier in vitro through control of shoot tip necrosis (STN) and validation of genetic integrity using SSR markers. *Plant Physiol. Rep.* **2021**, *26*, 238–246. [[CrossRef](#)]

62. Urtiga, C.D.C.; Silva-Cardoso, I.M.D.A.; Figueiredo, S.A. Low sodium isocyanurate concentrations as a substitute to medium autoclaving in plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2019**, *139*, 601–604. [[CrossRef](#)]

63. Viana, C.M.; Freire, D.; Abrantes, P.; Rocha, J.; Pereira, P. Agricultural land systems importance for supporting food security and sustainable development goals: A systematic review. *Sci. Total Environ.* **2022**, *806*, 150718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Vujović, T.; Ružić, D.J.; Serović, R. In vitro shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Hort. Sci.* **2012**, *39*, 101–107. [[CrossRef](#)]

65. Wang, M.; Ji, Y.; Feng, S.; Liu, C.; Xiao, Z.; Wang, X.; Wang, Y.; Xia, G. The non-random patterns of genetic variation induced by asymmetric somatic hybridization in wheat. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

66. Wikandari, R.; Manikharda; Baldermann, S.; Ningrum, A.; Taherzadeh, M.J. Application of cell culture technology and genetic engineering for production of future foods and crop improvement to strengthen food security. *Bioengineered* **2021**, *12*, 11305–11330. [[CrossRef](#)]

67. Zhao, S.; Wang, H.; Liu, K.; Li, L.; Yang, J.; An, X.; Li, P.; Yun, L.; Zhang, Z. The role of JRFPOs in the browning of walnut explants. *Plant Biol* **2021**, *21*, 9. [[CrossRef](#)]

68. Allen, D. E. and P. Hackney, 2010. Further fieldwork on the brambles (*Rubus fruticosus* L. agg.) of North-east Ireland". *Irish Naturalists' Journal*. 31: 18–22.

69. Arıkan, Ş., M. İpek and A. Esitken. 2014. In Vitro Micropropagation of Blackberry (*Rubus fruticosus*.) Cultivar "Jumbo". *Australian Journal of Industry Research SCIE Journals*, a special issue for the International Conferences held by the Australian Society for Commerce Industry and Engineering (SCIE) in Dubai during the 15-16 November

70. Barbieri, R., E. Coppo, A. Marchese, M. Daglia, E. Sobarzo-Sánchez, S.F. Nabavi and S.M. Nabavi, 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, 196: 44–68.

71. Carter, P.M., J.R. Clark, C.D. Paricka and D.Y. Crowne. 2006. Chilling Response of Arkansas Blackberry Cultivars. *Journal of the American Pomological Society*, Vol 60 (4): 187-197

72. Clapa, D., A. Fira, C. Plopa and A. Vescan. 2011. The micropropagation of some thornless blackberry cultivars. *Research Institute for Fruit Growing Pitesti, Romania*, Vol. XXVII, 113-119

73. Dall'Acqua, S., R. Cervellati, M.C. Loi and G. Innocenti, 2008. Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chem.* 106: 745–749

74. Eyduran, S., P.E. Eyduran, K.M. Khawar and Y.S. Agaoglu, 2008. Adaptation of eight American blackberry (*Rubus fruticosus* L.) cultivars for Central Anatolia. *Afr. J. Biotech.*, 7, 2600–2604

75. Fira, A., D. Clapa and C. Plopa. 2010. New Aspects Regarding the Micropropagation of Blackberry Cultivar, Thornless evergreen. *Bulletin UASVM Horticulture*, 67(1):106-114.; Fira, A., D. Clapa and E. Rakosy Tican. 2011. In Vitro Propagation of the Thornless Blackberry Cultivar 'Loch Ness'. *Bulletin UASVM Horticulture*, 68 (1): 39-46.

76. Fira, A., D. Clapa and C. Plopa. 2010. New Aspects Regarding the Micropropagation of Blackberry Cultivar, Thornless evergreen. *Bulletin UASVM Horticulture*, 67(1):106-114.

77. Galletta, G.J., J.L. Maas, J.R. Clark and C.E. Finn. 1998. 'Triple Crown' Thornless Blackberry. *Fruit Varieties Journal*, Vol. 52 (3): 124-127

78. Hummer, K.E. and J. Janick, 2007. *Rubus* iconography: Antiquity to the renaissance. *Acta Hort.* 759:89–105.

79. Lepse L. and V. Laugale. 2008. Micropropagation, rooting and acclimatization of blackberry "Agavam". *International Symposium on Biotechnology of fruit species: BIOTECH FRUIT 2008*

80. Marulanda, M.L., A.M. López and S.B. Aguilar, 2007. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. *Crop Breed. App. Biotech.*, 7:242–252

81. Muhammad Zia-Ul-Haq, R. Muhammad, De Feo, Vincenzo, Z. E., J. Hawa and M. Marius, 2014. *Rubus Fruticosus* L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses. *Molecules*, 19:10998-11029; doi: 10.3390/molecules190810998

82. Murad, W., A. Ahmad, S.A. Gilani and M.A. Khan, 2011. Indigenous knowledge and folk use of medicinal plants by the tribal communities of Hazar Nao forest, Malakand District, North Pakistan. *J. Med. Plants Res.*, 5: 1072–1086

83. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497

84. Radocaj, O., V. Vujasinovic, E. Dimic and Z. Basi, 2014. Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oils extracted from dried press pomace after longterm frozen storage of berries can be used as functional food ingredients. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 116:1– 9.

85. Reyes-Carmona J., G.G. Yousef, R.A. Martinez-Peniche and M.A. Lila, 2005. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry. *J. Food Sci.*, 70(7):1365-1376

86. Ruzic, D. and T. Lazic, 2006. Micropropagation as Means of Rapid Multiplication of Newly Developed Blackberry and Black Currant Cultivars. *Agric. Conspec. Sci.*, 71(4): 149-153

87. Zhang, C.L., D.F. Chen, M. C. Elliott and A. Slater, 2004. Efficient procedures for callus induction and adventitious shoot organogenesis in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40:475–481

88. А. А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич - Особливості мікроклонального розмноження видів рослин. Біла Церква, 2018

89. Слін Ю.Я., Зерова М.Я., Лушпа В.І., Шабарова С.І. Дари лісів. – Київ : Урожай, 1979. – 440 с.

90. Івченко, Т. В. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro* (Методичні рекомендації) / Т. В. Івченко, С. І. Коріснко, Т. І. Віщеня та ін. – Х. : Пляда, 2013.– 48 с.

91. Карпенчук Г.К., Мельник А.В. Обліки, спостереження, аналізи, обробка інформації в дослідях з плодовими та ягідними рослинами, Умань, 1987. 45 с.

92. Методика державного сортовипробування сільськогосподарських культур на придатність до поширення в Україні (плодові, ягідні, горіхоплідні, субтропічні, виноград та шовковиця) / Охорона прав на сорти рослин: офіц. бюлетень / [Гол. ред. В. В. Волкодав] К.: Алефа, 2005. Вип. 2. Ч. 2. С. 161–232.

93. Надточій І.П. Ожина для вашого саду. Дім, сад, город. 2018. № 12. С. 10-13.

94. Новий сезон на ринку фруктів та ягід: тенденції та перспективи. Агробізнес сьогодні. 2020. №11. С. 54 – 57.

95. Поперечна О. Лохина – ягода №1 в Україні за площею комерційних насаджень. Ягідник. 2020. №1. С.19 - 21.

96. Сердюк О. В. Підбір сортименту та вдосконалення технології обробітку ожини (*Rubus* subg. *Euibatus* Focke) в Лісостепу України / О. В. Сердюк, В. О. Силенко. // Современное садоводство – 2010. – №1. – С. 29-30.

97. Ханіна Л. В. Оптимізація умов введення малини та ожини в культуру *in vitro* // Науковий журнал КубГАУ. – 2014. – № 101. – С. 1–12

98. Шубенко Л.А., Шох С.С., Куманська Ю.О. Оцінка сортів ожини придатних для вирощування в умовах Правобережного Лісостепу України / Збірник наукових праць БНАУ «Агробіологія». 2020. 1 випуск. с 206.

99. Яворська Н. Й., Воробець Н. М. Вміст хлорофілів і каротиноїдів у пагонах лохини високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.) Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2020. № 3–4 (80). С. 33–38