

## ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНОГО ТА ВУГЛЕВОДНОГО СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ *ORIGANUM VULGARE* L. *IN VITRO*

А.В. Фокіна<sup>1</sup>, Т.М. Сатарова<sup>1,2</sup>, К.В. Деркач<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Український державний хіміко-технологічний університет, Дніпро, Україна

<sup>2</sup>ДУ Інститут зернових культур НААН України, Дніпро, Україна

\*Corresponding author: kvderkach@gmail.com

Received 2 August 2019; Accepted 22 September 2019

**Проблематика.** Материнка звичайна (*Origanum vulgare* L.) – ефіроолійна рослина, біологічно активні речовини якої мають протимікробні, противірусні, протипухлинні, ранозагоювальні властивості. Генетичне різноманіття цієї лікарської рослини потребує детального вивчення чутливості її генотипів у культурі *in vitro* для забезпечення високого рівня ефективності мікроклонального розмноження.

**Мета.** Розробити елементи технології мікроклонального розмноження материнки звичайної через активацію бруньок у культурі *in vitro*, зокрема дослідити вплив мінерально-вітамінного та вуглеводного складу живильного середовища на мультиплікацію пагонів у різних сортозразків та порівняти морфогенетичний потенціал верхівкових і латеральних бруньок у культурі *in vitro*.

**Методика реалізації.** Застосовано метод активації бруньок (метод стерильного живцювання). Використано варіанти живильних середовищ із повним та зменшеним удвічі вмістом макро-, мікросолей і вітамінів середовища MS, а також середовища, які різнилися за вуглеводним складом і містили сахарозу (15 або 30 г/л) чи глюкозу (15 або 30 г/л). Реєстрували й аналізували такі показники, як кількість новоутворених пагонів на живець і коефіцієнт розмноження.

**Результати.** Оптимальним у більшості генотипів для новоутворення пагонів як з верхівкових, так і з латеральних бруньок *in vitro* є середовище MS + 30 г/л глюкози. В середньому по досліді питома кількість пагонів, отриманих із живців із латеральними бруньками, у 1,82 раза перевищувала питому кількість пагонів, отриманих із живців із верхівковими бруньками. Найпродуктивнішим виявився сортозразок Д10, для якого на середовищі MS + 30 г/л глюкози отримано найбільші значення показника кількості новоутворених пагонів (2,9 шт. на живець для верхівкових і 3,7 шт. на живець для латеральних бруньок). Коефіцієнт розмноження для генотипу Д10 на середовищі MS + 30 г/л глюкози становив 14,6 і 19,3 міжвузла на живець відповідно для верхівкових і латеральних бруньок. У середньому по досліді коефіцієнт розмноження живців із латеральними бруньками в 1,47 раза перевищував аналогічний показник для живців із верхівковими бруньками.

**Висновки.** Показано вплив генотипу та складу живильного середовища на ефективність мікроклонального розмноження через активацію верхівкових і латеральних бруньок при стерильному живцюванні материнки звичайної. Серед досліджених варіантів вуглеводного та мінерального складу середовищ найефективнішим був варіант MS + 30 г/л глюкози. Найбільший потенціал до мікроклонального розмноження серед п'яти досліджених сортозразків виявив генотип Д10.

**Ключові слова:** материнка звичайна *Origanum vulgare* L.; мікроклональне розмноження *in vitro*; коефіцієнт розмноження; активація бруньок; живцювання.

### Вступ

З кожним роком зростає кількість досліджень можливостей використання ефіроолійних лікарських культур. Не є винятком і материнка звичайна (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*) – рослина, відома з давніх часів своїми протимікробними та противірусними властивостями. За останні роки не тільки більш детально вивчено саме ці якості материнки, але й стало відомо про інші її численні корисні ознаки. Зок-

рема, перспективним виявилось використання *O. vulgare* як компонентів засобів для шкіри з протизапальною, протипухлинною, ранозагоювальною та відбілювальною дією [1, 2]. Підтверджено противірусну активність материнки відносно респіраторно-синцитіального вірусу та вірусу простого герпесу [3].

Основною діючою речовиною материнки як лікарської рослини є ефірна олія. Складності у вивченні материнки пов'язані з високою варіабельністю вмісту ефірної олії: від 0,96 до

5,10 % у Південній Італії [4], від 0,12 до 1,76 % в Ірані [5]. Вміст окремих хімічних речовин різниться у різних генотипів *O. vulgare*, зокрема вміст карвакролу коливається від 0,3 до 46,8 % [5]. В Україні на сьогодні зареєстровано лише два сорти материнки – Україночка й Оранта [6].

Зазначені факти свідчать про необхідність селекційної роботи щодо виведення нових вітчизняних сортів материнки звичайної. Поширеним підходом до інтенсифікації селекційного процесу в рослин є використання сучасних методів біотехнології. Закріпленню селекційних досягнень, особливо для видів рослин, що розмножуються вегетативно, сприяє метод мікроклонального розмноження в культурі *in vitro*. Дослідження вказують, що клональні форми материнки звичайної, порівняно з вихідними рослинами, можуть містити ефірну олію, більш збагачену цінними речовинами [7].

Для *O. vulgare* дослідження в культурі *in vitro* стосувалися регенерації рослин із калусної тканини кореневих волосків материнки [8], вузлових сегментів донорних рослин [9], впливу регуляторів росту на ризогенез [10]. Вивчено можливості використання симбіозу материнки і бактерій *Pseudomonas* spp. для запобігання вітрифікації материнки [11–13] і характер арбускулярного мікоризного симбіозу материнки з грибом *Glomus viscosum* в умовах *in vitro* [14]. Окремі етапи технології культивування *in vitro* розроблено для іншого виду – *O. acutidens* [15–17]. Разом із тим генетичне різноманіття материнки звичайної *O. vulgare* потребує детального вивчення чутливості в культурі клітин, тканин та органів для розробки біотехнології мікроклонального розмноження генотипів, перспективних у селекційному відношенні.

Мета нашої роботи – розробка елементів технології мікроклонального розмноження материнки звичайної через активацію бруньок у культурі *in vitro*. У роботі були поставлені такі завдання: дослідити вплив мінерального та вуглеводного складу живильного середовища на мультиплікацію пагонів материнки звичайної; вивчити здатність до мультиплікації пагонів у різних сорторізків материнки звичайної та їх реакцію на компоненти живильного середовища; порівняти морфогенетичний потенціал верхівкових і латеральних бруньок у культурі *in vitro*.

## Матеріали і методи

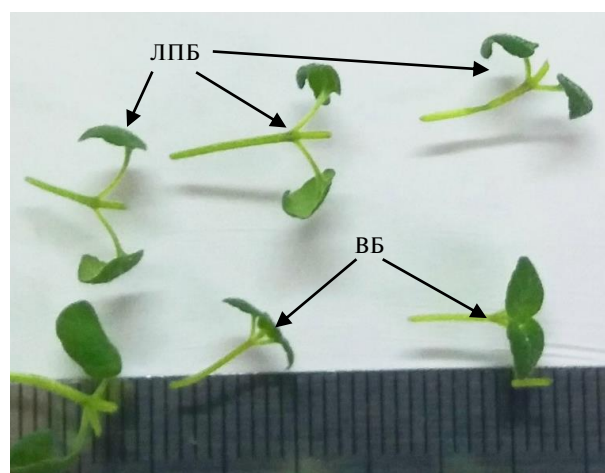
Як матеріал для дослідження використовували п'ять сорторізків материнки звичайної

(*Origanum vulgare* L.): Д1, Д4, Д7, Д9 та Д10, люб'язно надані Дослідною станцією лікарських рослин Інституту агроєкології та природокористування Національної академії аграрних наук (м. Березоточа). Досліджувані зразки відібрані з інтродукованих популяцій різних природних зон України і використовуються як вихідний матеріал для селекції нових сортів материнки. Експериментальна частина роботи в культурі *in vitro* проводилася на базі біотехнологічної лабораторії ТОВ “Комплексний Агросервіс”, м. Запоріжжя.

Донорами експлантів слугували стерильні пагони материнки, отримані на середовищі MS без гормонів [18]. Як експланти використовували два типи живців: живці з єдиною верхівковою брунькою та живці, які містять мутовку з двох листків і, відповідно, в пазухах листків по дві латеральні бруньки на живець (рис. 1).



а



б

**Рисунок 1:** Живцювання стерильного материнського пагона материнки звичайної, отриманого *in vitro*, для наступного циклу культивування на живильному середовищі: (а) донорний пагін; (б) живці, отримані при живцюванні донорного пагона: живці із верхівковою брунькою (ВБ); живці із латеральними пазушними бруньками (ЛПБ)

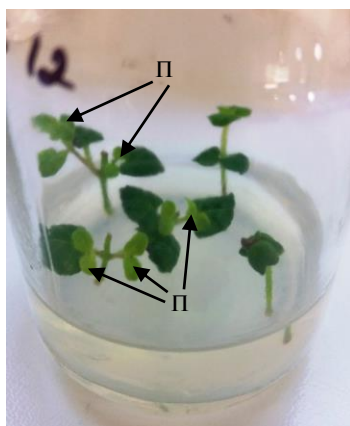
Як основу для мікроклонального розмноження материнки використано метод активації бруньок із подальшим стерильним живцюванням за [19–21]. Для вивчення впливу складу живильного середовища на розвиток бруньок і пагонів *in vitro* та подальший розвиток пагонів розглядали варіанти середовища з повним і зменшеним удвічі вмістом макро-, мікросолей та вітамінів MS за [18]. На фоні макро-, мікросолей і вітамінів MS і  $\frac{1}{2}$ MS використовували середовища, які різнилися за вуглеводним складом і містили сахарозу (15 або 30 г/л) та глюкозу (15 або 30 г/л).

Культивування живців проводили за температури 25 °C в умовах 16-годинного фотоперіоду та інтенсивності освітлення близько 1500 люкс. На варіант досліду експлантували по 20 живців.

Аналіз результатів проводили на 30-ту добу культивування за такими показниками, як кількість новоутворених пагонів на живець (пагонів/живець) та коефіцієнт розмноження. Коефіцієнт розмноження розраховували як кількість міжвузлів на новоутворених пагонах у перерахунку на 1 експлантований живець (міжвузлів/живець). Статистичний аналіз проводили за [22]. Дані в таблицях подано у вигляді  $x \pm m \cdot t_{0,05}$ , де  $x$  – середнє арифметичне значення показника,  $m$  – похибка середнього арифметичного,  $t_{0,05}$  – критерій Ст'юдента за рівня значущості 0,05.

## Результати

Через 3-4 доби після експлантації живців на живильне середовище і культивування в умовах *in vitro* спостерігали ініціацію росту новоутворених пагонів із бруньок (рис. 2).



**Рисунок 2:** Живці материнки звичайної через 10 діб культивування *in vitro*. П – ініціація новоутворених пагонів із латеральних пазушних бруньок

Спостереження за ростом і розвитком живців материнки в культурі *in vitro* показали, що вже до 15-ї доби культивування на пагонах, новоутворених із бруньок живців, закладаються всі бруньки наступного порядку і формуються всі міжвузля, які в подальшому можуть бути використані на наступному етапі мультиплікації для отримання живців-експлантів. Після 15-ї доби попередньо сформовані міжвузля витягуються завдяки інтеркалярному росту пагонів у довжину, але закладання нових бруньок і утворення нових міжвузлів не відбувається.

На середовищах MS + 15 г/л сахарози та MS + 15 г/л глюкози спостерігалася слабка утворення калусу по всій довжині експланта, а розвиток усіх типів бруньок на живцях для всіх сортотразків був заблокований. Якщо брунька і починала рости, новоутворений пагін гинув через кілька діб. На всіх інших досліджених типах середовищ спостерігалася реакція 100 % експлантів у вигляді активації верхівкових або латеральних бруньок із розвитком новоутворених пагонів.

За використання живців з єдиною верхівковою брунькою кількість новоутворених пагонів на живець коливалася від 1 до 2,9 шт. (табл. 1). У сортотразка Д1 утворення пагонів із верхівкових бруньок *in vitro* зростало від 1,1 шт. на середовищі  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л сахарози до 2,3 шт. за зниження вмісту сахарози до 15 г/л на фоні середовища  $\frac{1}{2}$ MS. Для сортотразка Д4 майже на всіх задіяних середовищах з однієї верхівкової бруньки розвивався 1 пагін і лише на  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л глюкози спостерігали достовірне підвищення показника до 1,9 пагона/живець. У сортотразка Д7 найвище значення показника на рівні 1,5 пагона/живець було отримано на середовищах  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л сахарози і  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози. Значення цього показника, отримане на  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л сахарози, достовірно було вищим, ніж на середовищах MS + 30 г/л сахарози і  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л глюкози. Зразок Д9 на всіх досліджених середовищах утворював по 1 пагону на живець. Для зразка Д10 найвищий показник кількості пагонів на живець на рівні 2,9 шт. був досягнутий на середовищі MS + 30 г/л глюкози, що достовірно перевищило результати, отримані на всіх інших варіантах середовищ.

Якщо ж порівняти реакцію різних сортотразків материнки на культивування *in vitro* живців із верхівковою брунькою (див. табл. 1), то на середовищах MS + 30 г/л сахарози і  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози різниця між ними не виявляється. На

середовищі MS + 30 г/л глюкози зразок Д10 демонстрував достовірне перевищення значення показника порівняно з Д4, Д7 і Д9. На середовищі ½MS + 30 г/л сахарози зразок Д7 мав незначну, але достовірну перевагу над Д4 і Д9. На ½MS + 15 г/л сахарози сортозразок Д1 достовірно переважав усі інші зразки, а на ½MS + 30 г/л глюкози Д4 достовірно переважав Д7, Д9 і Д10.

Оскільки материнка має супротивне листкорозташування, кожен живець із мутовкою листків має по дві латеральні бруньки, розміщені у пазухах листків. Однак кількість новоутворених *in vitro* пагонів для живців із латеральними бруньками коливалась у досліджених сортозразків від 2,0 до 3,7 пагона на живець (табл. 2). Для сортозразків Д1, Д4, Д7 та Д9 достовірного впливу складу живильного середовища на досліджуваний показник не виявлено. Проте для сортозразка Д10 на середовищі MS + 30 г/л глюкози порівняно з іншими варіантами досягнуто достовірне збільшення кількості новоутворених пагонів на живець у 1,4–1,6 рази. Порівняння ростової активності латеральних бруньок різних сортозразків на сере-

довищах однакового складу показує, що для MS + 30 г/л сахарози, ½MS + 15 г/л сахарози та ½MS + 15 г/л глюкози різниці між сортозразками недостовірні. На MS + 30 г/л глюкози ростова активність латеральних бруньок у Д10 перевищила як таку у всіх інших сортозразків. Сортозразок Д7 на ½MS + 30 г/л сахарози достовірно перевищував Д4, а на ½MS + 15 г/л глюкози – також і Д4 та Д9.

Отже, активація *in vitro* розвитку пагонів як із верхівкових, так і з латеральних бруньок живців материнки звичайної залежить від генотипу сортозразка та складу живильного середовища культивування. Оптимальним для більшості генотипів при новоутворенні пагонів як з верхівкових, так і з латеральних бруньок *in vitro* серед досліджених є середовище MS + 30 г/л глюкози. В середньому по дослідженні питома кількість пагонів, отриманих із живців із латеральними бруньками, у 1,82 рази перевищує питому кількість пагонів, отриманих із живців із верхівковими бруньками.

Важливим інтегрованим показником мультиплікації рослин при мікроклонуванні є коефіцієнт розмноження, який обчислюється кіль-

**Таблиця 1:** Вплив складу живильного середовища на утворення пагонів із верхівкових бруньок у сортозразків материнки звичайної *in vitro*

Склад живильного середовища		Кількість новоутворених пагонів, пагонів/живець				
		Зразок Д1	Зразок Д4	Зразок Д7	Зразок Д9	Зразок Д10
MS	сахароза 30 г/л	1,3 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,3
	сахароза 15 г/л	0	0	0	0	0
	глюкоза 30 г/л	2,4 ± 1,4	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,	1,0 ± 0,0	2,9 ± 0,9
	глюкоза 15 г/л	0	0	0	0	0
½MS	сахароза 30 г/л	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4
	сахароза 15 г/л	2,3 ± 0,8	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
	глюкоза 30 г/л	1,7 ± 0,7	1,9 ± 0,6	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
	глюкоза 15 г/л	1,4 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,7	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

*Примітка.* Тут і далі: MS – макро-, мікросоли та вітаміни за [18], ½MS – зменшена вдвічі концентрація макро-, мікросолей та вітамінів.

**Таблиця 2:** Вплив складу живильного середовища на утворення пагонів з латеральних бруньок у сортозразків материнки звичайної *in vitro*

Склад живильного середовища		Кількість новоутворених пагонів, пагонів/живець				
		Зразок Д1	Зразок Д4	Зразок Д7	Зразок Д9	Зразок Д10
MS	сахароза 30 г/л	2,3 ± 0,5	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,4
	сахароза 15 г/л	0	0	0	0	0
	глюкоза 30 г/л	2,1 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,7	2,2 ± 0,2	3,7 ± 0,7
	глюкоза 15 г/л	0	0	0	0	0
½MS	сахароза 30 г/л	2,3 ± 0,4	2,0 ± 0,0	3,2 ± 1,0	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,3
	сахароза 15 г/л	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,7	2,0 ± 0,0	2,6 ± 0,5
	глюкоза 30 г/л	2,4 ± 0,5	2,6 ± 0,6	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,5 ± 0,4
	глюкоза 15 г/л	2,3 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,9 ± 0,7	2,0 ± 0,0	2,3 ± 0,4

кістю міжвузлів на новоутворених пагонах у перерахунку на 1 експлантований живець. Оцінка коефіцієнта розмноження для живців материнки звичайної з верхівковими бруньками показала його коливання в діапазоні 4,3–14,6 міжвузла/живець (табл. 3). Для сортозразка Д1 максимальне значення цього показника було досягнуто на середовищі MS + 30 г/л глюкози, яке достовірно перевищує результат на середовищі MS + 30 г/л сахарози, а відносно інших варіантів середовищ демонструє позитивну тенденцію. Для Д4 найбільше значення коефіцієнта розмноження також досягнуто на середовищі MS + 30 г/л глюкози, що достовірно перебільшує результат, отриманий на середовищах  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози та  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л глюкози, а порівняно з рештою середовищ знову ж таки демонструє тенденцію до позитивного впливу на досліджуваний показник. Для Д7 достовірної різниці між коефіцієнтом розмноження на різних середовищах не виявлено, але для варіанта MS + 30 г/л глюкози зберігалася тенденція до інтенсифікації мультиплікації. Для Д9 найкращий коефіцієнт розмноження було отримано на середовищі  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози, із достовірними відмінностями з варіантами  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л сахарози та  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л глю-

кози. Для Д10 найвище значення коефіцієнта розмноження мало місце для MS + 30 г/л глюкози, що достовірно відрізнялось від усіх варіантів середовищ, окрім MS + 30 г/л сахарози. Порівняння реакції різних сортозразків на склад живильного середовища за коефіцієнтом розмноження живців із верхівковими бруньками показує, що ростова активність сортозразка Д10 достовірно перевищувала інші сортозразки на середовищах MS + 30 г/л сахарози та MS + 30 г/л глюкози. Сортозразок Д10 мав тенденцію до перевищення всіх інших сортозразків за коефіцієнтом розмноження на середовищах  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л сахарози,  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л сахарози,  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л глюкози та  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози, а за окремими із перелічених варіантів середовищ навіть мав достовірне перевищення над Д4 і Д9.

Оцінка коефіцієнта розмноження живців із латеральними бруньками (табл. 4) виявила діапазон його коливань у межах 5,6–19,3 міжвузла/живець залежно від сортозразка і варіанта живильного середовища. Для сортозразка Д1 найвищий коефіцієнт розмноження для цього типу експлантів був отриманий на середовищі MS + 30 г/л глюкози; він достовірно відрізнявся від значень показника для варіантів

**Таблиця 3:** Вплив складу живильного середовища на мультиплікацію з верхівкових бруньок у сортозразків материнки звичайної *in vitro*

Склад живильного середовища		Коефіцієнт розмноження, міжвузлів/живець				
		Зразок Д1	Зразок Д4	Зразок Д7	Зразок Д9	Зразок Д10
MS	сахароза 30 г/л	4,8 ± 0,7	6,1 ± 0,5	5,7 ± 0,8	5,1 ± 0,6	12,4 ± 2,7
	сахароза 15 г/л	0	0	0	0	0
	глюкоза 30 г/л	7,2 ± 1,3	6,7 ± 0,4	7,2 ± 1,8	5,7 ± 0,7	14,6 ± 2,2
	глюкоза 15 г/л	0	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ MS	сахароза 30 г/л	6,2 ± 0,9	5,8 ± 0,6	6,6 ± 1,8	5,9 ± 0,4	8,2 ± 1,2
	сахароза 15 г/л	6,8 ± 1,2	5,8 ± 0,8	6,1 ± 1,1	4,9 ± 0,5	7,3 ± 1,1
	глюкоза 30 г/л	5,9 ± 1,2	4,6 ± 0,9	6,1 ± 0,9	4,3 ± 0,4	7,7 ± 0,8
	глюкоза 15 г/л	5,9 ± 1,1	5,7 ± 0,5	6,0 ± 1,2	6,1 ± 0,5	7,8 ± 0,8

**Таблиця 4:** Вплив складу живильного середовища на мультиплікацію з латеральних бруньок у сортозразків материнки звичайної *in vitro*

Склад живильного середовища		Коефіцієнт розмноження, міжвузлів/живець				
		Зразок Д1	Зразок Д4	Зразок Д7	Зразок Д9	Зразок Д10
MS	сахароза 30 г/л	8,0 ± 1,3	10,4 ± 0,5	9,1 ± 1,5	5,6 ± 0,7	16,8 ± 2,4
	сахароза 15 г/л	0	0	0	0	0
	глюкоза 30 г/л	8,8 ± 0,7	10,8 ± 0,9	10,7 ± 3,1	8,0 ± 0,8	19,3 ± 3,0
	глюкоза 15 г/л	0	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ MS	сахароза 30 г/л	8,6 ± 1,3	8,5 ± 0,7	10,7 ± 2,2	7,5 ± 0,8	12,3 ± 1,1
	сахароза 15 г/л	6,1 ± 0,6	8,4 ± 1,6	10,8 ± 1,9	6,6 ± 0,5	13,4 ± 1,7
	глюкоза 30 г/л	6,4 ± 1,5	7,8 ± 0,8	9,3 ± 1,3	6,0 ± 0,6	14,4 ± 2,9
	глюкоза 15 г/л	7,8 ± 1,5	8,8 ± 0,7	11,6 ± 2,4	7,3 ± 0,4	13,3 ± 1,1

$\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л сахарози та  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л глюкози, для решти виявляв позитивну тенденцію до стимуляції пагоно- та брунькоутворення. У Д4 найвищий показник був отриманий також на варіанті MS + 30 г/л глюкози, достовірні відмінності мали місце для варіантів  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л сахарози,  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л глюкози та  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози, для решти відзначено тенденцію до перевищення показника. Для Д7 найвище значення отримано для  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози, але різниця із рештою варіантів середовищ була в межах статистичної похибки. Сортозразок Д9 найвище значення коефіцієнта розмноження також виявив на середовищі MS + 30 г/л глюкози; достовірні різниці встановлено при порівнянні цього варіанта із MS + 30 г/л сахарози,  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л сахарози та  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л глюкози. Сортозразок Д10 найвищий коефіцієнт розмноження мав на середовищі MS + 30 г/л глюкози, що достовірно відрізняло його від варіантів  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л сахарози,  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л сахарози та  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози. При порівнянні сортозразків між собою на всіх досліджених варіантах середовищ найкращі значення коефіцієнта розмноження при використанні живців із латеральними бруньками отримано для сортозразка Д10, причому лише порівняно зі зразком Д7 на варіантах  $\frac{1}{2}$ MS + 30 г/л сахарози,  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л сахарози та  $\frac{1}{2}$ MS + 15 г/л глюкози відзначено позитивну тенденцію, а для решти варіантів – достовірне перевищення показника.

Отже, проведений аналіз варіювання коефіцієнта розмноження для живців із верхівковими бруньками та живців із латеральними бруньками показав суттєвий вплив як генотипу, так і зовнішніх факторів, зокрема складу живильного середовища, на утворення та розвиток пагонів *in vitro*. Для живців обох типів і переважної більшості сортозразків найефективнішим для підвищення коефіцієнта розмноження було середовище MS + 30 г/л глюкози. Найпродуктивнішим сортозразком, особливо за використання живців із латеральними бруньками, виявився сортозразок Д10. У середньому по досліді коефіцієнт розмноження живців із латеральними бруньками в 1,47 раза перевищував аналогічний показник для живців із верхівковими бруньками.

### Обговорення

Вуглеводи у складі живильного середовища виступають як джерело карбону для біосинтезу речовин клітин, а також як джерело енер-

гії, необхідне для росту та розвитку рослини в умовах, коли не відбувається фотосинтез і не утворюється глюкоза із вуглекислого газу і води. Молекули вуглеводів можуть також виступати в ролі активаторів або інгібіторів роботи певних генів, тобто необхідні для регуляції експресії генів. Проте питання про ефективність тих чи інших видів вуглеводів для конкретних видів, сортозразків, генотипів рослин за різних маніпуляцій *in vitro* лишається дослідженим не повністю. В попередніх роботах для мікроклонального розмноження видів *Origanum* використовувався лише варіант із 30 г/л сахарози у середовищі MS [10, 15, 17]. У нашому дослідженні впливу сахарози і глюкози в концентраціях 15 і 30 г/л для 5 різних сортозразків *O. vulgare*, інтродукованих з українських земель і, отже, добре пристосованих до особливостей місцевого клімату, засвідчено суттєвий вплив на ефективність мікроклонального розмноження *in vitro* як мінерально-вітамінного і вуглеводного складу компонентів живильного середовища MS, так і генотипу експлантів. Найкращим варіантом для активації як верхівкових, так і латеральних бруньок на живцях материнки звичайної виявився варіант середовища MS + 30 г/л глюкози. Отримані дані свідчать і про суттєвий взаємний вплив генотипу і факторів середовища на ефективність мікроклонального розмноження материнки стерильним живцюванням. Разом із тим на середовищах із низьким вмістом вуглеводів (15 г/л) на фоні високого вмісту макро-, мікросолей та вітамінів MS активація бруньок була відсутня, натомість відбувалася ініціація калусогенезу, причому для всіх досліджених генотипів материнки звичайної. Це може свідчити про специфічність калусогенезу в цієї рослини, оскільки відомо, що у багатьох рослин ініціація калусогенезу відбувається при підвищенні вмісту вуглеводів у середовищі, наприклад до 60 г/л сахарози в кукурудзи [24].

Використання як експлантів живців із латеральними бруньками видається більш ефективним, ніж із верхівковими через наявність одразу двох точок росту і їх більший вихід із донорної рослини. Однак у середньому по досліді коефіцієнт розмноження при використанні живців із латеральними бруньками не у 2, а лише у 1,47 раза перевищував той самий показник для живців із верхівковими бруньками материнки, а за показником кількості новоутворених пагонів на вихідний живець не в 2, а лише у 1,82 раза.

Дослідження впливу складу живильного середовища на мікророзмноження *O. vulgare*, на жаль, нечисленні. Значно більше інформації накопичено стосовно реакції в культурі *in vitro* для *O. acutidens*. Yıldırım [16], коли використовував як експлант для мікророзмноження перший вузол тижневих проростків *O. acutidens*, отримав на середовищі MS + 30 г/л сахарози на фоні 0,2 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) та 1,8 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) найкращі результати із мікропропагування – частоту регенерації експлантів на рівні 100 %, кількість пагонів на експлант – 9,31 шт. і довжину новоутворених пагонів – 2,36 см. Однак судячи з опису процедури культивування, у цього виду материнки відбувається множинна ініціація пагонів із вузла, який фактично стає вузлом кущення, що суттєво відрізняється від морфогенезу *in vitro* *O. vulgare*. Kizil та Khawar [17] для того самого виду *O. acutidens* розробили ефективну технологію масового розмноження через культуру *in vitro* за використання як експлантів стеблових вузлів із 58-добових проростків, отриманих із насіння. В дослідженні цих авторів досягнуто частоту регенерації експлантів на рівні 100 %, кількість пагонів на експлант – 10,28 шт. за максимальної довжини пагонів 3,25 см на середовищі MS (що, як відомо, містить за прописом 30 г/л сахарози), доповненому БАП у діапазоні концентрацій 0,4–2,0 мг/л, із яких концентрація 0,8 мг/л виявилася оптимальною. Pandey *et al.* при мікроклональному розмноженні *O. vulgare* використовували як експланти вузлові сегменти з донорних рослин *in vitro* і отримали найкращі результати на середовищі MS із сахарозою 30 г/л на фоні 4 мкмоль БАП і 0,25 мкмоль НОК при тестуванні в діапазоні концентрацій 1–8 мкмоль БАП і 0,1–0,5 мкмоль НОК [9]. Максимальне значення показників, досягнуте в цій роботі, – регенерація зі 100 % експлантів, кількість пагонів на експлант – 27,5 шт., довжина пагона – 3,47 см. Lattanzio *et al.* [23] використовували культивування пагонів *O. vulgare* за нутрієнтного стресу для дослідження переходу карбону, що надходить до рослини, у склад фенольних сполук та інших вторинних метаболітів. Morone-Fortunato, Avato [14] як експланти для мікроклонування *O. vulgare* ssp. *hirtum* використовували одновузлові живці розміром 5–6 мм, отримані *in vitro* при стимуляції розвитку ізольованих аксілярних бруньок. У вказаній роботі експланти на середовищі MS за вмісту

БАП 0,5 і 1 мг/л забезпечили частоту регенерації на рівні 74–80 %, кількість пагонів на експлант – 3,0–3,2 шт., довжину новоутворених пагонів – 7,5–7,8 см і кількість живців із експланта – 7,0–7,4 шт. Goleniowski *et al.* [15] за використання при мікроклональному розмноженні *O. vulgare* × *applii* як експлантів мікроживців із рослин, отриманих *in vitro* з термінальних апексів донорних польових рослин, на середовищі MS + 30 г/л сахарози констатували найкращий результат на фоні 0,28 мкмоль БАП і 0,53 мкмоль НОК. У цій роботі вивчалася дія на розвиток експлантів поєднання у середовищі MS + 30 г/л сахарози БАП у концентраціях 0,28, 2,58 і 3,86 мкмоль та НОК у концентраціях 0,53, 5,3 і 5,83 мкмоль. Максимальний досягнутий авторами результат у 22,2 вузла (майбутнього живця) на експлант був зафіксований за дії 0,28 мкмоль БАП і 0,53 мкмоль НОК проти 20,1 вузла на експлант у контролі (без регуляторів росту). В роботі Фокіної та ін. [10] для *O. vulgare* на середовищі MS + 30 г/л сахарози, 1 мг/л БАП, 0,05 мг/л кінетину, 0,05 мг/л індолілоцтової кислоти і 0,1 мг/л аденіну отримано залежно від розташування міжвузля на донорному пагоні 0,83–1,10 пагона на бруньку і 1,5–2,67 міжвузля на новоутворений пагін.

Значення показників, досягнутих у нашій роботі, можна порівняти з результатами робіт Фокіної та ін. [10], Morone-Fortunato, Avato [14] і Goleniowski *et al.* [15], оскільки в них використовувалися той самий тип експлантів і метод мікроклонального розмноження – метод активації бруньок. Отримані нами найкращі результати у 2,9 і 3,7 новоутвореного пагона відповідно для експлантів із верхівковими і латеральними бруньками знаходяться на рівні результату, отриманого в роботі Morone-Fortunato, Avato [14], і перевищують такий у роботі Фокіної та ін. [10]. Значення коефіцієнта розмноження, отриманого нами для генотипу Д10 на середовищі MS + 30 г/л глюкози для латеральних бруньок (19,3 міжвузля/живець), лише на 13 % нижче за результат Goleniowski *et al.* [15] і значно перевищує рівень показника, наведений у решті публікацій.

## Висновки

Проведене дослідження засвідчило вплив генотипу та складу живильного середовища на ефективність мікроклонального розмноження *in vitro* через активацію розвитку верхівкових і

латеральних бруньок материнки звичайної. Серед досліджених варіантів живильного середовища за вуглеводним компонентом (сахароза 15 і 30 г/л, глюкоза 15 і 30 г/л) та мінерально-вітамінним компонентами (MS, ½MS) середовище MS + 30 г/л глюкози виявилось найбільш ефективним. Найбільший потенціал до мікроклонального розмноження серед п'яти досліджених сортозразків Д1, Д4, Д7, Д9 і Д10 ви-

явив сортозразок Д10. Для сортозразка Д10 на середовищі MS + 30 г/л глюкози отримано найбільшу кількість новоутворених пагонів: 2,9 на живець для верхівкових і 3,7 на живець для латеральних бруньок. Коефіцієнт розмноження сортозразка Д10 на середовищі MS + 30 г/л глюкози становив 14,6 і 19,3 міжвузла на живець відповідно для верхівкових і латеральних бруньок.

## References

- [1] Ding H, Chou T, Liang C. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*. Food Chem. 2010;123(2):254-62. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.025
- [2] Han X, Parker T. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. Biochimie Open. 2017;4:73-7. DOI: 10.1016/j.biopen.2017.02.005
- [3] Zhang X, Guo Y, Wang C, Li G, Xu J, Chung H, et al. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. Food Chem. 2014;152:300-6. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.153
- [4] Mastro G, Tarraf W, Verdini L, Brunetti G, Ruta C. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. Food Chem. 2017;235:1-6. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.05.019
- [5] Morshedloo M, Salami S, Nazeri V, Maggi F, Craker L. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. Ind Crops Prod. 2018;119:183-90. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2018.03.049
- [6] State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2019 | Ukrainian Institute for Plant Variety Examination [Internet]. Sops.gov.ua. 2019 [cited 25 July 2019]. Available from: <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin>
- [7] Chun S, Vattem D, Lin Y, Shetty K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. Process Biochem. 2005;40(2):809-16. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.02.018
- [8] Habibi P, de Sa M, da Silva A, Makhzoum A, da Luz Costa J, Borghetti I, et al. Efficient genetic transformation and regeneration system from hairy root of *Origanum vulgare*. Physiol Mol Biol Plants. 2016;22(2):271-7. DOI: 10.1007/s12298-016-0354-2
- [9] Pandey A, Belwal T, Tamta S, Bhatt I, Rawal R. Phenolic compounds, antioxidant capacity and antimutagenic activity in different growth stages of *in vitro* raised plants of *Origanum vulgare* L. Mol Biol Rep. 2019;46(2):2231-41. DOI: 10.1007/s11033-019-04678-x
- [10] Fokina A, Satarova T, Smetanin V, Kucenko N. Optimization of microclonal propagation *in vitro* of Oregano (*Origanum vulgare*). Biosyst Divers. 2018;26(2):98-102. DOI: 10.15421/011815
- [11] Shetty K, Curtis O, Levin R, Witkowsky R, Ang W. Prevention of vitrification associated with *in vitro* shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. J Plant Physiol. 1995;147(3-4):447-51. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)82181-4
- [12] Shetty K, Curtis O, Levin R. Specific interaction of mucoid strains of *Pseudomonas* spp. with Oregano (*Origanum vulgare*) clones and the relationship to prevention of hyperhydricity in tissue culture. J Plant Physiol. 1996;149(5):605-11. DOI: 10.1016/S0176-1617(96)80341-5
- [13] Strycharz S, Shetty K. Response of Oregano (*Origanum vulgare* L.) clonal lines to *Pseudomonas* sp. Z strain and polydye R-478 and implications for hyperhydricity prevention in tissue culture process. Biochemistry. 2002;38(3):343-50. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00073-0
- [14] Morone-Fortunato I, Avato P. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008;93(2):139-49. DOI: 10.1007/s11240-008-9353-5
- [15] Goleniowski M, Flamarique C, Bima P. Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare* Chaplii) from meristem tips. In Vitro Cell Develop Biol Plant. 2003;39(2):125-8. DOI: 10.1079/IVP2002361
- [16] Yildirim M. Micropropagation of *Origanum acutidens* (HAND.-MAZZ.) IETSWAART using stem node explants. ScientificWorldJournal. 2013;2013:1-3. DOI: 10.1155/2013/276464
- [17] Kizil S, Khawar K. Efficient mass propagation of *Origanum acutidens* (HAND.-MAZZ.) IETSWAART under *in vitro* conditions. Bangladesh J Bot. 2017;46(2):667-73.
- [18] Murashige T, Skoog F. A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962;15(3):473-97. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- [19] Kunakh V. Biotechnology of medicinal plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kyiv: Logos; 2005. 730 p.
- [20] Kushnir G, Sarnacka V. Microclonal propagation of the plants. Kyiv: Naukova Dumka; 2005. 271 p.
- [21] Cherevchenko O, Lavrentyeva A, Ivannikov R. Biotechnology of tropical and subtropical plants *in vitro*. Kyiv: Naukova Dumka; 2008.



- [22] Weaver K, Morales V, Dunn S, Godde K, Weaver P. An introduction to statistical analysis in research: with application in the biological and life sciences. Wiley; 2017. 594 p. DOI: 10.1002/9781119454205
- [23] Lattanzio V, Cardinali A, Ruta C, Fortunato I, Lattanzio V, Linsalata V, et al. Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. *Environ Exp Bot.* 2009;65(1):54-62. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2008.09.002
- [24] Derkach K, Abraimova O, Chernousova N, Smetanin V, Satarova T. Optimization of regeneration potential of maize Lancaster germplasm inbreds. *Achiev Probl Genet Breed Biotechnol.* 2012;4:465-70.

А.В. Фокина, Т.Н. Сатарова, Е.В. Деркач

#### ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО И УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ *ORIGANUM VULGARE* L. *IN VITRO*

**Проблематика.** Душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.) – эфиромасличное растение, биологически активные вещества которого обладают противомикробными, противовирусными, противоопухолевыми, ранозаживляющими свойствами. Генетическое разнообразие этого лекарственного растения требует детального изучения чувствительности его генотипов в культуре *in vitro* для обеспечения высокого уровня эффективности микроклонального размножения.

**Цель.** Разработать элементы технологии микроклонального размножения душицы обыкновенной путем активации почек в культуре *in vitro*, в частности исследовать влияние минерального, витаминного и углеводного состава питательной среды на мультипликацию побегов у различных сортообразцов и сравнить морфогенетический потенциал верхушечных и латеральных почек в культуре *in vitro*.

**Методика реализации.** Применен метод активации почек (метод стерильного черенкования). Использованы варианты питательных сред с полным и уменьшенным вдвое содержанием макро-, микросолей и витаминов среды MS, а также среды, которые различались по углеводному составу и содержали сахарозу (15 или 30 г/л) или глюкозу (15 или 30 г/л). Регистрировали и анализировали такие показатели, как количество новообразованных побегов на черенок и коэффициент размножения.

**Результаты.** Оптимальной для большинства генотипов для новообразования побегов как из верхушечных, так и из латеральных почек *in vitro* является среда MS + 30 г/л глюкозы. В среднем по опыту удельное количество побегов, полученных из черенков с латеральными почками, в 1,82 раза превышало удельное количество побегов, полученных из черенков с верхушечными почками. Самым продуктивным оказался сортообразец Д10, для которого на среде MS + 30 г/л глюкозы получены наибольшие значения показателя количества новообразованных побегов (2,9 шт. на черенок для верхушечных и 3,7 шт. на черенок для латеральных почек). Коэффициент размножения для генотипа Д10 на среде MS + 30 г/л глюкозы составил 14,6 и 19,3 междоузлия на черенок соответственно для верхушечных и латеральных почек. В среднем по опыту коэффициент размножения черенков с латеральными почками в 1,47 раза превышал аналогичный показатель для черенков с верхушечными почками.

**Выводы.** Показано влияние генотипа и состава питательной среды на эффективность микроклонального размножения путем активации верхушечных и латеральных почек при стерильном черенковании душицы обыкновенной. Среди исследованных вариантов углеводного и минерального состава сред самым эффективным был вариант MS + 30 г/л глюкозы. Наибольший потенциал к микроклональному размножению среди пяти исследованных сортообразцов проявил генотип Д10.

**Ключевые слова:** душица обыкновенная *Origanum vulgare* L.; микроклональное размножение *in vitro*; коэффициент размножения; активация почек; черенкование.

А.В. Фокина, Т.М. Сатарова, К.В. Деркач

#### THE EFFECT OF THE MINERAL AND CARBOHYDRATE COMPOSITION OF THE NUTRIENT MEDIUM ON THE EFFICIENCY OF MICROCLONAL PROPAGATION OF *ORIGANUM VULGARE* L. *IN VITRO*

**Background.** Oregano (*Origanum vulgare* L.) is an essential oil plant whose biologically active substances possess antimicrobial, antiviral, antitumor, wound healing properties. The genetic diversity of this medicinal plant requires a detailed study of the sensitivity of its genotypes *in vitro* culture to ensure a high level of microclonal propagation efficiency.

**Objective.** The aim of the paper is to develop elements of the technology of microclonal propagation of oregano by activating buds growing *in vitro*, in particular, to study the effect of the mineral, vitamin, and carbohydrate composition of the nutrient medium on shoots multiplication in different cultivars and to compare the morphogenetic potential of the apical and lateral buds in an *in vitro* culture.

**Methods.** The method of activation of the buds growing (method of sterile cutting) is applied. The variants of nutrient medium with full and halved content of macro-, microsalts, and vitamins of MS medium, as well as medium that differed in carbohydrate composition and contained sucrose (15 or 30 g/l) or glucose (15 or 30 g/l) were used. Such indicators as the number of newly formed shoots per one cutting and the reproduction rate were recorded and analyzed.

**Results.** The optimal medium for most genotypes for new shoots from both apical and lateral buds *in vitro* is MS+30 g/l glucose. On average, the specific number of shoots obtained from cuttings of lateral buds was 1.82 times higher than the specific number of shoots obtained from cuttings of apical buds. The sample Д10 was found to be the most productive, for which on MS + 30 g/l glucose medium the highest number of newly formed shoots was obtained (2.9 pieces per a cutting for apical buds and 3.7 pieces per a cutting for lateral ones). The coefficient of multiplication for genotype Д10 on MS + 30 g/l glucose was 14.6 and 19.3 internodes per a cutting, respectively, for apical and lateral buds. On average, the coefficient of multiplication for cuttings of lateral buds was 1.47 times higher than that one for cuttings of apical buds.

**Conclusions.** The effect of the genotype and composition of the nutrient medium on the efficiency of microclonal propagation by activating apical and lateral buds in the sterile cutting of oregano was shown. Among the studied variants of the carbohydrate and mineral compositions of the medium, the most effective was MS+30 g/l glucose. Genotype Д10 revealed the greatest potential for microclonal reproduction among the five samples.

**Keywords:** Oregano *Origanum vulgare* L.; microclonal propagation *in vitro*; reproduction rate; buds activation; cuttings.