

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО

**Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології**

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

**Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття**

_____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**

_____ **Олена КВАСКО**

«___» _____ 20__ р.

«___» _____ 20__ р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «Мікроклональне розмноження материнки звичайної
(*Origanum vulgare* L.)»**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

к.б.н., доцент

_____ **Олена КВАСКО**

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

д.с.-г.н., професор

_____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**

Виконав

_____ **Роман ЗАГЛАДЬКО**

Київ - 2026

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

**Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття, к.б.н., доцент**

_____ **Олена КВАСКО**

«____» _____ **20 __ р.**

**З А В Д А Н Н Я
ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
ЗДОБУВАЧУ**

Загладьку Роману Миколайовичу

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія»

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи **«Мікроклональне розмноження материнки
звичайної (*Origanum vulgare* L.)»**

затверджена наказом від «30» жовтня 2025 року №2596 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру «15» травня 2026 р.

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: рослини материнка звичайна,
регулятори росту, живильні середовища

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Вплив гіпохлориту натрію (NaOCl) на стерилізацію експлантів пазушних бруньок материнки звичайної.
2. Регенерація пагонів *O. vulgare* із пазушних меристем.
3. Вплив індолілмасляної кислоти на укорінення одержаних рослин-регенерантів *O. vulgare*
4. Вплив різних ґрунтових сумішей на адаптація рослин-регенерантів *O. vulgare*

Перелік графічних документів: рисунки, таблиці

Дата видачі завдання «01» вересня 2025 р.

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

Юлія КОЛОМІЄЦЬ

Завдання взяв до виконання

Роман ЗАГЛАДЬКО

РЕФЕРАТ

Загальний обсяг роботи 50 сторінок, кількість ілюстрацій 10, таблиць 7, кількість використаних джерел у списку літератури 62.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, материнка звичайна, морфогенез, укорінення.

Мета роботи – розроблення етапів вегетативного розмноження *in vitro* *O. vulgare*.

Об'єкт дослідження – мікроклональне розмноження

Предмет дослідження – материнка звичайна *O. vulgare*

Методи дослідження – метод ізольованих клітин та тканин

Дослідження включало використання методу тканинної культури для розмноження рослин материнки звичайної (*O. vulgare*), використовуючи експлантати апікальних і пазушних бруньок. Апікальні та пазушні бруньки *O. vulgare* – одне з найважливіших джерел екстракції фенольних сполук із сильною антиоксидантною активністю, були використані для оцінки впливу регуляторів росту на мікроклональне розмноження *in vitro*. Перший експеримент полягав у стерилізації експлантатів апікальних і пазушних бруньок з використанням 70% етанолу протягом 30 секунд (C_2H_5OH) та гіпохлориту натрію ($NaOCl$). Після стерилізації гіпохлоритом натрію найбільша середня кількість здорових бруньок була отримана за використання 3% розчину і тривалість стерилізації становила 15 хвилин. Встановлено, що найвища проліферація бруньок спостерігалася в експлантатах пазушних бруньок протягом 8 тижнів культивування і була виявлена кращою порівняно з експлантатами верхівок пагонів для індукції та проліферації пагонів. Найефективнішою комбінацією регуляторів росту для мікророзмноження була 0,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л ГК₃. Показано, що середовище MS з 1,5 мг/л ІМК є найбільш придатним з протестованих середовищ для вкорінення, оскільки на цьому середовищі спостерігали утворення меншої кількості калюсу та більшої кількості коренів.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Мікророзмноження лікарських рослин	10
1.2. Соматоклональна мінливість у рослин за мікротоклонального розмноження	12
1.3. Культура <i>Origanum vulgare</i> (Lamiaceae) та її розмноження	13
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
2.1. Етапи мікротоклонального розмноження	24
2.2. Приготування живильного середовища	27
2.3. Рослинний матеріал	31
2.4. Стерилізація експлантів та умови культивування	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	33
3.1 Вплив гіпохлориту натрію (NaOCl) на стерилізацію експлантів пазушних бруньок материнки звичайної	33
3.2. Регенерація пагонів <i>O. vulgare</i> із пазушних меристем	34
3.3. Вплив індолілмасляної кислоти на укорінення одержаних рослин-регенерантів <i>O. vulgare</i>	39
3.4. Вплив різних ґрунтових сумішей на адаптація рослин- регенерантів <i>O. vulgare</i>	41
ВИСНОВКИ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	44

ВСТУП

Лікарські рослини – це трави, що містять різноманітні активні терапевтичні сполуки; проте наразі вони стикаються з численними загрозами у своїх середовищах існування в різних географічних регіонах

Рід *Origanum* відомий своїм широким спектром антиоксидантних, антибактеріальних, протигрибкових, антипаразитарних та антитромбінових властивостей.

Материнка звичайна (*Origanum vulgare*) належить до родини ясноткових (*Lamiaceae*), роду Материнка звичайна (*Origanum*), і має найширше поширення серед видів Материнки звичайної (*Origanum*) [1, 2]. Під комерційною назвою «орегано» (oregano) знаходиться велика кількість таксонів рослин, що належать до різних видів, родів або навіть родин, що призводить до значної плутанини [3, 4]. *O. vulgare* subsp. *hirtum*, відома під народною назвою «грецький орегано», загалом вважається такою, що має найкращу якість [3]. На відміну від традиційних методів розмноження, вегетативне розмноження *in vitro*, тобто мікророзмноження з використанням пазушних сегментів, дозволяє отримувати велику однорідну популяцію рослин за відносно короткий проміжок часу, незалежно від пори року. Існують методи культивування *in vitro* для індукції калюсу, регенерації та вкорінення рослин *O. vulgare* [5, 6]. Досі не було повідомлено про методи культивування *in vitro* *O. vulgare*, яка має значні морфологічні, а також хімічні відмінності порівняно з іншими підвидами *O. vulgare* [2, 3].

Культивування клітин та органів рослин *in vitro* на хімічно визначених середовищах дає можливість регенерувати та відбирати рослини з бажаними характеристиками (використовуючи соматоклональні варіанти), які інакше важко отримати традиційною селекцією рослин [4]. Запропонувати узагальнене середовище для досягнення тотипотентності у всіх рослинах або навіть у всіх клітинах однієї й тієї ж рослини непросте завдання, оскільки вид та баланс регуляторів росту, необхідних для різних морфогенетичних явищ,

варіюються від тканини до тканини та від клітини до клітини залежно від їхнього метаболічного статусу [5]. Досі не повідомлялося про успіхи в регенерації материнки звичайної (*Origanum vulgare* L.), хоча повідомлялося про утворення калюсу [6]. Цей вид є маловикористаною ароматичною та лікарською рослиною [7], джерелом олії материнки звичайної (*Origanum*). Олія материнки (*Origanum*), яку отримують з усіх надземних частин рослини (багатим джерелом є квітучі головки), використовується у виробництві високоякісних ароматизаторів, парфумерії, косметики та лікєро-горілочаних виробів. Оскільки олія має вітрогінні, шлункові, сечогінні, потогінні та еменогогонні властивості, її використовують для лікування хронічного ревматизму, зубного болю, болю в вухах, кашлюку та бронхіту [8].

На відміну від традиційних методів розмноження, вегетативне мікророзмноження, використовуючи апікальні та пазушні експлантати, дозволяє отримувати значною мірою однорідну популяцію рослин за відносно короткий проміжок часу, незалежно від сезону. Однак спроби збільшити кількість високоцінних метаболітів шляхом застосування біотехнологічних методів розмноження *O. vulgare* видаються досить обмеженими. Для мікророзмноження *O. vulgare* використовувалося повнорозмірне середовище Гамборга В5 з 20 г/л сахарози, 6 г/л агару, доповненого факторіальними комбінаціями 6-бензиламінопурину (6-БАП) (0,25 та 0,50 мг/л) та 0,01 мг/л α -нафтилоцтової кислоти (НОК). Для вкорінення *in vitro* оптимальний розвиток пагонів досягається шляхом додавання 0,5 мг/л НОК. Мороне-Фортунато та Авато повідомили, що найкращі результати мікророзмноження з точки зору відсотка росту, кількості пагонів, що розвиваються, та довжини пагонів орегано спостерігаються при додаванні 0,5 мг/л 6-БАП на поживне середовище МС. Укорінення орегано здійснювалося в поживному середовищі, що містило 0,15 мг/л ІОК. Голеніовські та ін. розробили протокол для розмноження *Origanum vulgare* $\times$ *applied in vitro*, вивчаючи вплив 6-БАП та НОК в різних концентраціях та комбінаціях на мікророзмноження.

Грецький орегано може розмножуватися пророщуванням насіння та мікророзмноженням *in vitro*. Дрібне насіння має хороший рівень проростання. На жаль, цей спосіб розмноження має дуже суттєвий недолік – як перехресно-запильна рослина, потомство насіння представлятиме різноманітну популяцію щодо габітусу, забарвлення, вмісту та запаху ефірної олії. Використання мікророзмноження рослин дозволяє зберегти генотипові та фенотипові характеристики вихідних рослин, а також рослини вільні від сезонних та соматичних коливань, зараження бактеріями, грибками або комахами, а також забруднення навколишнього середовища, що може вплинути на їхню лікарську цінність. Файсал та ін. виявили, що рослини *Vasopa monnieri* L., розмножені *in vitro* з використанням TDZ, були генетично однорідними до своїх материнських рослин. З іншого боку, вибір типу та концентрації цитокініну, що екзогенно надходить у живильне середовище під час пагонів рослин, помітно впливає не тільки на проліферацію пагонів, але й на виробництво метаболітів з антиоксидантною активністю. У наукових працях бракує даних про зміни антиоксидантного потенціалу екстрактів у розсаді *O. heracleoticum*, розмноженої *in vitro*, залежно від типу та концентрації регуляторів росту рослин, доданих до поживного середовища для мікророзмноження рослин.

Метою цієї роботи була оптимізація етапів мікроклонального вегетативного розмноження *in vitro* *O. vulgare*.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Глобальний попит на високоякісний рослинний матеріал для харчових продуктів та ліків постійно зростає через зростання населення світу [1]. Хоча традиційні методи розмноження рослин, такі як брунькування, щеплення, живцювання та насіннєве розмноження, виступають основою системи рослинництва [1, 2]. Ці методи часто не відповідають поточним та очікуваним вимогам ефективних та економічно вигідних систем розмноження рослин через недостатню кількість сільськогосподарських угідь, необхідність тривалого часу для отримання потомства, залежність від сезонів та обмеження в консистенції отриманого рослинного матеріалу [3]. Сьогодні культура тканин рослин є потужним інструментом для відтворення ідентичних рослин генотипу з однієї частини рослини без залежності від географічних та кліматичних факторів [4]. Таким чином, культура тканин рослин є альтернативним методом традиційного вегетативного розмноження [4, 5]. Мікророзмноження, спочатку застосовуване до декоративних рослин [5], розширилося і охопило різні культури, плодові рослини, овочі, дерева, лікарські та ароматичні рослини, і зараз є багатомільярдною галуззю у всьому світі [6].

Розмноження на основі тканин, широко відоме як мікророзмноження, є швидким та ефективним методом, який можна досягти в обмеженому просторі [7]. У цьому процесі невеликий сегмент рослини, зібраний з вибраних видів рослин, відомий як експлант, такий як зрізи листя, кінчики пагонів, вузлові сегменти та кінчики коренів, асептично культивується на штучному середовищі, багатому на поживні речовини. У процесі мікророзмноження рослини можуть регенерувати через органогенез та соматичний ембріогенез (СЕ) [8]. Органогенез зазвичай класифікується на два різні шляхи: прямий органогенез, при якому бруньки пагонів формуються безпосередньо з тканини експлантату, та непрямий органогенез, де регенерація пагонів відбувається через проміжну фазу формування калюсу [9]. Отже, мікророзмноження

помітно збільшило масове виробництво генетично однорідних та високоякісних рослинних матеріалів, зробивши значний внесок у сільське господарство, садівництво та лісівництво. Однак, незважаючи на ці досягнення, критичним недоліком розмноження *in vitro* є виникнення соматональної варіації – спадкових генетичних та епігенетичних модифікацій, викликаних штучними умовами культури тканин. Такі варіації можуть загрожувати клональній точності, погіршувати продуктивність та якість врожаю, а також ускладнювати отримання регуляторного схвалення та прийняття на ринок, особливо в комерційно чутливих системах вирощування культур [6, 8].

1.1. Мікророзмноження лікарських рослин

Мікророзмноження – це високоефективний метод отримання генетично ідентичних рослинних матеріалів [9, 10]. Генетично ідентичні особини забезпечують однорідність врожайності, росту та якості, що є важливим для комерційної стабільності. Ця однорідність спрощує вирощування, знижує виробничі витрати та підвищує ринкову привабливість. Крім того, вона дозволяє швидко розмноження елітних генотипів, зберігаючи бажані ознаки [10]. Перша комерційна технологія мікророзмноження розпочалася з орхідей у 1970-х роках [11]; пізніше її спостерігали у численних плодових рослин, дерев, спецій, декоративних рослин та сільськогосподарських культур [12]. Між 1970-ми та 1980-ми роками комерційний процес мікророзмноження зазнав значного зростання завдяки зростанню кількості комерційних лабораторій, що займаються цією діяльністю [12]. Мікророзмноження – це ефективний біотехнологічний метод, що використовується в садівництві, лісовому господарстві та сільському господарстві, який дозволяє швидко та масштабне відтворення ознак, що відповідають типу, є вільними від хвороб та генетично кращими сортами [12, 13]. Клональна точність – здатність клону зберігати свою генетичну ідентичність з часом – є життєво важливою для розмноження *in vitro*, оскільки успіх цього процесу залежить від отримання

великої кількості генетично ідентичних рослин, що відповідають типу, з невеликого сегмента рослини-донора [14]. Наприклад, у бананів клональна точність мікророзмножених рослин через пазушні бруньки спостерігалася при культивуванні в умовах, багатих на цитокиніни [15]. Аналогічно, підтверджена генетична однорідність у рослин суниці (*Fragaria* × *ananassa*), отриманих з біореактора, та кореляція клональної точності з підвищеним вмістом антоціанів та антиоксидантною активністю порівняно з рослинами, розмноженими традиційним способом [16]. Кунду та ін. розробили високоточний протокол соматичного ембріогенезу у *Vaccinium vitis-idaea* (брусниці). Це дослідження показало, що регенеровані рослини зберегли генетичну однорідність, а також демонстрували підвищену концентрацію флавоноїдів, антоціанів та антиоксидантну активність порівняно з вихідними рослинами-донорами [17]. У яблуні генетична подібність 92–100% спостерігалася на підщепі EMLA 111 [18]. Генетично нестабільні, нетипові мікророзмножувані рослини є основною причиною фінансових втрат, особливо у культур з високим попитом, де однорідність та передбачуваність є важливими [19]. Наприклад, варіації кольору, форми та розміру можуть різко знизити ринкову вартість комерційно важливих видів рослин. Виробники стикаються зі значними втратами, маючи справу з низькоякісними, низьковрожайними рослинами [19]. Подальше ускладнення виникає з багаторічними рослинами, такими як деревні декоративні рослини, деревні дерева, лікарські рослини та фруктові дерева, де наслідки генетичної нестабільності можуть не проявитися лише через кілька років після посадки, що призводить до відкладених втрат після того, як значні ресурси вже були вкладені [19, 20]. Ці регенеровані рослини можуть демонструвати низку небажаних фенотипових варіацій, включаючи стерильність, раннє цвітіння, змінену довжину міжвузлів, аномалії листя, такі як альбіносне або хлоротичне листя, підвищену стійкість до солі та зміни кольору плодів або квіток [21]. Крім того, генетичні зміни, викликані соматоклональними варіаціями, загрожують здоров'ю рослин та виробництву стійкого до хвороб, однорідного

рослинного матеріалу [21]. Ця генетична нестабільність може підвищити вразливість до комах-шкідників, патогенів та стресів навколишнього середовища, значно знижуючи продуктивність сільськогосподарських культур та збільшуючи кількість спалахів хвороб. Щоб керувати цими ризиками, виробники повинні значно інвестувати в передові системи боротьби з хворобами та шкідниками [22]. Однак витрати, пов'язані з цими заходами боротьби з хворобами уражених культур та видів рослин, що розмножуються мікророзмноженням, ще більше зменшують економічні переваги мікророзмноження [23].

1.2. Сомаклональна мінливість у рослин за мікроклонального розмноження

Хоча мікророзмноження пропонує численні переваги, тривалі стресові умови під час росту іноді можуть призвести до генетичної нестабільності у рослин, що розмножуються мікророзмноженням [24]. Ларкін та Скоукрофт вперше ввели термін «сомаклональна мінливість» для опису мінливості, що спостерігається у рослин, регенерованих за допомогою тканинної або клітинної культури [25]. Сомаклональна мінливість є непередбачуваною та неконтрольованою, і більшість варіацій не має прямого агрономічного чи комерційного значення [26]. Однак інші назви, такі як протоклональна, гаметоклональна та мериклональна мінливість, часто використовуються для опису варіантів з культур протопластів, пиляків та меристеми відповідно [27]. Сомаклональна мінливість є результатом генетичних та епігенетичних змін, які можуть відбуватися в рослинах, регенерованих за допомогою тканинної культури [28]. Генетична мінливість залишається стабільною протягом усього статевого циклу або повторного безстатевого розмноження, тоді як епігенетична мінливість може бути нестабільною навіть під час безстатевого розмноження [29]. Наявність неочікуваних, неконтрольованих та спонтанних змін під час тканинної культури є небажаною при комерційному мікророзмноженні [30]. Типи експлантатів, кількість субкультур, регулятори

росту рослин та шлях регенерації відповідають за соматоклональну мінливість [31, 32, 33, 34]. Однак соматоклональна мінливість вважається обмеженням у техніці мікророзмноження, вона також пропонує цінні можливості для отримання нових стійких до хвороб та високоврожайних варіантів, а саме рису [35], помідорів [36], баклажанів [37], огірків [38], моркви [39], бананів [40] та винограду [41]. Існує безліч методів визначення та ідентифікації соматоклональних варіантів, головним чином заснованих на різних морфологічних ознаках, числових та структурних варіаціях хромосом, а також біохімічних та молекулярних маркерах ДНК. Розуміння соматоклональної мінливості є важливим для оптимізації протоколів мікророзмноження та отримання рослин, що відповідають типу. Це може забезпечити економічну життєздатність та якість цієї цінної технології [42].

Соматоклональна мінливість – це складне явище, і залишається важким до кінця зрозуміти способи взаємодії генетичних та епігенетичних механізмів у середовищах культивування *in vitro* [27, 28]. Значним фактором, що сприяє цій мінливості, є оксидативний стрес, який часто індукується різними параметрами, такими як склад і рН середовища, концентрації регуляторів росту рослин, гормональний дисбаланс, а також коливання температури та вологості. Ці несприятливі умови призводять до надмірного вироблення активних форм кисню (АФК), які, як відомо, викликають різноманітні молекулярні порушення, включаючи зміни в патернах метилювання ДНК, хромосомні аберації, розриви ланцюгів та точкові мутації [43]. Отже, ступінь соматоклональної мінливості тісно пов'язаний зі специфічними умовами середовища *in vitro*, що підкреслює необхідність розробки та підтримки оптимізованих, жорстко контрольованих протоколів культивування для забезпечення генетичної цілісності та клональної однорідності.

1.3. Культура *Origanum vulgare* (Lamiaceae) та її розмноження

Рослина орегано поширена по всьому світу і представлена переважно двома видами: *Origanum vulgare* (Lamiaceae), що походить з Європи,

та *Lippia graveolens* (Verbenaceae), що походить з Америки. Мексика є другим за величиною виробником орегано у світі, з видом *L. graveolens* HBK. Однак більшість видів, що використовуються, є дикими, і їх вирощування здійснюється традиційним та обмеженим способом.

Орегано – це трав'яниста, багаторічна та ароматична рослина, широко поширена по всьому світу, *Origanum vulgare* [24]. Таксономічно вона має представників чотирьох родин: Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae та Verbenaceae, причому дві останні є найбільш відомими [25]. Існують певні дискусії щодо кількості родів та видів, визнаних під цією назвою, наразі зареєстровано від 24 до 61 виду, розподілених серед 16-27 родів [26].

Найбільш економічно важливими видами є: *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss) Hayak (грецький орегано), *Origanum onites* L. (турецький орегано), *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns & Link, *Coridothymus capitatus* (L.) Rchb. (іспанський орегано, що належить до родини ясноткових) та *Lippia graveolens* HBK (мексиканський орегано, з родини вербенових) [17]. Важливо зазначити, що існує велика різниця між європейським орегано (*Origanum* sp.) та мексиканським орегано (*Lippia* sp.), як буде описано в цій роботі [21]. Однак, оскільки назва орегано була дана всім тим рослинам, багатим на фенольні монотерпени, головним чином карвакрол і тимол, у наявній інформації досі існує плутанина [29].

Види *Origanum* (материнки звичайної) – це напівчагарники або багаторічні трави з кількома стеблами, висхідними або прямостоячими, майже сидячим або черешковим листям і квітами у вертицилястах, зібраних у густі або пухкі колоски, розташовані у волотистому або щиткоподібному суцвітті. Рослини *Origanum* широко використовуються в усьому світі як дуже популярна спеція під народною назвою «орегано». Вони мають велике економічне значення, яке пов'язане не лише з їх використанням як спеції. Фактично, як показали нещодавні дослідження, орегано традиційно використовується багатьма іншими способами, оскільки його ефірні олії мають антимікробну, цитотоксичну та антиоксидантну активність [15]. Знання

великого морфологічного та хімічного різноманіття роду *Origanum* та природного поширення його різних таксонів є важливим для кращого використання цієї дуже перспективної культури.

Материнка звичайна (Origanum vulgare L.) – багаторічна трав'яниста рослина завдовжки 30-80 см, гілляста та вкрита волосками, злегка червонувато-фіолетового кольору. Цвіте з липня по вересень [1], походить із Середземномор'я [2, 3], росте на дренованих сухих мулистих ґрунтах у теплих регіонах і може переносити низькі температури [4]. Це гемікриптофітна рослина, органи якої на період несприятливої пори року (посухи або зими) розташовані на рівні землі. Розмножується насінням або безстатевим шляхом [5].

Материнка звичайна (*Origanum vulgare*) є важливою кулінарною травою та належить до числа найбільш широко споживаних пряних рослин у світі [6]. Крім того, ця рослина вже давно використовується в традиційній медицині, і інтерес до розробки нових рецептур у різних галузях зростає. Кілька досліджень показали, що ця рослина містить широкий спектр вторинних метаболітів. Більшість з них є фенольними сполуками, такими як флавоноїди, терпеноїди, фенольні кислоти, алкалоїди, а також жирні кислоти серед інших [7, 8]. Ці основні сполуки відповідають за біологічну активність, яка дозволяє їх використовувати не лише в медичній галузі, але й у харчових продуктах та косметичних препаратах [8, 9]. Кілька досліджень продемонстрували кілька терапевтичних властивостей: антимікробні [10], спазмолітичні [11], противірусні [12] та нейропротекторні [13]. З цих причин материнка звичайна є одним з найбільш комерційно популярних видів з чудовими біологічними властивостями. Як результат, її глобальний маркетинг та споживання постійно зростають [14]. Фактично, зростаючий попит у фармацевтичній, парфумерній та косметичній промисловості вимагає великомасштабного виробництва. Наразі більша частина рослинної сировини *Origanum vulgare* збирається в природі, що сприяє його зникненню в природних популяціях [15]. Крім того, він зазнає надмірної експлуатації, яка серйозно загрожує сталому

використанню його ресурсів для майбутніх поколінь. Збереження цього виду залишається важливою необхідністю для зменшення його надмірної експлуатації.

Традиційні методи розмноження мають кілька недоліків, а саме: масштабне розмноження насінням пов'язане з кількома перешкодами, такими як низька схожість, низька життєздатність, стерильність насіння, повторне вегетативне розмноження, що призводить до поступової втрати врожаю, і, нарешті, низька здатність живців до вкорінення [16]. Крім того, пошук альтернативних шляхів культивування цих видів *in vitro* є перспективною біотехнологічною стратегією для збереження виду та його масштабного виробництва. Це дозволяє швидке масове розмноження та підтримку його довговічності.

O. vulgare L. (орегано звичайне, дикий майоран, іспанський майоран) – ймовірно, найвідоміший вид роду *Origanum*, який використовується в традиційній медицині та як кулінарна спеція. Назва *Origanum* вперше була використана Гіппократом (460–370 pp. до н. е.), походить від грецьких слів «гора» (oros) та «радість» (ganos) і може бути перекладена як «радість гір» [15]. *O. vulgare* – це багаторічна рослина, що виростає понад 100 см. Вона утворює прямостояче стебло з розгалуженою верхівкою, іноді червонуватого кольору. Листя орегано черешкове, широкояйцеподібне до еліптично-ланцетного, цільне або дрібно пропиляне, розташоване супротивно. Рослина дає численні дрібні рожеві, рожево-бузкові або білі квіти, зібрані в перисті суцвіття, що містять досить багато нектару. Комахами-запилювачами орегано є переважно бджоли та джмелі; численні види метеликів також відвідують квіти орегано [15, 17]. Період цвітіння орегано тривалий і триває з червня по вересень; цвітіння рясне, і рослина в цей час дуже декоративна. Характерною особливістю цього виду є залозиста опушеність усієї рослини та інтенсивний, приємний, трав'янистий та пряний аромат, що нагадує чебрець. Орегано – олійна рослина, а тимол, присутній в олії, викликає запах [18, 19]. Сировиною рослинної сировини є трава орегано (*Origanum herba*), зібрана з посівів та

природних місць на початку цвітіння рослини, коли вона містить ефірну олію [20, 21].

Проліферація та вкорінення пагонів *in vitro* значною мірою залежить від складу базального середовища в солях, включаючи тип, концентрацію та співвідношення макроелементів/мікроелементів, джерело заліза, вітамінів та навколишні умови, такі як фотоперіод та температура [14], тому різні середовища, що використовуються в цьому дослідженні з критським диктанієм (MS, B5), мають різний склад та концентрацію компонентів, що призводить до різних реакцій на ріст рослин. Збільшена потенційна потреба експлантів вузлів пагонів *O. dictamnus* для проліферації, вкорінення та подальшого росту може пояснити його кращу продуктивність у середовищі MS, ніж у B5. Різні реакції експлантів на два досліджені тут базальні середовища для культивування можна пояснити різним співвідношенням $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ у кожному середовищі або різницею в загальному вмісті азоту, який становить 39,4 мМ (18,79 мМ KNO_3 + 20,61 мМ NH_4NO_3) у MS та 25,74 мМ у B5 (24,73 мМ KNO_3 + 1,01 мМ NH_4SO_4) [15]. MS виявився ідеальним базальним середовищем, що посилює проліферацію пагонів у інших видів *Origanum*, включаючи *O. onites* [16], *O. syriacum* L. [17], *O. majorana* L. [18], *Origanum vulgare* x *applii* [19] та *O. vulgare* [20].

Окрім складу базового середовища для культивування, створення компетентного протоколу прямої регенерації *in vitro* також сильно залежить від пошуку найкращого типу цитокініну та його найкращої концентрації як вирішального коефіцієнта успіху, незалежно від виду рослини [21]. Показники проліферації пагонів досліджуваних мікропагонів *O. dictamnus* були краще покращені при застосуванні 2,2 мкМ ВА, потім 2,32 мкМ кінетину та згодом 2,46 мкМ 2-іР. Висота пагонів, вирощених *in vitro*, збільшення довжини міжвузлів, швидкість проліферації мікропагонів і, перш за все, генотип – це параметри, на які значною мірою впливає індивідуальне та комбіноване застосування типу та концентрації доданого цитокініну до середовища для культивування [22]. Відмінності, зумовлені стабільністю, рухливістю,

кон'югацією та швидкістю окислення гормонів серед різних цитокінінів, можуть пояснити неоднорідну компетентність експлантів до різної відносної сили цитокінінів під час стадії посилення індукції пагона [23]. Було продемонстровано перевагу БА над кінетином та 2-іР у стимулюванні утворення кількох пагонів, ймовірно, по-перше, тому, що хімічна стабільність БА є найвищою серед групи цитокінінів у системах вирощування рослин *in vitro*, тоді як більшість інших цитокінінів, особливо пуринового типу, вважаються менш стабільними [24]. По-друге, кількість БА, що знижується в середовищі, відбувається меншою швидкістю порівняно з іншими фітогормонами або нелегко розкладається і тому продовжує утримуватися в середовищі, дозволяючи більшій кількості вільної або іонізованої БА швидко надходити до тканин рослин через середовище [25]. По-третє, спостерігається вищий дисконтинууючий ефект БА на припинення домінування верхівки пагона та перемикання конфігурації бічних пагонів та вегетативного розвитку листя культур кінчиків пагонів [23]. Нарешті, тканини рослин мають вищу здатність легше метаболізувати БА, ніж інші синтетичні регулятори росту [26]. Численні дослідження підтверджують вищу ефективність ВА як найбільш підходящого типу цитокінінів, що застосовується окремо або в комбінації з ауксином (ІМК, НОК) для проліферації *in vitro* у кількох інших видів *Origanum*, включаючи *O. majorana* L. [18], *O. sipyleum* [27], *O. syriacum* та *O. ehrenbergii* [6], *O. vulgare* [28], *O. minutiflorum* [29], *O. vulgare* x *applii* [19] та *O. vulgare* [20].

Укорінення досліджуваних мікропагонів *O. dictamnus* краще стимулювалося цитокініном ВА у середовищі MS, потім кінетином і згодом 2-іР, тоді як у середовищі B5 кінетин був найбільш переважним цитокініном, ВА – найменш переважним, а 2-іР – помірною здатністю, причому кожен цитокінін застосовували з 0,25 мкМ ІМК + 0,3 мкМ ГК₃. Різні реакції були описані в інших видів *Origanum*, де вкорінення мікропагонів краще стимулювалося або в середовищі MS повної концентрації без регуляторів росту рослин, як у випадку *O. syriacum* та *O. ehrenbergii* [6], або в середовищах

MS або B5 різної концентрації, доповнених лише ауксинами (ІМК, НОК, ІОК) за відсутності цитокінінів, включаючи *O. sipyleum* L. [27, 30] та *O. acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart [7], *O. syriacum* [17, 31], *O. heracleoticum* L. [32] та *O. vulgare* [33]. Відсоток вкорінених мікропагонів є коефіцієнтом, що має більше значення порівняно з видовженням коренів, для приживлення рослин та ефективного загартування в умовах *ex vitro*, проте довше коріння дозволяє рослинам краще закріплюватися в субстраті та ефективніше використовувати водний потенціал і мінерали завдяки більшій легкості та вищій швидкості поглинання [34]. Вкорінені рослини критського диктанії, вирощені на суміші субстрату торф:перліт (1:1 об./об.) після 2 місяців у тепличному тумані, показали середній рівень виживання *ex vitro* 80,4%, незалежно від попередніх умов *in vitro*. Повідомляється про широкий діапазон показників виживання (48–98%) рослин, вкорінених *in vitro*, в умовах *ex vitro* під час акліматизації та поступового процесу загартування для інших видів *Origanum*, включаючи *O. sipyleum* L. [30], *O. majorana* L. [18] та *O. syriacum* L. [17], а також широкий спектр сумішей субстратів, таких як торф: перліт (1:1, 1:2, 1:3, 2:1 об./об.) [6, 30, 31, 32]; торф: вермикуліт (1:1 об./об.) [18]; торф: пісок: вермикуліт (1:1:1 об./об.) [17]; та торф: пісок: перліт (1:1:1 об./об.) [30]. Таким чином, між двома базальними середовищами (MS, B5), трьома типами цитокінінів (БА, кінетин та 2-іР) та трьома протестованими концентраціями цитокінінів, MS виявився ідеальним середовищем, БА – найефективнішим цитокініном, а 2,2 мкМ – оптимальною концентрацією, у поєднанні з 0,25 мкМ ІМК та 0,3 мкМ ГК₃, що сприяє найкращій проліферації та вкоріненню експлантатів пазушних бруньок *O. dictamnus in vitro* протягом однієї 30-денної стадії культивування, що забезпечує 100% успіх виживання *ex vitro*. Високий рівень акліматизації та загартування виживання рослин *in vitro* та їх подальшого росту вегетативної та кореневої системи має першорядне значення в кожній системі культивування тканин рослин, оскільки це може сприяти економії коштів, скороченню циклу маркетингу, пришвидшенню встановлення розсадного матеріалу та подальшому впровадженню рослин у культивування

в польових умовах [35].

У попередньому дослідженні того ж виду рослин [13], як представлено тут, серед двох різних базальних середовищ (MS та B5) та двох різних концентрацій БА (1,11 та 2,22 мкМ), що застосовувалися одночасно з 0,25 мкМ ІМК та 0,3 мкМ ГК₃, середовище MS + 2,22 мкМ БА виявилось кращим для проліферації та вкорінення пагонів *in vitro*, а також для успішного виживання вкорінених мікропагонів *ex vitro*. Подальшим прогресом цього дослідження став вплив двох інших типів цитокінінів, окрім БА, а саме кінетину та 2-іР, і той факт, що всі ці три цитокініни були додані до середовищ MS та B5 у двох різних та граничних концентраціях, нижчій 0 мкМ (без цитокінінів) та вищій 4,4 мкМ, що не було протестовано в попередній роботі Сарропулу та ін. [13]. Результати цього дослідження ілюструють, що збільшення всіх параметрів проліферації та вкорінення пагонів *in vitro*, за винятком кількості пагонів у середовищі MS за комбінації 2,2 мкМ БА + 0,25 мкМ ІМК + 0,3 мкМ ГК₃, а також виживання *ex vitro*, може бути результатом оптимального посилення поділу та видовження завдяки ролі БА як цитокініну головним чином у поділі/проліферації клітин і меншою мірою у розширенні клітин, тоді як ІМК як ауксин бере участь як у поділі клітин, так і в збільшенні клітин [21], порівняно з двома іншими комбінаціями концентрацій БА, 0 та 4,4 мкМ. Паралельно з нашими висновками, у іншого виду *Origanum*, у *O. acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart, кожне збільшення концентрації БА (0,6–2,4 мг/л) з 0,2 мг/л НОК послідовно призводило до збільшення кількості коренів, довжини пагонів та коренів до 1,8 мг/л БА, проте спостерігалось різке зниження всіх вищезазначених параметрів при використанні вищої концентрації БА (2,4 мг/л) [7], і цю реакцію можна пояснити зниженням швидкості поглинання води та мінеральних компонентів із середовища [36]. Стає очевидним, що 2,2 мкМ тут є оптимальною концентрацією БА для балансу цитокінінів та ендогенного ауксину, що призводить до вивільнення апікального домінування пагона [37], таким чином, крім балансу цитокінін/ауксин, існує сильна взаємкореляція між ендогенними

концентраціями регуляторів росту рослин та застосованими екзогенними у середовищі, що впливає на морфогенез [38]. Що стосується вкорінення, вплив БА на ріст коренів залежав від концентрації [39], оскільки кореневі меристеми збільшувалися та призводили до швидшого росту та більш розгалуженого коріння під впливом цитокінінів, особливо БА, яка регулює активність меристем завдяки підвищеній експресії цитокініноксидази [40]. Підвищена мітотична активність у рослин, індукована БА, була пов'язана з більшою довжиною корінців та більшою кількістю ініційованих коренів [41].

Культитивування різних калюсних експлантатів (листя, черешка, кореня) *in vitro*.

Процес регенерації органів рослин контролюється відповідним співвідношенням концентрацій між ауксинами та цитокінінами, двома основними групами регуляторів росту рослин, які є важливими для стимулювання специфічних реакцій органогенезу з різних частин тканин (листя, черешок, корінь тощо), таким чином, взаємодія між цитокінінами та ауксинами є складною, а коріння, пагони та формування калюсу значно залежать від різних комбінацій та концентрацій регуляторів росту рослин [42], типу експланта та виду рослини [43]. Результати цього дослідження показали 100% індукцію калюсу у всіх випадках, незалежно від типу експланта, типів PGR та концентрацій. Поясненням реакції калюсування тут може бути підвищення рівня ендогенного ауксину на ріжучому краї кожної частини тканини (листя, черешок, корінь), що активує проліферацію клітин, особливо в середовищах, збагачених цитокінінами [44]. У кількох видах *Origanum* (*O. vulgare*, *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. syriacum*) [45], середовище MS, доповнене PGR, виявилось ефективним для утворення калюсу як з листових експлантатів [45, 46], так і з гіпокотильних експлантатів майорану (*O. majorana* L.) [47].

Склад середовища та джерело експлантату як комбінований фактор мали значний вплив на ініціацію калюсу та регенерацію рослин [48]. У досліджуваному *O. dictamnus* одночасне утворення калюсу (100%) та

регенерація пагонів (20%) було отримано експлантатами листя та черешків у середовищі ODK1 (20 мкМ ТДЗ + 5 мкМ ІМК). ТДЗ – це фенілсечовина, яка стимулює високу активність морфогенезу в тканинах рослин, особливо в листках [49], та активно бере участь у синтезі ауксину, підвищуючи рівень ендогенної ІОК та її попередника триптофану [50], демонструючи різні реакції регенерації залежно від генотипу та початкового типу експлантату [49]. У системах культури тканин було виявлено, що ТДЗ окремо або в поєднанні з ІМК є ефективним для реакцій регенерації пагонів [49]. Було показано, що ТДЗ проявляє як цитокініноподібну, так і ауксиноподібну активність порівняно з іншими поширеними ауксинами та цитокінінами, завдяки своїй здатності змінювати рівень ендогенних регуляторів росту рослин [51], і ця здатність може бути пов'язана зі збільшенням швидкості вироблення ендогенних цитокінінів та пригніченням активності ферментів цитокініноксидази [52], що забезпечує краще засвоєння поживних речовин та посилення регенерації [53].

Здатність калюсу до регенерації залежить від виду рослини, типу експлантату, компонентів середовища та ендогенних концентрацій PGR в результаті їх поглинання з позаклітинних джерел, а також їх метаболізму та ендогенної взаємодії [54]. Незважаючи на те, що рослинні клітини несуть однакову генетичну інформацію, їхня морфогенетична компетентність не є послідовною через відмінності, з одного боку, у просторовому та часовому розподілі клітин, а з іншого боку, в їх фізіологічній стадії та стадії розвитку [55]. У досліджуваному *O. dictamnus* після 10 місяців культивування спостерігалось утворення нового вторинного калюсу порівняно з початковим первинним лише кореневим калюсом при перенесенні з ODK2 (0,5 мкМ кінетину + 5 мкМ 2,4-Д) на середовище ODR0 (без PGR), та калюсом черешка з ODK2 на ODR3 (2,2 мкМ ВА + 0,25 мкМ ІВА + 0,3 мкМ ГК₃) або ODR0.

Попередні дослідження продемонстрували, що цитокінін ВА у певній концентрації може стимулювати субкультуру, диференціацію та регенерацію калюсу у великій кількості видів рослин [56]. У цьому дослідженні регенерація пагонів відбувалася лише через калюс, отриманий з листя, при перенесенні з

ODK1 на середовище ODR0 (без PGR) або середовище ODR2 (1,1 мкМ БА + ІМК+ ГК₃). Низький рівень регенерації пагонів з калюсу листя (10–30%) може бути пов'язаний з тривалим періодом підтримки (10 місяців) експлантатів у культурі [57]. Формування пагонів *in vitro* може змінюватися залежно від типів експлантатів, що використовуються [58]. Ехсандар та ін. [59] вказали на здатність калюсів до диференціації в зачатки пагонів після повторних субкультур у середовищі MS, що містить БА. Експлантати листя, отримані з калюсів, продемонстрували здатність до регенерації пагонів порівняно з експлантатами черешків та кореневих калюсів *O. dictamnus*, як представлено тут, і причинами такої реакції можуть бути (1) вища ювенільність та менша кількість судинної тканини в експлантатах листя та калюсу [60], (2) молоде листя є здоровими, не старіючими, багатими на поживні речовини тканинами, які містять вищі концентрації ендогенних гормонів [61] та (3) клітини листя мають вищий органогенний потенціал, ніж клітини черешків та коренів [62]. Регенерація коренів з експлантатів листя та калюсу *O. dictamnus* спостерігалася в перехідних комбінованих середовищах ODK2-ODR0 (без регуляторів росту рослин), тоді як експлантати черешків та калюсу диференціювалися в коріння у всіх протестованих середовищах для регенерації, як за відсутності регуляторів росту рослин, так і збагачених БА + ІМК + ГК₃. Регенерація пагонів *O. dictamnus in vitro* через калюс, отриманий з листя, та калюс, отриманий з черешка, а не через калюс кореневого походження, є дуже важливим кроком, оскільки вегетативні частини рослини є бажаними експлантатами для систем культури тканин завдяки їхній здатності зберігати генетичну гомозиготність батьківського генотипу [63].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Етапи мікроклонального розмноження

Сполуки, які забезпечують успішний ріст клітин і тканин рослин у культурі *in vitro*, а також процеси їх регенерації, поділяють на кілька основних груп: макро- та мікроелементи, джерела вуглецю й енергії, вітаміни, органічні сполуки азоту та фітогормони. Усі ці компоненти є необхідними складовими поживних середовищ, оскільки саме вони створюють оптимальні умови для росту, поділу та диференціації рослинних клітин.

Основу поживних середовищ становлять макроелементи, серед яких особливе значення мають азот, фосфор, сірка та залізо. Азот у більшості середовищ присутній у вигляді нітратів, а в окремих рецептурах, зокрема середовищах Мурасіге-Скуга та Гамборга В5, додатково використовують амонійні солі. Нітрати виступають головним джерелом азотного живлення і зазвичай вносяться у концентраціях від 2 до 25 мМ. Для інтенсивного росту калусних та суспензійних культур концентрацію нітратів і амонію іноді підвищують до 60 мМ. Доведено, що збільшення сирової маси клітинної суспензії прямо пов'язане з активним поглинанням нітратів та їх перетворенням на органічні сполуки. У суспензійній культурі тютюну *Nicotiana tabacum* описано енергозалежний механізм транспорту нітратів, який активується самими нітратами та пригнічується амінокислотами. Часткова заміна нітратного азоту амонійним позитивно впливає на ріст тканин та підвищує ефективність метаболічних процесів.

Фосфор є важливим елементом для формування калусних тканин та розвитку ізольованих органів. Його вносять у середовище переважно у вигляді ортофосфатів, хоча додатковим джерелом можуть бути й фосфати цукрів. Іони натрію, хлору та сульфатів необхідні у незначних кількостях, однак вони відіграють важливу роль у підтриманні осмотичного балансу та регуляції кислотності середовища. Джерелами сірки можуть бути сульфати, сульфіти, цистеїн, глутатіон або метіонін. Залізо вводять у вигляді неорганічних солей

або комплексних сполук органічних кислот. Для покращення доступності заліза в широкому діапазоні рН доцільно використовувати хелатуючі агенти, зокрема ЕДТА, які забезпечують стабільність цього елемента у поживному середовищі.

Крім макроелементів, важливими компонентами середовищ є мікроелементи – цинк, бор, марганець, молібден, мідь, кобальт та інші. Вони беруть участь у роботі ферментних систем, регулюють обмін речовин та впливають на інтенсивність фізіолого-біохімічних процесів у клітинах. Незважаючи на те, що ці елементи потрібні у незначних концентраціях, їх дефіцит може істотно пригнічувати ріст і розвиток тканин.

Одними з найважливіших компонентів поживних середовищ є вуглеводи, оскільки ізольовані клітини й тканини переважно не здатні до повноцінного автотрофного живлення. Найчастіше як джерело енергії використовують сахарозу або глюкозу в концентраціях 20–40 г/л. У деяких випадках застосовують мальтозу або інші вуглеводи. Полісахариди використовують рідко, проте окремі тканини, наприклад пухлинні, можуть засвоювати крохмаль завдяки активності гідролітичних ферментів.

Значну роль у рості й розвитку клітин відіграють вітаміни. Хоча їх дія в умовах мікроклонального розмноження вивчена не повністю, відомо, що вони активізують метаболізм і стимулюють клітинний поділ. Тіамін (вітамін В1) є коферментом у процесах перетворення вуглеводів та окислювального декарбоксилювання кетокислот. Піридоксин (вітамін В6) бере участь у реакціях переамінування амінокислот, а нікотинова кислота входить до складу окисно-відновних ферментів. До поживних середовищ також додають інозитол, пантотенову кислоту та біотин, які сприяють нормальному функціонуванню клітин.

Для регуляції росту і морфогенезу рослинних тканин використовують фітогормони – ауксини, цитокініни та гібереліни. Саме вони визначають напрямок диференціації клітин, утворення калюсу, пагонів або коренів. Оскільки різні тканини мають неоднакову здатність до синтезу власних

гормонів, їх розвиток значною мірою залежить від наявності екзогенних регуляторів росту. Для індукції калусоутворення найчастіше застосовують ауксини – індолілоцтову кислоту, α -нафтилооцтову кислоту та 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту. На початкових етапах культивування використовують підвищені концентрації ауксинів, а надалі їх вміст поступово знижують.

Цитокініни – кінетин, 6-бензиламінопурин, зеатин та інші – стимулюють поділ клітин і формування пагонів. Співвідношення ауксинів і цитокінінів визначає тип морфогенезу: високий рівень ауксинів сприяє формуванню коренів, тоді як перевага цитокінінів стимулює утворення пагонів і бруньок. Саме завдяки регулюванню гормонального складу середовища можна керувати процесами регенерації рослин *in vitro*.

На етапі укорінення експлантів особливе значення мають ауксини, які активізують ріст кореневої системи. Для цього використовують індоліл-3-оцтову кислоту, індолілмасляну кислоту або α -нафтилооцтову кислоту. В окремих випадках застосовують 2,4-Д, яка характеризується високою фізіологічною активністю.

Крім основних компонентів, до поживних середовищ можуть входити додаткові органічні речовини: гідролізат казеїну, кокосове молоко, екстракт дріжджів, бананове пюре, томатний або апельсиновий сік. Вони є джерелами амінокислот, вітамінів і природних стимуляторів росту. Аскорбінову та лимонну кислоти використовують як антиоксиданти для запобігання потемнінню тканин у процесі культивування. Через нестійкість до високих температур такі компоненти стерилізують методом мембранної фільтрації.

Для покращення укорінення та адсорбції токсичних сполук у поживні середовища нерідко додають активоване вугілля в концентраціях 0,1–3%. Воно сприяє розвитку коренів, зменшує накопичення інгібіторів росту та пригнічує небажане калусоутворення. Водночас використання активованого вугілля має певні недоліки, оскільки темне забарвлення середовища ускладнює контроль за розвитком мікроорганізмів.

Для приготування твердих поживних середовищ використовують агар-агар – полісахарид, отриманий із морських водоростей. Зазвичай його додають у концентраціях 0,3–0,7%. Важливим показником якості середовища є рН, оптимальне значення якого для більшості культур становить 5,5–5,8. За надто кислого середовища агар не утворює гелю, що негативно впливає на культивування тканин.

Для вирощування клітин, тканин та органів рослин у біотехнології найчастіше застосовують поживні середовища Мурасіге-Скуга, Уайта та Гамборга В5. Їх готують на основі маточних розчинів макро- і мікроелементів, вітамінів та фітогормонів, які зберігають у концентрованому вигляді для багаторазового використання. Процес приготування робочих середовищ включає розчинення сахарози, додавання солей, регуляторів росту, корекцію рН, введення агар-агару та подальшу стерилізацію в автоклаві.

2.2. Приготування живильного середовища

Послідовність приготування маточних розчинів макро-, мікроелементів та вітамінів.

На першому етапі відповідно до рецептури готують розчини макросолей: NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 та $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Кожну сіль розчиняють окремо у хімічних стаканах, використовуючи нагрівання для прискорення процесу розчинення. Винятком є $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, який розчиняють без нагрівання. Після повного розчинення компонентів усі розчини об'єднують і доводять дистильованою водою до кінцевого об'єму 1 л. Розчин $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ додають останнім у вже охолоджену суміш, що дозволяє уникнути утворення осаду.

Далі згідно з рецептурою готують окремий розчин CaCl_2 .

Наступним кроком є приготування розчину хелату заліза. Для цього використовують FeSO_4 та Na_2EDTA . Суміш нагрівають до кипіння для забезпечення повного утворення стабільного хелатного комплексу заліза.

Після цього окремо готують розчин мікроелементів відповідно до

складу поживного середовища.

Отримані маточні розчини макро- та мікроелементів розливають у окремі скляні ємності з притертими пробками, маркують та зберігають у холодильнику. Розчин хелату заліза рекомендується зберігати окремо у посудині з темного скла для запобігання руйнуванню під дією світла.

Концентровані розчини вітамінів готують окремо. Для цього використовують десятикратні наважки кожного вітаміну, які розчиняють у 10 мл дистильованої води. У результаті 1 мл такого розчину містить кількість вітаміну, необхідну для приготування 1 л поживного середовища за рецептурою Мурасіге-Скуга. Готові вітамінні розчини зберігають у замороженому стані у невеликих флаконах.

Приготування розчинів фітогормонів

Для приготування розчинів ауксинів (2,4-Д, ІОК, НОК) беруть 100 мг речовини та розчиняють її у 0,5–2 мл етанолу. Цитокініни – кінетин, зеатин і БАП – попередньо розчиняють у невеликій кількості 0,5 н розчину NaOH або KOH. Абсцизову кислоту (АБК) розчиняють у 70%-му етанолі.

Після розчинення більшість гормональних розчинів (за винятком АБК) злегка підігрівають і доводять дистильованою водою до об'єму 100 мл. Таким чином, 1 мл розчину містить 1 мг відповідного фітогормону. Готові розчини зберігають у холодильнику при температурі +4 °С не довше одного місяця.

На основі приготовлених маточних розчинів готують поживне середовище Мурасіге-Скуга, яке використовують для культивування калюсних тканин, апікальних меристем картоплі, суниці та інших рослинних об'єктів.

Послідовність приготування робочого поживного середовища об'ємом 1 л.

1. У хімічний стакан об'ємом 1 л наливають приблизно 400 мл дистильованої води.

Таблиця 2.1.

Основні складові компоненти Мурасіге-Скуга

Компонент	Наважка, г	Температура зберігання	Кількість маточного розчину для приготування 1л середовища, мл
Макросолі, г на 1 л маточного розчину			
KNO ₃	38	4	95
NH ₄ NO ₃	33		
KH ₂ PO ₄	3,4		
MgSO ₄ ·7H ₂ O або	7,4		
MgSO ₄ безводний	3,6		
CaCl ₂ ·2H ₂ O або	13,8	4°C	5
CaCl ₂ безводний	8,8		
Fe-хелат, мг на 100 мл маточного розчину			
Fe ₂ SO ₄ · 7H ₂ O	557	4°C	5
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	745		
Мікросолі, мг на 100 мл маточного розчину			
H ₃ BO ₃	620	4°C	1
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860		
KJ	83		
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	25		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5		
H ₃ BO ₃	620	4°C	1
Органічні компоненти, мг на 10 мл маточного розчину			
Мезоінозит	1000	- 20°C	по 1 мл
Нікотинова	5		

кислота			
Піридоксин HCl	5		
Тіамін HCl	5		
Гліцин	20		
Сахароза	-	кімнатна	30 г/л
Агар	-	кімнатна	7 г/л

2. Окремо відважують 30 г сахарози, додають її до води та ретельно розчиняють. Для прискорення процесу допускається легке підігрівання розчину.

3. До отриманого розчину додають необхідний об'єм маточного розчину макросолей – зазвичай 50 мл.

4. Потім вносять маточний розчин мікроелементів у кількості 1 мл.

5. Відповідно до рецептури середовища додають необхідні вітаміни та регулятори росту.

6. Після внесення всіх компонентів визначають рН середовища. Оптимальне значення має становити 5,6–5,8. За потреби рН коригують додаванням 0,1 н розчину КОН або NaOH для підвищення рН чи 0,1 н HCl для його зниження.

7. В іншому хімічному стакані в 300 мл дистильованої води розчиняють 7 г агар-агару. Суміш нагрівають при постійному перемішуванні до повного розчинення агару.

8. Гарячий агаризований розчин об'єднують із розчином солей, вітамінів та сахарози, після чого доводять загальний об'єм дистильованою водою до 1 л.

9. Готове поживне середовище розливають у пробірки приблизно на одну третину їх об'єму та закривають ватно-марлевими корками або алюмінієвою фольгою.

10. Заключним етапом є стерилізація середовища в автоклаві відповідно до встановленого режиму стерилізації.

2.3. Рослинний матеріал

Рослини вирощували окремо в горщиках з торфом, піском та перлітом (1:1:1, об./об./об.) у теплицях для декоративних рослин та поливали тричі на тиждень водопровідною водою щоранку.



Рис. 2.1. Зовнішній вигляд материнки звичайної.

2.4. Стерилізація експлантатів та умови культивування

Пагони, включаючи верхівкові бруньки однорічних рослин та довжиною 2 см, промивали під проточною водою протягом 30 хвилин. Експлантати занурювали на 20 хвилин у 0,1% HgCl_2 у витяжній шафі. Вузли промивали п'ять разів дистильованою водою, занурювали в 70% етанол на 1-2 хвилини, замочували в 20% NaOCl (4,6% активного хлору) протягом 20 хвилин, потім промивали стерилізованою дистильованою водою 4-5 разів у ламінар-боксі. Експлантати культивували на живильному середовищі Murashige and Skoog (MS) [11], що містило 3% сахарози, 7,5 г/л агару та різні концентрації 6-БАП (0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 та 2,5 мг/л) та ГК₃ (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 та 0,5 мг/л). рН середовища доводили до 5,6-5,7 за допомогою 1 N KOH та 1 N HCl. Експлантати поміщали в пробірки (один/пробірку) та інкубували при температурі 25°C та 16-годинному фотоперіоді. Експлантати субкультивували у скляні пробірки, що містили 15 мл того ж середовища кожні 4 тижні, загалом дві субкультивування. Пагони, отримані з вузлів, потім переносили в

середовище для вкорінення, яке містило різні концентрації індол-3-масляної кислоти (ІМК) (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 та 3 мг/л) та доповнювали 3% сахарозою та 7,5 г/л агару. Вкорінені саджанці віком два місяці та заввишки близько 15 см обережно виймали з пробірок, промивали коріння від агару та пересаджували у пластикові горщики діаметром 13 см, заповнені автоклавованим торфом та перлітом (1:1, об./об.), по одній рослині на горщик. Горщики з рослинами накривали прозорим пластиком, щоб запобігти втраті вологості, та поміщали в кімнату для вирощування, а листя обприскували водою тричі на день. Через 3 тижні саджанці пересаджували у 15-коміркові лотки у теплиці. Через 10 днів визначали кількість акліматизованих рослин та відсоток виживання. Експеримент був проведений за повністю рандомізованим планом (10 повторностей $\times$ 6 комбінацій регуляторів росту рослин (PPP)). Дані були статистично проаналізовані за допомогою програми Excel. Середні значення були розділені за критерієм найменшої значущої різниці (LSD) з рівнем ймовірності 0,05.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Вплив гіпохлориту натрію (NaOCl) на стерилізацію експлантатів пазушних бруньок материнки звичайної

Результати в таблиці 3.1 вказують на суттєві відмінності між різними концентраціями гіпохлориту натрію (NaOCl) та кількістю бруньок, що вижили за стерилізації 1% розчином гіпохлориту натрію (NaOCl). Кількість життєздатних бруньок почала зменшуватися зі збільшенням тривалості стерилізації понад 15 хвилин і досягла найбільшої кількості за використання 3% розчину гіпохлориту натрію (NaOCl). Найбільша середня кількість життєздатних бруньок була отримана за тривалості стерилізації 15 хвилин. Кількість життєздатних бруньок знижувалася до 27% за тривалості стерилізації 25 хвилин, тоді як найменша кількість 23% бруньок була досягнута при стерилізації 5 хвилин.

Таблиця 3.1

Вплив концентрації гіпохлориту натрію NaOCl (мг/л) та тривалості стерилізації (хвилини) на середню кількість життєздатних експлантатів

Час, хв	5	10	15	20	25	Середнє
Концентрація						
1	23	55	63	35	27	40,6
2	64	72	82	41	29	57,6
3	78	86	91	84	52	78,2
4	59	63	78	67	28	59
5	28	32	47	36	27	34
Середнє	50,4	61,6	72,2	52,6	32,6	

Результати статистичного аналізу показали, що середня кількість життєздатних бруньок була найбільшою за використання 3% розчину гіпохлориту натрію протягом 15 хвилин. Розчин гіпохлориту натрію, який використовували багато дослідників для поверхневої стерилізації частин

рослин, був ефективним і не пошкоджував експлантати при відповідних концентраціях [8]. Ці висновки подібні до висновків Іполіта [9], який зазначав, що високі концентрації гіпохлориту натрію можуть бути ефективними для стерилізації поверхневих частин рослин, культивованих *in vitro*, але це супроводжується їх загибеллю. Причиною може бути різний тип рослини та ступінь стійкого пошкодження.

3.2. Регенерація пагонів *O. vulgare* із пазушних меристем

Морфогенетичний потенціал пазушних меристем було оцінено на різних модифікаціях живильного середовища з додаванням цитокінінів (6-БАП, Кін та 2iP) у різних концентраціях (0,1–10,0 мг/л), було показано суттєвий вплив на індукцію множинних пагонів. Вузлові експлантати, культивовані на безгормональному живильному середовищі МС, служили контролем. В контролі не спостерігали індукції пазушних бруньок, які зрештою некротизувалися, тоді як присутність регуляторів росту в живильному середовищі сприяла індукції пазушних бруньок, і значну частоту регенерації було досягнуто при застосуванні різних регуляторів росту рослин. З трьох різних протестованих цитокінінів, 6-бензиламінопурин виявився ефективнішим за інші цитокініни щодо індукції та подальшої проліферації пагонів. Кілька пагонів утворювалися протягом 2–3 тижнів культивування, а максимальна частота (91%) спостерігалася на середовищі MS з додаванням 6-БАП (2,5 мг/л), на якому індукція пагонів становила $6,5 \pm 0,2$ пагонів з довжиною пагону ($4,6 \pm 0,4$ см) після 8 тижнів культивування.

6-БАП – це цитокінін, який сильно сприяє диференціації пагонів, і він широко використовується для цієї мети. Наприклад, Jaydip (2021) використовував 6-БАП для покращення системи регенерації пагонів верхівок пагонів добре відомих видів *O. dictamnus*, а Cioć et al. (2019) показали, що збільшення концентрацій 6-БАП підвищує ефективність мікророзмноження пагонів з *O. sipyleum* L. *in vitro*.



Рис. 3.1. Експлантати для мікроклонального розмноження *O. vulgare*.



Рис. 3.2. Рослини-регенеранти *O. vulgare* після чотирьох тижнів культивування на середовищі МС, доповненому 6-БАП і ГК₃.



Рис. 3.3. Рослини-регенеранти *O. vulgaris* після восьми тижнів культивування на середовищі МС, доповненому 0,5 мг/л 6-БАП і 0,2 мг/л ГК₃



Рис. 3.4. Рослини-регенеранти *O. vulgaris*, які використані для власне мікроклонального розмноження.

Пагін, включаючи апікальні бруньки, розрізали на сегменти довжиною 2 см та поміщали в живильне середовище MS, яке містило різні комбінації 6-БАП та ГК₃, для стимуляції росту та розвитку пагонів (рис. 3.1, 3.2). Найефективнішою комбінацією регуляторів росту для мікророзмноження була 0,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л ГК₃ (рис. 3.3, 3.4).

Після першого субкультивування більшість пагонів (5,1 пагонів/експлантат) утворилися на живильному середовищі MS, доповненому 0,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л ГК₃, але після другого субкультування на тому ж середовищі утворилося максимум 3,8 пагонів/експлантат (табл. 3.2). Пагони утворилися у 83% експлантатів у середньому за перше та друге субкультивування (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Мікроклональне розмноження *O. vulgare*

Регулятори росту та їхня концентрація	Кількість пагонів після 1 пасажу, шт	Кількість пагонів після 2 пасажу, шт	Частота регенерації, %
0,1 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ГК ₃	2,8±0,2	2,2±0,1	47±2,0
0,1 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л ГК ₃	3,5±0,2	2,8±0,1	51±2,0
0,5 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ГК ₃	4,1±0,1	3,7±0,2	62±4,0
0,5 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л ГК ₃	5,1±0,2	3,8±0,2	83±2,0
1,0 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ГК ₃	4,3±0,4	3,6±0,4	78±4,0
1,0 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л ГК ₃	3,8±0,2	3,2±0,2	71±2,0

Проліферація пазушних бруньок за допомогою методу *in vitro* вважається найбезпечнішою та найнадійнішою стратегією, яка зберігає генетичну однорідність одержаного посадкового матеріалу [15].

Різноманітні морфогенетичні реакції з різними концентраціями та комбінаціями регуляторів росту рослин були зареєстровані на вузлових та верхівкових експлантатах пагонів. Вплив різних регуляторів росту рослин на індукцію множинних пагонів з апікальних та пазушних бруньок був зареєстрований у багатьох лікарських рослин, таких як *Centella asiatica*, *Rauvolfia tetraphylla*; *Psoralea corylifolia*; *Asteracantha longifolia*; *Eclipta alba* [17, 20, 24]. Бруньки пагона розвивалися передчасно з вузлових сегментів та експлантатів верхівок пагонів, культивованих на живильному середовищі MS, доповненому різними цитокінінами. Ці бруньки розмножувалися, утворюючи кластери вторинних та третинних пагонів. Серед різних протестованих цитокінінів, максимальна індукція утворення бруньок пагона та проростання пагона була отримана на середовищі MS, доповненому 6-БАП (2,5 мкМ) як з вузлових сегментів, так і з експлантатів кінчиків пагона, а потім Кін та 2-іР. Перевага 6-БАП над іншими цитокінінами в системі культивування тканин була добре продемонстрована в низці досліджень на ранніх стадіях з використанням різноманітних експлантатів, таких як *Cucumis sativus*; *Adhatoda vasica*; *Ocimum basilicum*; *Gynura procumbens*; *Vitex negundo* [18-20]. Природні рибозиди та нуклеотиди в цитокініні 6-БАП є відносно стабільнішими порівняно з іншими цитокінінами [25], що є одним з можливих пояснень отриманої покращеної реакції. Спостерігалася лінійна кореляція між 6-БАП до оптимального рівня та кількістю пагонів на експлантат. Навпаки, вища концентрація 6-БАП понад оптимальний рівень (2,5 мкМ) пригнічувала загальну частоту проростання пагонів, їх кількість та довжину. Зниження потенціалу регенерації, ймовірно, було пов'язане зі шкідливим впливом високої концентрації на клітини, що зумовлені формуванням вегетативних бруньок. Зменшення кількості пагонів при концентрації, вищій за оптимальний рівень, було зареєстровано у різних лікарських рослин,

включаючи *Ruta graveolens*; *Eclipta alba* та *Tylophora indica* [32]. Порівняння відносної ефективності різних цитокинінів для формування кількох пагонів показало порядок ефективності: 6-БАП>Кін>2-іР.

3.3. Вплив індолілмасляної кислоти на укорінення одержаних рослин-регенерантів *O. vulgare*

Здорове та міцне коріння має вирішальне значення для успішної акліматизації та пересадки регенерованих рослин, а гормон росту індолілмасляна кислота зазвичай застосовується для індукції кореневої системи. Тому пагони, що утворилися з експлантів, збирали та переносили на живильне середовище МС з вибраними концентраціями ІМК, а через 30 днів фіксували ефективність укорінення. Частота індукції коренів була значно вищою при додаванні ІМК, ніж за її відсутності, але суттєвої різниці в цьому відношенні між обробками вибраними концентраціями ІМК не було. Час укорінення також був значно коротшим при додаванні ІМК, ніж за її відсутності. Збільшення концентрації ІМК збільшувало довжину коренів, але не мало суттєвого впливу на кількість коренів. Збільшення концентрації ІМК призводило до утворення калюсу, що не підходить для акліматизації розсади.

Після першого та після другого субкультивування рослини переносили на середовище для вкорінення, що містило різні концентрації ІМК (рис. 3.5). ІМК у концентрації 1,5 або 2,5 мг/л індукувала утворення більшості коренів (у 72,3% пагонів) (рис. 3.6, 3.7; табл. 3.3). У контролі (без ауксину) коріння не утворювалося (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Концентрація ІМК	Частота укорінення, %
0 мг/л	0±0
0,5 мг/л	48,6±2,4
1,0 мг/л	51,8±3,2
1,5 мг/л	72,3±1,6

2,0 мг/л	54,2±1,8
2,5 мг/л	71,4±2,2
3,0 мг/л	58,7±2,0



Рис. 3.5. Формування множинних пагонів на середовищі МС з додаванням 0,5 мг/л 6-БАП і 0,2 мг/л ГК₃



Рис. 3.6. Укорінені рослини-регенеранти *O. vulgare* на середовищі МС з додаванням ІМК.



Рис. 3.7. Укорінені рослини-регенеранти *O. vulgare* після 8 тижнів культивування.

3.4. Вплив різних ґрунтових сумішей на адаптація рослин-регенерантів *O. vulgare*

Добре вкорінені рослини-регенеранти були пересаджені в різні ґрунтові суміші. Спостерігали вплив різних комбінацій ґрунту на середній відсоток виживання саджанців через один місяць після пересадки. на кількість листя, довжину листя та ширину листя. Рослини-регенеранти, вирощені на чистому торфі, продемонстрували 86% виживання та розвинули значно більшу кількість листя та довжину листя, ніж інші варіанти. Сам по собі торф продемонстрував значно найвищий рівень виживання (84%) саджанців у теплиці, ніж інші ґрунтові суміші. Більше того, було зазначено, що торф значно збільшив ріст та енергію саджанців, а також набув швидкого зростання саджанців порівняно з іншими ґрунтовими сумішами. Крім того, загальний рівень виживання саджанців, пересаджених на перліт + торф (1:1), становив 72,5%, що є значно нижчим показником. Протягом першого тижня після пересадки висока вологість була вирішальною для виживання рослин, тому всі рослини були накриті поліетиленовими пластиковими плівками для підтримки вологості (рис. 3.8). Рослини материнки звичайної були пересаджені у більші

пластикові горщики після трьох місяців після пересадки (рис. 3.8).

Рослини акліматизували в торфї та перліті, а потім адаптували до ґрунту. Рослини, отримані з середовища для вкорінення з ІМК 1,5 мг/л, показали найкращу акліматизацію (виживання 86,2%) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Кількість акліматизованих рослин та їх відсоток виживання

Концентрація ІМК	Кількість адаптованих рослин- регенерантів, шт	Життєздатність, %
0 мг/л	0±0	0±0
0,5 мг/л	34,4±0,2	69,4±2,0
1,0 мг/л	36±0,1	72,3±1,6
1,5 мг/л	46±0,2	86,2±1,8
2,0 мг/л	42±0,4	84,2±1,8
2,5 мг/л	36,5±0,2	73,2±2,0
3,0 мг/л	34,4±0,4	68,9±2,0



Рис. 3.8. Адаптовані рослини-регенеранти *O. vulgare*

ВИСНОВКИ

1. Після стерилізації гіпохлоритом натрію найбільша середня кількість здорових бруньок була отримана за використання 3% розчину і тривалість стерилізації становила 15 хвилин.
2. Встановлено, що найвища проліферація бруньок спостерігалася в експлантатах пазушних бруньок протягом 8 тижнів культивування і була виявлена кращою порівняно з експлантатами верхівок пагонів для індукції та проліферації пагонів.
3. Найефективнішою комбінацією регуляторів росту для мікророзмноження була 0,5 мг/л 6-БАП та 0,2 мг/л ГК₃
4. Показано, що середовище MS з 1,5 мг/л ІМК є найбільш придатним з протестованих середовищ для вкорінення, оскільки на цьому середовищі спостерігали утворення меншої кількості калюсу та більшої кількості коренів.
5. Рослини, отримані з середовища для вкорінення з ІМК 1,5 мг/л, показали найкращу акліматизацію (виживання 86,2%).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bahar, N.H.A.; Lo, M.; Sanjaya, M.; Van Vianen, J.; Alexander, P.; Ickowitz, A.; Sunderland, T. Meeting the Food Security Challenge for Nine Billion People in 2050: What Impact on Forests? *Glob. Environ. Chang.* 2020, 62, 102056
2. Hemanthakumar, A.S.; Preetha, T.S. Macro- and Micropropagation of Plants for Income Generation. In *Conservation and Sustainable Utilization of Bioresources*; Springer Nature: Singapore, 2023; pp. 409–450.
3. Lasley, B.L.; Loskutoff, N.M.; Anderson, G.B. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species. *Theriogenology* 1994, 41, 119–132.
4. Chandran, H.; Meena, M.; Barupal, T.; Sharma, K. Plant Tissue Culture as a Perpetual Source for Production of Industrially Important Bioactive Compounds. *Biotechnol. Rep.* 2020, 26, e00450
5. Abdalla, N.; El-Ramady, H.; Seliem, M.K.; El-Mahrouk, M.E.; Taha, N.; Bayoumi, Y.; Shalaby, T.A.; Dobránszki, J. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae* 2022, 8, 677.
6. Bertsouklis, K.; Kartsonas, E.; Carra, A. Seed Germination and Micropropagation of Ornamental Plants. *Horticulturae* 2024, 10, 541.
7. Bettoni, J.C.; Wang, M.-R.; Wang, Q.-C. In Vitro Regeneration, Micropropagation and Germplasm Conservation of Horticultural Plants. *Horticulturae* 2024, 10, 45
8. George, I.E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.-J.; (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. In *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 3rd ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2008; Volume 1, The Background; pp. 353–355.
9. Ozyigit, I.I.; Dogan, I.; Hocaoglu-Ozyigit, A.; Yalcin, B.; Erdogan, A.; Yalcin, I.E.; Cabi, E.; Kaya, Y. Production of Secondary Metabolites Using Tissue Culture-Based Biotechnological Applications. *Front. Plant Sci.* 2023, 14, 1132555
10. Debnath, S.C.; Vyas, P.; Goyali, J.C.; Igamberdiev, A.U. Morphological and Molecular Analyses in Micropropagated Berry Plants Acclimatized under Ex Vitro Condition. *Can. J. Plant Sci.* 2012, 92, 1065–1073.

11. Taji, A.; Kumar, P.; Lakshmanan, P. In Vitro Plant Breeding; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2024.
12. Yancheva, S.; Kondakova, V. Plant Tissue Culture Technology: Present and Future Development. In Bioprocessing of Plant In Vitro Systems; Springer: Cham, Switzerland, 2018; pp. 39–63.
13. Costa, G.F.D.; Cabral, P.D.S.; Silva, F.G.; Rubio Neto, A.; Mendonça, M.A.C. Clonal Fidelity and Genetic Diversity of Micropropagated *Hancornia Speciosa* Gomes (Apocynaceae) as Evaluated by Molecular Markers. *Forests* 2022, 13, 1645.
14. Debnath, S.C. Molecular Markers for Genetic Fidelity During In Vitro Propagation of Horticultural Crops. *Acta Hortic.* 2012, 929, 459–465.
15. Venkatachalam, L.; Sreedhar, R.V.; Bhagyalakshmi, N. Micropropagation in Banana Using High Levels of Cytokinins Does Not Involve Any Genetic Changes as Revealed by RAPD and ISSR Markers. *Plant Growth Regul.* 2007, 51, 193–205.
16. Debnath, S. Bioreactors and Molecular Analysis in Berry Crop Micropropagation—A Review. *Can. J. Plant Sci.* 2011, 91, 147–157.
17. Kundu, S.; Barua, R.; Marshall, H.D.; Siow, Y.L.; Igamberdiev, A.U.; Debnath, S.C. Somatic Embryogenesis in *Vaccinium vitis-Idaea* L.: A High-Fidelity Micropropagation Approach Producing True-to-Type Plants with Enhanced Phytochemical Profiles. *Plant Cell Tissue Organ Cult. (PCTOC)* 2025, 161, 37.
18. Gupta, R.; Modgil, M.; Chakrabarti, S.K. Assessment of Genetic Fidelity of Micropropagated Apple Rootstock Plants, EMLA 111, Using RAPD Markers. *Indian J. Exp. Biol.* 2009, 47, 925–928.
19. Amin, A.; Sharma, N.; Sultan, P.; Gandhi, S.G.; Srinivas, K.; Hassan, Q.P.; Ahmed, Z. In Vitro Propagation of *Bergenia Stracheyi*: An Alternative Approach for Higher Production of Valuable Bioactive Compounds. *Vegetos* 2024, 1–10.
20. Khezri, M.; Asghari-Zakaria, R.; Zare, N. Plant Cell and Tissue Culture: Propagation, Improvement, and Conservation of Medicinal Plants.

In Biosynthesis of Natural Products in Plants; Springer Nature: Singapore, 2024; pp. 267–291.

20. Mohapatra, P.; Ray, A.; Jena, S. Evaluation of Genetic Stability of In Vitro Raised Orchids Using Molecular-Based Markers. In Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops; Springer Nature: Singapore, 2022; pp. 293–316.

21. Dorani, E.; Dehghanian, Z.; Gougerdchi, V.; Hamedpour-Darabi, M. Application of Somaclonal Variation in Crop Improvements. In Plant Mutagenesis; Springer: Cham, Switzerland, 2024; pp. 93–109.

22. Nath, J.; Kumari, A.; Joshi, S.; Gusain, S.; Kumari, K.; Patial, M.; Rawat, M.; Joshi, R. Micropropagation Technology for Improvement of Ornamental Plants. In Ornamental Horticulture: Latest Cultivation Practices and Breeding Technologies; Springer Nature: Singapore, 2024; pp. 121–149.

23. Reuveni, O.; Golubowicz, S.; Israeli, Y. Factors Influencing the Occurrence of Somaclonal Variations in Micropropagated Bananas. *Acta Hortic.* 1993, 336, 357–364.

24. Larkin, P.J.; Scowcroft, W.R. Somaclonal Variation—A Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theor. Appl. Genet.* 1981, 60, 197–214.

25. Bairu, M.W.; Aremu, A.O.; Van Staden, J. Somaclonal Variation in Plants: Causes and Detection Methods. *Plant Growth Regul.* 2011, 63, 147–173.

26. Leva, A.R.; Petruccelli, R.; Rinaldi, L.M.R. Somaclonal Variation in Tissue Culture: A Case Study with Olive. In Recent Advances in Plant In Vitro Culture; InTech: London, UK, 2012.

27. Duta-Cornescu, G.; Constantin, N.; Pojoga, D.-M.; Nicuta, D.; Simon-Gruita, A. Somaclonal Variation—Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 838.

28. Lindner, M.; Verhagen, I.; Mateman, A.C.; van Oers, K.; Laine, V.N.; Visser, M.E. Genetic and Epigenetic Differentiation in Response to Genomic Selection for Avian Lay Date. *Evol. Appl.* 2024, 17, e13703.

29. Hasnain, A.; Naqvi, S.A.H.; Ayesha, S.I.; Khalid, F.; Ellahi, M.; Iqbal, S.; Hassan, M.Z.; Abbas, A.; Adamski, R.; Markowska, D.; et al. Plants In Vitro Propagation with Its Applications in Food, Pharmaceuticals and Cosmetic Industries; Current Scenario and Future Approaches. *Front. Plant Sci.* 2022, 13, 1009395.
30. Savita; Pati, P.K.; Virk, G.S.; Nagpal, A. An Efficient Somatic Embryogenesis Protocol for Citrus jambhiri and Assessment of Clonal Fidelity of Plantlets Using RAPD Markers. *J. Plant Growth Regul.* 2015, 34, 309–319.
31. Hussien, E.T.; Ahmed, M.F.; Ahmed, E.Z. Biometric Measurements and Genetic Instability Assessment of In Vitro Micro-Shoots Culture of Populus alba. *Plant Physiol. Rep.* 2022, 27, 398–406.
32. Shukla, S.; Bhutani, R.; Gupta, N.; Shukla, S.K.; Raman, T.; El-Sheikh, M.A.; Elansary, H.O.; Moussa, I.M. Studies on banana for propagation, conservation and genome analysis. *Cogent Food Agric.* 2025, 11, 2447898.
33. Gimenez, M.D.; Yañez-Santos, A.M.; Paz, R.C.; Quiroga, M.P.; Marfil, C.F.; Conci, V.C.; García-Lampasona, S.C. Assessment of Genetic and Epigenetic Changes in Virus-Free Garlic (*Allium sativum* L.) Plants Obtained by Meristem Culture Followed by In Vitro Propagation. *Plant Cell Rep.* 2016, 35, 129–141.
34. Verma, D.; Ansari, M.W.; Agrawal, G.K.; Rakwal, R.; Shukla, A.; Tuteja, N. In Vitro Selection and Field Responses of Somaclonal Variant Plants of Rice Cv PR113 for Drought Tolerance. *Plant Signal. Behav.* 2013, 8, e23519.
35. Ali, A.; El-Denary, M.; El-Gendy, A.; Galal, O.; Mohamed, M.; El Sayed, T. Morphological Evaluation of Some Tomato Somaclones Variation under Field Conditions. *J. Plant Prod.* 2018, 9, 833–838.
36. Hannachi, S.; Werbrouck, S.; Bahrini, I.; Abdelgadir, A.; Affan Siddiqui, H. Agronomical, Physiological and Biochemical Characterization of In Vitro Selected Eggplant Somaclonal Variants under NaCl Stress. *Plants* 2021, 10, 2544.
37. Biernacik, B.; Słomnicka, R.; Kaźmińska, K.; Mużacz, S.; Bartoszewski, G. A Single Nucleotide Substitution Introducing Premature Stop

Codon within CsTFL1 Explains the Determinate-2 Phenotype in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Sci. Rep.* 2024, 14, 25368.

38. Geem, K.R.; Lee, Y.-J.; Lee, J.; Hong, D.; Kim, G.-E.; Sung, J. Role of Carrot (*Daucus carota* L.) Storage Roots in Drought Stress Adaptation: Hormonal Regulation and Metabolite Accumulation. *Metabolites* 2025, 15, 56.

39. Ferreira, M.d.S.; Rebouças, T.A.; Rocha, A.d.J.; Oliveira, W.D.d.S.; Santos, A.C.L.S.d.; Jesus, J.P.F.L.d.; Ramos, A.P.d.S.; Ferreira, C.F.; Santos-Serejo, J.A.d.; Haddad, F.; et al. Selection and Characterization of Somaclonal Variants of Prata Banana (AAB) Resistant to Fusarium Wilt. *Agronomy* 2024, 14, 1740

40. Cui, X.; Liu, Q.; Luo, Y.; Zhu, P.; Guan, P.; Zhang, J. Study on Influencing Factors of Embryo Rescue and Germplasm Innovation in Seedless Grape. *Plant Cell Tissue Organ Cult. (PCTOC)* 2024, 157, 24.

41. Joshi, A.; Tripathi, A.; Sharma, N.; Tailor, A. Somaclonal Variation for the Improvement of Tree Species. In *Biotechnological Approaches for Sustaining Forest Trees and Their Products*; Springer Nature: Singapore, 2024; pp. 77–102.

42. Huang, H.; Ullah, F.; Zhou, D.-X.; Yi, M.; Zhao, Y. Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 800.

43. Akçam E, Yürekli AK (1993). Callus culture studies on *Origanum spyleum* L. species. *J. Fac. Sci. Ege Univ.* 15(1): 21-25.

44. Azad MAK, Yokota S, Ishiguri F, Yoshizawa N (2006). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of a medicinal plant, *Phellodendron amurense* rupestris. *In vitro: Cell Dev. Biol. Plant.* 42(6): 502-506.

45. Baker KHC (2002). The Turkish *Origanum* species. In: Kintzios SE (ed) *The Genera Origanum and Lippia, Medicinal And Aromatic Plants- Industrial Profiles*, CRC Press, USA, pp. 109-126.

46. Goleniowski ME, Flamarique C, Bima P (2003). Micropropagation of Oregano (*Origanum vulgare* x 3 APPLII) from meristem tips. *In vitro: Cell Dev. Biol. Plant.* 39: 125-128.

47. Kadota M, Niimi Y (2003). Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar stocks. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 261-265.
48. Moreno-Fortunato I, Avato P (2008). Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 93(2): 139-149.
49. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
50. Nadeem M, Palni LMS, Purohit AN, Pandey H, Nandi SK (2000). Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: An important medicinal herb. *Biol. Conserv.* 92: 121-129.
51. Nalawade SM, Sagare AP, Lee CY, Kao CL, Tsay HS (2003). Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Acad. Sin.* 44: 79-98.
52. Ozkan G, Sagdic O, Ekici I, Ozturk I, Ozcan MM (2007). Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract and its antioxidant and antibacterial activities. *J. Food Lipids*, 141(2): 157-169.
53. Özçelik H (2000). Studies on protections of endemic and rare plants of Lakes region. *Bull. Pure Appl. Sci.* 19B: 93-116.
54. Paster N, Menasherov M, Shaaya E, Juven B, Ravid U (1993). The use of essential oils applied as fumigants to control mycotoxigenic fungi attacking stored grain. *Hassadeh.* 74: 25-27.
55. Schiuma G (1999). Propuesta de reglamentacion para la proteccion de la flora silvestre de aromaticas y medicinales. In: du Tucuman SM (ed) Congreso Nacional de Recursos Naturales, Aromaticas y Medicinales, SAIPA, Argentina, pp. 20-23.
56. Socorro O, Tarrega I, Rivas F (1998). Essential oils from wild and micropropagated plants of *Origanum bastetanum*. *Phytochemistry*, 48(8): 1347-1349.

57. Thomas TT, Philip B (2005). Thidiazuron induced high-frequency shoot organogenesis from leaf-derived callus of a medicinal climber, *Tylophora indica* (Burm.F) Merrill. *In vitro: Cell Dev. Biol. Plant.* 41: 124-128.
58. Ueno K, Shetty K (1998). Prevention of hyperhydricity in oregano shoot cultures is sustained through multiple subcultures by selected polysaccharide-producing soil bacteria without re-inoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 119-124.
59. Vokou D, Kokkini S, Bessiere JM (1993). Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochem. Syst. Ecol.* 21: 287-295.
60. Webster CA, Jones OP (1989). Micropropagation of apple rootstock M9: Effect of sustained subculture on apparent rejuvenation in vitro. *J. Hort. Sci.* 64: 421-428.
61. Zhu LH, Yuan-Li X, Welander M (2005). Optimization and growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. In: Hvoslef AK, Preil W (eds), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, Cost Action 843 (Project), Springer, pp. 253-261.