

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-3-2651>
<https://elibrary.ru/TEEUTB>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Сравнительная оценка действия цитокининов на морфогенез и накопление фенольных соединений у *Hyssopus officinalis* в культуре *in vitro*



Е. А. Попова*, О. В. Кригер

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Поступила в редакцию: 28.04.2026

Принята после рецензирования: 30.05.2026

Принята к публикации: 07.07.2026

*e-mail: elena_popova97@mail.ru

© Е. А. Попова, О. В. Кригер, 2026



Аннотация.

Hyssopus officinalis L. – эфиромасличная культура семейства *Lamiaceae* (Яснотковые), которая ценится за фенольные соединения, флавоноиды и гидроксикоричные кислоты, обуславливающие ее фармакологический потенциал. Применение биотехнологических методов *in vitro* открывает возможность направленно влиять на морфогенез и синтез вторичных метаболитов путем добавления регуляторов роста в питательную среду, что делает актуальным поиск их оптимальных концентраций. Цель исследования – изучить влияние регуляторов роста цитокининового типа на микроразмножение и содержание биологически активных веществ у *H. officinalis* в условиях *in vitro*.

Объектом исследования служили микрорастения *in vitro* *H. officinalis* сорта Лекарь. Стерилизацию семян проводили с применением четырех дезинфицирующих агентов (H_2O_2 , $AgNO_3$, $NaClO$ и H_2SO_4), после чего семена высевали на среду Мурасиге-Скуга без регуляторов роста. Проростки культивировали на среде, дополненной различными концентрациями цитокининов (6-бензиламинопурина, кинетина, тидиазурона и 6-(γ , γ -диметилаллиламино)пурина), при 16-часовом фото-периоде и температуре 25 ± 1 °C в течение 30 суток. В полученных экстрактах микрорастений спектрофотометрически определяли суммарное содержание фенольных соединений, флавоноидов, гидроксикоричных кислот и антиоксидантную активность. Статистическую обработку данных выполняли с использованием однофакторного дисперсионного анализа и иерархического кластерного анализа.

Установлено, что обработка семян *H. officinalis* концентрированной серной кислотой обеспечила 98 % стерильности и 99 % всхожести, что превосходит ранее опубликованные данные. Среди регуляторов роста наиболее эффективным для морфогенеза оказался 6-бензиламинопурин в концентрации 0,1 мг/л, обеспечивший максимальную длину побегов (4,6 см), их количество (3,2 шт.) и число узлов (9,6 шт.). Кластерный анализ подтвердил, что оптимальными для развития микрорастений являются концентрации 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина, 1,0 мг/л кинетина и 0,1 мг/л тидиазурона. При оценке биологической активности 6-бензиламинопурина (0,1 мг/л) максимально увеличивал содержание фенольных соединений (в 5 раз), гидроксикоричных кислот (в 5 раз) и антиоксидантную активность, тогда как тидиазурон (0,1 мг/л) селективно стимулировал накопление флавоноидов.

Разработанные для *H. officinalis* подходы к стерилизации семян и подбору регуляторов роста для микроразмножения обеспечивают получение растительного сырья с заданным биохимическим профилем.

Ключевые слова. *Hyssopus officinalis*, микроразмножение *in vitro*, регуляторы роста, фенольные соединения, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, антиоксидантная активность

Для цитирования: Попова Е. А., Кригер О. В. Сравнительная оценка действия цитокининов на морфогенез и накопление фенольных соединений у *Hyssopus officinalis* в культуре *in vitro*. Техника и технология пищевых производств. 2026. Т. 56. № 3. С. 481–491. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-3-2651>

Effect of Cytokinins on Morphogenesis and Accumulation of Phenolic Compounds in *Hyssopus officinalis*: A Comparative Study *in vitro*



Elena A. Popova*^{ORCID}, Olga V. Kriger^{ORCID}

Immanuel Kant Baltic Federal University^{ORCID}, Kaliningrad, Russia

Received: 28.04.2026
 Revised: 30.05.2026
 Accepted: 07.07.2026

*e-mail: elena_popova97@mail.ru
 © E.A. Popova, O.V. Kriger, 2026



Abstract.

Hyssopus officinalis L. is a valuable essential oil plant of the *Lamiaceae* family, which owes its pharmacological properties to phenolic compounds, flavonoids, and hydroxycinnamic acids. Cultivation *in vitro* makes it possible to control morphogenesis and the accumulation of secondary metabolites by adding growth regulators to the nutrient medium. Since this requires knowledge of optimal concentrations, the aim of this *in vitro* study was to investigate the effect of cytokinin-type growth regulators on the micropropagation and content of bioactive substances in *H. officinalis*.

The research featured *in vitro* microplants of *H. officinalis* (cv. Lekar). The seeds were sterilized using H₂O₂, AgNO₃, NaClO, and H₂SO₄ as disinfectants. They were then sown on a Murashige and Skoog medium without growth regulators. The resulting seedlings were cultured on a medium supplemented with different concentrations of cytokinins (6-benzylaminopurine, kinetin, thidiazuron, and 6-(γ,γ-dimethylallylamino)purine). The experiment lasted for 30 days under a 16/8-h light/dark regimen at 25 ± 1°C. The obtained microplant extracts underwent spectrophotometry to determine the total contents of phenolic compounds, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and antioxidant activity. Statistical data processing was performed using a one-way analysis of variance and hierarchical cluster analysis.

The treatment of *H. officinalis* seeds with concentrated sulfuric acid resulted in 98% sterility and 99% germination, exceeding previously published data. Among the growth regulators, 6-benzylaminopurine at 0.1 mg/L was found to be the most effective for morphogenesis, resulting in the highest shoot length (4.6 cm), shoot number (3.2), and node number (9.6). Cluster analysis confirmed that concentrations of 0.1 mg/L 6-benzylaminopurine, 1.0 mg/L kinetin, and 0.1 mg/L thidiazuron were optimal for microplant development. In terms of bioactivity, 6-benzylaminopurine (0.1 mg/L) maximally increased the content of phenolic compounds (5-fold), hydroxycinnamic acids (5-fold), and antioxidant activity, while thidiazuron (0.1 mg/L) selectively stimulated flavonoid accumulation.

The novel methods of seed sterilization combined with specific growth regulators for *H. officinalis* ensured the production of plant material with a targeted biochemical profile.

Keywords. *Hyssopus officinalis*, micropropagation *in vitro*, growth regulators, phenolic compounds, flavonoids, hydroxycinnamic acids, antioxidant activity

For citation: Popova EA, Kriger OV. Effect of Cytokinins on Morphogenesis and Accumulation of Phenolic Compounds in *Hyssopus officinalis*: A Comparative Study *in vitro*. Food Processing: Techniques and Technology. 2026;56(3):481–491. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-3-2651>

Введение

В настоящее время наблюдается устойчивый рост глобальной тенденции к фитотерапии, которая является неотъемлемой частью традиционной медицины как в России, так и в других странах мира [1]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, примерно 80 % населения в развивающихся странах используют традиционные средства природного происхождения для лечения и профилактики заболеваний [2].

Многие растения обладают антиоксидантным, антибактериальным, противовирусным, спазмолитическим, противовоспалительным и цитотоксическим действием, что делает их перспективными источниками ценных

биологически активных веществ [3–8]. Возрастающий интерес к лекарственным растениям стимулирует разработку биотехнологических методов их сохранения и рационального использования.

Семейство Яснотковые (*Lamiaceae*) объединяет более 230 родов и около 7000 видов ароматических растений, многие из которых принадлежат к лекарственным [3, 5, 8–10]. *Hyssopus officinalis* L. – типичный представитель данного семейства, традиционно используемый в фитотерапии [3]. Наличие комплекса биологически активных соединений в различных органах *H. officinalis* обуславливает его выраженные фармакологические свойства. Фитохимические компоненты

растения, включая фенольные соединения, флавоноиды, полисахариды и дубильные вещества, обеспечивают широкий спектр терапевтических эффектов: антиоксидантные, противосудорожные, противогрибковые, противомикробные, антигемолитические, противовоспалительные и спазмолитические свойства [3, 8, 10–12].

Особый интерес представляют фенольные соединения и флавоноиды, которые не только определяют адаптационный потенциал растения, но и служат маркерами качества при производстве фитопрепаратов [13, 14]. Гидроксикоричные кислоты вносят основной вклад в антиоксидантную активность экстрактов *H. officinalis* [3]. Накопление этих метаболитов существенно варьируется в зависимости от условий выращивания, что создает трудности при стандартизации сырья, полученного из природных популяций или в результате традиционного культивирования [12].

Использование традиционного лекарственного растительного сырья сопряжено с рядом ограничений: истощение природных популяций ценных видов, риск их исчезновения, а также зависимость от сезона сбора, географического местопрорастания и вариабельности химического состава сырья [15]. Кроме того, заготовка дикорастущих растений не всегда позволяет получить материал с воспроизводимым содержанием целевых соединений, что является критичным для фармацевтической промышленности.

Традиционные методы размножения *H. officinalis* (семенной и черенкование) часто сопряжены с низкой всхожестью семян, медленным ростом и риском передачи патогенов. В связи с этим методы микроклонального размножения *in vitro* представляют собой перспективную альтернативу, позволяющую получать генетически однородный посадочный материал с высоким коэффициентом размножения и воздействовать на метаболизм растений через модификацию питательной среды [16]. Микроразмножение *in vitro* выступает в качестве перспективного биотехнологического инструмента, который позволяет получать целевые лекарственные соединения, а также обеспечивать устойчивое сохранение и рациональное использование биоразнообразия [16].

Добавление в питательную среду регуляторов роста не только позволяет контролировать процессы морфогенеза в растениях, но и оказывать влияние на накопление вторичных метаболитов [17]. Цитокинины – один из ключевых классов фитогормонов, участвующих в регуляции деления клеток, дифференцировки побегов и синтеза фенольных соединений. Разные представители цитокининов обладают различной активностью и могут неодинаково влиять на метаболизм растений в культуре *in vitro* [17]. Механизмы их действия включают активацию транскрипционных факторов, регуляцию экспрессии генов биосинтеза фенилпропаноидов, а также модуляцию гормонального баланса.

Подтверждением этого служат исследования, проведенные на близкородственных видах, таких как *Melissa*

и *Lallemantia* [18, 19]. Например, в исследовании влияния регуляторов роста растений на микроразмножение *in vitro* и метаболические профили *Melissa officinalis* L. показано, что растения, выращенные на среде Мурасиге-Скуга, обогащенной 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), продемонстрировали максимальное содержание общих фенолов [20].

Для *H. officinalis* выявлено, что БАП эффективно индуцирует образование побегов [21–23]. В литературе представлено сравнительное изучение трех цитокининов (БАП, кинетин (КИН), тидиазурина (ТДЗ)) в концентрации 1 мг/л: максимальное содержание фенольных соединений и флавоноидов достигалось при добавлении ТДЗ [15]. Имеются данные о влиянии минерального состава и аэрации на накопление флавоноидов у *H. officinalis* сорта Лекарь [25], а также о действии БАП на рост сорта Иней [26]. Однако комплексное влияние широкого диапазона концентраций четырех цитокининов (БАП, КИН, ТДЗ и 6-(γ , γ -диметилаллил)амино)пурина (2iP)) на морфогенетические параметры и накопление фенольных соединений, флавоноидов, гидроксикоричных кислот и антиоксидантную активность у *H. officinalis* ранее не изучалось. Особый интерес представляет цитокинин 2iP, который широко используется в культуре *in vitro* многих растений, но его действие на *H. officinalis* до сих пор не исследовано.

Цель исследования – изучить влияние регуляторов роста цитокининового типа на микроразмножение и содержание биологически активных веществ у *H. officinalis* в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись микрорастения *in vitro* *Hyssopus officinalis* L. сорта Лекарь, полученные из семян фирмы «Гавриш» (Россия). Подготовка семян *H. officinalis* для стерилизации включала их очистку мыльным раствором с последующей промывкой проточной и дистиллированной водой. На первом этапе три группы семян погружали на 1 мин в 70 % раствор этанола (C_2H_5OH). Далее семена дезинфицировали с использованием H_2O_2 , $AgNO_3$ и $NaClO$ в течение 15 мин. Четвертую группу семян сначала помещали в 1 мл концентрированной H_2SO_4 на 1 мин, промывали водопроводной и дистиллированной водой, после чего в течение 1 мин выдерживали в 70 % растворе C_2H_5OH . Затем семена дополнительно дезинфицировали $NaClO$ в течение 15 мин. Завершающим этапом проводили пятикратную промывку стерильной дистиллированной водой. Для каждого стерилизуемого агента отбирали по 140 семян. После стерилизации семена высевали на агаризованную (7 г/л) среду Мурасиге-Скуга (МС) [27] без регуляторов роста и инкубировали в чашках Петри в течение 14 суток.

Полученные проростки переносили в колбы со средой МС, дополненной различными концентрациями 6-бензиламинопурина (БАП), кинетина (КИН), тиди-

азурона (ТДЗ) и 6-(γ,γ -диметилаллиламино)пурина (2iP) (табл. 1). Культивирование выполняли при 16-часовом фотопериоде и температуре 25 ± 1 °C в течение 30 суток. По окончании этого периода оценивали длину побегов, а также число узлов, побегов и корней. Высушенные в лиофильной сушилке Triad (Labconco, США) образцы растений упаковывали и хранили при температуре –18 °C.

Фенольные соединения экстрагировали 70 % раствором этанола из измельченных сухих микрорастений *H. officinalis* в соответствии с методикой [28].

Количественную оценку биологически активных веществ в экстрактах микрорастений *H. officinalis* проводили спектрофотометрическим методом на приборе UV-3600 (Shimadzu, Япония). Все измерения осуществляли в трехкратной повторности.

Суммарное содержание фенольных соединений определяли с помощью реактива Фолина-Чокальтеу при длине волны 765 нм, используя калибровочную кривую по галловой кислоте [29]. Результаты выражали в миллиграммах-эквивалента галловой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. ГК/г СМ).

Суммарное содержание флавоноидов оценивали по комплексообразованию с хлоридом алюминия ($AlCl_3$) при 415 нм, полученные данные пересчитывали на эквивалент рутина [30]. Результаты выражали в миллиграммах-эквивалента рутина на грамм сухой массы (мг-экв. рутина/г СМ).

Суммарное содержание гидроксикоричных кислот определяли по реакции с реактивом Арно, измеряя оптическую плотность при 510 нм, с калибровкой по розмариновой кислоте [31]. Результаты выражали в миллиграммах-эквивалента розмариновой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. РК/г СМ).

Антиоксидантную активность выявляли по ингибированию радикала DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) при 515 нм [32]. Результаты выражали в миллиграммах-эквивалента аскорбиновой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. АК/г СМ).

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием пакетов IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corpora-

tion, США) и OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, США). Для выявления статистически значимых различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим апостериорным критерием Тьюки ($p \leq 0,05$), а также иерархический кластерный анализ методом Варда.

Результаты и их обсуждение

Первым этапом проводили стерилизацию семян *Hyssopus officinalis* L. с применением четырех дезинфицирующих средств: 3 % пероксида водорода, 10 % нитрата серебра, концентрированной серной кислоты и 20 % гипохлорита натрия. Для каждого химического вещества использовали по 140 семян. Семена инкубировали на среде Мурасиге-Скуга (МС) без добавления регуляторов роста в течение двух недель, далее проводили оценку эффективности методов стерилизации.

По результатам оценки наиболее эффективным оказался метод стерилизации концентрированной серной кислотой, обеспечивший 137 стерильных и 138 проросших семян, тогда как применение нитрата серебра привело к инфицированию 137 семян из 140 (рис. 1). Обработка серной кислотой способствует размягчению плотной семенной оболочки, характерной для многих видов семейства *Lamiaceae*, и обеспечивает более глубокое проникновение стерилизующего агента (гипохлорита натрия) во внутренние ткани семени.

Ранее для стерилизации семян *H. officinalis* использовали комбинацию 70 % этанола (30 с) и 10 % гипохлорита натрия (10 мин) [8, 21]. В данном эксперименте добавление этапа обработки концентрированной серной кислотой позволило достичь 98 % стерильности и 99 % всхожести, что превосходит результаты, приведенные в указанных работах (рис. 1).

Таким образом, предложенный протокол стерилизации является высокоэффективным и может быть рекомендован для введения в культуру *in vitro* семян *H. officinalis*, а также, возможно, других видов с плотной семенной кожурой.

Подбор регуляторов роста для размножения микрорастений *in vitro* *H. officinalis* выполняли с использо-

Таблица 1. Концентрация регуляторов роста для микроразмножения *Hyssopus officinalis* L.

Table 1. Concentrations of growth regulators for *Hyssopus officinalis* L. micropropagation

Концентрация регулятора роста в 1 л среды, мг/л				
Контроль	6-(γ,γ -диметилаллил-амино)пурин	Тидиазурон	Кинетин	6-бензиламинопурин
0	0,50	0,10	0,10	0,10
0	1,00	0,25	0,25	0,25
0	2,50	0,50	0,50	0,50
0	5,00	1,00	1,00	1,00
0	7,50	1,50	1,50	1,50
0	10,00	2,00	2,00	2,00
0	15,00	3,00	3,00	3,00

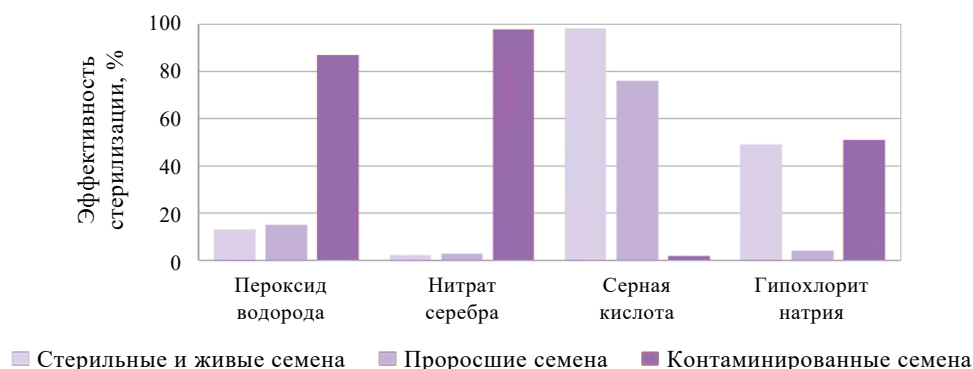


Рисунок 1. Оценка эффективности различных способов стерилизации семян *Hyssopus officinalis* L.

Figure 1. Effect of various sterilization methods on *Hyssopus officinalis* L. seeds

ванием стерильных двухнедельных проростков. Регуляторы роста добавляли в питательную среду МС в различных концентрациях (табл. 1), в качестве контроля применяли среду МС без добавления регуляторов роста.

Каллусообразование отмечалось при добавлении 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрациях 0,25; 0,50 и 1,00 мг/л; кинетина (КИН) – 0,25; 0,50 и 1,50 мг/л; тидиазурина (ТДЗ) – 2,0 и 3,0 мг/л, а также при всех концентрациях 6-(γ , γ -диметилаллиламино)пурина (2iP). Ризогенез наблюдался только на среде с добавлением 1 мг/л КИН. Однако в других работах продемонстрировано [21, 22], что для индукции корнеобразования применяются ауксины, такие как индолилмасляная кислота и индолилуксусная кислота. Отсутствие массового корнеобразования на средах с цитокининами ожидаемо, т. к. цитокинины в высоких концентрациях подавляют ризогенез.

КИН в данном исследовании проявил себя как стимулятор ризогенеза и образования узлов при концентрации 1 мг/л, что не было отмечено в других исследованиях [21, 22]. Вероятно, этот эффект является сортоспецифичным и требует дальнейшего изучения.

Максимальное увеличение длины побегов зафиксировано при внесении БАП в дозе 0,1 мг/л ($4,6 \pm 0,2$ см), а также КИН в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л ($4,5 \pm 0,4$ и $4,2 \pm 0,5$ см соответственно) (рис. 2). На среде с ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л прирост побегов составлял $3,2 \pm 0,3$ см, что было наибольшим показателем и статистически не отличалось от контрольной группы ($3,7 \pm 0,3$ см). Однако концентрации 2iP приводила к снижению прироста длины побегов.

Наибольшее количество побегов наблюдалось при добавлении 0,1 мг/л БАП ($3,2 \pm 0,4$ шт.) и ТДЗ ($2,1 \pm 0,5$ шт.), а также при добавлении 1,0 мг/л КИН ($2,5 \pm 0,6$ шт.) (рис. 3). В присутствии различных концентраций 2iP не установлено значимых различий в количестве побегов (ANOVA, $F = 4,4$; $p = 0,005$).

Результаты анализа количества узлов *H. officinalis* на среде с добавлением разных концентраций регуляторов роста представлены на рисунке 4. Наибольшее количество узлов отмечено при добавлении 0,5 мг/л БАП

($9,6 \pm 0,5$ шт.), 1,0 мг/л КИН ($7,6 \pm 0,9$ шт.), 0,1 мг/л ТДЗ ($6,6 \pm 2,2$ шт.) и 2,5 мг/л 2iP ($9,5 \pm 1,3$ шт.).

Цитокинины играют ключевую роль в регуляции побегообразования у *H. officinalis* в культуре *in vitro*. Наиболее эффективным для увеличения длины побегов и их количества оказался БАП в низкой концентрации (0,1 мг/л). Это согласуется с более ранними данными о том, что БАП успешно индуцирует образование побегов у иссопа [21–23]. Однако в упомянутых работах оптимальные концентрации БАП составляли 1–2 мг/л, тогда как в данном эксперименте максимальный эффект достигнут при более низкой концентрации. Такое отличие может быть обусловлено использованием разных сортов, а также различиями в условиях культивирования и продолжительностью эксперимента.

На дендрограмме, представленной в верхней части рисунка 5, можно выделить два кластера морфометрических параметров. В первый кластер входят длина проростков и количество узлов, во второй кластер – количество побегов. Дендрограмма, расположенная слева, в свою очередь, делит исследуемые концентрации цитокининов на два основных кластера. Наиболее эффективные концентрации регуляторов роста (0,1 мг/л ТДЗ; 1,0 мг/л КИН и 0,1 мг/л БАП) входят в первый кластер, во второй кластер – все остальные. Кластерный анализ объективно подтверждает, что именно эти три варианта концентраций цитокининов в питательной среде обеспечивают наилучшее развитие микрорастений по комплексу морфометрических показателей.

Полученные результаты об ингибирующем эффекте 2iP согласуются с литературными данными [10]. В указанном исследовании аналогичные эффекты наблюдались у других растений. Следует подчеркнуть, что этот факт подтверждает необходимость тщательного подбора регуляторов роста для растений *in vitro*.

Активный рост микрорастений *H. officinalis in vitro* обеспечивали три варианта питательной среды МС с добавлением 0,1 мг/л БАП, 1,0 мг/л КИН или 0,1 мг/л ТДЗ. Микрорастения, полученные на данных средах,

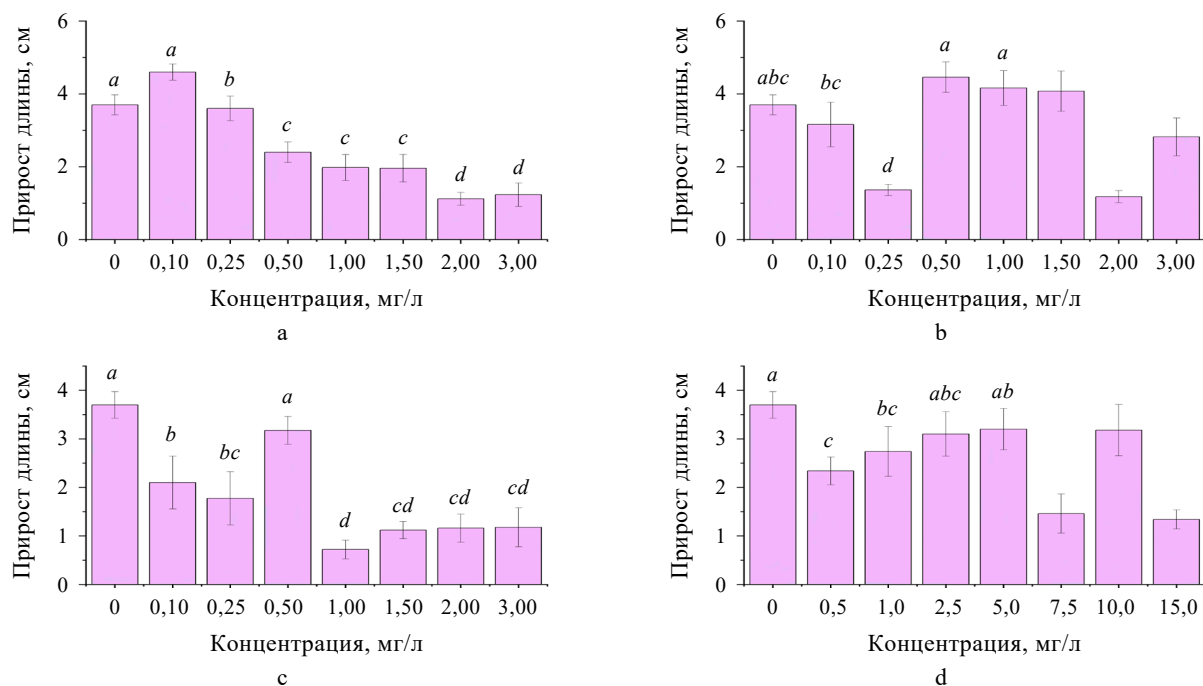


Рисунок 2. Влияние концентраций цитокининов на прирост длины побегов микрорастений *Hyssopus officinalis* L. *in vitro*: а – 6-бензиламинопурин; б – кинетин; с – тидиазурон; д – 6-(γ,γ-диметилаллиламино)пурин. Статистически значимые различия отмечены разными буквами (ANOVA, тест Тьюки (HSD), $p \leq 0,05$)

Figure 2. Effect of cytokinin concentrations *in vitro* on the growth of shoots of *Hyssopus officinalis* L. microplants: а – 6-benzylaminopurine; б – kinetin; с – thidiazuron; and д – 6-(γ,γ-dimethylallylamino)purine. Statistically significant differences are marked with different letters (ANOVA, Tukey test (HSD), $p < 0.05$)

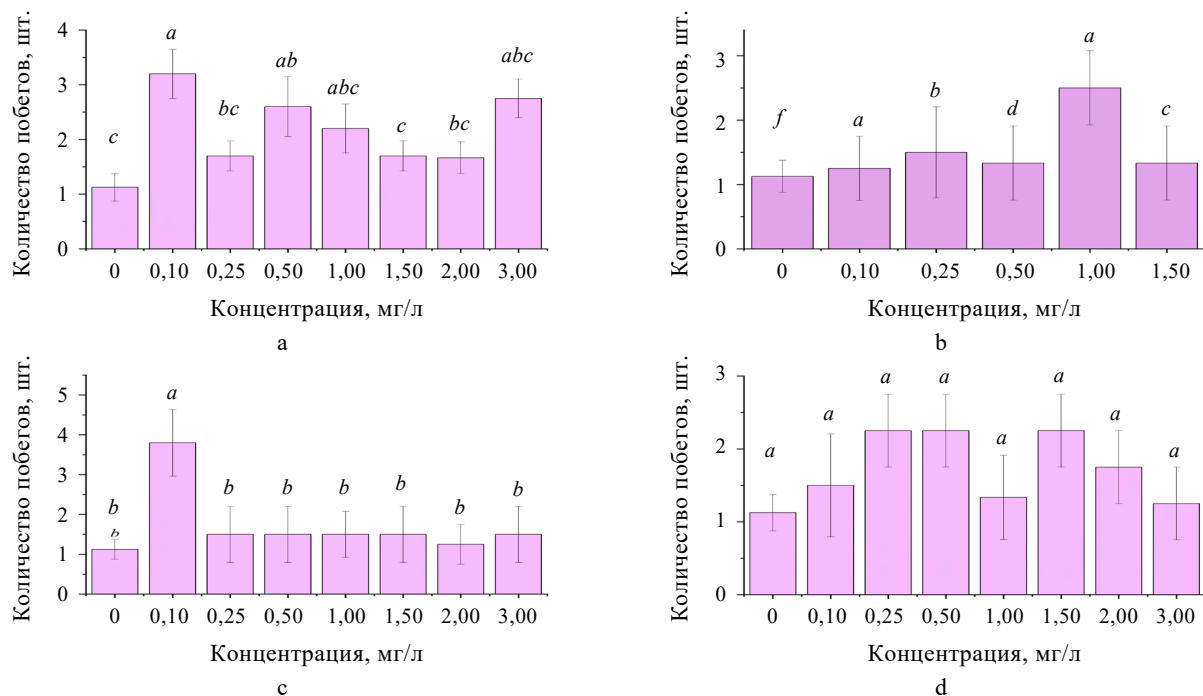


Рисунок 3. Влияние концентраций цитокининов на количество побегов микрорастений *Hyssopus officinalis* L. *in vitro*: а – 6-бензиламинопурин; б – кинетин; с – тидиазурон; д – 6-(γ,γ-диметилаллиламино)пурин. Статистически значимые различия отмечены разными буквами (ANOVA, тест Тьюки (HSD), $p \leq 0,05$)

Figure 3. Effect of cytokinin concentrations *in vitro* on the number of shoots of *Hyssopus officinalis* L. microplants: а – 6-benzylaminopurine; б – kinetin; с – thidiazuron; and д – 6-(γ,γ-dimethylallylamino)purine. Statistically significant differences are marked with different letters (ANOVA, Tukey test (HSD), $p < 0.05$)

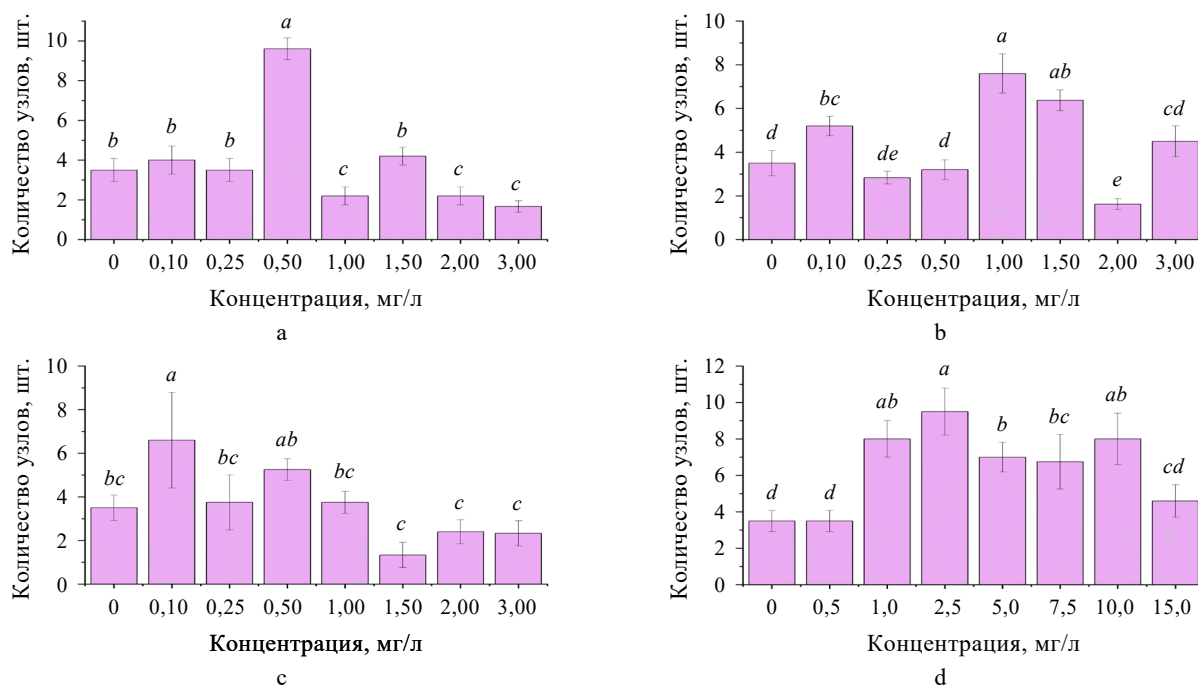


Рисунок 4. Влияние концентраций цитокининов на количество узлов микрорастений *Hyssopus officinalis* L. *in vitro*: а – 6-бензиламинопурин; б – кинетин; с – тидиазурон; д – 6-(γ,γ-диметиаллиламино)пурин. Статистически значимые различия отмечены разными буквами (ANOVA, тест Тьюки (HSD), $p \leq 0,05$)

Figure 4. Effect of cytokinin concentrations *in vitro* on the number of nodes of *Hyssopus officinalis* L. microplants: а – 6-benzylaminopurine; б – kinetin; с – thidiazuron; and д – 6-(γ,γ-dimethylallylamino)purine. Statistically significant differences are marked with different letters (ANOVA, Tukey test (HSD), $p < 0.05$)

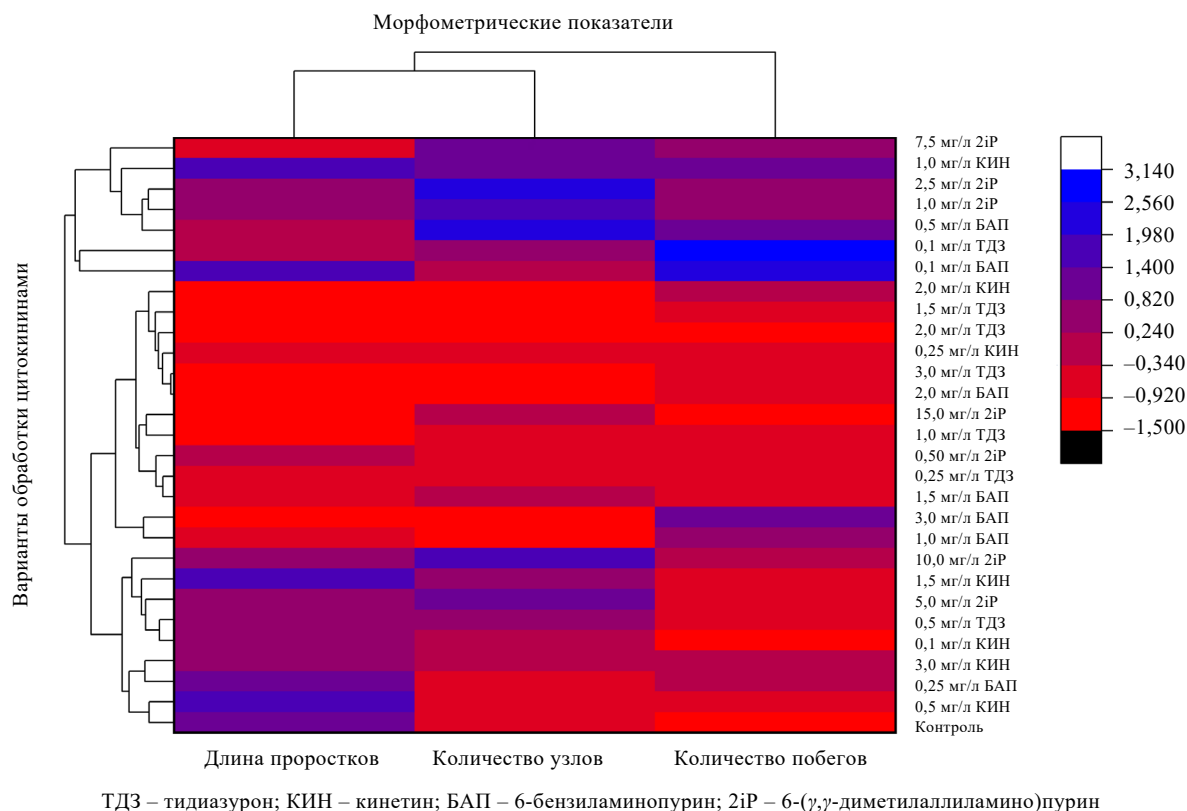


Рисунок 5. Тепловая карта морфометрических показателей микрорастений *Hyssopus officinalis* L. *in vitro*

Figure 5. Heatmap of morphometric characteristics of *Hyssopus officinalis* L. microplants *in vitro*

отобраны для последующего анализа содержания биологически активных веществ и антиоксидантной активности.

В результате установлено, что добавление в среду БАП в концентрации 0,1 мг/л привело к пятикратному увеличению уровня фенольных соединений ($45,2 \pm 2,5$ мг-экв. ГК/г СМ) по сравнению с контролем, что соответствует максимальному показателю среди всех исследуемых концентраций (рис. 6). Концентрации КИН (0,1 мг/л) и ТДЗ (0,1 мг/л) стимулировали накопление фенольных соединений до $40,8 \pm 4,2$ и $29,7 \pm 5,9$ мг-экв. ГК/г СМ соответственно. Контрольные микрорастения *in vitro*, выращенные на питательной среде без добавления регуляторов роста, содержали $8,5 \pm 3,9$ мг-экв. ГК/г СМ.

Максимальное содержание фенольных соединений при добавлении БАП в концентрации 0,1 мг/л согласуется с наблюдениями на *Melissa officinalis* L., где БАП также стимулировал накопление общей суммы фенольных соединений [13]. В работе [24] на *H. officinalis*, напротив, максимальное содержание фенольных соединений достигнуто при добавлении ТДЗ в концентрации 1 мг/л. Расхождение с результатами объясняется, скорее всего, разницей в использованных концентрациях: в цитируемой работе все цитокинины тестировали при 1 мг/л, тогда как в данном исследовании БАП оказался эффективен при концентрации 0,1 мг/л, а ТДЗ в той же дозе уступал ему.

При изучении количественного содержания флавоноидов в исследованных экстрактах *H. officinalis* получена иная закономерность (рис. 7). Самый высокий показатель зарегистрирован при концентрации 0,1 мг/л ТДЗ ($4,0 \pm 2,3$ мг-экв. рутина/г СМ) в питательной среде.

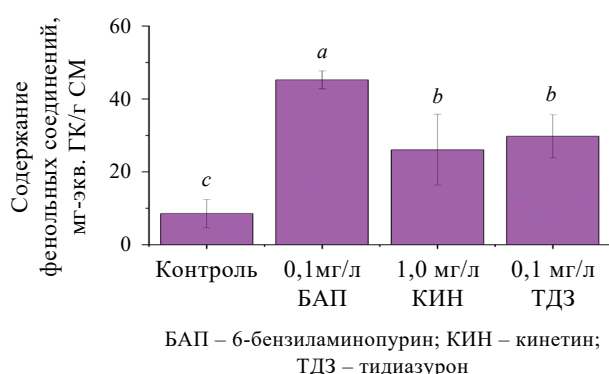


Рисунок 6. Сумма фенольных соединений в микрорастениях *in vitro* *Hyssopus officinalis* L. в зависимости от используемого цитокинина. Статистически значимые различия отмечены разными буквами (ANOVA, тест Тьюки (HSD), $p \leq 0,05$)

Figure 6. Total phenolics in *Hyssopus officinalis* L. microplants *in vitro* across cytokinins. Statistically significant differences are marked with different letters (ANOVA, Tukey test (HSD), $p < 0.05$)

В исследовании М. Ю. Чередниченко и др. [24] на *H. officinalis* сорте Лекарь не было выявлено влияния регуляторов роста на накопление флавоноидов, что обусловлено отличиями в используемых концентрациях и типах гормонов, в т. ч. отсутствием ТДЗ. Стоит отметить, что максимум накопления флавоноидов достигался при более высокой дозе ТДЗ (2 мг/л) [23]. Данные, полученные в рамках исследования, впервые показывают, что ТДЗ в низкой концентрации (0,1 мг/л) способен селективно усиливать синтез флавоноидов у этого сорта. Это различие, по-видимому, связано с особенностями роста или условиями выращивания.

Максимальное содержание гидроксикоричных кислот ($115,9 \pm 3,2$ мг-экв. РК/г СМ) отмечено на среде с 0,1 мг/л БАП в питательной среде (рис. 8). Данная величина превышает контрольный уровень ($21,7 \pm 5,9$ мг-экв. РК/г СМ) в 5 раз. При добавлении 1 мг/л КИН ($82,5 \pm 5,5$ мг-экв. РК/г СМ) и 0,1 мг/л ТДЗ ($46,5 \pm 12,9$ мг-экв. РК/г СМ) показатели также значимо превышали контроль, но эффект был ниже, чем при использовании БАП.

Антиоксидантная активность (DPPH-метод) также была максимальной в варианте с 0,1 мг/л БАП ($72,8 \pm 2,8$ мг-экв. АК/г СМ), что статистически значимо превышало контроль ($46,6 \pm 6,4$ мг-экв. АК/г СМ) (рис. 9). При добавлении кинетина (1,0 мг/л) этот показатель составил $46,6 \pm 5,1$ и $29,6 \pm 5,1$ мг-экв. АК/г СМ соответственно, не отличаясь достоверно от контроля.

Таким образом, применение БАП в концентрации 0,1 мг/л продемонстрировало максимальную эффективность, увеличивая содержание фенольных соединений, гидроксикоричных кислот и антиоксидантную активность, тогда как ТДЗ в концентрации 0,1 мг/л стимулировал накопление флавоноидов.

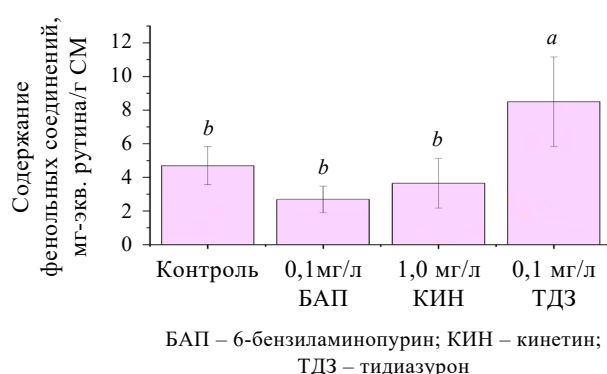


Рисунок 7. Сумма флавоноидов в микрорастениях *in vitro* *Hyssopus officinalis* L. в зависимости от используемого цитокинина. Статистически значимые различия отмечены разными буквами (ANOVA, тест Тьюки (HSD), $p \leq 0,05$)

Figure 7. Total flavonoids in *Hyssopus officinalis* L. microplants *in vitro* across cytokinins. Statistically significant differences are marked with different letters (ANOVA, Tukey test (HSD), $p < 0.05$)

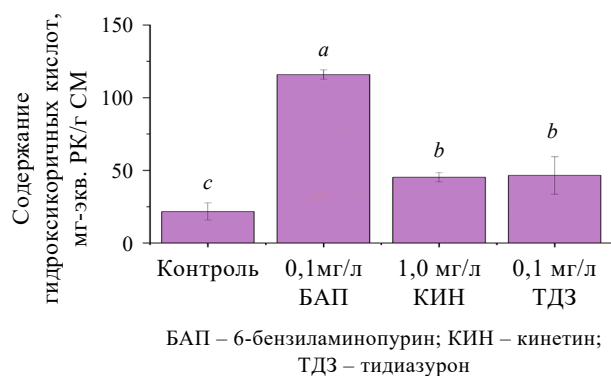


Рисунок 8. Сумма гидроксикоричных кислот в микрорастениях *in vitro* *Hyssopus officinalis* L. в зависимости от используемого цитокинина. Статистически значимые различия отмечены разными буквами (ANOVA, тест Тьюки (HSD), $p \leq 0,05$)

Figure 8. Hydroxycinnamic acids in *Hyssopus officinalis* L. microplants *in vitro* across cytokinins. Statistically significant differences are marked with different letters (ANOVA, Tukey test (HSD), $p < 0.05$)

Выводы

В ходе исследования проведен подбор различных методов стерилизации семян *Hyssopus officinalis* L. сорта Лекарь. Установлено, что использование концентрированной серной кислоты в комбинации с последующей обработкой этанолом и гипохлоритом натрия обеспечило максимальную стерильность (98 %) и всхожесть семян (99 %), что значительно превосходит результаты, полученные при применении других агентов (пероксида водорода, нитрата серебра и гипохлорита натрия без предварительной обработки серной кислотой).

Изучено влияние различных концентраций четырех регуляторов роста на размножение микрорастений *in vitro* *H. officinalis*. Показано, что для роста микрорастений наиболее эффективно использовать питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) (обеспечивает максимальное увеличение длины побегов и их количества), 1,0 мг/л кинетина (стимулирует ризогенез и образование узлов) и 0,1 мг/л тидиазурина (ТДЗ) (индуцирует побегообразование). Все исследованные концентрации 6-(γ,γ -диметилаллил amino)пурина подавляли рост побегов, поэтому данный цитокинин не рекомендуется для микроразмножения *H. officinalis*.

Выявлена зависимость накопления вторичных метаболитов и антиоксидантной активности от типа цитокинина. Добавление 0,1 мг/л БАП в питательную среду обеспечивает максимальное накопление фенольных соединений, гидроксикоричных кислот

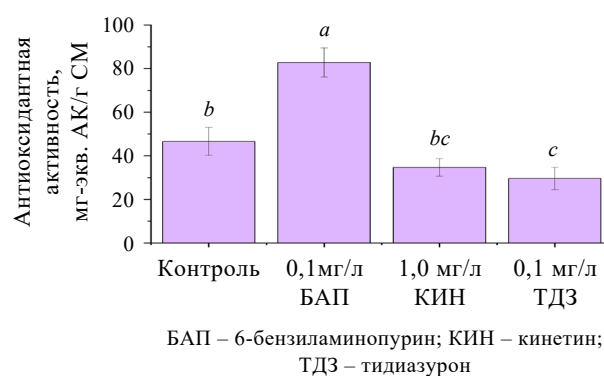


Рисунок 9. Влияние цитокининов на антиоксидантную активность экстрактов микрорастений *in vitro* *Hyssopus officinalis* L. Статистически значимые различия отмечены разными буквами (ANOVA, тест Тьюки (HSD), $p \leq 0,05$)

Figure 9. Effect of cytokinins on the antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. microplant extracts *in vitro*. Statistically significant differences are marked with different letters (ANOVA, Tukey test (HSD), $p < 0.05$)

и антиоксидантную активность, тогда как 0,1 мг/л ТДЗ избирательно повышает содержание флавоноидов.

Практическая значимость результатов заключается в возможности направленного регулирования биохимического профиля микрорастений *in vitro* *H. officinalis* путем выбора соответствующего регулятора роста. Для внедрения предложенных протоколов в промышленность необходимы дальнейшие исследования качественного состава вторичных метаболитов.

Критерии авторства

Е. А. Попова – методология, проведение экспериментальных исследований, обработка результатов и подготовка статьи. О. В. Кригер – концептуализация исследования, редактирование статьи. Все авторы ознакомились и согласились с опубликованной версией рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

E.A. Popova developed the methodology, conducted the experimental studies, processed the results, and wrote the manuscript. O.V. Kriger developed the research concept and proofread the manuscript. Both authors approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Захарова И. Н., Пупыкина К. А., Пупыкина В. В. Исторические аспекты применения фитотерапии и особенности ее использования в педиатрической практике. Педиатрия. Consilium Medicum. 2025. № 1. С. 80–89. [Zakharova I.N.,

- Pupykina KA, Pupykina VV. Historical aspects of phytotherapy application and features of use in pediatric practice: A review. *Pediatrics. Consilium Medicum*. 2025;(1):80–90. (In Russ.)] <https://doi.org/10.26442/26586630.2025.1.203185>
2. Monalisa, Fakih M, Perbawati C. Relevance of WHO traditional medicine strategy (2014–2023) with traditional health care policy in the perspective of national law and international law. *Asian Journal of Legal Studies*. 2022;1(1):25–34. <https://doi.org/10.53402/ajls.v1i1.117>
3. Tahir M, Khushtar M, Fahad M, Rahman MA. Phytochemistry and pharmacological profile of traditionally used medicinal plant Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2018;8(7):132–140. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8721>
4. Fedorova AM, Shevel AA, Kovalenko SV, Miller ES, Loseva AI, et al. Geroprotective potential of *Thymus vulgaris* L. callus culture and its metabolites. *Foods and Raw Materials*. 2026;14(2):443–460. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2026-2-688>
5. Velichkovich NS, Dunchenko NI, Stepanova AA, Kozlova OV, Faskhutdinova ER, et al. The phytochemical composition of Kuzbass medicinal plants. *Foods and Raw Materials*. 2025;13(2):219–232. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2025-2-649>
6. Babich O, Larina V, Krol O, Ulrikh E, Sukhikh S, et al. *In vitro* study of biological activity of *Tanacetum vulgare* extracts. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):616. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020616>
7. Люц В. А., Харлов С. Ю., Величкович Н. С., Проскурякова Л. А., Остапова Е. В. и др. Антимикробные свойства экстрактов *Pulmonaria officinalis*, *Heracleum sibiricum*, *Syringa vulgaris*, произрастающих в Сибири. *Техника и технология пищевых производств*. 2025. Т. 55. № 3. С. 673–686. [Lutz VA, Harlov SYu, Velichkovich NS, Proskuryakova LA, Ostapova EV, et al. Antimicrobial properties of siberian wild plant extracts: *Pulmonaria officinalis*, *Heracleum sibiricum*, and *Syringa vulgaris*. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2025;55(3):673–686. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-3-2597>
8. Попова Е. А., Пунгин А. В., Пантюхина А. П., Кроль О. В. Оценка содержания вторичных метаболитов и антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур и микрорастений *in vitro* *Hyssopus officinalis* L. *Техника и технология пищевых производств*. 2024. Т. 54. № 4. С. 658–674. [Popova EA, Pungin AV, Pantyukhina AP, Krol OV. Evaluating secondary metabolites and antioxidant activity of *in vitro* callus and micro-plant extracts of *Hyssopus officinalis* L. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2024;54(4):658–674. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2534>
9. Akharaiyi FC, Ehis-Eriakha CB, Olagbemide PT, Igbudu FH. *Hyptis suaveolens* L. leaf extracts in traditional health care systems. *Foods and Raw Materials*. 2023;11(2):293–299. <https://doi.org/10.21603/2308-40572023-2-577>
10. Sayyahi J, Mobaiyen H, Jafari B, Jafari-Sales A. Antibacterial effects of methanolic extracts of *Reum ribes* L. and *Hyssopus officinalis* L. on some standard pathogenic bacteria. *Jorjani Biomedicine Journal*. 2019;7(3):34–44. <https://doi.org/10.29252/jorjanibiomedj.7.3.34>
11. Sharifi-Rad J, Qusppe C, Kumar M, Akram M, Amin M, et al. *Hyssopus* essential oil: An update of its phytochemistry, biological activities, and safety profile. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022:8442734. <https://doi.org/10.1155/2022/8442734>
12. Попова Е. А. Влияние засоления на состав вторичных метаболитов и антиоксидантную активность экстрактов каллусных культур *Hyssopus officinalis* L. *Техника и технология пищевых производств*. 2025. Т. 55. № 4. С. 767–777. [Popova EA. Effect of salinity on secondary metabolites and antioxidant activity in callus extracts of *Hyssopus officinalis* L. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2025;55(4):767–777. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-4-2604>
13. Tungmunthum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*. 2018;5(3):93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
14. Mutha RE, Tatiya AU, Surana SJ. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;7(1):25. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>
15. Hosseini B, Alizadeh M, Hassani A, Jafari M, Rahimi A. High-frequency *in vitro* direct shoot regeneration from nodal explants of hyssop plant (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Medicinal Plants and By-products*. 2016;5(2):187–193.
16. Singh RK, Chokheli VA. Plant biotechnology: Applications in *in vitro* plant conservation and micropropagation. *Horticulturae*. 2025;11(4):358. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11040358>
17. Pasternak TP, Steinmacher D. Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*. *Plants*. 2024;13(2):327. <https://doi.org/10.3390/plants13020327>
18. Medeiros APR, Leite JF, Assis RMAD, Rocha JPM, Bertolucci SKV, et al. Exogenously applied growth regulators affect the growth, phenols, protein and essential oil composition *Melissa officinalis*. *Revista Ciência Agronômica*. 2025;56:e202391743. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20250050>
19. Pourebadi N, Motafakkerzadeh R, Kosari-Nasab M, Farsad Akhtar N, Movafeghi A. The influence of TDZ concentrations on *in vitro* growth and production of secondary metabolites by the shoot and callus culture of *Lallemantia iberica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2015;122:331–339. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0769-4>

20. Varmazyar M, Shahhoseini R, Salehi Arjmand H, Akramian M. Phytochemical-growth responses of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) to gibberellic acid and benzyladenine under different nutritional conditions. *Journal of Medicinal Plants and By-Products*. 2025;14(1):541–548. <https://doi.org/10.22034/jmpb.2025.367614.1817>
21. Zayova E, Geneva M, Stancheva I, Dimitrova L, Petrova M, et al. Evaluation of the antioxidant potential of *in vitro* propagated hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) with different plant growth regulators. *Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries*. 2018;10(4):295–304. <https://doi.org/10.5958/0975-6892.2018.00044.8>
22. Sadat-Hosseini M, Askari N. Effects of culture media and plant growth regulators on micropropagation and root architecture of the hyssop medicinal plant (*Hyssopus officinalis* L.) under *in vitro* conditions. *Journal of Crops Improvement*. 2024;26(2):409–421. <https://doi.org/10.22059/jci.2024.363422.2837>
23. Shoja HM, Shishavan HK. Effects of different hormonal treatments on growth parameters and secondary metabolite production in organ culture of *Hyssopus officinalis* L. *Biotechnologia*. 2021;102(1):33. <https://doi.org/10.5114/bta.2021.103760>
24. Чередниченко М. Ю., Хлебникова Д. А., Федотова П. А., Брем Е. С., Романенко В. А. Влияние условий культивирования на рост и накопление биологически активных веществ иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) в условиях *in vitro*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2024. Т. 27. № 5. С. 50–58. [Cherednichenko MYu, Khlebnikova DA, Fedotova PA, Brem ES, Romanenko VA. Influence of cultivation conditions on the growth and accumulation of biologically active substances of *Hyssopus officinalis* L. under *in vitro* conditions. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2024;27(5):50–58. (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/25877313-2024-05-06>
25. Федотова П. А., Жданова М. В., Чередниченко М. Ю. Изучение влияния гормонального состава питательной среды на эффективность клонального микроразмножения *Hyssopus officinalis* сорта Иней: материалы Междунар. конф. молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии». Москва, 2023. С. 115–117. [Fedotova PA, Zhdanova MV, Cherednichenko MY. Study of the effect of the hormonal composition of the nutrient medium on the effectiveness of clonal micropropagation of *Hyssopus officinalis* of the Hoarfrost variety: Proceeding Intern. Sci. Conf. Moscow, 2023. pp. 115–117. (In Russ.)]
26. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
27. Feduraev P, Skrypnik L, Nebreeva S, Dzhobadze G, Vagina A, et al. Variability of phenolic compound accumulation and antioxidant activity in wild plants of some *Rumex* species (*Polygonaceae*). *Antioxidants*. 2022;11(2):311. <https://doi.org/10.3390/antiox11020311>
28. Padhi EM, Liu R, Hernandez M, Tsao R, Ramdath DD. Total polyphenol content, carotenoid, tocopherol and fatty acid composition of commonly consumed Canadian pulses and their contribution to antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2017;38:602–611. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.006>
29. Štefan MB, Rodríguez VJ, Blažeković B, Kindl M, Vladimir-Knežević S. Total hydroxycinnamic acids assay: Prevalidation and application on *Lamiaceae* species. *Food Analytical Methods*. 2013;7(2):326–336. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9630-8>
30. Skrypnik L, Feduraev P, Golovin A, Maslennikov P, Belov N, et al. Biotechnological potential of different organs of Mistletoe (*Viscum album* L.) collected from various host tree species in an urban area. *Plants*. 2022;11(20):2686. <https://doi.org/10.3390/plants11202686>

Дополнительная информация об авторах / Additional information about the authors

Попова Елена Александровна / Elena A. Popova ORCID 0000-0001-7008-3823; eLIBRARY SPIN 9577-5085
Кригер Ольга Владимировна / Olga V. Kriger ORCID 0000-0002-1489-0716; eLIBRARY SPIN 4981-1381