

DOI 10.5281/zenodo.10281197

EDN FILGZQ

УДК 633.81:57.085.2

Якимова О. В., Егорова Н. А.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ, ГЕНОТИПА И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СОХРАНЕНИЕ *IN VITRO* СОРТОВ И ОБРАЗЦОВ ДУШИЦЫ

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Реферат. В связи с развитием эфиромасличной отрасли значительное внимание уделяется пополнению и изучению коллекции генофонда эфиромасличных и лекарственных культур, в том числе рода *Origanum L.* Для поддержания коллекций ценных генотипов на современном уровне эффективно использовать биотехнологии сохранения *in vitro*. Цель исследования – изучение влияния состава питательной среды, генотипа и длительности депонирования на развитие эксплантов сортов и образцов душицы при низких положительных температурах *in vitro*. Исследования проводили в 2021–2022 гг. в лаборатории биотехнологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма». Материалом для исследования служили сегменты стебля с одним узлом шести генотипов *Origanum vulgare L.* (образцы г31, г163 и сорта Славница, Квазар, Ак-Кая, Урусвати), полученные при клональном микроразмножении. Экспланты культивировали на пяти модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) при температуре 4–6 °С и освещенности 500–600 лк. Анализ морфометрических параметров проводили после шести и 12 месяцев хранения. Показано, что после года депонирования на средах с 0,5 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,4 %-ми сорбита, или 0,4 г/л хлорхолинхлорида с 2 % сахарозы количество жизнеспособных эксплантов варьировало в пределах 25,0–84,6 %, при этом у большинства генотипов отмечали некроз верхушек побегов. Наибольшее количество сохранённых эксплантов получили при культивировании в банках или пробирках на среде МС с 0,5 мг/л БАП и 6 % сахарозой. На этой среде отмечали 61,3–91,6 % жизнеспособных эксплантов и формирование 1,6–6,7 побегов 37,0–64,5 мм длиной (в зависимости от генотипа). Установлено, что для успешного возобновления роста эксплантов после депонирования изученных образцов и сортов душицы в условиях культуральной комнаты при 26 °С достаточно одного субкультивирования. Более интенсивное развитие микропобегов при отрастании отмечено у сортов Квазар и Ак-Кая. Проведенные исследования могут служить основой для дальнейшей разработки методики депонирования *O. vulgare in vitro*.

Ключевые слова: душица обыкновенная (*Origanum vulgare L.*), депонирование *in vitro*, эксплант, состав питательной среды, генотип, культуральный сосуд.

Для цитирования: Якимова О. В., Егорова Н. А. Анализ влияния питательной среды, генотипа и условий культивирования на сохранение *in vitro* сортов и образцов душицы // Таврический вестник аграрной науки. 2023. № 4(36). С. 174–189. EDN: FILGZQ. DOI: 10.5281/zenodo.10281197.

For citation: Yakimova O. V., Yegorova N. A. *In vitro* preservation of oregano cultivars and samples: analysis of the influence of culture medium, genotype and cultivation conditions // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2023. No. 4(36). P. 174–189. EDN: FILGZQ. DOI: 10.5281/zenodo.10281197.

Введение

В последние годы в связи с развитием эфиромасличной отрасли особое внимание уделяют пополнению, изучению и поддержанию коллекции генофонда эфиромасличных и лекарственных культур при сохранении генетической стабильности и

жизнеспособности образцов [1–3]. В настоящее время ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма является основным держателем коллекции эфиромасличных, пряноароматических и лекарственных растений (зарегистрирована как уникальная научная установка № 507515 (<http://www.ckr-rf.ru>)). В нее входят специализированные коллекции основных и перспективных эфиромасличных культур, в том числе душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) [4, 5]. Душица – перспективное эфиромасличное и пряноароматическое растение, которое широко применяют как пряность в кулинарии, в фармацевтической, парфюмерно-косметической, лакокрасочной промышленности, а также в традиционной и народной медицине [6–8]. Особую ценность имеет эфирное масло душицы – источник фенолов тимола и карвакрола, превосходящих по своим свойствам многие иммуномодуляторы, антибиотики и антигистаминные препараты [9, 10]. Коллекция душицы насчитывает 48 образцов, включая три новых сорта селекции ФГБУН «НИИСХ Крыма» [1, 11]. Душица – вегетативно размножаемая культура, поэтому основным методом сохранения ценных для селекции образцов и сортов является поддержание растений в полевых коллекциях. Однако данный прием считают достаточно трудозатратным, коллекционные питомники занимают обширные площади, также высока вероятность поражения образцов болезнями и вредителями.

Для проведения селекции и поддержания коллекций сортов и ценных образцов на современном уровне эффективно использование биотехнологических методов. В частности, создание медленно растущих коллекций *in vitro* путем снижения температуры культивирования, а также добавления в состав питательной среды осмотиков или ингибиторов роста. Использование данной технологии имеет ряд преимуществ: значительное снижение площади для культивирования растений, увеличение интервала между субкультивированиями, снижение затрат [12–14]. Правильный подбор типа экспланта, состава питательной среды и условий депонирования *in vitro* позволяет минимизировать возможность появления соматоклональных вариантов и эффективно сохранить ценные образцы и сорта [14–16].

В литературе представлен обширный материал, касающийся сохранения редких и исчезающих видов растений [17–19], так как на сегодняшний день в Красной книге Международного союза охраны природы насчитывается более 8000 видов растений [20]. Есть данные о создании медленно растущих коллекций тропических, плодово-ягодных, декоративных и основных сельскохозяйственных культур [21–25]. Показана возможность сохранения микрорастений киви, фейхоа, абрикоса, сливы, клематиса, юкки при низких положительных температурах в течение 6–24 месяцев в зависимости от вида растения [12]. Разработан протокол депонирования виноградной лозы на протяжении шести и 12 месяцев с последующим анализом генетической стабильности методом RAPD- и ISSR-ПЦР [26]. Оптимизированы условия холодого хранения трех сортов канны садовой с использованием в составе питательной среды МС 0,15–0,25 г/л ССС [27]. Однако литературные сведения, касающиеся сохранения *in vitro* эфиромасличных и лекарственных культур, достаточно ограничены и представлены лишь для некоторых видов растений [12, 28]. Так, E. R. J. Keller с коллегами разработали протокол сохранения нескольких генотипов мяты (*Mentha villosa* Huds., *Mentha piperita* L.) при 2 и 10 °С на безгормональной питательной среде МС на протяжении шести месяцев [29]. На примере нескольких сортов мяты и лаванды изучено влияние разных типов эксплантов (меристемы, микрочеренки), длительности холодого хранения и концентраций сахарозы в питательной среде на развитие микрорастений при депонировании [30]. Показана возможность успешного депонирования сортов мяты Ажурная и Бергамотная при температуре 4–6 °С без освещения в течение 12 месяцев. При этом микропобеги изучаемых сортов сохраняли генетическую стабильность [31].

Большинство исследований по культуре ткани *in vitro* душицы посвящены оптимизации протоколов микроразмножения этого ценного растения [32–34]. Встречаются работы, в которых сохранение микрорастений душицы осуществляли с использованием методов клонального микроразмножения *in vitro* и дальнейшим культивированием микропобегов на свету при 22–26 °С [35–38]. Так, показано влияние происхождения донорного растения [37], типа экспланта и его расположения на побеге [36], состава питательной среды [37, 39] и количества субкультивирований [32] на развитие микропобегов некоторых видов душицы на разных этапах размножения *in vitro*. Sargoroulou V. с соавторами выявили возможность сохранения редких эндемичных видов душицы путем микрочеренкования проростков из семян и дальнейшего их культивирования на питательной среде МС с добавлением 2,2 мкМ БАП и 0,25 мкМ ИМК в условиях культуральной комнаты с переносом на свежие питательные среды каждые 30 суток [40]. Однако исследований, посвященных вопросам создания медленно растущих коллекций *O. vulgare in vitro* при низких температурах, в доступной литературе мы не встречали.

Цель исследований – изучение влияния состава питательной среды, генотипа и длительности депонирования на развитие эксплантов сортов и образцов душицы при низких положительных температурах *in vitro*.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в 2021–2022 гг. в лаборатории биотехнологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма». Для проведения исследований использовали растения шести сортов и селекционных образцов душицы (сорта Славница, Квазар, Ак-Кая, Урусвати и образцы г31, г163), которые выращивали в условиях закрытого грунта. Все работы по введению в культуру *in vitro* и микрочеренкованию побегов проводили в условиях операционной комнаты в ламинар-боксе БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Для работы в асептических условиях подготовку материалов, оборудования, питательных сред, а также анализ ростовых процессов в ходе эксперимента осуществляли согласно общепринятым методам в культуре клеток, тканей и органов растений *in vitro* [41, 42], а также разработанным нами для душицы [41].

В качестве эксплантов для депонирования использовали сегменты стебля с одним узлом, полученные путем микрочеренкования побегов со второго этапа микроразмножения *in vitro*, культивируемых на оптимизированной для сортов и образцов душицы питательной среде МС с 0,5 мг/л бензиламинопурина (БАП) [34]. Экспланты помещали на поверхность агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [43] с 0,5 мг/л БАП, сорбита, хлорхолинхлорида (ССС) и 2–6 %-ми сахарозы. Экспланты выращивали в пробирках с ватно-марлевыми пробками (пробирки) и стеклянных банках, закрытых фольгой (банки). Количество эксплантов в культуральном сосуде рассчитывали исходя из соотношения 10 мл питательной среды на один эксплант. Микрочеренки культивировали в холодильной камере при температуре 4–6 °С и освещенности 500–600 лк в течение одного года без пересадки. Анализ основных морфометрических показателей проводили после шести и 12 месяцев холодого хранения. Полученные микропобеги черенковали в асептических условиях, пересаживали на свежую питательную среду (оптимальную для микроразмножения сортов и образцов душицы) и помещали в условия культуральной комнаты (при 26 °С, влажности 70 % и освещенности 2–3 клк с 16-часовым фотопериодом), где дважды проводили субкультивирование. После каждого субкультивирования анализировали морфометрические показатели. Коэффициент размножения (К.Р.) рассчитывали как произведение количества микропобегов на эксплант и количества узлов на побеге.

В каждом варианте опыта (при депонировании и микроразмножении *in vitro*) использовали 20 эксплантов в двукратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Microsoft Office Excel (2010) и программы Statistica 10.0. Результаты представлены в таблицах в виде средней арифметической величины со стандартной ошибкой. Для анализа достоверности различий применяли многодиапазонный тест Тьюки при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что на средах с 0,5 мг/л БАП, сорбита или ССС с 2 %-ми сахарозы, после шести месяцев культивирования количество жизнеспособных эксплантов (рисунок 1) и частота развивающихся побегов (рисунок 2) у изучаемых генотипов в зависимости от варианта опыта варьировали в пределах 25,0–84,6 % и 20,0–90,9 % соответственно.

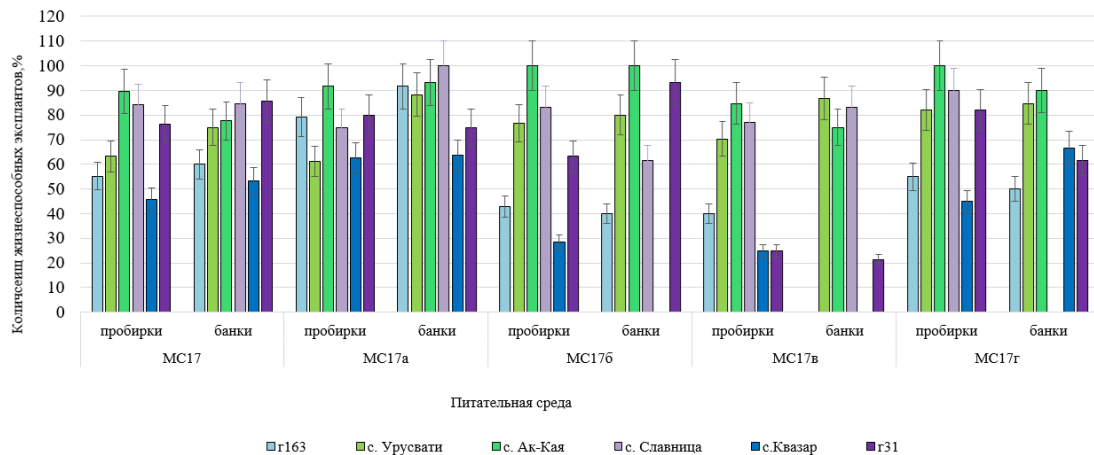


Рисунок 1 – Влияние состава питательной среды, генотипа и типа культурального сосуда на количество жизнеспособных эксплантов после шести месяцев депонирования

Примечание. Здесь и далее: добавки в среде MC: MC 17 – 0,5 мг/л БАП, 2 % сахарозы; MC 17a – 0,5 мг/л БАП, 6 % сахарозы; MC 17b – 0,5 мг/л БАП, 0,4 % сорбита, 2 % сахарозы; MC 17v – 0,5 мг/л БАП, 0,4 г/л ССС, 2 % сахарозы; MC 17g – 0,5 мг/л БАП, 0,4 % сорбита, 4 % сахарозы.

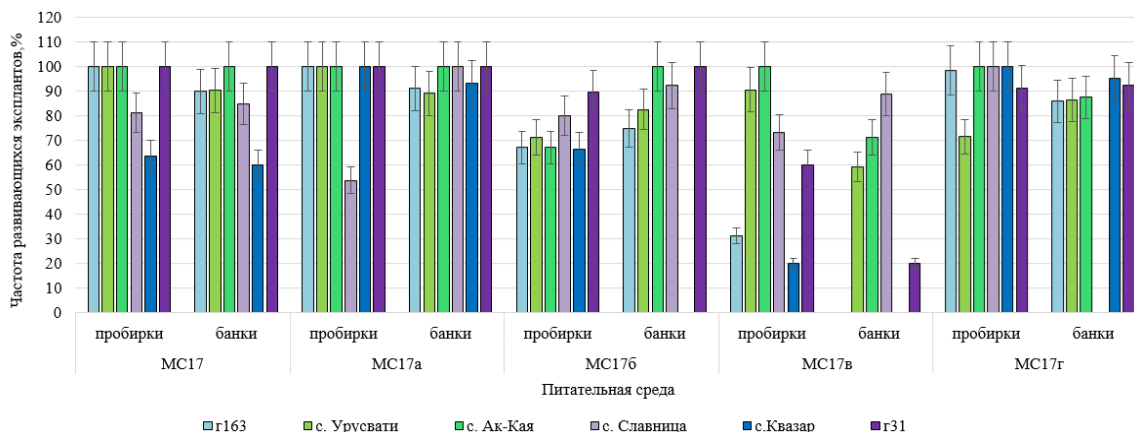


Рисунок 2 – Влияние состава питательной среды, генотипа и типа культурального сосуда на частоту развивающихся эксплантов после шести месяцев депонирования

У сорта Квазар при культивировании в банках на питательных средах МС17б и МС17в наблюдали полную гибель эксплантов. Жизнеспособные экспланты всех изучаемых генотипов медленно развивались, формируя при этом 1,2–6,0 пазушных и адвентивных побегов, длиной 21,6–57,8 мм (таблица 1). У изучаемых образцов и сортов максимальное число жизнеспособных эксплантов (62,5–100 %) и наиболее высокие морфометрические параметры микропобегов отмечали при культивировании на питательных средах с добавлением 0,5 мг/л БАП и 2 или 6 % сахарозы. Минимальные значения параметров развития эксплантов наблюдали у сорта Квазар, при этом из эксплантов развивались слабые истонченные побеги с сильно удлинненными междоузлиями. Так, количество побегов на эксплант у этого сорта было в 2,3–2,8 раза меньше по сравнению с другими изучаемыми образцами и сортами.

В работах многих авторов показано замедление роста и развития растений в условиях *in vitro* под воздействием низких положительных температур [14, 15, 19]. Митрофанова И. В. с соавторами депонировали микропобеги розы эфиромасличной, лавандина и лаванды узколистной при снижении концентрации микросолей в составе питательной среды и добавлении 0,2–0,4 г/л ССС и 6,0 % сахарозы. При этом жизнеспособность эксплантов после шести месяцев депонирования составила 95 % [12].

Таблица 1 – Влияние состава питательной среды, генотипа и типа культурального сосуда на развитие эксплантов душицы после шести месяцев депонирования

Питательная среда, состав, мг/л	Сорт, образец	Тип культурального сосуда	Длина побега, мм	Количество побегов, шт./эксплант	Количество узлов, шт./побег
1	2	3	4	5	6
МС 17 БАП-0,5; 2 % сахарозы	г163	пробирки	29,1 ± 3,8 ^{abcde} ghijklm	1,6 ± 0,2 ^{abcde}	2,9 ± 0,2 ^{bcdefghijlm}
		банки	24,2 ± 2,9 ^{ijklmnopqrs}	2,1 ± 0,3 ^{abcdef}	2,5 ± 0,2 ^{bcdefghi}
	Урусвати	пробирки	24,3 ± 3,1 ^{bcdefghijkl}	1,4 ± 0,2 ^{abc}	2,8 ± 0,3 ^{efghijklm}
		банки	29,3 ± 2,3 ^{cdefghijklmp}	2,5 ± 0,3 ^{bcdef}	2,8 ± 0,2 ^{bcdefg}
	Ак-Кая	пробирки	41,6 ± 3,2 ^{kmnoqr}	1,8 ± 0,2 ^{bcde}	3,1 ± 0,1 ^{cdefghilm}
		банки	40,9 ± 3,4 ^{ijklmnopqrs}	1,9 ± 0,1 ^{bcde}	3,7 ± 0,3 ^{efghijklmn}
	Славница	пробирки	26,0 ± 3,1 ^{bcdefghijklmp}	1,4 ± 0,1 ^{abc}	2,3 ± 0,2 ^{bcdefg}
		банки	27,6 ± 2,7 ^{bcdefghijklmp}	1,9 ± 0,2 ^{abcde}	2,2 ± 0,2 ^{bcdefg}
	Квазар	пробирки	13,4 ± 2,7 ^{abcde} fg	1,5 ± 0,2 ^{abcde}	1,5 ± 0,2 ^{abcd}
		банки	20,8 ± 0,3 ^{abcde} ghijklm	1,8 ± 0,5 ^{abcde}	2,0 ± 0,3 ^{abcde} gh
	г31	пробирки	27,2 ± 2,0 ^{bcdefghijk}	1,8 ± 0,2 ^{abcde}	1,8 ± 0,2 ^{bcdefghi}
		банки	52,9 ± 4,4 ^{oqrs}	2,5 ± 0,3 ^{bcdef}	4,1 ± 0,3 ^{ghijklmn}
МС 17а БАП-0,5; 6 % сахарозы	г163	пробирки	57,8 ± 3,5 ^s	2,3 ± 0,2 ^{bcde}	5,2 ± 0,3 ^{cdefghilm}
		банки	34,8 ± 1,6 ^{diklmnop}	6,0 ± 0,4 ^h	3,1 ± 0,2 ^{bcdefghijlm}
	Урусвати	пробирки	43,4 ± 5,7 ^{klmnopqrs}	1,4 ± 0,1 ^{abc}	3,7 ± 0,4 ^{efghijklmn}
		банки	25,8 ± 1,2 ^{cdefghijklp}	3,2 ± 0,4 ^{cdefg}	2,4 ± 0,1 ^{bcdefg}
	Ак-Кая	пробирки	52,8 ± 4,1 ^{oqrs}	1,6 ± 0,1 ^{bce}	4,6 ± 0,3 ^{ijkn}
		банки	54,6 ± 3,8 ^{qrs}	3,5 ± 0,3 ^{dfg}	4,3 ± 0,3 ^{ijkn}
	Славница	пробирки	51,9 ± 5,2 ^{noqrs}	3,0 ± 0,4 ^{bcdefg}	4,3 ± 0,4 ^{hijklmn}
		банки	40,1 ± 2,3 ^{iklmnopr}	4,3 ± 0,6 ^{efg}	3,2 ± 0,2 ^{cdefghijlm}
	Квазар	пробирки	21,6 ± 2,8 ^{abcde} ghijkl	1,3 ± 0,1 ^{ab}	2,7 ± 0,3 ^{bcdefghijkm}
		банки	36,9 ± 3,8 ^{cdefghijklmnopqrs}	2,1 ± 0,4 ^{abcde}	3,0 ± 0,3 ^{bcdefghijklmn}
	г31	пробирки	39,9 ± 2,6 ^{hijklmnopqrs}	1,5 ± 0,2 ^{abcde}	1,6 ± 0,2 ^{bcdefghijklmn}
		банки	52,7 ± 5,5 ^{noqrs}	1,8 ± 0,2 ^{abcde}	4,8 ± 0,5 ^{ln}
	г163	пробирки	14,0 ± 1,9 ^{abcde} ghij	1,3 ± 0,1 ^{abc}	1,9 ± 0,3 ^{abcde} fg
		банки	24,5 ± 2,5 ^{abcde} ghijklmnopqrst	1,3 ± 0,2 ^{abcde}	2,3 ± 0,3 ^{abcde} ghijklmn
	Урусвати	пробирки	15,2 ± 2,1 ^{abce} g	1,4 ± 0,2 ^{abc}	2,1 ± 0,3 ^{bcde}
		банки	28,9 ± 3,2 ^{bcde} ghijklmp	2,2 ± 0,3 ^{bcde}	2,5 ± 0,2 ^{bcdefg}

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
МС 176	Ак-Кая	пробирки	37,7 ± 2,6 ^{cdefghijklmp}	1,7 ± 0,1 ^{bcde}	2,8 ± 0,2 ^{bcdefghm}
		банки	37,9 ± 4,6 ^{cdefghijklmn}	1,8 ± 0,2 ^{bcde}	3,6 ± 0,4 ^{defghijklmn}
БАП-0,5; 0,4 % сорбита, 2 % сахарозы	Славница	пробирки	32,3 ± 3,1 ^{cdefghijklmp}	2,5 ± 0,3 ^{bcdef}	2,9 ± 0,2 ^{hijklmn}
		банки	39,5 ± 4,3 ^{ghijklmnopqrs}	1,6 ± 0,3 ^{abcde}	2,8 ± 0,3 ^{cdefghijklmn}
	Квазар	пробирки	18,9 ± 1,6	1,3 ± 0,2 ^{abcde}	2,3 ± 0,3 ^{bcdefghijkm}
		банки	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	г31	пробирки	20,6 ± 2,3 ^{abcdifghijkl}	1,6 ± 0,2 ^{abcde}	3,1 ± 0,2 ^{bcdefghijklmn}
		банки	47,3 ± 3,0 ^{mnoqrs}	2,1 ± 0,4 ^{bcde}	3,3 ± 0,2 ^{ln}
МС 17в	г163	пробирки	54,3 ± 4,6 ^{opqrs}	1,2 ± 0,1 ^{ab}	4,9 ± 0,6 ^{ijklmn}
		банки	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Урусовати	пробирки	11,0 ± 1,5 ^{abce}	1,3 ± 0,1 ^{ab}	3,0 ± 0,2 ^{bcdefghijklm}
		банки	18,5 ± 1,6 ^{abcde}	2,0 ± 0,3 ^{bcde}	1,9 ± 0,1 ^{abc}
БАП-0,5; 0,4 г/л ССС, 2 % сахарозы	Ак-Кая	пробирки	8,7 ± 0,9 ^{ab}	1,7 ± 0,2 ^{bcde}	1,4 ± 0,2 ^{ab}
		банки	13,1 ± 1,6 ^{bcdefghij}	1,6 ± 0,2 ^{abcde}	1,9 ± 0,3 ^{abcde}
	Славница	пробирки	14,3 ± 2,1 ^{abce}	1,7 ± 0,2 ^{abcde}	2,0 ± 0,3 ^{bcd}
		банки	31,7 ± 3,7 ^{abcde}	2,0 ± 0,3 ^{abcde}	2,6 ± 0,3 ^{abcde}
	Квазар	пробирки	4,3 ± 0,2 ^{bcdef}	1,3 ± 0,2 ^{abcd}	1,2 ± 0,1 ^{abcde}
		банки	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	г31	пробирки	8,8 ± 0,6 ^{bcdefghijklmnopq}	1,3 ± 0,1 ^{abcde}	1,6 ± 0,2 ^{bcdefghijklmn}
		банки	5,0 ± 0,5 ^{bcdefghijklmn}	1,3 ± 0,3 ^{abcde}	1,2 ± 0,2 ^{bcdefghijklm}
МС 17г	г163	пробирки	84,8 ± 4,6 ^t	2,1 ± 0,2 ^{abcde}	8,5 ± 0,8 ^o
		банки	63,0 ± 5,1 ^{mrs}	2,0 ± 0,2 ^{abc}	6,0 ± 0,5 ^{mn}
	Урусовати	пробирки	42,2 ± 4,1 ^{klmnopqrs}	1,7 ± 0,2 ^{bcde}	3,7 ± 0,3 ^{ghijklm}
		банки	19,6 ± 1,1 ^{abce}	4,8 ± 0,4 ^{fg}	2,3 ± 0,2 ^{bcde}
БАП-0,5; 0,4 % сорбита, 4 % сахарозы	Ак-Кая	пробирки	36,3 ± 2,2 ^{kmnoqr}	1,5 ± 0,1 ^{abc}	3,1 ± 0,2 ^{cdefghijklm}
		банки	57,1 ± 5,7 ^{ijklmnopqrs}	3,9 ± 0,6 ^{efgh}	4,2 ± 0,3 ^{kn}
	Славница	пробирки	37,5 ± 4,3 ^{bcdefghijklmnopqrst}	1,4 ± 0,2 ^{abc}	3,3 ± 0,3 ^{bcdefghijklmn}
		банки	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Квазар	пробирки	27,9 ± 1,6 ^{bcdefghijklmnopq}	1,8 ± 0,2 ^{abcde}	2,9 ± 0,1 ^{bcdefghijklm}
		банки	35,7 ± 3,1 ^{defghijklmnopqrst}	2,6 ± 0,4 ^{bcdef}	2,8 ± 0,2 ^{bcdefghijkm}
	г31	пробирки	38,0 ± 3,5 ^{dfhijklmnopqrst}	1,5 ± 0,1 ^{abce}	3,1 ± 0,2 ^{bcdefghijklm}
		банки	33,8 ± 2,7 ^{bcdefghijklmnopqrst}	1,9 ± 0,1 ^{abcde}	2,8 ± 0,5 ^{bcdefghijklmn}

Примечание. Здесь и далее: в каждом столбце разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения ($p \leq 0,05$).

В то же время, в наших исследованиях добавление в состав питательной среды ССС оказывало негативное влияние на депонирование эксплантов душицы, а в некоторых вариантах опыта приводило к их гибели. Следует отметить, что при культивировании микрорастений в банках, закрытых фольгой, из эксплантов развивалось в 1,4–2,6 раза больше побегов, чем в пробирках, в то время как на длину побега и количество узлов на побеге этот фактор не оказывал достоверно значимого влияния.

После 12 месяцев культивирования на питательных средах с сорбитом или ССС и 2 % сахарозы у исследуемых образцов и сортов наблюдали тенденцию к снижению числа жизнеспособных эксплантов, а также некроз верхушек побегов по сравнению с более кратковременным хранением, что свидетельствует о низкой способности эксплантов переносить холодовой стресс. Наибольшее число жизнеспособных (61,3–91,6 %) (рисунок 3) и развивающихся (66,7–100 %) (рисунок 4) эксплантов при хранении в течение года выявлено при добавлении в состав среды 0,5 мг/л БАП и 6 % сахарозы. Для некоторых видов растений эффективным приемом для поддержания коллекции *in vitro* было повышение концентрации сахарозы в питательной среде [12]. В то же время, при оптимизации условий депонирования нескольких сортов лаванды добавление в состав среды высоких концентраций сахарозы приводило к снижению отдельных

морфометрических показателей развития эксплантов, а при холододовом хранении *in vitro* сортов мяты повышение концентрации сахарозы не влияло на показатели жизнеспособности и развития эксплантов [30]. Бразильскими учеными был разработан эффективный протокол холододового хранения *in vitro* в течение полугодия четырех генотипов мяты на питательной среде без гормонов, содержащей 2 % сахарозы [29]. Также показана возможность успешного депонирования мяты на оптимальной для микроразмножения питательной среде МС с добавлением 2% сахарозы, 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК [31].

С помощью трехфакторного дисперсионного анализа установлено, что на количество жизнеспособных эксплантов душицы после 12 месяцев холододового хранения определяющее влияние оказывали состав питательной среды (26,6 %) и совместное действие питательной среды и генотипа (26,7 %) (рисунок 5).

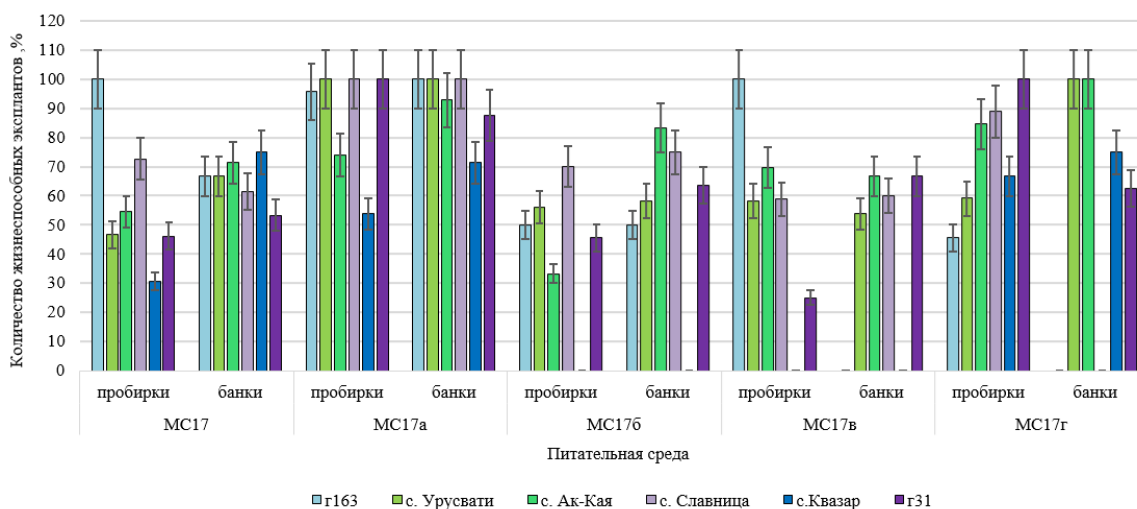


Рисунок 3 – Влияние состава питательной среды, генотипа и типа культурального сосуда на количество жизнеспособных эксплантов после 12 месяцев депонирования

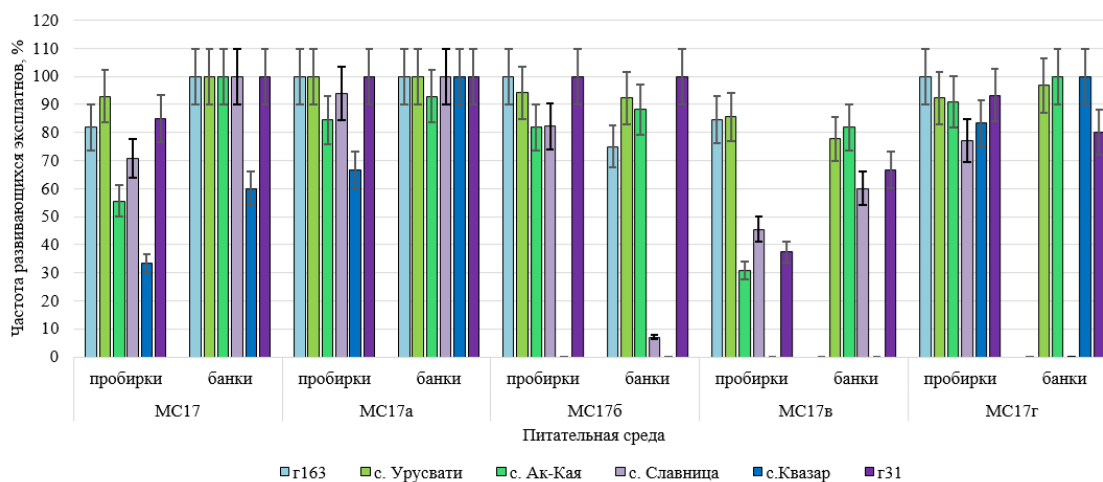


Рисунок 4 – Влияние состава питательной среды, генотипа и типа культурального сосуда на частоту развивающихся эксплантов после 12 месяцев депонирования

Установлено, что тип культурального сосуда не влиял на данный показатель. Вместе с тем анализ морфометрических параметров показал, что при культивировании микрорастений на оптимальной питательной среде в пробирках у некоторых генотипов

длина побегов была в 1,3–1,6 раз выше по сравнению с культивированием в банках (таблица 2).

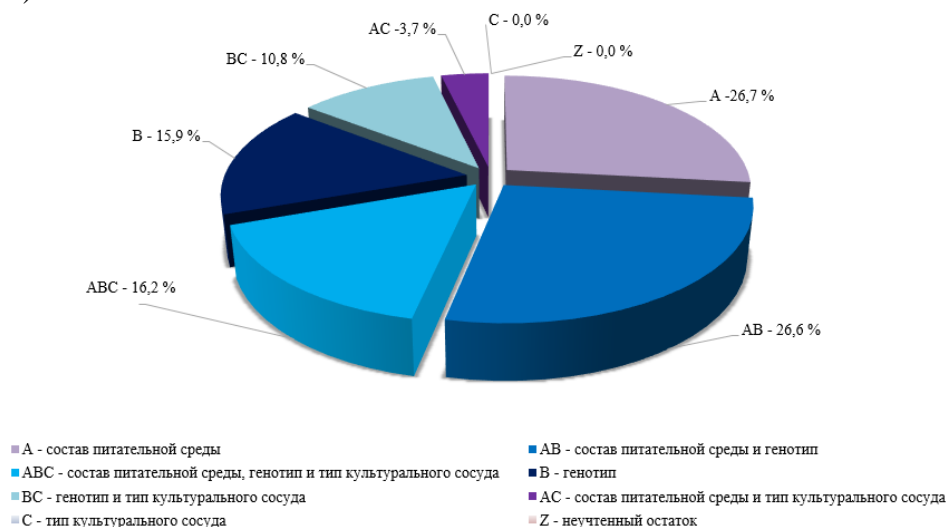


Рисунок 5 – Доля влияния фактора (состав питательной среды, генотип и тип культурального сосуда) на количество жизнеспособных эксплантов после 12 месяцев депонирования

Таблица 2 – Влияние состава питательной среды, генотипа и типа культурального сосуда на развитие эксплантов душицы при депонировании в течение 12 месяцев

Питательная среда, состав, мг/л	Сорт, образец	Тип культурального сосуда	Длина побега, мм	Количество побегов, шт./эксплант	Количество узлов, шт./побег
1	2	3	4	5	6
МС 17 БАП-0,5; 2 % сахарозы	г163	пробирки	28,9 ± 3,0 ^{bcdefghij}	1,6 ± 0,2 ^{abc}	2,5 ± 0,2 ^{bcdefghijkp}
		банки	36,5 ± 4,3 ^{ghijklmnop}	2,1 ± 0,2 ^{abcdefghijk}	3,1 ± 0,2 ^{defghijklmnop}
	Урусвати	пробирки	40,5 ± 3,2 ^{fghijklmnop}	1,9 ± 0,3 ^{abcdefghi}	3,4 ± 0,5 ^{efghijklmnop}
		банки	34,2 ± 3,1 ^{defghijkl}	2,4 ± 0,3 ^{abcdefghi}	3,4 ± 0,2 ^{defghijklp}
	Ак-Кая	пробирки	36,4 ± 3,1 ^{fghijkl}	2,9 ± 0,2 ^{bcdefghijk}	2,6 ± 0,2 ^{cdefghijkmp}
		банки	47,5 ± 4,2 ^{hijklmnop}	1,9 ± 0,2 ^{abcdefghi}	4,2 ± 0,4 ^{ijklmnop}
	Славница	пробирки	24,1 ± 3,1 ^{abcdefgh}	2,5 ± 0,3 ^{abcdefghi}	2,2 ± 0,2 ^{abcdifghi}
		банки	33,7 ± 3,8 ^{defghijklmn}	1,9 ± 0,2 ^{abcdefghi}	2,9 ± 0,2 ^{defghijklmnop}
	Квазар	пробирки	22,2 ± 3,7 ^{abcdefghij}	1,9 ± 0,2 ^{abcdefgh}	1,7 ± 0,2 ^{abcdefghijk}
		банки	22,7 ± 3,4 ^{abcdefghijk}	2,0 ± 0,3 ^{abcdefghi}	2,5 ± 0,2 ^{abcdefghijklmn}
	г31	пробирки	30,5 ± 2,8 ^{cdefghijkl}	3,0 ± 0,4 ^{abcdefghik}	2,6 ± 0,2 ^{bcdefghijkmp}
		банки	20,8 ± 2,5 ^{abcdefghij}	1,8 ± 0,4 ^{abcdefghi}	2,1 ± 0,2 ^{abcdefghijkl}
МС 17а БАП-0,5; 6 % сахарозы	г163	пробирки	60,6 ± 2,9 ^{mnp}	3,4 ± 0,3 ^l	4,7 ± 0,3 ^{klnp}
		банки	37,0 ± 1,9 ^{hijkl}	6,7 ± 0,5 ^{defghijk}	4,0 ± 0,2 ^{gijklmnop}
	Урусвати	пробирки	56,3 ± 3,3 ^{hijklmnop}	1,6 ± 0,2 ^{abcdefghi}	6,3 ± 0,2 ^{mnp}
		банки	42,2 ± 3,6 ^{hijklp}	3,6 ± 0,3 ^{efghijk}	3,4 ± 0,2 ^{fgijkl}
	Ак-Кая	пробирки	50,7 ± 3,9 ^{ijklmnop}	3,1 ± 0,4 ^{cddefghi}	3,8 ± 0,3 ^{gijklmnop}
		банки	51,4 ± 3,3 ^{jmnop}	4,2 ± 0,3 ^{fghijkl}	4,6 ± 0,3 ^{ijklmnop}
	Славница	пробирки	64,5 ± 3,2 ^p	4,7 ± 0,7 ^{hijkl}	6,9 ± 0,9 ^q
		банки	48,6 ± 2,6 ^{ijklmnop}	4,6 ± 0,5 ^{hijkl}	3,4 ± 0,4 ^{fgijklmnop}
	Квазар	пробирки	36,3 ± 3,5 ^{defghijkl}	2,2 ± 0,3 ^{abcdefghi}	2,4 ± 0,3 ^{abcdefghijk}
		банки	49,8 ± 5,6 ^{hijklmnop}	2,8 ± 0,3 ^{abcdefghij}	4,1 ± 0,3 ^{ghijklmnopq}
	г31	пробирки	38,9 ± 3,5 ^{fghijklmnop}	2,3 ± 0,4 ^{abcdefghikl}	3,1 ± 0,4 ^{abcdefghijklmnop}
		банки	56,3 ± 5,1 ^{klmnop}	2,1 ± 0,3 ^{abcdefghi}	5,2 ± 0,5 ^{mnoq}
МС 17б	г163	пробирки	21,0 ± 2,6 ^{abcdefghijklmnop}	2,0 ± 0,2 ^{abcdefghi}	2,2 ± 0,2 ^{abcdefghijklmnopq}
		банки	21,5 ± 3,1 ^{abcdefghijklmnop}	1,3 ± 0,1 ^{abcdefghijk}	2,0 ± 0,2 ^{abcdefghijklmnopq}

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	
БАП-0,5; 0,4 % сорбита, 2 % сахарозы	Урусвати	пробирки	31,8 ± 4,1 ^{cdefghijkl}	1,3 ± 0,1 ^{abcdefghi}	3,2 ± 0,3 ^{efghijklmnp}	
		банки	31,9 ± 2,4 ^{cdefghijklmnop}	1,9 ± 0,2 ^{abcde}	2,8 ± 0,2 ^{abcdefghijklkopq}	
	Ак-Кая	пробирки	34,2 ± 4,0 ^{abcdefghijklmnop}	2,2 ± 0,2 ^{abcdefghijk}	2,9 ± 0,3 ^{abcdefghijklmnop}	
		банки	36,6 ± 3,6 ^{fijklmnop}	1,7 ± 3,4 ^{abcdefgi}	4,2 ± 0,5 ^{gijklmnop}	
	Славница	пробирки	34,3 ± 3,2 ^{ifhijkl}	5,6 ± 0,4 ^{kl}	2,9 ± 0,2 ^{defghijmp}	
		банки	37,2 ± 4,1 ^{fghijklmnop}	1,7 ± 0,3 ^{abcdefghi}	2,5 ± 0,3 ^{abcdefghijklmnop}	
	Квазар	пробирки	-	-	-	
		банки	-	-	-	
	г31	пробирки	31,4 ± 2,6 ^{cdefghijkl}	1,9 ± 0,2 ^{abcdefgi}	2,5 ± 0,2 ^{bcdefghijklp}	
		банки	49,5 ± 3,5 ^{ijklmnop}	2,3 ± 0,5 ^{abcdefghi}	3,2 ± 0,3 ^{defghijklmnop}	
МС 17в БАП-0,5; 0,4 г/л ССС, 2 % сахарозы	г163	пробирки	60,0 ± 7,5 ^{lmnop}	1,3 ± 0,1 ^{abcde}	6,1 ± 0,1 ^{oq}	
		банки	-	-	-	
	Урусвати	пробирки	20,6 ± 0,2 ^{abcdifghijk}	1,3 ± 0,2 ^{abcdefg}	3,5 ± 0,5 ^{abcdefghijklmn}	
		банки	24,2 ± 0,9 ^{abcdifghijklm}	1,3 ± 0,2 ^{abcdefg}	2,1 ± 0,3 ^{abcdefghijklmnop}	
	Ак-Кая	пробирки	11,7 ± 1,1 ^{abcdg}	2,7 ± 0,2 ^{abcdefghik}	1,3 ± 0,3 ^{abcdeh}	
		банки	16,2 ± 1,2 ^{abcdefghi}	1,6 ± 0,3 ^{abcdefghi}	2,2 ± 0,4 ^{abcdefghijklm}	
	Славница	пробирки	15,6 ± 1,4 ^{abcdefg}	2,1 ± 0,3 ^{abcdefgh}	1,8 ± 0,2 ^{abcdefgh}	
		банки	28,6 ± 2,9 ^{abcdefghijklmnop}	1,7 ± 0,3 ^{abcdefghijk}	2,6 ± 0,4 ^{abcdefghijklmnopq}	
	Квазар	пробирки	-	-	-	
		банки	-	-	-	
	г31	пробирки	20,7 ± 1,4 ^{abcdefghijklmnop}	1,3 ± 0,2 ^{abcdefghijk}	1,6 ± 0,4 ^{abcdefghijklmn}	
		банки	5,3 ± 0,3 ^{abcdefghijklm}	1,1 ± 0,1 ^{abcdef}	2,0 ± 0,1 ^{abcdifghijklmnopq}	
	МС 17г БАП-0,5; 0,4 % сорбита, 4 % сахарозы	г163	пробирки	63,7 ± 6,1 ^{op}	1,7 ± 0,2 ^{abcdefgi}	5,2 ± 0,6 ^{noq}
			банки	-	-	-
Урусвати		пробирки	41,4 ± 4,5 ^{hijklmno}	2,1 ± 0,3 ^{abcdefgi}	4,2 ± 0,6 ^{gijklmnop}	
		банки	35,6 ± 3,8 ^{efhikl}	5,4 ± 0,3 ^{jl}	3,9 ± 0,3 ^{gijklmnopq}	
Ак-Кая		пробирки	43,2 ± 2,7 ^{hijklmnop}	1,8 ± 0,2 ^{abcdefgi}	1,8 ± 0,2 ^{gijklmnop}	
		банки	62,7 ± 5,1 ^{np}	4,3 ± 0,5 ^{ghijkl}	5,1 ± 0,3 ^{lno}	
Славница		пробирки	30,9 ± 8,9 ^{cdefghijkl}	2,9 ± 0,3 ^{abcdefghijk}	2,5 ± 0,2 ^{bcdefghijk}	
		банки	-	-	-	
Квазар		пробирки	27,3 ± 1,8 ^{abcdefghijkl}	2,0 ± 0,3 ^{abcdefghi}	2,8 ± 0,3 ^{abcdifghijklmnop}	
		банки	50,0 ± 4,4 ^{ijklmnop}	3,3 ± 0,3 ^{abcdefghijk}	4,3 ± 0,3 ^{gijklmnop}	
г31	пробирки	36,5 ± 3,7 ^{fghijklmnop}	1,9 ± 0,3 ^{abcdefghi}	3,0 ± 0,2 ^{difghijklmnop}		
	банки	36,7 ± 2,6 ^{fghijklmnop}	2,0 ± 0,3 ^{abcdefghij}	3,3 ± 0,3 ^{abcdifghijklmnop}		

В то же время, количество побегов, сформированных в пробирках, было в 1,3–2,3 раза ниже, чем в банках. Тем не менее, основным показателем успешного депонирования растений является количество жизнеспособных эксплантов. В наших экспериментах на лучшей для депонирования питательной среде этот показатель для эксплантов изучаемых образцов и сортов душицы имел одинаково высокие значения при культивировании и в пробирках, и в банках.

Важным этапом при формировании коллекций является проверка жизнеспособности культур при их отрастании в обычных условиях культивирования *in vitro*. На примере нескольких генотипов было изучено влияние холодого хранения на развитие эксплантов (микрочеренков, полученных после микрочеренкования) душицы при их переносе на свежие питательные среды и выращивании в условиях культуральной комнаты при 26 °С и освещенности 2–3 клк с 16-часовым фотопериодом для оценки их способности к восстановлению роста.

Анализ отрастания культур показал, что после 12 месяцев хранения при первом субкультивировании все морфометрические показатели были достаточно высокими. Частота жизнеспособных развивающихся эксплантов варьировала в пределах 60,8–100 %, при этом, в зависимости от генотипа формировалось от 3,1 до 20,3 побегов длиной до 42,4 мм (таблица 3). Следует отметить, что у изученных генотипов (за исключением сорта

Урусвати) в первом пассаже отмечали высокие коэффициенты размножения, которые в зависимости от образца варьировали от 9,4 до 74,6. Во втором субкультивировании в большинстве вариантов опыта наблюдали достоверно значимое снижение основных морфометрических параметров. В частности, коэффициент размножения у большинства изучаемых образцов и сортов при втором субкультивировании уменьшился в 1,3–15,5 раза по сравнению с первым. У сорта Урусвати достоверно значимых различий данного показателя в зависимости от количества субкультивирований не выявлено.

Таблица 3 – Влияние генотипа на развитие эксплантов душицы в условиях культуральной комнаты после 12 месяцев депонирования

Сорт, образец	Количество субкультивирований	Количество жизнеспособных эксплантов, %	Длина побега, мм	Количество побегов, шт./эксплант	Количество узлов, шт./побег	К.Р.
г163	1	100 ^a	26,7 ± 1,1 ^{abcde}	3,1 ± 0,1 ^{ab}	5,6 ± 0,6 ^{abc}	17,4 ± 1,2 ^c
	2	74,3 ± 8,9 ^a	20,3 ± 1,5 ^{abc}	2,7 ± 0,3 ^a	2,0 ± 0,1 ^a	5,4 ± 0,3 ^b
Урусвати	1	77,0 ± 3,1 ^a	22,9 ± 1,6 ^a	3,4 ± 0,3 ^a	2,8 ± 0,2 ^a	9,4 ± 0,9 ^a
	2	100 ^a	33,6 ± 3,1 ^{bcdefg}	2,6 ± 0,3 ^a	3,4 ± 0,3 ^{abc}	9,0 ± 0,8 ^a
Ак-Кая	1	90,2 ± 5,5 ^a	27,8 ± 1,6 ^{abcde}	7,4 ± 0,4 ^{ab}	3,3 ± 0,1 ^{abc}	24,4 ± 2,1 ^e
	2	100 ^a	38,2 ± 2,4 ^{fg}	4,8 ± 0,1 ^a	3,9 ± 0,2 ^{bc}	18,7 ± 1,8 ^c
Славница	1	100 ^a	21,4 ± 0,7 ^a	15,1 ± 0,9 ^{bc}	3,1 ± 0,2 ^{ab}	46,6 ± 3,8 ^f
	2	12,5 ± 1,2 ^b	5,5 ± 0,2 ^{abc}	2,7 ± 0,3 ^{abc}	1,1 ± 0,1 ^{abc}	3,0 ± 0,2 ^b
Квазар	1	100 ^a	42,4 ± 1,2 ^g	20,3 ± 1,6 ^c	3,7 ± 0,1 ^c	74,6 ± 7,1 ^g
	2	80,9 ± 6,6 ^a	24,2 ± 1,4 ^{abd}	3,8 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	9,5 ± 0,8 ^a
г31	1	100 ^a	33,2 ± 1,5 ^{cef}	7,7 ± 0,6 ^{ab}	2,8 ± 0,2 ^a	21,6 ± 1,9 ^d
	2	90,3 ± 6,6 ^a	34,1 ± 2,2 ^{defg}	3,2 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,2 ^{abc}	10,1 ± 0,6 ^a

Следует отметить, что лучшее развитие побегов в условиях культуральной комнаты после 12 месяцев холодного хранения наблюдали у сортов Квазар, Ак-Кая. У них выявлено максимальное число жизнеспособных эксплантов (100,0 %) и высокие К.Р. (до 74,6). У сорта Славница и образцов г163, г31 эти параметры также были высоки, однако формировались нетипичные, тонкие и часто витрифицированные микропобеги с укороченными междоузлиями. Учитывая эффективное отрастание эксплантов у большинства генотипов уже в первом субкультивировании после депонирования и высокие К.Р., можно рекомендовать при поддержании коллекции душицы *in vitro* использовать для возобновления роста только один пассаж и дальше после микрочеренкования снова переводить культуры в холодильную камеру. Для других видов растений иногда требуется более продолжительный период для возобновления роста. Так, у мяты при анализе отрастания эксплантов после холодного хранения, наоборот, было выявлено слабое развитие эксплантов после первого субкультивирования (количество жизнеспособных эксплантов не превышало 45 %), а после второго данный параметр увеличился до 100 % [31].

Выводы

В результате проведенных исследований изучено влияние состава питательной среды, генотипа и типа культурального сосуда на развитие эксплантов шести сортов и образцов душицы обыкновенной при их сохранении *in vitro* в течение 6–12 месяцев в холодильной камере при температуре 4–6 °С и освещенности 500-600 лк.

Показано, что лучшее развитие эксплантов при депонировании в течение 12 месяцев наблюдали на питательной среде МС, дополненной 0,5 мг/л БАП и 6 % сахарозы при культивировании в банках или пробирках. На этой среде в зависимости от генотипа количество жизнеспособных эксплантов варьировало в пределах 61,3–91,6 %. На данный показатель достоверно значимое влияние оказывал состав питательной среды (26,6 %) и

совместное действие состава питательной среды и генотипа (26,7 %). При этом из эксплантов развивалось 1,6–6,7 побегов длиной 37,0–64,5 мм.

Установлено, что при последующем отрастании для успешного возобновления роста эксплантов изученных образцов и сортов душицы в условиях культуральной комнаты достаточно одного субкультивирования. При этом количество жизнеспособных эксплантов достигало 80,9–100 %, а коэффициент размножения – до 9,4–74,6 (в зависимости от генотипа). Лучшее развитие микропобегов при отрастании наблюдали у сортов Квазар и Ак-Кая. Проведенные исследования являются основой для разработки методики депонирования сортов и образцов *O. vulgare in vitro*.

Литература

1. Мягких Е. Ф., Каширина Н. А. Прикладное значение фундаментальных исследований в сфере эфиромасличных и лекарственных растений // Материалы международной научно-практической конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки». Симферополь: Ариал, 2023. С. 50–51. DOI: 10.5281/zenodo.8354252.
2. Паштецкий В. С., Невкрытая Н. В., Мишнев А. В., Назаренко Л. Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра: монография. Симферополь: Ариал, 2018. 320 с.
3. Myagkikh E., Babanina S., Mishnev A., Radchenko L., Pashtetskiy V., Nevkrytaya N., Loretts O. Ecological adaptability of some cultivars and breeding samples of *Origanum vulgare* L. // Agronomy. 2022. Vol. 12. No. 1. Art. No.16. DOI: 10.3390/agronomy12010016.
4. Myagkikh E. F., Babanina S. S., Pashtetsky V. S., Karpukhin M. Yu. Morphological variability of phenotypic traits in of Oregano samples // Agronomy Research. 2020. Vol. 18. No. 4. P. 2489–2500. DOI: 10.15159/AR.20.217.
5. Alekseeva M., Zagorcheva T., Rusanova M., Rusanov K., Atanassov I. Genetic and flower volatile diversity in natural populations of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietsw. in Bulgaria: toward the development of a core collection // Frontiers in Plant Science. 2021. Vol. 12. DOI: 10.3389/fpls.2021.679063.
6. Chishti Sh., Kaloo Z. A., Sultan Ph. Medicinal importance of genus *Origanum*: a review // Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2013. Vol. 5 (10). P. 170–177. DOI: 10.5897/JPP2013.0285.
7. Idir F., Van Ginneken S., Coppola G. A., Grenier D., Steenackers H. P., Bendali F. *Origanum vulgare* ethanolic extracts as a promising source of compounds with antimicrobial, anti-biofilm, and anti-virulence activity against dental plaque bacteria // Frontiers in Microbiology. 2022. Vol. 13. Art. No. 999839. DOI: 10.3389/fmicb.2022.999839.
8. Veenstra J. P., Johnson J. J. Oregano (*Origanium vulgare*) extract for food preservation and improving gastrointestinal health // International Journal of Nutrition. 2019. Vol. 3(4). P. 43–52. DOI: 10.14302/issn.2379-7835.ijn-19-2703.
9. Mashhadi F., Ghorbani N. M., Yaraee R. Immunomodulatory effects of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. ethanolic extracts *in vitro* // Immunoregulation. 2021. Vol. 4(1). P. 21–32. DOI: 10.32598/Immunoregulation.4.1.1.
10. Alekseeva M., Zagorcheva T., Atanassov I., Rusanov K. *Origanum vulgare* L. – a review on genetic diversity, cultivation, biological activities and perspectives for molecular breeding // Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2020. Vol. 26. No. 6. P. 1183–1197.
11. Мягких Е. Ф., Марченко М. П., Новиков И. А. Сравнительный анализ гибридов *Origanum vulgare* L. по комплексу признаков // Таврический вестник аграрной науки. 2018. № 2 (14). С. 89–95.
12. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: коллективная монография // Под ред. Митрофановой И. В. Симферополь: Ариал, 2018. 260 с. DOI: 10.32514/978-5-907118-87-4.
13. Дунаева С. Е., Гавриленко Т. А. Коллекции плодовых и ягодных культур *in vitro* (стратегии создания и хранение) // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 161. С. 10–19.
14. Chauhan R., Singh V., Quraishi A. *In vitro* conservation through slow-growth storage // In book: Synthetic Seeds. Springer Nature (Switzerland), 2019. P. 397–416. DOI: 10.1007/978-3-030-24631-0_19.
15. Молканова О. И., Коновалова Л. Н., Стахеева Т. С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень государственного Никитского ботанического сада. 2016. № 120. С. 17–23.
16. Спиридович Е. В., Фоменко Т. И., Власова А. Б., Козлова О. Н., Вайновская И. Ф., Юхимук А. Н. Кузьменкова С.М., Носиловский О.А., Решетников В.Н. Асептическая коллекция и банк ДНК

Центрального ботанического сада НАН Беларуси как эффективные инструменты сохранения редких растений // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2017. № 3. С. 117–128.

17. Крицкая Т. А., Кашин А. С. Особенности длительного депонирования культуры *in vitro* некоторых редких и исчезающих видов растений Саратовской области // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16. С. 74–80. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-1-74-80.

18. Мурасева Д. С., Звягина Н. С., Новикова Т. И., Дорогина О. В. Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21(5). С. 554–560. DOI: 10.18699/VJ17.272.

19. Носов А. М., Юрин В. М., Спиридович Е. В., Высоцкая О. Н., Решетников В. Н. Биотехнологические коллекции растений и криобанки – важная часть Национального банка-депозитария живых систем // Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси. М.: Медисонт, 2017. С. 284–290.

20. Chauhan R. S. Biotechnological approaches for conservation of rare, endangered and threatened plants // International Journal of Scientific and Research Publications. 2016. Vol. 6. P. 10–14.

21. Cha-um S., Kirdmanee C. Minimal growth *in vitro* culture for preservation of plant species // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. 2007. Vol. 1 (1). P. 13–25.

22. Концевая И. И. Эффект абсцизовой кислоты при депонировании карельской березы в культуре *in vitro* // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4. № 7. С. 11–16. DOI: 10.5281/zenodo.1312145.

23. Дорошенко Н. П. К вопросу создания коллекции генофонда винограда *in vitro* // Русский виноград. 2017. Т. 5. С. 68–86.

24. Кушнаренко С. В., Ромаданова Н. В., Аралбаева М. М., Матакова Г. Н., Бекебаева М. О., Бабисекова Д. И. Создание коллекции *in vitro* сортов и гибридов картофеля как исходного материала для криоконсервации // Биотехнология. Теория и практика. 2013. № 1. С. 28–33. DOI: 10.11134/btp.1.2013.6.

25. Ruzic Dj., Vujovic T., Cerovic R. *In vitro* preservation of autochthonous plum genotypes // Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2012. Vol. 18. No. 1. P. 55–62.

26. Dessoky E. S., Attia A. O., Ismail I. A., Sadik A. S., Al-Sodany Y. M. Preservation and genetic stability for *in vitro* propagated taify grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Al-Bayadi // Bioscience Research. 2017. Vol. 14(3). P. 616–625.

27. Тевфик А. Ш., Митрофанова И. В. Особенности получения и сохранения *Canna × hybridia Hort. ex Backter* в условиях *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. № 3. С. 99–109. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109.

28. Егорова Н. А., Тевфик А. Ш., Ставцева И. В., Якимова О. В., Загорская М. С., Коваленко М. С., Бабанина С. С. Особенности депонирования некоторых эфиромасличных растений в коллекции *in vitro* // Материалы международной научной конференции, посвященной 65-летию деятельности Отдела биохимии и биотехнологии растений Государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» «Настоящее и будущее биотехнологии растений». М.: ИВЦ Минфина, 2023. С. 118.

29. Keller E. R. J., Senula A., Dreiling M. Genebanking of vegetatively propagated medicinal plants – two cases: *Allium* and *Mentha* // Acta Horticulturae. 2005. No. 676. P. 103–109. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.676.12.

30. Егорова Н. А., Ставцева И. В., Якимова О. В., Каменек Л. И., Кривоухатко А. Г. Некоторые аспекты клонального микроразмножения и сохранения *in vitro* эфиромасличных растений // Таврический вестник аграрной науки. 2015. № 1 (3). С. 18–24.

31. Егорова Н. А., Загорская М. С., Абдурашитов С. Ф. Особенности длительного сохранения мяты сортов Ажурная и Бергамотная в коллекции *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. № 1. С. 64–75.

32. Егорова Н. А., Якимова О. В. Влияние длительного субкультивирования на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. И *Origanum vulgare* L. // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2019. № 47. С. 22–39. DOI: 10.17223/19988591/47/2.

33. Якимова О. В., Егорова Н. А. Влияние состава питательной среды и генотипа на клональное микроразмножение душицы *in vitro* // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2015. Вып. 4 (55). С. 304–309.

34. Якимова О. В., Егорова Н. А. Клональное микроразмножение душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) в культуре *in vitro*: методические рекомендации. Симферополь: ФГБУН «НИИСХ Крыма», 2017. 24 с.
35. Benkaddour R., Ali N. B., Hamdoun O., Badoc A., Azaroual L., Martin P., Lamarti A. Micropropagation and acclimatization of common oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*) by shoot tip culture // American Journal of Plant Sciences. 2022. Vol. 13. P. 833–855. DOI: 10.4236/ajps.2022.136056.
36. Fokina A. V., Satarova T. M., Smetanin V. T., Kucenko N. I. Optimization of microclonal propagation *in vitro* of oregano (*Origanum vulgare*) // Biosystems Diversity. 2018. Vol. 26. No. 2. P. 98–102. DOI: 10.15421/011815.
37. Oluk E. A., Cakir A. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey // African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8 (21). P. 5769–5772. DOI:10.5897/AJB09.1216.
38. Goleniowski M. E., Flamarique C., Bima P. Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare* × *apalii*) from meristem tips // In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2003. Vol. 39. P. 125–128. DOI: 10.1079/IVP2002361.
39. Korkor A. M., Mohamed S. A., Abd El-kane O. M., Gohar A. A. Adaptation of the *in vitro* culture of *Origanum majorana* L. for production of phenolic acids // IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2017. Vol. 12. No. 2. P. 30–38. DOI: 10.9790/3008-1202013038.
40. Sarropoulou V., Maloupa E., Grigoriadou K. *In vitro* direct organogenesis of the Creta dittany (*Origanum dictamnus* L.), an important threatened Greek endemic species // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2021. Vol. 49. No. 1. DOI: 10.15835/nbha50212715.
41. Davey M. R., Anthony P. Plant cell culture: essential methods. Singapore: Markono Print Media Pte. Ltd, 2010. 335 p. DOI: 10.1002/9780470686522.
42. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. К.: Наукова думка, 2005. 270 с.
43. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15. No. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

References

1. Myagkikh E. F., Kashirina N. A. Practical value of fundamental research in the field of essential oil and medicinal plants // Proceedings of VII international scientific conference “Current State, Problems and Prospects of the Development of Agrarian Science”. Simferopol: Arial, 2023. P. 50–51. DOI: 10.5281/zenodo.8354252.
2. Pashtetsky V. S., Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V., Nazarenko L. G. Essential oil industry in the Crimea. Yesterday, today, tomorrow: monograph. Simferopol: Arial, 2018. 320 p.
3. Myagkikh E., Babanina S., Mishnev A., Radchenko L., Pashtetskiy V., Nevkrytaya N., Loretts O. Ecological adaptability of some cultivars and breeding samples of *Origanum vulgare* L. // Agronomy. 2022. Vol. 12. No. 1. Art. No.16. DOI: 10.3390/agronomy12010016.
4. Myagkikh E. F., Babanina S. S., Pashtetsky V. S., Karpukhin M. Yu. Morphological variability of phenotypic traits in of Oregano samples // Agronomy Research. 2020. Vol. 18. No. 4. P. 2489–2500. DOI: 10.15159/AR.20.217.
5. Alekseeva M., Zagorcheva T., Rusanova M., Rusanov K., Atanassov I. Genetic and flower volatile diversity in natural populations of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietsw. in Bulgaria: toward the development of a core collection // Frontiers in Plant Science. 2021. Vol. 12. DOI: 10.3389/fpls.2021.679063.
6. Chishti Sh., Kaloo Z. A., Sultan Ph. Medicinal importance of genus *Origanum*: a review // Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2013. Vol. 5 (10). P. 170–177. DOI: 10.5897/JPP2013.0285.
7. Idir F., Van Ginneken S., Coppola G. A., Grenier D., Steenackers H. P., Bendali F. *Origanum vulgare* ethanolic extracts as a promising source of compounds with antimicrobial, anti-biofilm, and anti-virulence activity against dental plaque bacteria // Frontiers in Microbiology. 2022. Vol. 13. Art. No. 999839. DOI: 10.3389/fmicb.2022.999839.
8. Veenstra J. P., Johnson J. J. Oregano (*Origanum vulgare*) extract for food preservation and improving gastrointestinal health // International Journal of Nutrition. 2019. Vol. 3(4). P. 43–52. DOI: 10.14302/issn.2379-7835.ijn-19-2703.
9. Mashhadi F., Ghorbani N. M., Yaraee R. Immunomodulatory effects of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. ethanolic extracts *in vitro* // Immunoregulation. 2021. Vol. 4(1). P. 21–32. DOI: 10.32598/Immunoregulation.4.1.1.
10. Alekseeva M., Zagorcheva T., Atanassov I., Rusanov K. *Origanum vulgare* L. – a review on genetic diversity, cultivation, biological activities and perspectives for molecular breeding // Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2020. Vol. 26. No. 6. P. 1183–1197.

11. Myagkih E. F., Marchenko M. P., Novikov I. A. Comparative analysis of *Origanum vulgare* L. hybrides according to the complex of characteristics // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2018. No. 2 (14). P. 89–95.
12. Fundamentals of creating an *in vitro* gene bank of species, varieties and forms of ornamental, aromatic and fruit crops: collective monograph // Ed. by Mitrofanova I. V. Simferopol: Arial, 2018. 260 p. DOI: 10.32514/978-5-907118-87-4.
13. Dunaeva S. E., Gavrilenko T. A. *In vitro* collections of fruit and berry crops: establishment and conservation strategy // Proceedings on applied botany, genetics and breeding. 2007. Vol. 161. P. 10–19.
14. Chauhan R., Singh V., Quraishi A. *In vitro* conservation through slow-growth storage // In book: Synthetic Seeds. Springer Nature (Switzerland), 2019. P. 397–416. DOI: 10.1007/978-3-030-24631-0_19.
15. Molkanova O. I., Konovalova L. N., Stakheeva T. S. Propagation and conservation characteristics of valuable and rare species collection *in vitro* // Bulletin of the State Nikitsky Botanical Garden. 2016. No. 120. P. 17–23.
16. Spiridovich E. V., Fomenko T. I., Vlasova A. B., Kozlova O. N., Vainovskaya I. F., Yukhimuk A. N., Kuzmenkova S.M., Nosilovsky O.A., Reshetnikov V.N. Conservation of rare plants in the aseptic collection and DNA bank of the Central Botanical Garden of NAS of Belarus // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series. 2017. No. 3. P. 117–128.
17. Kritskaya T. A., Kashin A. S. Features of *in vitro* cold storage of some of rare and endangered plants of Saratov region // Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology. 2016. Vol. 16. P. 74–80. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-1-74-80.
18. Muraseva D. S., Zvyagina N. S., Novikova T. I., Dorogina O. V. Conservation of the Western Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) in *in vitro* collection // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017. Vol. 21(5). P. 554–560. DOI: 10.18699/VJ17.272.
19. Nosov A. M., Yurin V. M., Spiridovich E. V., Vysotskaya O. N., Reshetnikov V. N. Plant biotechnological collections and cryobanks are an important part of the National bank – depository of living systems // Proceedings of the International Conference “Role of Botanical Gardens and Arboretums in conservation, investigation and sustainable using diversity of the plant world” dedicated to the 85th anniversary of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. Moscow: Medisont, 2017. P. 284–290.
20. Chauhan R. S. Biotechnological approaches for conservation of rare, endangered and threatened plants // International Journal of Scientific and Research Publications. 2016. Vol. 6. P. 10–14.
21. Cha-um S., Kirdmanee C. Minimal growth *in vitro* culture for preservation of plant species // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. 2007. Vol. 1 (1). P. 13–25.
22. Kontsevaya I. I. Effect of abscisic acid on depositing of the Karelian birch *in vitro* // Bulletin of Science and Practice. 2018. Vol. 4. No. 7. P. 11–16. DOI: 10.5281/zenodo.1312145.
23. Doroshenko N. P. About creation of vine gene pool collection *in vitro* // Russian grapes. 2017. Vol. 5. P. 68–86.
24. Kushnarenko S. V., Romadanova N. V., Aralbaeva M. M., Matakova G. N., Bekebaeva M. O., Babisekova D. I. Preservation of a collection *in vitro* of potato varieties and hybrids as starting material for cryopreservation // Biotechnology. Theory and practice. 2013. No. 1. P. 28–33. DOI: 10.11134/btp.1.2013.6.
25. Ruzic Dj., Vujovic T., Cerovic R. *In vitro* preservation of autochthonous plum genotypes // Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2012. Vol. 18. No. 1. P. 55–62.
26. Dessoky E. S., Attia A. O., Ismail I. A., Sadik A. S., Al-Sodany Y. M. Preservation and genetic stability for *in vitro* propagated taify grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Al-Bayadi // Bioscience Research. 2017. Vol. 14(3). P. 616–625.
27. Tevfik A. Sh., Mitrofanova I. V. *In vitro* derivation and storage characteristics of *Canna × hybrida* Hort. ex Backer // Izvestia Vuzov. Prikladnaya Chimia I Biotechnologia [Proceedings of Universitets. Applied chemistry and biotechnology]. 2017. Vol. 7. No. 3. P. 99–109. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-3-99-109
28. Yegorova N. A., Tevfik A. Sh., Stavtseva I. V., Yakimova O. V., Zagorskaya M. S., Kovalenko M. S., Babanina S. S. Features of depositing some essential oil plants in *in vitro* collections // Materials of the International Scientific Conference “The present and future of plant biotechnology” dedicated to the 65th anniversary of the Department of Biochemistry and Plant Biotechnology of the State Scientific Institution “Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus”. Moscow: Information and computing center of the Ministry of Finance, 2023. P. 118.
29. Keller E. R. J., Senula A., Dreiling M. Genebanking of vegetatively propagated medicinal plants – two cases: *Allium* and *Mentha* // Acta Horticulturae. 2005. No. 676. P. 103–109. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.676.12.
30. Yegorova N. A., Stavtzeva I. V., Yakimova O. V., Kamenyok L. I., Krivochatko A. G. Some aspects of clonal micropropagation and conservation *in vitro* of essential oil plants // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2015. No. 1 (3). P. 18–24.

31. Yegorova N. A., Zagorskaya M. S., Abdurashytov S. F. Features of long-term preservation of Azhurnaya and Bergamotnaya mint cultivars in an *in vitro* collection // Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. 2022. Vol. 12. No. 1. P. 64–75. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75.
32. Yegorova N. A., Yakimova O. V. The effect of long-term subcultivation on clonal micropropagation of *Melissa officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. // Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Series “Biology”. [Tomsk State University Journal of Biology]. 2019. Vol. 47. P. 22–39. DOI: 10.17223/19988591/47/2.
33. Yakimova O. V., Yegorova N. A. The influence of the composition of the nutrient medium and genotype on clonal micropropagation of *Origanum in vitro* // Proceedings of the Kuban State Agrarian University. 2015. Vol. 4 (55). P. 304–309.
34. Yakimova O. V., Yegorova N. A. Clonal micropropagation of oregano (*Origanum vulgare* L.) in *in vitro* culture: methodological recommendations. Simferopol: Research Institute of Agriculture of Crimea. 2017. 24 p.
35. Benkaddour R., Ali N. B., Hamdoun O., Badoc A., Azaroual L., Martin P., Lamarti A. Micropropagation and acclimatization of common oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*) by shoot tip culture // American Journal of Plant Sciences. 2022. Vol. 13. P. 833–855. DOI: 10.4236/ajps.2022.136056.
36. Fokina A. V., Satarova T. M., Smetanin V. T., Kucenko N. I. Optimization of microclonal propagation *in vitro* of oregano (*Origanum vulgare*) // Biosystems Diversity. 2018. Vol. 26. No. 2. P. 98–102. DOI: 10.15421/011815.
37. Oluk E. A., Cakir A. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey // African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8 (21). P. 5769–5772. DOI:10.5897/AJB09.1216.
38. Goleniowski M. E., Flamarique C., Bima P. Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare* × *applii*) from meristem tips // *In vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant. 2003. Vol. 39. P. 125–128. DOI: 10.1079/IVP2002361.
39. Korkor A. M., Mohamed S. A., Abd El-kane O. M., Gohar A. A. Adaptation of the *in vitro* culture of *Origanum majorana* L. for production of phenolic acids // IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2017. Vol. 12. No. 2. P. 30–38. DOI: 10.9790/3008-1202013038.
40. Sarropoulou V., Maloupa E., Grigoriadou K. *In vitro* direct organogenesis of the Creta dittany (*Origanum dictamnus* L.), an important threatened Greek endemic species // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2021. Vol. 49. No. 1. DOI: 10.15835/nbha50212715.
41. Davey M. R., Anthony P. Plant cell culture: essential methods. Singapore: Markono Print Media Pte. Ltd, 2010. 335 p. DOI: 10.1002/9780470686522.
42. Kushnir G. P., Sarnatska V. V. Microclonal propagation of plants. Theory and practice. Kyiv: Naukova dumka, 2005. 270 p.
43. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15. No. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

UDC 633.81:57.085.2

Yakimova O. V., Yegorova N. A.

**IN VITRO PRESERVATION OF OREGANO CULTIVARS AND SAMPLES:
ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF CULTURE MEDIUM, GENOTYPE AND
CULTIVATION CONDITIONS**

Summary. Currently, the development of the essential oil industry causes the considerable attention to the replenishment and studying the collection of the essential oil and medicinal crops gene pool, including genus *Origanum* L. To maintain valuable genotypes collections at the current level, it is effective to use biotechnological methods of preservation *in vitro*. The aim of this study was to investigate the effect of culture medium composition, genotype and deposition duration on the development of explants of cultivars and samples of oregano under low positive temperatures *in vitro*. The studies were carried out in 2021–2022 at the Laboratory of Biotechnology, a structural unit of the Research Institute of Agriculture of Crimea. Stem segments with one node from six *Origanum vulgare* L. genotypes (samples ‘g31’, ‘g163’ and cultivars ‘Slavnitsa’, ‘Kvazar’, ‘Ak-Kaya’, ‘Urusvati’; all obtained by clonal micropropagation) were used as a material for the study. Explants were cultivated on five Murashige and Skoog (MS) culture medium modifications at a temperature of 4–6 °C and illumination of 500–600 lux. Morphometric parameters were analyzed after 6 and 12 months of storage. After one year of deposition on media supplemented with 0.5 mg/l

*benzylaminopurine (BAP) and 0.4% sorbitol, or 0.4 g/l chlorocholine chloride with 2% sucrose, the number of viable explants varied from 25.0 to 84.6 % but it should be mentioned that shoot tip necrosis in this case was observed in most genotypes. Better preservation of explants was observed when they were cultivated in jars or test tubes on MS medium with 0.5 mg/l BAP and 6 % sucrose. On this medium, 61.3–91.6% of viable explants with 1.6–6.7 shoots ranging in length from 37.0 to 64.5 mm (depending on the genotype) were formed. It had been established that one subcultivation was enough for successful resumption of explants growth after depositing (the studied oregano samples and cultivars were placed in a culture room conditions at 26 °C). The best development of microshoots during regrowth was in cultivars 'Kvazar' and 'Ak-Kaya'. These studies can serve as the basis for further development of the method for *O. vulgare* preservation in vitro.*

Keywords: *Origanum vulgare L., in vitro deposition, explant, culture medium composition, genotype, culture vessel.*

Якимова Ольга Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: olyyakimova@yandex.ru.

Егорова Наталья Алексеевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биотехнологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Yakimova Olga Valerievna, Cand. Sc. (Biol.), researcher of the Laboratory of biotechnology, FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea"; 150, Kievskaya str., Simferopol, 295493, Russia; e-mail: olyyakimova@yandex.ru.

Yegorova Natalia Alekseevna, Dr. Sc. (Biol.), chief researcher, head of the Laboratory of biotechnology FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea"; 150, Kievskaya str., Simferopol, 295493, Russia; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Дата поступления в редакцию – 18.09.2023

Дата принятия к печати – 10.11.2023