

УДК 634.71 : 631.532/535

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА ЕЖЕВИКИ *IN VITRO*

Иванова-Ханина Л. В.

*Академия биоресурсов и природопользования (структурное подразделение) ФГАОУ ВО
«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь,
Республика Крым, Россия
E-mail: lidaivanova-khanina@rambler.ru*

В результате исследований выявлены особенности влияния гормонального состава питательной среды на процессы приживаемости, роста и развития микропобегов ежевики на 1–3 этапах микроклонального размножения. Установлено, что для сорта 'Рубен' оптимальной концентрацией гормонов на этапе введения в культуру *in vitro* является введение БАП (0,5 мг/л) и ГК₃ (0,2 мг/л), для сорта 'Triple Crown' – несколько выше концентрация указанных гормонов – 1,0 и 0,5 мг/л соответственно. На этапе мультипликации для обоих сортов оптимальным было введение БАП и ГК₃ по 0,5 мг/л, что позволило получить 1,6–2,2 побега высотой 42,6–45,5 мм. Для индукции ризогенеза оптимальным было использование ИМК в концентрации 0,2 мг/л для сорта 'Triple Crown' и 0,5 мг/л для сорта 'Рубен'. Проведенные исследования являются основой для оптимизации методики микроклонального размножения ежевики в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: микроклональное размножение, ежевика, *in vitro*, питательная среда, эксплант

ВВЕДЕНИЕ

Большой интерес к посадочному материалу ежевики обусловлен не только привлекательным внешним видом ягод, но и их уникальными полезными свойствами. Ягоды ежевики содержат каротиноиды, витамины группы В, провитамин А, витамины С, Е и Р, органические кислоты, микроэлементы. Употребление ягод ежевики способствует повышению иммунитета, активизации процессов мышления, благоприятно воздействует на сердечно-сосудистую и нервную системы, улучшает процессы метаболизма [1].

Культивирование ежевики, особенно ремонтантных форм, обеспечивающих конвейер продукции в курортный сезон – с первых чисел июня и до конца октября, представляет значительный интерес для экономики аграрного сектора Крыма. Однако, специфические климатические условия: скудные осадки, повышенные температуры и низкая влажность воздуха в летний период, а также возвратные весенние заморозки ограничивают возможности производства посадочного материала ягодных растений [2].

В связи с этим актуально использование методов размножения *in vitro*. Наиболее часто для получения однородного посадочного материала используют метод микроклонального размножения. По сравнению с традиционным методом вегетативного размножения он имеет ряд несомненных преимуществ: сокращение

сроков получения посадочного материала, высокий коэффициент размножения и возможность оздоровления растений от патогенов [3, 4].

Вопросам оптимизации технологии микрклонального размножения ягодных растений уделено немало внимания, что прослеживается в работах Волосевич Н. Н. [5], Эрст А. А., Вечерниной Н. А. [6] и др. авторов. Отдельные этапы разработаны и для размножения ежевики *in vitro* [7–9], однако в большинстве работ подчеркивается, что видовая и сортовая специфичность эксплантов вызывает необходимость подбора и усовершенствования состава питательной среды на каждом из этапов микрклонального размножения.

Целью данных исследований являлось выявление влияния гормонального состава питательной среды на уровень регенерации, рост и развитие микропобегов ежевики *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили перспективные для южных регионов сорта ежевики 'Triple Crown' и 'Рубен', характеризующиеся комплексом ценных признаков.

При проведении исследований использовали общепринятые методики по культуре изолированных клеток, тканей и органов растений [10–12]. Эксплантами для введения в асептическую культуру служили пазушные почки ежевики. Стерилизация растительного материала заключалась в последовательной обработке 70 % этанолом (40 с) и 50 % раствором Domestos (10 мин.), с последующей промывкой в трех сменах стерильной воды. С почек удаляли кроющие листья и высаживали их на питательную среду. Экспланты культивировали на модификациях агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга (МС), с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП), кинетина (кин.) и гибберелловой кислоты (ГК₃). Условия культивирования эксплантов: температура 25±2 °С, 16-ти часовой фотопериод при освещенности 2,0–3,0 тыс. люкс и относительной влажности воздуха 70 %.

На этапе мультипликации регенерировавшие в условиях *in vitro* микропобеги ежевики разделяли на сегменты длиной 6–10 мм и высаживали на свежую питательную среду. Для культивирования использовали модификации питательной среды МС с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) и гибберелловой кислоты (ГК₃) в разных концентрациях.

Для укоренения использовали питательную среду с половинным количеством макро- и микросолей (½ МС), с добавлением β-индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) или β-индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Укореняемые микропобеги имели 3–5 пазушных почек и высоту побега не менее 20 мм.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета программ Excel 7.0 для Microsoft Windows®. В таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность процессов регенерации эксплантов на первом этапе микроклонального размножения в значительной степени обусловлена составом питательной среды. Оптимизацию гормонального состава осуществляли на базе питательной среды МС, добавляя цитокинины (БАП, кинетин) и гибберелловую кислоту (ГК₃) в различных концентрациях.

Выбор в качестве экспланта почки (организованной структуры) и включение в состав питательной среды цитокининов позволяли стимулировать образование побегов. Анализ полученных данных показал, что культивирование на питательной среде с добавлением БАП способствовало получению более высоких биометрических показателей (табл. 1). Так, у сорта 'Triple Crown' уровень приживаемости при культивировании на среде с добавлением кинетина (0,2–0,5 мг/л) и ГК₃ (0,1–0,2 мг/л) составил 62,0–78,6 %, частота регенерации – 54,1–66,4 %. При использовании сочетания БАП (0,2–0,5 мг/л) и ГК₃ (0,1–0,2 мг/л) эти показатели были незначительно выше (67,3–80,0 % и 46,6–72,4 %).

Таблица 1

Влияние гормонального состава питательной среды на развитие эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* (30 сут. культивирования)

Параметры роста	Содержание и концентрация гормонов, мг/л						
	кин. 0,2 ГК ₃ 0,1	кин. 0,5 ГК ₃ 0,1	кин. 0,5 ГК ₃ 0,2	БАП 0,2 ГК ₃ 0,1	БАП 0,5 ГК ₃ 0,1	БАП 0,5 ГК ₃ 0,2	БАП 1,0 ГК ₃ 0,5
'Triple Crown'							
Уровень приживаемости, %	75,5±5,2	78,6±5,8	62,0±3,6	67,3±5,2	68,5±5,5	80,0±3,5	85,1±5,3
Частота регенерации, %	54,1±4,9	66,4±4,4	58,6±4,1	46,6±2,9	56,2±4,6	72,4±2,9	76,0±4,2
Высота побега, мм	22,6±1,4	24,8±1,3	30,2±1,7	42,7±1,2	28,4±2,1	35,5±1,3	40,4±2,4
Количество побегов, шт.	1,8±0,6	2,0±0,4	2,3±0,2	2,3±0,1	2,6±0,1	2,6±0,5	3,0±0,2
'Рубен'							
Уровень приживаемости, %	60,0±2,5	75,0±5,8	68,5±3,8	72,2±5,1	70,5±4,3	88,1±2,1	90,9±3,6
Частота регенерации, %	46,1±2,2	54,9±4,6	54,6±4,3	65,0±5,5	62,5±3,9	76,5±3,0	84,8±6,2
Высота побега, мм	24,2±1,3	20,6±1,1	28,9±1,3	33,8±1,4	33,5±1,3	38,1±2,1	36,5±2,0
Количество побегов, шт.	2,1±0,2	2,2±0,6	2,2±0,4	2,2±0,4	2,4±0,3	2,5±0,1	2,8±0,4

В то же время Мытницкая Ю. Ф. и др. [13] при культивировании ремонтантных форм малины *in vitro* отмечали существенную разницу в выживаемости эксплантов на средах с разными видами цитокининов. В наших исследованиях во всех вариантах отмечалось формирование сразу нескольких побегов, но частота множественного побегообразования была различной, количество

сформировавшихся побегов варьировало от 1,8 до 2,3 шт. на среде с добавлением кинетина и от 2,3 до 3,0 шт. на средах с добавлением БАП. В эксперименте учитывали высоту одного (основного) побега. Отмечено, что культивирование на питательных средах с добавлением БАП обеспечивало большую высоту побегов (28,4–42,7 мм). Оптимальным для сорта 'Triple Crown' является вариант с БАП (1,0 мг/л) и ГК₃ (0,5 мг/л), что способствовало формированию 3,0±0,2 шт. побегов высотой 40,4±2,4 мм.

Для сорта 'Рубен' наблюдалась аналогичная тенденция в реакции на разные виды цитокининов, но оптимальным оказалось введение БАП и ГК₃ в меньшей концентрации (0,5 мг/л и 0,2 мг/л соответственно).

На этапе мультипликации основная цель заключается в достижении максимального коэффициента размножения. На коэффициент размножения в культуре *in vitro* влияет совокупность факторов: генотип растения, состав питательной среды, физические условия культивирования, стабильность процесса размножения при субкультивировании микропобегов.

Приступать ко второму этапу микроклонального размножения исследуемых сортов ежевики можно уже через 30 суток после эксплантации почек, т. к. за этот период из одного экспланта формируется, в среднем, 2–3 побега высотой 30–40 мм (см. табл. 1). Кроме того, при увеличении длительности культивирования возрастает возможность механического травмирования побегов при извлечении их из пробирки.

После разделения микропобегов на черенки с одной-двумя пазушными почками культивирование осуществляли на питательных средах с добавлением БАП и ГК₃ в разных концентрациях. Через 3–5 суток после черенкования наблюдали некоторое утолщение базальной части микрочеренков, затем – пробуждение пазушной почки и рост микропобегов. Частота регенерации побегов во всех вариантах эксперимента была высокой и составляла 80,0–96,0 % (табл. 2).

При анализе изменения высоты основного побега в зависимости от концентрации регуляторов роста выявлена динамика повышения значения этого параметра с увеличением концентрации ГК₃ с 0,1 мг/л до 0,5 мг/л на фоне БАП (0,5 мг/л). Повышение концентрации ГК₃ до 1,0 мг/л, как и повышение концентрации БАП, не оказывало существенного влияния на высоту и количество сформировавшихся побегов. Таварткиладзе О. К. и Вечернина Н. А. [7] при культивировании перспективной формы ежевики садовой бесшипой на средах с содержанием БАП выше 5 мкМ отмечали наибольшее количество регенерировавшихся почек (коэффициент размножения был равен 15), но они были гипергидратированы и не пригодны для дальнейшего размножения. Таким образом, на этапе мультипликации оптимальным из исследуемых вариантов является добавление в состав питательной среды БАП и ГК₃ по 0,5 мг/л, что позволяет получить, в среднем, 1,6–2,2 побега высотой 42,6–45,5 мм.

Исследованиями многих авторов [3, 10, 11] показано, что под действием цитокининов, используемых на первых этапах размножения *in vitro*, у многих растений ингибируется образование корневой системы и необходимым является этап укоренения микропобегов. Для индукции процессов ризогенеза в состав

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ...

питательной среды вводят ауксины (ИУК, ИМК, НУК, ИПК) в различных концентрациях. Под влиянием цитокининов стимулируется процесс деления клеток паренхимы побега и дифференциация корневых зачатков в основании микропобега. Исследованиями [7, 8, 14] показано, что для укоренения ягодных растений *in vitro* эффективным является использование ИМК или ИУК.

Таблица 2
Влияние гормонального состава питательной среды на развитие микропобегов ежевики на этапе мультипликации (30 сут. культивирования)

Параметры роста	Содержание и концентрация гормонов, мг/л				
	БАП 0,5 ГК ₃ 0,1	БАП 0,5 ГК ₃ 0,3	БАП 0,5 ГК ₃ 0,5	БАП 1,0 ГК ₃ 0,5	БАП 0,5 ГК ₃ 1,0
'Triple Crown'					
Частота регенерации, %	84,0±4,5	88,4±2,6	90,6±3,7	90,1±4,5	88,4±6,2
Высота побега, мм	38,6±1,4	42,2±1,8	45,5±1,3	46,4±1,8	46,6±1,3
Количество побегов, шт.	1,8±0,2	2,4±0,6	2,2±0,5	2,2±0,2	1,9±0,4
'Рубен'					
Частота регенерации, %	92,3±5,1	95,5±2,5	96,0±2,0	84,0±4,7	80,0±3,0
Высота побега, мм	32,6±0,7	38,2±1,4	42,6±1,0	44,2±1,3	44,1±1,8
Количество побегов, шт.	1,2±0,4	1,6±0,2	1,6±0,5	1,5±0,2	1,4±0,6

Для укоренения микропобеги ежевики высаживали на питательную среду с половинным количеством макро- и микросолей (½ МС), содержащую полный набор витаминов и ауксины (ИМК или ИУК в концентрациях 0,2–1,0 мг/л). Частота ризогенеза в эксперименте была высокой независимо от генотипа, вида ауксина и его концентрации в питательной среде и составляла 74,8–86,0 % у микропобегов сорта 'Triple Crown' и 84,2–88,0 % у сорта 'Рубен' (табл. 3).

Таблица 3
Влияние концентрации ауксинов на развитие микропобегов ежевики на этапе укоренения *in vitro* (30 сут. культивирования)

Параметры роста	Концентрация ауксинов, мг/л					
	ИУК			ИМК		
	0,2	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0
'Triple Crown'						
Частота ризогенеза, %	74,8±5,6	86,0±3,5	77,9±3,2	80,0±2,5	76,4±3,0	79,2±4,4
Прирост побегов, мм	22,5±2,1	21,2±1,6	16,3±2,8	19,4±2,0	21,3±1,6	16,2±2,3
Количество корней, шт.	3,3±0,5	4,6±0,3	3,7±0,2	4,2±0,1	4,7±0,6	4,6±0,5
Длина корней, мм	32,2±1,4	35,8±2,1	36,7±1,6	41,8±2,1	43,2±1,7	43,0±1,6
'Рубен'						
Частота ризогенеза, %	84,2±3,9	85,0±2,0	85,2±2,2	86,4±4,6	88,0±3,0	87,5±2,4
Прирост побегов, мм	21,9±1,6	19,5±1,5	18,4±2,1	22,3±1,8	24,0±1,5	22,8±1,6
Количество корней, шт.	3,0±0,5	4,5±0,2	4,7±0,4	3,9±0,6	4,8±0,5	5,0±0,2
Длина корней, мм	28,4±2,1	26,5±2,2	27,3±1,6	24,8±2,1	31,5±1,8	28,0±1,8

Волосевич Н. Н. с соавторами [14] отмечают, что появление корней у ежевики наблюдали даже на средах, содержащих цитокинины, но оптимальной для укоренения была среда с добавлением 0,5 мг/л ИМК на фоне 1,0 мг/л ГК₃. Анализ данных, представленных в таблице 3, позволяет отметить, что в обоих вариантах использования ауксинов наблюдалось интенсивное укоренение микропобегов и развитие корней. Анализ биометрических показателей сорта 'Triple Crown' показал, что варианты с добавлением ИУК в концентрации 0,5 мг/л и ИМК в концентрации 0,2 мг/л и 0,5 мг/л не имеют существенных различий. В связи с этим оптимальным для данного сорта является добавление в среду ИМК в концентрации 0,2 мг/л. Для сорта 'Рубен' выделен вариант с добавлением ИМК в концентрации 0,5 мг/л, поскольку длина корней была существенно выше, чем при добавлении ИМК в концентрации 0,2 мг/л. Кроме того, в процессе культивирования отмечена тенденция к снижению величины прироста при увеличении концентрации ауксинов, что, вероятно, связано с ингибирующим воздействием ауксинов на процессы роста побегов.

Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизирован гормональный состав питательной среды для введения почек исследуемых сортов ежевики в культуру *in vitro*, подобраны оптимальные модификации питательной среды МС для этапа мультипликации и укоренения микропобегов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На первом этапе микроклонального размножения на уровень регенерации, рост и развитие микропобегов исследуемых сортов ежевики значительное влияние оказывает гормональный состав питательной среды. Для сорта 'Triple Crown' на этапе введения в культуру *in vitro* оптимальным является добавление в среду БАП (1,0 мг/л) и ГК₃ (0,5 мг/л), что способствует формированию 3,0±0,2 шт. побегов высотой 40,4±2,4 мм. Для сорта 'Рубен' – БАП (0,5 мг/л) и ГК₃ (0,2 мг/л).
2. На этапе мультипликации уровень регенерации микропобегов ежевики после черенкования достаточно высокий и составляет 80,0–96,0 %.
3. Оптимальной модификацией питательной среды МС на этапе мультипликации является вариант с добавлением БАП и ГК₃ по 0,5 мг/л, что позволяет получить, в среднем 1,6–2,2 побега высотой 42,6–45,5 мм.
4. Для индукции ризогенеза *in vitro* у микропобегов исследуемых сортов ежевики оптимальным является использование в качестве ауксина ИМК в концентрации 0,2 мг/л для сорта 'Triple Crown' и 0,5 мг/л для сорта 'Рубен'.

Список литературы

1. Ягодные культуры: учебное пособие / В. В. Даньков, М. М. Скрипниченко, С. Ф. Логинова, Н. Н. Горбачева, Г. В. Щербакова, Т. В. Долженко – СПб.: Изд-во «Лань», 2015 г. – 192 с.
2. Копылов В. И. Плодоводство Крыма в XXI веке / В. И. Копылов, В. В. Шевченко, Н. М. Щербатко // Агропромышленный комплекс Крыма в XXI веке : научн. труды КГАУ – Симферополь, 2002. – Вып. 68. – С. 68–77.
3. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений : учебное пособие / Е. А. Калашникова. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. – 318 с.

4. Иванова-Ханина Л. В. Основы биотехнологии растений: клеточные технологии в селекции и размножении : учебное пособие / Л. В. Иванова-Ханина. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2015. – 144 с.
5. Волосевич Н. Н. Размножение *in vitro* и оздоровление от вирусов малины / Н. Н. Волосевич, С. Э. Семенов, Н. В. Кухарчик // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология : тезисы IX Междунар. конф. – Звенигород, 2008. – С. 78–79.
6. Эрст А. А. Введение в культуру смородины золотистой / А. А. Эрст, Н. А. Вечернина // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология : тезисы IX Междунар. конф. – Звенигород, 2008. – С. 450–451.
7. Таварткиладзе О. К. Размножение ежевики в культуре *in vitro* / О. К. Таварткиладзе, Н. А. Вечернина // Эл. журнал «Известия Алтайского государственного университета». Биологические науки [Электронный ресурс], 2007. – № 3 (55). – Режим доступа: <http://izvestia.asu.ru/2007/3/biol/TheNewsOfASU-2007-3-biol-06.pdf>
8. Соловых Н. В. Клональное размножение ягодных культур *in vitro* / Н. В. Соловых, С. А. Муратова, М. Б. Янковская // «Актуальные проблемы размножения ягодных культур и пути их решения» : мат. Междунар. научн.-метод. дистанционной конф. [Электронный ресурс], 2010. – Режим доступа: <http://konferenc2010.narod.ru>
9. Ташматова Л. В. Особенности клонального микроразмножения ежевики с различной формой роста / Л. В. Ташматова, Л. А. Грюнер, О. В. Мацева // Эл. журнал «Современное садоводство» [Электронный ресурс], 2014. – № 4. – Режим доступа: <http://journal.vniispk.ru>
10. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
11. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
12. Kartha K. K. Meristem culture / K. K. Kartha // Plant tissue culture methods / Ed. by O.L. Gamborg, L.R. Wetter. – Canada, Saskatoon, 1975. – P. 39–43.
13. Мытницкая Ю. Ф. Эффективность различных цитокининов при введении в культуру *in vitro* новых сортов ремонтантной малины / Ю. Ф. Мытницкая, В. В. Заякин, С. Н. Евдокименко, И. Я. Нам // В сб.: «Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений». Сб. статей Междунар. науч. конф. – Минск, 2014. – С. 180–183.
14. Волосевич Н. Н. Ризогенез ягодных культур *in vitro* / Н. Н. Волосевич, С. Э. Семенов, Е. В. Колбанова // В сб.: «Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений». Сб. науч. тр. III Междунар. науч. конф. к 50-летию отдела биохимии и биотехнологии растений, Минск: Издательский центр БГУ, 2008. – С. 222–226.

INFLUENCE OF THE HORMONAL COMPOSITION OF NUTRIENT MEDIUM ON INTENSITY OF BLACKBERRY GROWTH *IN VITRO*

Ivanova-Khanina L. V.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University», Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: lidaiwanova-khanina@rambler.ru*

The method of microclonal propagation is characterized by a high multiplication factor and the possibility to obtain a homogeneous planting material, improved from pathogens. Much attention has been paid to the issues of optimizing the microclonal propagation technology of soft-berry plants, but most of the studies point that the species and varietal specificity of explants necessitate to select and optimize the nutrient medium composition for different stages of microclonal reproduction *in vitro*.

The purpose of these studies was to identify the effect of the hormonal composition of the nutrient medium on the regeneration level, growth and development blackberry microshoot in vitro.

The blackberry varieties 'Triple Crown' and 'Ruben', promising the southern regions, were used for this study. Blackberry axillary buds were used for *in vitro* culture. Analysis of the obtained data showed cultivation on a nutrient medium with the addition of BAP (0,2–0,5 mg/l) forwarded to higher biometric indicators than the additional kinetin (0,2–0,5 mg/l). The optimal option of the nutrient medium for the 'Triple Crown' variety is the addition of BAP (1,0 mg/l) and HA (0,5 mg/l), which contributes to formation of 3,0±0,2 pcs. shoots height 40,4±2,4 mm. For the Ruben variety turned out that the administration of BAP and HA in a lower concentration (0,5 mg/l and 0,2 mg/l, respectively) was optimal.

At the stage of multiplication, the frequency of shoots regeneration in all experiment variants of the was high and amounted to 80,0–96,0 %. Optimal for the studied varieties is the adding to the nutrient medium of BAP and HA at 0,5 mg/l, which makes it possible to obtain, on average, 1,6–2,2 shoots with a height of 42,6–45,5 mm.

At the rooting stage, microshoots of blackberry were planted on depleted nutrient medium MS (½ MS) containing IBA or IAA in concentrations of 0,2–1,0 mg/l. The frequency of rhizogenesis in the experiment was high regardless of the genotype, the type of auxin and its concentration in the nutrient medium and was 74,8–86,0 % for the Triple Crown variety, and for 'Ruben' formed 84,2–88,0 %. Analysis of roots number and length of the studied varieties made it possible to reveal the optimal type and concentration of auxins. For the Triple Crown variety, it is optimal to add an IBA at a concentration of 0,2 mg/l to the medium – 4,2 units are formed. roots 41,8 mm long. For the 'Ruben' adding 0,5 mg/l IBA contribute in formation of 4,8 pcs. roots with a length of 31,5 mm.

Thereby, as a result of the research, the hormonal composition of the nutrient medium for the introduction of the buds of the studied blackberry varieties into an in vitro culture has been optimized.

Keywords: microclonal reproduction, blackberry, in vitro, nutrient medium, explant

References

1. Dan'kov V. V., Skripnichenko M. M., Loginova S. F., Gorbacheva N. N., Shcherbakova G. V. and Dolzhenko T. V. Soft-berry varieties: Textbook, 192 (SPb.: Publ. House "Lan", 2015).
2. Kopylov V. I., Shevchenko V. V. and Scherbatko N. M. Horticulture of Crimea in the XXI century, *Agro-industrial complex of the Crimea in the 21st century: Sci. Works of the CSAU*, **68**, 68 (2002)
3. Kalashnikova E. A. Cell engineering of plants: Textbook, 318 (M.: Publ. office: Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RGAU-MSHA), Moscow, 2012).
4. Ivanova-Khanina L. V. Basics of Plant Biotechnology: Cell Technologies in Breeding and Reproduction: Textbook, 144 (Simferopol: Publ. office: "ARIAL", 2015).
5. Volosevich N. N., Semenas S. E. and Kukharchik N. V. Reproduction in vitro and improvement raspberry from viruses, *Biology of plant cells in vitro and biotechnology: theses IX International. conf.*, 78 (2008).
6. Erst A. A. and Vechernina N. A. Introduction in culture the golden currant, *Biology of plant cells in vitro and biotechnology: theses of the IX International. conf.*, 450 (2008).
7. Tavartkiladze O. K. and Vechernina N. A. Blackberry reproduction *in vitro* culture [Electronic resource]: *El. magazine "News of Altai State University". Biological Sciences*, **3 (55)** (2007), Access Mode: URL: <http://izvestia.asu.ru/2007/3/biol/TheNewsOfASU-2007-3-biol-06.pdf>
8. Solovikh N. V., Muratova S. A. and Yankovskaya M. B. Clonal propagation soft-fruit crops *in vitro* [Electronic resource]: «*Relevant problems of berry cultures reproduction and ways of their solution*»:

- Proceedings of the International Scientific-Methodological Conference*, 2010. – Access Mode: URL: <http://konferenc2010.narod.ru>.
9. Tashmatova L. V., Gryuner L. A. and Matsneva O. V. Features of blackberry clonal micropropagation with different form of growth, *El. Journal of Modern Horticulture*, **4**, 60 (2014). – Access mode: URL: <http://journal.vniispk.ru>
 10. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V. and Polishchuk V. E. The culture of tissue methods in plant physiology and biochemistry, 488 (Kiev: Naukova Dumka, 1980).
 11. Butenko R. G. The culture of isolated tissues and plant morphogenesis physiology, 272 (Moscow: Science, 1964).
 12. Kartha K. K. Meristem culture : Plant tissue culture methods, 39 (Saskatoon: N.R.C. Canada, 1975).
 13. Mytnitskaya Yu. F., Zayakin V. V., Evdokimenko S. N. and Nam I. Ya. The effect of using diferent cytokinins for introducing *in vitro* culture the new remontant raspberries, *Biotechnological techniques to preserve a biodiversity and for plant breeding. Collection of articles of the International scientific conference*, 180 (2014).
 14. Volosevich N. N., Semenas S. E. and Kolbanova E. V. Rhizogenesis soft-berries *in vitro*, *Theoretical and applied aspects of plant biotechnology and biochemistry. Collection of scientific report*, 222 (2008).