

Тевфик А. Ш., Егорова Н. А.

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* ТИМЬЯНА ОБЫКНОВЕННОГО**

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

**Реферат.** Тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris* L.) – многолетний полукустарник, одно из древнейших пряно ароматических и лекарственных растений. В сырье содержится до 0,75 % эфирного масла, наиболее ценные компоненты которого – тимол и линалоол. Тимьян широко применяется в медицинской практике, кулинарии и парфюмерной промышленности. Для повышения эффективности селекционной и семеноводческой работы с тимьяном необходимо внедрение биотехнологических приемов. В этом плане актуальна разработка методов клонального микроразмножения, которые позволяют не только быстро размножать ценные генотипы, но и получать генетически однородный оздоровленный посадочный материал. Цель исследования – изучение влияния условий культивирования и состава питательной среды на развитие эксплантов на втором этапе клонального микроразмножения *Thymus vulgaris* L. *in vitro*. В статье представлены результаты исследований морфометрических показателей эксплантов при культивировании на семи вариантах питательной среды Мурасиге и Скуга в банках или пробирках с циклом выращивания 30, 40, 50, 60 и 70 сут. При более длительном цикле выращивания (70 сут) коэффициент размножения был в 4,4 раза выше, чем при стандартной продолжительности культивирования (30 сут). Анализ влияния типа культурального сосуда показал, что в банках развивалось в 2,9–3,3 раза больше побегов на эксплант по сравнению с культивированием в пробирках. Сравнение двух цитокининов выявило, что лучшее развитие эксплантов было при культивировании на средах, содержащих кинетин. На средах с БАП наблюдали высокую степень витрификации микропобегов и образование мелких побегов, неспособных к дальнейшей регенерации. Установлено, что наиболее эффективной питательной средой на этапе собственно размножения тимьяна обыкновенного является МС с 1,0 мг/л кинетина. При оптимальном сочетании изученных факторов коэффициент размножения достигал 12,8. Выявлено, что на средах с кинетином происходит индукция ризогенеза с частотой 57,7–98,0 %. Результаты исследований являются основой для разработки методики клонального микроразмножения *Thymus vulgaris* L.

**Ключевые слова:** *Thymus vulgaris* L., клональное микроразмножение, регуляторы роста, продолжительность цикла выращивания, культуральный сосуд, питательная среда.

**Введение**

В последнее время во всем мире эфиромасличные растения имеют широкий спектр использования, благодаря высокому содержанию биологически активных веществ. Одним из таких ценных растений является тимьян (*Thymus*) – многолетний полукустарник из семейства Яснотковые (Lamiaceae). Эфирное масло и растительное сырье тимьяна входят в состав большого количества комбинированных лекарственных препаратов и оказывают благотворное влияние на организм: укрепляют иммунитет, положительно влияют на нервную систему, деятельность ЖКТ, а также обладают анальгетическим, отхаркивающим, спазмолитическим, антигельминтным, противозудным и антиоксидантным действием [1, 2]. Наиболее важными компонентами эфирного масла тимьяна являются тимол и линалоол. При этом особую ценность имеет тимол, благодаря антисептическим, бактерицидным и дезинфицирующим свойствам, что позволяет

использовать его против патогенной микрофлоры организма, в том числе и устойчивой к антибиотикам [3].

В ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводится комплекс исследований, связанных с созданием новых сортов, разработкой приемов выращивания и переработки эфиромасличных культур [2]. С целью повышения эффективности селекции и семеноводства необходимо применение биотехнологических методик для ускоренного размножения разных видов ценных эфиромасличных растений, которые позволят значительно увеличить коэффициент размножения культур, снизить энергоемкость, преодолеть сезонность производства, а также ускорить селекционный процесс [4]. Процесс клонального микроразмножения состоит из четырех этапов: введение в культуру *in vitro*, собственно микроразмножение, ризогенез, адаптация *in vivo*. Одним из важных этапов является второй, который может повторяться несколько раз до получения необходимого числа микрорастений. Основной задачей на этом этапе является получение высокого коэффициента размножения. Однако для большинства эфиромасличных культур отсутствуют четкие и воспроизводимые системы клонального микроразмножения. При анализе зарубежных публикаций по изучению тимьяна в культуре *in vitro* следует отметить, что все они касаются видов, которые не встречаются в РФ [5, 6]. Изучению особенностей морфогенетического потенциала тимьяна обыкновенного в культуре *in vitro* были посвящены лишь единичные научные работы [7, 8].

**Цель исследований** – изучение влияния гормонального состава питательной среды, типа культурального сосуда и продолжительности цикла выращивания на развитие эксплантов на втором этапе клонального микроразмножения *Thymus vulgaris in vitro*.

#### **Материалы и методы исследований**

Материал для исследований – ткани и органы растений тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris L.*) образца № 20841 из коллекции ФГБУН «НИИСХ Крыма». В работе использовали общепринятые методы культуры органов и тканей растений [9, 10]. В качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом (8–10 мм), полученные при микрочеренковании побегов, развившихся при введении почек в культуру *in vitro*. Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [11] с добавлением гибберелловой кислоты (ГК<sub>3</sub>), кинетина (Кин.), БАП (бензиламинопурина) и ИУК (Sigma, США) в пробирках (16 × 150 мм) или в стеклянных банках (250 мл), закрытых фольгой. В пробирки с 10 мл питательной среды помещали один эксплант, а в банки с 30 мл среды – три–четыре экспланта. Культивирование проводили при температуре 24–26 °С, относительной влажности воздуха – 70 % и освещенности – 2–3 тысячи люкс с фотопериодом 16 часов. Анализ морфометрических параметров развивающихся эксплантов проводили на 30, 40, 50, 60 и 70-е сутки культивирования. При этом определяли количество и длину побегов, количество узлов на побег, количество витрифицированных побегов, частоту ризогенеза, длину корней. Коэффициент размножения рассчитывали как количество микрочеренков, которое можно получить за одно субкультивирование, для этого количество образующихся на экспланте побегов умножали на число узлов на побеге. В каждом варианте опыта анализировали не менее 20 эксплантов, повторность опыта – двух-трехкратная. Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам [12], с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010). Достоверность различий между вариантами рассчитывали по t-критерию Стьюдента при  $P \leq 0,05$ . В таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки, а на графиках – средние значения и доверительные интервалы.

#### **Результаты и их обсуждение**

На морфогенетический потенциал эксплантов *in vitro* влияют многие факторы: генотип, физиологическое состояние донорного растения, тип экспланта, условия

культивирования (тип пробки, тип культурального сосуда, освещенность, продолжительность цикла выращивания), состав питательной среды.

Одним из важных вопросов, практически не освещенным отечественными и зарубежными учеными, является влияние типа культурального сосуда на микроразмножение *in vitro*. В наших исследованиях экспланты помещали в пробирки или банки с питательной средой, закрытые фольгой. При изучении зависимости морфометрических показателей эксплантов от разных типов культуральных сосудов на 40-е сут не выявлено существенных различий на всех питательных средах с кинетином (таблица 1). При культивировании в банках на питательной среде МС с 0,5 мг/л БАП и 2,0 мг/л ГК<sub>3</sub> был получен более высокий коэффициент размножения ( $6,7 \pm 0,3$ ) по сравнению с пробирками ( $5,0 \pm 0,2$ ).

**Таблица 1 – Влияние состава питательной среды и типа культурального сосуда на развитие эксплантов на втором этапе клонального микроразмножения тимьяна (40-е сут)**

Регуляторы роста в питательной среде МС, мг/л	Количество побегов на эксплант, шт.		Длина побега, см		Коэффициент размножения	
	пробирки	банки	пробирки	банки	пробирки	банки
Кин. – 1,0	$1,3 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,4$
Кин. – 1,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,3$
Кин. – 1,0; ГК <sub>3</sub> –1,0; ИУК – 0,5	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3$
Кин. – 1,0; ИУК – 0,5	$1,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$
Кин. – 1,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0; БАП – 0,2	$2,7 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,4^*$	$4,1 \pm 0,3^*$
БАП – 0,5	$1,7 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$
БАП – 0,5; ГК <sub>3</sub> –2,0	$4,1 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2^*$	$6,7 \pm 0,3^*$

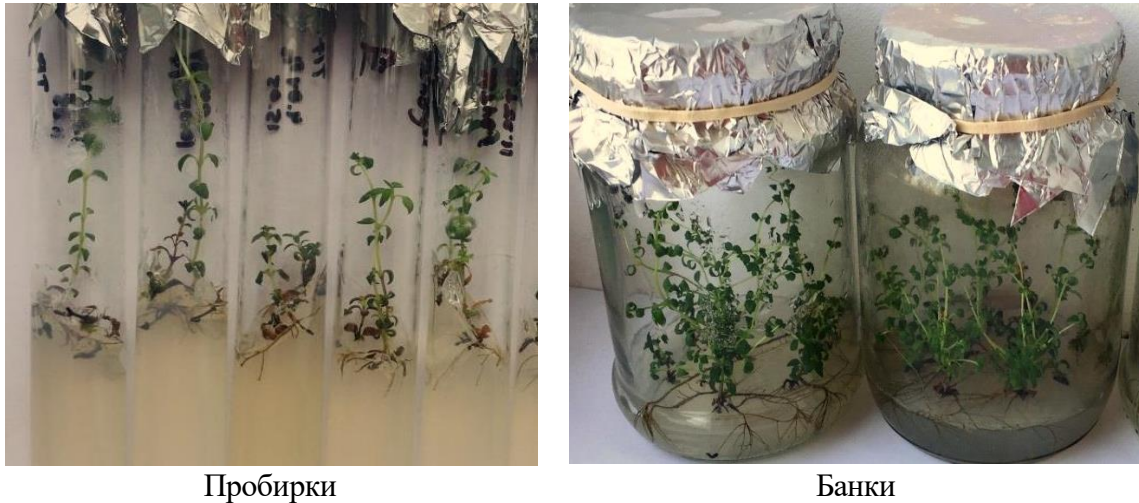
*Примечание.* \* с учетом витрифицированных побегов.

Таким образом, при продолжительности цикла выращивания 40 сут во всех вариантах опыта коэффициент размножения не превышал 6,7. Поэтому в дальнейшем с целью повышения данного показателя мы проанализировали развитие эксплантов в разных культуральных сосудах при более длительном цикле выращивания (50, 60, 70 сут) без пересадки на свежую среду.

Анализ влияния типа культурального сосуда на количество побегов на 70 сут показал, что при культивировании в банках на питательных средах МС с кинетином образуется в 2,9–3,3 раза больше побегов на эксплант, чем в пробирках (таблица 2; рисунок 1). А при культивировании эксплантов в пробирках на питательной среде с БАП и ГК<sub>3</sub> было получено больше побегов, чем в банках, хотя эти различия были недостоверны. При сравнении длины эксплантов и количества узлов на побеге достоверных различий не было выявлено практически во всех вариантах опыта.

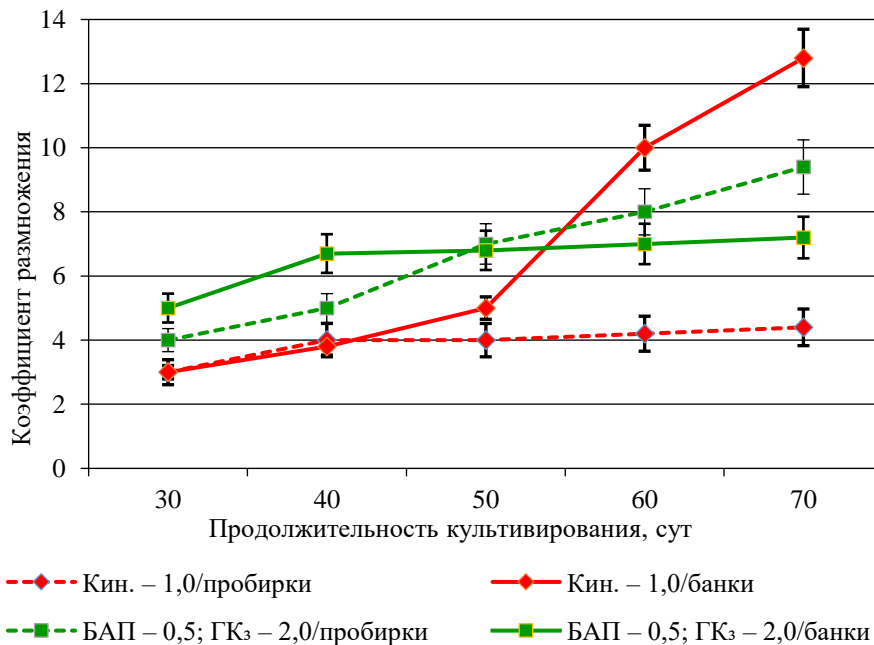
**Таблица 2 – Влияние состава питательной среды и типа культурального сосуда на развитие эксплантов на втором этапе клонального микроразмножения тимьяна (70-е сут)**

Регуляторы роста в питательной среде МС, мг/л	Количество побегов на эксплант, шт.		Длина побега, см		Количество узлов на побег, шт.	
	пробирки	банки	пробирки	банки	пробирки	банки
Кин.–1,0	$1,6 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,1$
Кин.–1,0; ГК <sub>3</sub> –1,0	$1,1 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$
Кин.–1,0; ГК <sub>3</sub> –1,0; ИУК–0,5	$1,1 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$
Кин.–1,0; ИУК – 0,5	$1,3 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,7$	$2,2 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,2$
Кин.–1,0; ГК <sub>3</sub> –1,0; БАП–0,2	$5,5 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
БАП – 0,5	$1,3 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$
БАП – 0,5; ГК <sub>3</sub> –2,0	$8,3 \pm 0,7$	$6,5 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$



**Рисунок 1 – Развитие микропобегов тимьяна при культивировании в разных культуральных сосудах (питательная среда МС с 1,0 мг/л Кин.)**

Еще одним фактором, который имеет особое значение для максимальной реализации морфогенетического потенциала эксплантов, является длительность цикла выращивания. Для многих видов растений продолжительность цикла выращивания при микроразмножении обычно составляет 30–40 сут [10, 13]. В наших исследованиях при такой продолжительности были получены низкие морфометрические показатели эксплантов. При культивировании без пересадок более 50 сут в банках на среде МС с 1,0 мг/л кинетина отметили увеличение коэффициента размножения в 3,5 (60 сут) и 4,4 (70 сут) раза по сравнению с 30 сут (рисунок 2).

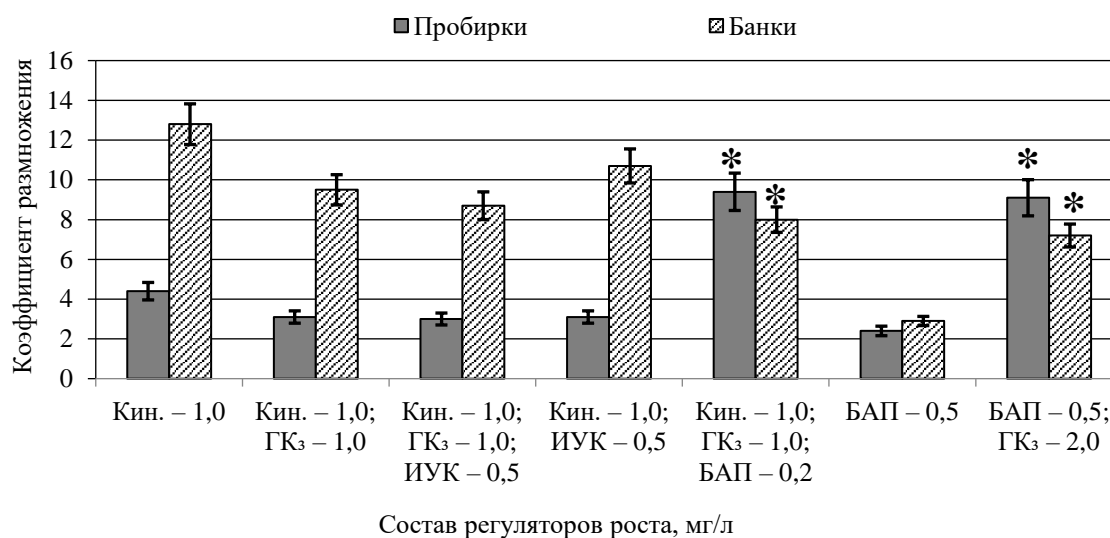


**Рисунок 2 – Влияние длительности цикла выращивания, типа культурального сосуда и питательной среды на коэффициент размножения тимьяна**



В результате коэффициент размножения на этой среде достиг максимального значения – 12,8. В то же время в пробирках этот показатель на среде МС с 1,0 мг/л кинетина с 30 до 70 сут увеличился незначительно. При использовании в составе питательной среды другого цитокинина – БАП (совместно с ГК<sub>3</sub>), коэффициент размножения на 70 сут культивирования, наоборот, был выше в пробирках (9,4), чем в банках (7,2). Это происходило за счет увеличения количества образовавшихся побегов на эксплант.

На других питательных средах, содержащих кинетин, отметили аналогичное увеличение коэффициента размножения при культивировании эксплантов в банках по сравнению с пробирками (рисунок 3). Выявлено, что повышение коэффициента размножения при использовании в качестве культурального сосуда банок происходило в первую очередь за счет множественного побегообразования и значительного повышения количества образовавшихся микропобегов. Как видно из представленных данных, при культивировании эксплантов в пробирках коэффициент размножения на средах с кинетином не превышал 4,2.



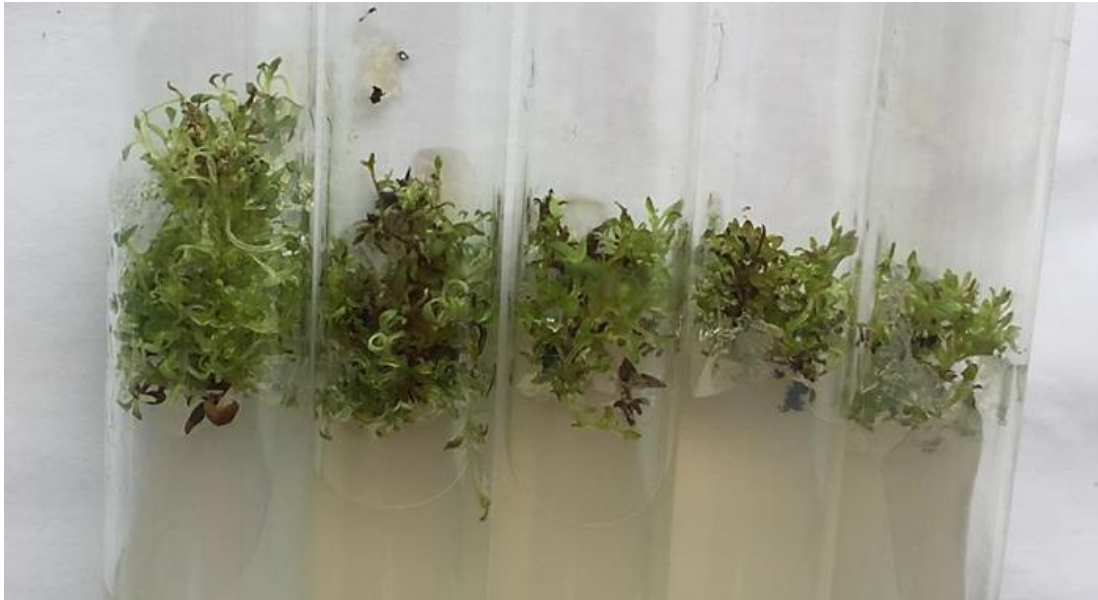
**Рисунок 3 – Влияние типа культурального сосуда и питательной среды на коэффициент размножения тимьяна (70 сут).**

**Примечание.** \* с учетом витрифицированных побегов.

Известно, что гормоны играют важную роль в осуществлении взаимодействия клеток, тканей и органов растений и регуляции морфогенетического потенциала в культуре *in vitro*. При анализе литературных источников выявлено, что данные по оптимальным питательным средам для эксплантов различных видов тимьяна довольно противоречивы. Так, для активного побегообразования *T. persicus* необходима питательная среда МС с 2,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК [5], для *T. broussonetii* – с 1,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИУК [14], для *T. huemalis* – с 1,5 мг/л кинетина [15]. В наших исследованиях при изучении влияния питательной среды на развитие эксплантов на втором этапе микроразмножения использовали преимущественно среды с кинетином, так как на этапе введения *in vitro* был выявлен высокий морфогенетический потенциал эксплантов тимьяна на средах, содержащих этот цитокинин [16].

Результаты изучения влияния регуляторов роста в питательной среде на микроразмножение *T. vulgaris* показали, что существенное влияние на втором этапе

размножения оказывал тип цитокинина. Выявлено, что применение различных цитокининов (БАП или кинетина) вызывало разные морфогенетические реакции эксплантов тимьяна. Так, БАП (совместно с ГК<sub>3</sub>) стимулировал адвентивное побегообразование у основания эксплантов. Однако образовавшиеся микропобеги (6,5–8,3 шт./эксплант) даже на 70-е сут культивирования были укороченными (длиной 0,5–0,7 см). Такие побеги невозможно черенковать, а при последующих субкультивированиях они не регенерировали в полноценные побеги (таблица 2, рисунок 4). Необходимо отметить, что часть образовавшихся побегов на средах с БАП и ГК<sub>3</sub> была оводненной, что в свою очередь значительно снижало количество побегов для микроразмножения. Упоминания о витрификации побегов при размножении *in vitro* встречаются в публикациях некоторых ученых [17–19]. Это явление обычно связывают с высокой влажностью и избытком сахаров и минеральных веществ у растений при культивировании *in vitro*, в результате чего нередко возникают физиологические, морфологические и анатомические изменения из-за низкой эффективности фотосинтеза и нарушения работы устьичного аппарата.



**Рисунок 4 – Культивирование эксплантов тимьяна на питательной среде MS, содержащей 0,5 мг/л БАП и 2,0 мг/л ГК<sub>3</sub>**

Следует отметить, что питательная среда, содержащая в качестве гормонов один БАП, не способствовала образованию большого количества побегов на эксплант. Это свидетельствует о том, что данный цитокинин вызывал множественное побегообразование только при совместном применении с ГК<sub>3</sub>. Совместное применение БАП и кинетина также индуцировало образование множества мелких побегов у основания эксплантов.

Использование в качестве цитокинина одного кинетина способствовало значительному увеличению длины эксплантов (2,0–2,8 см). При более длительном цикле выращивания на среде с этим регулятором роста происходило образование побегов первого и второго порядка, что позволило значительно повысить коэффициент размножения за счет сочетания двух методов размножения: множественного побегообразования и микрочеренкования. При этом добавление к данному цитокинину ИУК и ГК<sub>3</sub> вызывало снижение коэффициента размножения. Поэтому для лучшего развития эксплантов и последующего размножения на втором этапе необходимо использовать питательную среду MS, содержащую 1,0 мг/л кинетина.

Установлено, что более длительный цикл выращивания на питательных средах, содержащих кинетин, вызывал не только значительное повышение коэффициента размножения, но и активное корнеобразование (таблица 3). Так на 70-е сут культивирования получено в среднем 4,5–4,9 корней на эксплант. При сравнении влияния типа культурального сосуда на этот показатель существенных различий не выявлено. Однако при анализе зависимости длины корней от условий культивирования установлено, что культивирование в банках (на 70-е сут) позволило получить корни длиной до 2,6–3,5 см, тогда как в пробирках их длина составила 1,1–1,3 см.

**Таблица 3 – Влияние состава питательной среды, типа культурального сосуда и длительности цикла выращивания на укоренение микропобегов тимьяна *in vitro***

Регуляторы роста в питательной среде МС, мг/л	Длительность цикла выращивания, сут	Частота ризогенеза, %		Количество корней на побег, шт.		Длина корня, см	
		пробирки	банки	пробирки	банки	пробирки	банки
Кин. – 1,0	30	10,8 ± 1,3	10,1 ± 1,8	0	0	0	0
	50	40,0 ± 4,7	36,2 ± 4,1	3,8 ± 0,3	3,9 ± 0,4	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,2
	70	57,7 ± 6,5	67,2 ± 7,5	4,5 ± 0,6	4,9 ± 0,3	1,2 ± 0,1	2,6 ± 0,2
Кин. – 1,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0	30	6,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0	0	0	0
	50	22,9 ± 3,4	50,2 ± 5,5	3,1 ± 0,4	2,9 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2
	70	51,0 ± 5,6	98,0 ± 9,5	3,7 ± 0,5	4,4 ± 0,6	1,1 ± 0,1	3,5 ± 0,3
Кин. – 1,0; ГК <sub>3</sub> –1,0; ИУК – 0,5	30	1,1 ± 0,1	3,2 ± 0,4	0	0	0	0
	50	20,3 ± 2,3	28,0 ± 3,3	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1
	70	48,4 ± 4,9	93,3 ± 8,7	4,0 ± 0,3	4,3 ± 0,4	1,3 ± 0,1	2,6 ± 0,4
Кин. – 1,0; ИУК – 0,5	30	10,4 ± 0,3	10,2 ± 0,7	0	0	0	0
	50	19,4 ± 3,4	36,3 ± 4,7	1,4 ± 0,2	2,0 ± 0,4	0,9 ± 0,3	2,3 ± 0,1
	70	40,0 ± 3,4	71,4 ± 8,4	3,5 ± 0,4	4,1 ± 0,5	1,1 ± 0,1	2,8 ± 0,3
Кин. – 1,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0; БАП – 0,2	30	0	0	0	0	0	0
	50	2,2 ± 0,2	4,1 ± 0,4	0	0	0	0
	70	0	7,1 ± 0,1	0	2,0 ± 0,1	0	1,3 ± 0,1
БАП – 0,5	70	0	0	0	0	0	0
БАП – 0,5; ГК <sub>3</sub> – 2,0	70	0	19,4 ± 2,7	0	0	0	0

Изучение влияния регуляторов роста на ризогенез *in vitro* показало, что максимальная частота корнеобразования получена на питательных средах МС с 1,0 мг/л Кин. и 1,0 мг/л ГК<sub>3</sub>; и МС с 1,0 мг/л Кин., 1,0 мг/л ГК<sub>3</sub> и 0,5 мг/л ИУК; максимальная средняя длина корней – на МС с 1,0 мг/л Кин. и 1,0 мг/л ГК<sub>3</sub>. Следует отметить, что применение даже невысокой концентрации БАП (0,2 мг/л), ингибировало процесс ризогенеза и образование корней отметили лишь у единичных микропобегов.

Таким образом, выявлена эффективность использования для второго этапа микроразмножения тимьяна питательных сред МС с добавлением кинетина и культивирования в банках с более продолжительным циклом выращивания (70 сут). Установлено, что при таких условиях у микропобегов происходит активный ризогенез. Это свидетельствует о возможности исключения специального этапа укоренения микропобегов и объединения второго и третьего этапов размножения *in vitro*.

### Выводы

В результате исследований выявлены особенности морфогенеза эксплантов тимьяна обыкновенного на втором этапе клонального микроразмножения *in vitro* в зависимости от состава регуляторов роста в питательной среде и условий культивирования.

Установлено преимущество использования в качестве культуральных сосудов банок, что позволило повысить коэффициент размножения в 2,8–3,3 раза по сравнению с пробирками. Выявлено, что при более длительном цикле выращивания (70 сут) коэффициент размножения был в 4,4 раза выше, чем при стандартной

продолжительности культивирования (30 сут). Показана эффективность использования для второго этапа клонального микроразмножения питательных сред МС с 1,0 мг/л кинетина. При оптимальном сочетании изученных факторов коэффициент размножения достигал 12,8.

Выявлено, что при культивировании более 50-ти сут на питательных средах с кинетином происходила индукция ризогенеза с частотой до 57,7–98,0 %. Максимальная частота корнеобразования и длина корней были отмечены при культивировании в банках на среде МС с 1,0 мг/л кин. и 1,0 мг/л ГК<sub>3</sub>.

*Работа выполнена в рамках государственного задания № 0834-2015-0006 и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Республики Крым, грант № 18-416-910008 р\_а.*

### Литература

1. Алинкина Е. С., Мишарина Т. А., Фаткуллина Л. Д. Антирадикальные свойства эфирных масел орегано, тимьяна и чабера // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 1. С. 82–87.
2. Паштецкий В. С., Невкрытая Н. В., Мишнев А. В., Назаренко Л. Г. Эфиромасляная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 320 с.
3. Popov P. L. Plant species, using against virus infections of man and animals: regularities of the distribution in the phylogenetic classification system // J. of Stress Physiology & Biochemistry. 2008. Vol. 4. No. 3. P. 17–64.
4. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений: Учебное пособие. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. 318 с.
5. Bakhtiar Z., Mirjalili M. H., Sonboli A. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant // Crop Breeding and Applied Biotechnology. 2016. Vol. 16. P. 48–54.
6. Leal F., Taghouti M., Nunes F., Silva A., Coelho A.C., Matos M. Thymus plants: a review micropropagation, molecular and antifungal activity // Active ingredients from aromatic and medicinal plants. Chapter 7 // Ed. by Hany A. El-Shemy. 2017. P. 107–126. DOI: 10.5772/66623.
7. Ozudogru E. A., Kaya E., Kirdok E., Issever-Ozturk S. *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* L. and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots // In Vitro Cell & Dev. Biol – Plant. 2011. Vol. 47. P. 309–320.
8. Kulpa D., Wesolowska A., Jadczyk P. Micropropagation and composition of essential oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) // Not Bot Horti Agrobo. 2018. No. 46 (2). P. 525–532.
9. Калинин Ф. Л., Кушнер Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микроклонального размножения растений. К.: Наукова думка. 1992. 232 с.
10. Калашникова Е. А., Кочиева Е. З., Миронова О. Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Колос, 2006. 144 с.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. No. 3. P. 473–497.
12. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
13. Егорова Н. А., Кривоухатко А. Г., Ставцева И. В., Каменек Л. И. Микроразмножение эфиромасличных растений с использованием культуры изолированных тканей и органов *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2013. № 1. С. 9–14.
14. Nordine A., Bousta D., Khanchoufi A., Meskaoui A. An efficient and rapid *in vitro* propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region // Int. J. Pharm. Biosci. Technol. 2013. Vol. 1. No. 3. P. 118–129.
15. Nordine A., Mohammed H., Meskaoui A. *In vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis of *Thymus broussonetii* – a vulnerable aromatic and medicinal plant species // IJPRBS. 2014. Vol. 3. No. 1. P. 425–439.
16. Тевфик А. Ш., Егорова Н. А., Загорская М. С. Особенности морфогенеза эксплантов тимьяна обыкновенного на первом этапе клонального микроразмножения // Таврический вестник аграрной науки. 2018. № 2 (14). С. 118–127.
17. Nazarika B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants // Scientia Horticulturae. 2006. Vol. 108 (2). P. 105–120.
18. Поливанова О. Б., Чередниченко М. Ю. Пути преодоления витрификации многоколосника фенхельного *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (Lamiaceae) в культуре *in vitro* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2017. Вып. 5. С. 17–28.
19. Ziv M. Quality of micropropagated plants – vitrification // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 1991. Vol. 27 (2). P. 64–69.



## References

1. Alinkina E. S., Misharina T. A., Fatkullina L. D. Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013. Vol. 49. No. 1. P. 82–87.
2. Pashetskii V. S., Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V., Nazarenko L.G. Essential oil industry in the Crimea. Yesterday, today, tomorrow. Simferopol: Publishing house Arial, 2017. 244 p.
3. Popov P. L. Plant species, using against virous infections of man and animals: regularities of the distribution in the phylogenetic classification system // *J. of Stress Physiology & Biochemistry*. 2008. Vol. 4. No. 3. P. 17–64.
4. Kalashnikova E. A. Cell engineering of plants: Textbook. Moscow: Publishing house of Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy (RSAU – MAA), 2012. 318 p.
5. Bakhtiar Z., Mirjalili M. H., Sonboli A. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant // *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2016. Vol. 16. P. 48–54.
6. Leal F., Taghouti M., Nunes F., Silva A., Coelho A.C., Matos M. Thymus plants: a review micropropagation, molecular and antifungal activity // *Active ingredients from aromatic and medicinal plants. Chapter 7* // Ed. by Hany A. El-Shemy. 2017. P. 107–126. DOI: 10.5772/66623.
7. Ozudogru E. A., Kaya E., Kirdok E., Issever-Ozturk S. *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* L. and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots // *In Vitro Cell & Dev. Biol – Plant*. 2011. Vol. 47. P. 309-320.
8. Kulpa D., Wesołowska A., Jadczyk P. Micropropagation and composition of essentials oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) // *Not Bot Horti Agrobo*. 2018. No. 46(2). P. 525-532.
9. Kalinin F. L., Kushnir G. P., Sarnatskaya V. V. Technology of microclonal propagation of plants. Kiev: Naukova dumka, 1992. 232 p.
10. Kalashnikova E. A., Kochieva E. Z., Mironova O. Yu. Workshop on agricultural biotechnology. Moscow: Kolos, 2006. 144 p.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. No. 3. P. 473-497.
12. Lakin G. F. Biometrics: Textbook for biologists. Moscow: Vysshaya shkola, 1990. 352 p.
13. Yegorova N. A., Kryvokhatko A. G., Stavtseva I. V., Kamenyok L. I. Essential oil plants micropropagation with the use of tissue and organ culture *in vitro* // *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2013. No. 1. P. 9–14.
14. Nordine A., Bousta D., Khanchoufi A., Meskaoui A. An efficient and rapid *in vitro* propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region // *Int. J. Pharm. Biosci. Technol*. 2013. Vol. 1. No. 3. P. 118–129.
15. Nordine A., Mohammed H., Meskaoui A. *In vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis of *Thymus broussonetii* – a vulnerable aromatic and medicinal plant species // *IJPRBS*. 2014. Vol. 3. No. 1. P. 425–439.
16. Tevfik A. Sh., Yegorova N. A., Zagorskaya M. S. Peculiarities of *Thymus vulgaris* L. explants morphogenesis at the first stage of clonal micropropagation // *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2018. No. 2 (14). P. 118–127.
17. Hazarika B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants // *Scientia Horticulturae*. 2006. Vol. 108 (2). P. 105–120.
18. Polivanova O. B., Cherednichenko M. Yu. Ways of vitrification overcoming of *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (Lamiaceae) in *in vitro* culture // *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2017. No. 5. P. 17–28.
19. Ziv M. Quality of micropropagated plants – vitrification // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 1991. Vol. 27 (2). P. 64–69.

UDC 633.81:57.085.2

Tevfik A. Sh., Yegorova N. A.

### INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS AND CULTURE MEDIUM GORMONAL COMPOSITION ON THE MICROPROPAGATION OF *THYMUS VULGARIS* L. *IN VITRO*

**Summary.** *Thyme (Thymus vulgaris L.) is a perennial subshrub, one of the oldest spicy aromatic and medicinal plants. Its raw material contains up to 0.75 % of essential oil, the main valuable components of which are thymol and linalool. Thyme is widely known in medical practice as a disinfectant, expectorant, analgesic, and sedative. It is also used as an ingredient in cooking and perfumery. To improve the efficiency of thyme breeding and seed production, it is necessary to introduce biotechnological techniques. In this regard, the development of clonal micropropagation methods, which allow both quickly multiply*

valuable genotypes and obtain genetically stable disease-free planting material, is of current interest. The aim of the investigation was to study the influence of cultivation conditions and culture medium composition on the explants development at the second stage of *Thymus vulgaris* L. clonal micropropagation in vitro. The results of studies the morphometric explant parameters when cultured on 7 variants of the Murashige and Skoog culture medium in glass jars or test tube with a growing cycle of 30, 40, 50, 60, and 70 days were presented. With a longer growing cycle (70 days), the multiplication index was 4.4 times higher than under the standard cultivation duration (30 days). Analyses of the effect of culture vessel type showed that a greater number of shoots per explant developed in glass jars (2.9–3.3 times more) compared to cultivation in test tubes. When comparing two cytokinins, the best explants development was revealed on culture media containing kinetin. On the culture media with BAP, a high degree of vitrification of microshoots and the formation of small shoots unable to further regeneration were observed. The most effective culture medium at the stage of micropropagation is MS with 1.0 mg/l of kinetin. At the optimum combination of the studied factors the multiplication index reached 12.8. The induction of rhizogenesis (with the frequency of 57.7–98.0 %) on the culture media with kinetin was revealed. The results of the studies are the basis for development *T. vulgaris* clonal micropropagation methods.

**Keywords:** *Thymus vulgaris* L., clonal micropropagation, growth regulators, duration of the cultivation cycle in vitro, culture vessel, culture medium.

Тевфик Арзы Шевкиевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: tevfik.arzy@yandex.ua.

Егорова Наталья Алексеевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», 295453, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Tevfik Arzy Shevkievna, Cand. Sc. (Biol.), researcher of the Laboratory of biotechnology, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”; 150, Kievskaya str., Simferopol, 295493, Russia; e-mail: tevfik.arzy@yandex.ua.

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

*Дата поступления в редакцию – 15.12.2018.*

*Дата принятия к печати – 15.01.2019.*