

Селекція та генетика

УДК 633.522 : 58.085

МОДИФІКАЦІЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ НЕПСИХОТРОПНИХ КОНОПЕЛЬ (*CANNABIS SATIVA* L.) СЕРЕДНЬОЄВРОПЕЙСЬКОГО ЕКОЛОГО-ГЕОГРАФІЧНОГО ТИПУ *IN VITRO*

Мищенко С.В., кандидат сільськогосподарських наук, докторант

ІНСТИТУТ РОСЛИННИЦТВА ім. В. Я. ЮР'ЄВА НААН

Для підвищення ефективності культивування однодомних непсихотропних конопель (*Cannabis sativa* L.) середньоєвропейського еколого-географічного типу в умовах *in vitro* запропоновано живильне середовище Мурасіге і Скуга, яке включає 440 мг/л (3 мМ) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 370 мг/л (1,5 мМ) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22,3 мг/л (100 мкМ) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 8,6 мг/л (30 мкМ) $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,83 мг/л (5 мкМ) КJ, 0,25 мг/л (1 мкМ) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 мг/л гліцину, 100 мг/л мезо-інозиту, 0,5 мг/л піридоксину, 0,1 мг/л тіаміну, а також NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, комплексований (хелатований) EDTA- Na_2 , H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, нікотинову кислоту, сахарозу, агар, фітогормони за потреби, модифікувати наступним чином: 2400 мг/л (30 мМ) NH_4NO_3 , 1768 мг/л (17,5 мМ) KNO_3 , 136 мг/л (1 мМ) KH_2PO_4 , 34,72 мг/л (125 мкМ) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, комплексованого (хелатованого) EDTA- Na_2 , 12,36 мг/л (200 мкМ) H_3BO_3 , комплексованої (хелатованої) $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$, 0,05 мг/л (0,2 мкМ) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 мг/л (0,2 мкМ) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 мг/л аскорбінової кислоти, 1 г/л активованого вугілля, 10–30 г/л глюкози, 8 г/л агару.

Ключові слова: коноплі, живильне середовище, макроелементи, мікроелементи, фітогормони, *in vitro*.

Напрями дослідження культури клітин і тканин конопель (*Cannabis sativa* L.) *in vitro* дуже різноманітні, дані технології активно розвиваються і мають широкий спектр застосування [3–8, 10–15].

Досить часто в селекційній роботі виникає потреба у підвищенні коефіцієнта розмноження цінних генотипів однодомних непсихотропних конопель середньоєвропейського еколого-географічного типу. Для цього використовують мікроклональне розмноження рослин в умовах *in vitro*. Крім того, культивування соматичних тканинних структур і регенерація з них рослин дозволяє отримувати генетично змінені рослини-регенеранти, які можуть генотипово і фенотипово суттєво відрізнитись від своїх вихідних форм і стати цінним селекційним матеріалом. Саме проходження клітинами стадії калюсогенезу веде до появи різного роду змін в генотипі, а рівень соматклональної мінливості залежить від різних факторів, зокрема сорту, типу експланта, умов культивування *in vitro*, складу живильних середовищ, наявності екзогенних регуляторів росту тощо. При цьому, на відміну від штучно індукованого мутагенезу, є

можливість добору корисних і елімінації шкідливих чи небажаних мутантних форм. Особливе значення для селекції має отримання гаплоїдів з подальшим подвоєнням хромосомного набору. Метод подвоєних гаплоїдів дозволяє створити гомозиготний матеріал і підвищити його продуктивність.

Вважається, що подальших досліджень потребує питання мікроклонального розмноження конопель *in vitro* саме волокнистого (з відсутністю психотропних властивостей) типу, оскільки під час його здійснення виникають певні складнощі [14]. У селекційно-генетичній роботі все більш затребуваним стає застосування біотехнологічних методів для отримання принципово нового селекційного матеріалу, однак рослини цього типу є недостатньо чутливими до культивування *in vitro* загалом та культури ізольованих клітин і тканин зокрема. Вони слабо піддаються впливу фотоперіоду і здатні до цвітіння при значному розмаху варіації тривалості світлового дня (фенологічні фази лише незначним чином подовжуються чи скорочуються), а тому швидко закінчують свій розвиток і відмирають, що унеможлиблює їх подальше використання *in vitro*, характеризуються сильним апікальним домінуванням. Зважаючи на вищевикладені аргументи, актуальною є розробка такого живильного середовища для культивування однодомних непсихотропних конопель середньоєвропейського еколого-географічного типу в умовах *in vitro*, яке б покращувало цей процес та результат культивування за рахунок інтенсифікації росту пагонів і поліпшення їх життєздатності, сприяло подовженню тривалості вегетативної стадії розвитку і онтогенезу загалом, гальмувало настання генеративної стадії, виступало інгібітором накопичення фенольних сполук.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проводили на базі Інституту луб'яних культур НААН. У ролі експлантів використовували незрілі зародки насінин, пиляки, частини гіпокотилів, сім'ядольних і справжніх листків, черешків і стебел, апікальні меристеми сортів однодомних технічних (промислових) конопель без психотропних властивостей Гляна, Глесія, Артеміда і Глухівські 51 та їх самозапилених ліній. Базовими слугували живильні середовища Мурасіге і Скуга, Гамборга і Евелейга, Уайта, які доповнювали фітогормонами (ауксинами, цитокінінами та гібереловою кислотою) у різних співвідношеннях, залежно від передбачуваного результату, мікроклональне розмноження здійснювали на безгормональному середовищі. Експланти культивували за фотоперіоду 16 год, відносної вологості повітря 60–80%, температури 22–24°C. За результатами пілотних досліджень для модифікації було вибране найбільш відоме і поширене живильне середовище Мурасіге і Скуга, яке містить неорганічні макро- і мікросолі, органічні сполуки у вигляді вуглеводу сахарози, амінокислот, фітогормонів (за потреби), вітамінів та агару [9]. Воно є універсальним і може бути застосоване для культивування зазначеного типу конопель, але недовіком було те, що експланти рослин досліджуваних сортів росли досить повільно,

з'являлися некротичні плями на листках при інтенсивному освітленні, пагони швидко вступали у фазу цвітіння, закінчували свій розвиток і відмирили, що унеможливило їх подальше використання, індукція калюсогенезу і органогенезу була ускладнена, спостерігалось накопичення фенольних сполук, тому дане відоме середовище потребувало модифікації свого складу для покращення культивування конопель. Ефективність модифікації кожного компонента досліджували окремо, а потім проводили комплексне спостереження.

Результати досліджень та їх обговорення. Експериментально було встановлено найкращий варіант модифікації середовища Мурасіге і Скуга, до якого внесено наступні зміни складових: 2400 мг/л (30 мМ) NH_4NO_3 , 1768 мг/л (17,5 мМ) KNO_3 , 136 мг/л (1 мМ) KH_2PO_4 , 34,72 мг/л (125 мкМ) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, комплексованого (хелатованого) EDTA-Na_2 , 12,36 мг/л (200 мкМ) H_3BO_3 , комплексованої (хелатованої) $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$, 0,05 мг/л (0,2 мкМ) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 мг/л (0,2 мкМ) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 мг/л аскорбінової кислоти (вітамін С), 1 г/л активованого вугілля, 10–30 г/л глюкози, 8 г/л агару і вилучено ніотинову кислоту (вітамін РР).

Нітроген є одним із надзвичайно важливих біогенних макроелементів для рослин, оскільки він входить до складу молекул амінокислот і відповідно білків, фітогормонів, ДНК, РНК, хлорофілу тощо [2].

Сучасні сорти технічних (промислових) конопель середньоєвропейського еколого-географічного типу є досить вимогливими до забезпеченості доступними для живлення сполуками даного елемента. Наявність Нітрогену у складі середовища головним чином забезпечується присутністю іонів NH_4^+ та NO_3^- . Саме підвищена, у порівнянні із живильним середовищем Мурасіге і Скуга, концентрація NH_4NO_3 (2400 мг/л) інтенсифікує ріст експлантів та калюсів конопель досліджуваного типу, сприяє кращому розвитку вегетативних органів, водночас гальмує розвиток генеративних органів, подовжуючи тривалість їх онтогенезу *in vitro* загалом.

Фізіологічна роль Калію визначається тим, що він не є конституційним елементом і в рослинах здебільшого залишається в іонній формі. Іонний Калій підтримує на оптимальному рівні фізико-хімічні властивості протопласта, активує роботу численних ферментів, сприяє синтезу АТФ, підтримці водного балансу рослин на оптимальному рівні шляхом підвищення осмотичного потенціалу клітин і здатності білків до гідратації, у підсумку підвищуючи надходження води в клітини і збільшуючи посухостійкість рослин; сприятливо діє на білковий, ліпідний і вуглеводний обмін, активізує фотосинтетичне й окисне фосфорилування тощо [2].

Потреба конопель у Калію дещо менша, порівняно з іншими культурами. Знижена, у порівнянні із живильним середовищем Мурасіге і Скуга, концентрація іонів K^+ , джерелом яких є солі KNO_3 (1768 мг/л) і KH_2PO_4 (136 мг/л), гармонізує інтенсивний ріст рослин, що

спостерігається внаслідок підвищеної концентрації Нітрогену, попереджує надмірне витягування стебла і міжвузлів, викликає формування додаткових вузлів, що важливо для збільшення коефіцієнта розмноження мікроклонів. У той же час, через достатню кількість вуглеводу глюкози (яка за нашими даними дає кращі результати, порівняно з сахарозою), водний баланс (осмотичний тиск) порушується не суттєво.

Фосфор – це конституційний елемент рослин, що входить до складу молекул багатьох органічних сполук, зокрема вуглеводів, РНК і ДНК, білків, ферментів (НАДФ), АДФ і АТФ, тому відіграє важливу роль в енергетичному обміні, сприяє прискоренню біохімічних процесів; завдяки буферним властивостям фосфоровмісних солей підтримується на оптимальному рівні рН протопласта, прискорюється розвиток рослин і їх перехід у генеративний стан, необхідний для доброго засвоєння Нітрогену тощо [2].

Знижена, у порівнянні із живильним середовищем Мурасіге і Скуга, до 136 мг/л концентрація Фосфору у вигляді іонів ортофосфорної кислоти PO_4^{3-} (136 мг/л KH_2PO_4) у певній мірі гальмує розвиток рослин (але не ріст) і їх перехід у генеративний стан, а також попереджає появу некротичних плям на листках за інтенсивного освітлення.

Ферум входить до складу окисно-відновних ферментів, забезпечуючи перенесення електронів або Гідрогену як відновника та синтез хлорофілу [2].

Для конопель властивий постійний ріст молодих пагонів із вузлів як при штучному видаленні апікальних меристем, так і без них. Підвищена, у порівнянні із живильним середовищем Мурасіге і Скуга, до 34,72 мг/л концентрація $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, комплексованого (хелатованого) $EDTA-Na_2$, необхідна для попередження розвитку хлорозів у молодих листків конопель, які інтенсивно ростуть *in vitro*.

Експериментально було встановлено, що культивування конопель досліджуваного типу в умовах *in vitro* дає кращі результати при збільшеному вмісті у середовищі таких мікроелементів, як Бор, Купрум і Кобальт, тому їх концентрацію подвоєно, а H_3BO_3 , комплексовано (хелатовано) гліцеролом – $C_3H_5(OH)_3$, що сприяє кращому засвоєнню елементу. Включення до середовища 5 мг/л аскорбінової кислоти, яка є антиоксидантом, та 1 г/л активованого вугілля попереджують утворення фенольних сполук, що спричиняють пригнічення росту і розвитку або ж ведуть до загибелі експлантів. Нікотинову кислоту виключено зі складу середовища, оскільки вона у конопель даного типу негативно впливала на ріст і розвиток пагонів, соматичний і генеративний калюсогенез і органогенез.

Маточний розчин (шток) компонентів живильного середовища зручно готувати за таблицею 1 (дотримуючись загальноприйнятих правил).

Таблиця 1 – Концентрація компонентів пропонованого живильного середовища для культивування одnodомних несихотропних конопель (*Cannabis sativa* L.) середньоєвропейського еколого-географічного типу в умовах *in vitro*

Компонент живильного середовища	Масова концентрація, мг/л	Молярна концентрація	Масова концентрація маточного розчину, мг/л	Об'єм маточного розчину для приготування 1 л живильного середовища, мл
Макроелементи				
NH ₄ NO ₃ *	2400	30 мМ	48000	50
KNO ₃ *	1768	17,5 мМ	35360	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	3 мМ	8800	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	1,5 мМ	7400	
KH ₂ PO ₄ *	136	1 мМ	2720	
FeSO ₄ · 7H ₂ O *	34,75	0,125 мМ	6950	5
EDTA-Na ₂ *	46,62	0,125 мМ	9320	
Мікроелементи				
H ₃ BO ₃ *	12,36	100 мкМ	12360	1
C ₃ H ₅ (OH) ₃ *	36,8	200 мкМ	36800	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	100 мкМ	22300	1
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6	30 мкМ	8600	
KJ	0,83	5 мкМ	830	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	1 мкМ	250	
CuSO ₄ · 5H ₂ O *	0,05	0,2 мкМ	50	
CoCl ₂ · 6H ₂ O *	0,05	0,2 мкМ	50	
Органічні складові				
Гліцин	2		2000	1
Мезо-інозит	100		20000	5
Нікотинова кислота *				
Піридоксин	0,5		500	1
Тіамін	0,1		100	1
Аскорбінова кислота *	5		5000	1
Активоване вугілля *	1000			
Глюкоза *	10000–30000			
Агар *	8000			

Примітки:

1. * – складові, концентрацію яких було змінено (або додано), решта – за прописом Мурасіге і Скуга.

2. Фітогормони вносять у склад середовища залежно від потреби.

3. Для мікроклонального розмноження масова концентрація глюкози становить 10000 мг/л, для індукції калусогенезу – 30000 мг/л.

Дані, наведені в таблиці 2, свідчать про ефективність пропонованого живильного середовища.

Таблиця 2 – Порівняння ефективності відомого і пропонованого живильного середовища

Ознака	Середовище Мурасіге і Скуга	Пропоноване середовище	Рівень значимості різниці (P) за t-критерієм Стьюдента
Висота пагонів, вирощених з насіння на 35-ту добу культивування, см	10,83 ± 0,245	13,73 ± 0,287	P < 0,001
Кількість міжвузлів, шт.	3,5 ± 0,09	4,9 ± 0,18	P < 0,001
Висота мікроклонів на 35-ту добу культивування, см	4,23 ± 0,446	7,10 ± 0,541	P < 0,001
Кількість міжвузлів, шт.	3,3 ± 0,28	5,8 ± 0,35	P < 0,001
Перехід в генеративну фазу	Наявний на 60-ту добу	Відсутній на 100-ту добу	
Маса калусу з 1-го гіпокотильного сегмента на 35-ту добу культивування, г *	1,49 ± 0,092	2,15 ± 0,070	P < 0,001
Здатність до органогенезу *	Відсутня	Наявна	

Примітка. * – живильне середовище додатково містило екзогенні регулятори росту – 0,5 мг/л 2,4-Д, 0,3 мг/л кінетину, 0,5 мг/л ГКз.

Вирощені на пропонованому середовищі для культивування конопель *in vitro* пагони характеризувались більш інтенсивним ростом, вищими показниками ознак висоти, кількості міжвузлів, маси калусу, утвореного на гіпокотильних сегментах, здатністю до органогенезу, тривалим періодом вегетативної фази. Розробка оформлена у вигляді корисної моделі [1].

Висновки. Використання запропонованого модифікованого живильного середовища підвищує ефективність культивування однодомних непсихотропних конопель (*Cannabis sativa* L.) середньоєвропейського еколого-географічного типу в умовах *in vitro*.

Список використаної літератури

1. Живильне середовище для культивування однодомних ненаркотичних конопель (*Cannabis sativa* L.) середньоросійського еколого-географічного типу в умовах *in vitro*: пат. 139471 UA. № у 2019 06014; заявл. 31.05.2019; опубл. 10.01.2020, Бюл. № 1.
2. Злобін Ю. А. Курс фізіології і біохімії рослин: підручник. Суми, 2004. 464 с.
3. Міщенко С. В. Індукція калусогенезу в технічних (промислових) конопель в

умовах *in vitro*. *Луб'яні та технічні культури*. 2018. Вип. 6 (11). С. 21–28.

4. Міщенко С. В. Ефективність розмноження *Cannabis sativa* L. з насіння з низькою схожістю та життєздатністю в умовах *in vitro*. *Таврійський науковий вісник*. 2018. Вип. 100. Т. 2. С. 3–8.

5. Chaohua C., Gonggu Z., Lining Z. et al. A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*. 2016. Vol. 83. P. 61–65. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.035

6. Grulichova M., Mendel P., Lalge A. B. et al. Effect of different phytohormones on growth and development of micropropagated *Cannabis sativa* L. *MendelNet 2017: Proceedings of 24th International PhD Students Conference (November 8 and 9, 2017)*. Brno, 2017. P. 618–623.

7. Lata H., Chandra S., Khan I. et al. Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2009. Vol. 45, Iss. 1. P. 12–19. DOI: 10.1007/s11627-008-9167-5

8. Lata H., Chandra S., Techen N. et al. *In vitro* mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2016. Vol. 3, Iss. 1. P. 18–26. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.12.001

9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

10. Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Kaczmarek Z. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2005. Vol. 47, Iss. 2. P. 145–151.

11. Smýkalová I., Vrbová M., Cvečková M. et al. The effects of novel synthetic cytokinin derivatives and endogenous cytokinins on the *in vitro* growth responses of hemp (*Cannabis sativa* L.) explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2019. Vol. 139. P. 381–394. DOI: 10.1007/s11240-019-01693-58.

12. Thacker X., Thomas K., Fuller M. et al. Determination of optimal hormone and mineral salts levels in tissue culture media for callus induction and growth of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Agricultural Sciences*. 2018. Vol. 09, Iss. 10. P. 1250–1268. DOI: 10.4236/as.2018.910088

13. Wielgus K., Luwanska A., Lassocinski W. et al. Estimation of *Cannabis sativa* L. tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration. *Journal of Natural Fibers*. 2008. Vol. 5, Iss. 3. P. 199–207. DOI: 10.1080/15440470801976045

14. Wróbel T., Dreger M., Wielgus K. et al. The application of plant *in vitro* cultures in cannabinoid production. *Biotechnology Letters*. 2018. Vol. 40, Iss. 3. P. 445–454. DOI: 10.1007/s10529-017-2492-1

15. Zwenger S. R. *The biotechnology of Cannabis sativa*: monograph. New York, 2014. 249 p.

MODIFICATION OF A NUTRITION FOR THE CULTIVATION OF NON-PSYCHOTROPIC HEMP (*CANNABIS SATIVA* L.) CENTRAL EUROPEAN ECOLOGICAL-GEOGRAPHICAL TYPE *IN VITRO*

Serhiy Mishchenko

PLANT PRODUCTION INSTITUTE nd. a. V. YA. YURYEV NAAS

To improve the efficiency of cultivation of monoecious non-psychoactive hemp (Cannabis sativa L.) of Central European ecological-geographical type in vitro, the Murashige and Skoog medium was proposed, which includes 440 mg/l (3 mM) CaCl₂ · 2H₂O, 370 mg/l (1, 5 mM) MgSO₄ · 7H₂O, 22,3 mg/l (100 mM) MnSO₄ · 4H₂O, 8,6 mg/l (30 mM) ZnSO₄ · 4H₂O, 0,83 mg/l (5 mM) KJ, 0,25 mg/l (1 mM) Na₂MoO₄ · 2H₂O, 2 mg/l glycine, 100 mg/l meso-inositol, 0,5 mg/l pyridoxine, 0,1 mg/l thiamine, as well as NH₄NO₃, KNO₃, KH₂PO₄, FeSO₄ · 7H₂O, complexed (chelated) EDTA-Na₂, H₃BO₃, CuSO₄ · 5H₂O, CoCl₂ · 6H₂O, nicotinic acid, sucrose, agar, phytohormones, if necessary, modify as follows: 2400 mg/l (30 mM) NH₄NO₃, 1768 mg/l (17,5 mM) KNO₃, 136 mg/l (1 mM) KH₂PO₄, 34,72 mg/l (125 mM) FeSO₄ · 7H₂O, complexed (chelated) EDTA-Na₂, 12,36 mg/l (200 mM) H₃VO₃, complexed (chelated) C₃H₅(OH)₃, 0,05 mg/l (0,2 mM) CuSO₄ · 5H₂O, 0,05 mg/l (0,2 mM) CoCl₂ · 6H₂O, 5 mg/l ascorbic acid, 1 g/l activated carbon, 10–30 g/l glucose, 8 g/l agar.

Keywords: hemp, nutrient medium, macronutrients, trace elements, phytohormones, *in vitro*.

REFERENCES

1. Zhyvylne seredovyshe dlia kultyvuvannya odnodomnykh nenarkotychnykh konopel (*Cannabis sativa* L.) serednorosiiskoho ekoloho-heohrafichnoho typu v umovakh *in vitro* [Nutrient medium for cultivation of monoecious non-narcotic hemp (*Cannabis sativa* L.) of Middle Russian ecological-geographical type *in vitro*]: Pat. 139471 UA. № u 2019 06014; zaiavl. 31.05.2019; opubl. 10.01.2020, Biul. № 1.
2. Zlobin Yu. A. (2004) *Kurs fiziologii i biokhunii roslyn: pidruchnyk* [Course of plant physiology and biochemistry: a textbook]. Sumy. 464 .
3. Mishchenko S. V. (2018) *Induktsiia kalusohenezu v tekhnichnykh (promyslovykh) konopel v umovakh in vitro* [Induction of callusogenesis in technical (industrial) hemp *in vitro*] / Lub'iani ta tekhnichni kultury. Sumy, FOP I.V. Shcherbyna. Vol. 6 (11). 21–28
4. Mishchenko S. V. (2018) *Efektivnist rozmnozhenia Cannabis sativa L. z nasinnia z nyzkoiu skhozhistiu ta zhyttiezdatnistiu v umovakh in vitro* [Propagation efficiency of *Cannabis sativa* L. from seeds with low germination and viability *in vitro*] / Tavriiskyi naukovi visnyk. Volp. 100. T. 2. 3–8.
5. Chaohua C., Gonggu Z., Lining Z. et al. (2016) A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*. Vol. 83. 61–65. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.035
6. Grulichova M., Mendel P., Lalde A. B. et al. (2017) Effect of different phytohormones on growth and development of micropropagated *Cannabis sativa* L. *MendelNet 2017: Proceedings of 24th International PhD Students Conference (November 8 and 9, 2017)*. Brno. 618–623.
7. Lata H., Chandra S., Khan I. et al. (2009) Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. Vol. 45, Iss. 1. 12–19. DOI: 10.1007/s11627-008-9167-5
8. Lata H., Chandra S., Techen N. et al. (2016) *In vitro* mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. Vol. 3, Iss. 1. 18–26. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.12.001
9. Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with

tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15, Iss. 3. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

10. Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Kaczmarek Z. (2005) Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. Vol. 47, Iss. 2. 145–151.

11. Smýkalová I., Vrbová M., Cvečková M. et al. (2019) The effects of novel synthetic cytokinin derivatives and endogenous cytokinins on the *in vitro* growth responses of hemp (*Cannabis sativa* L.) explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 139. 381–394. DOI: 10.1007/s11240-019-01693-58.

12. Thacker X., Thomas K., Fuller M. et al. (2018) Determination of optimal hormone and mineral salts levels in tissue culture media for callus induction and growth of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Agricultural Sciences*. Vol. 09, Iss. 10. 1250–1268. DOI: 10.4236/as.2018.910088

13. Wielgus K., Luwanska A., Lassocinski W. et al. (2008) Estimation of *Cannabis sativa* L. tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration. *Journal of Natural Fibers*. Vol. 5, Iss. 3. 199–207. DOI: 10.1080/15440470801976045

14. Wróbel T., Dreger M., Wielgus K. et al. (2018) The application of plant *in vitro* cultures in cannabinoid production. *Biotechnology Letters*. Vol. 40, Iss. 3. 445–454. DOI: 10.1007/s10529-017-2492-1

15. Zwenger S. R. (2014) *The biotechnology of Cannabis sativa: monograph*. New York. 249.