

DOI 10.25637/TVAN.2018.02.12.

УДК 633.81:57.085.2

Тевфик А.Ш., Егорова Н.А., Загорская М.С.

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА ЭКСПЛАНТОВ  
ТИМЬЯНА ОБЫКНОВЕННОГО НА ПЕРВОМ ЭТАПЕ КЛОНАЛЬНОГО  
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ**

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

**Реферат.** Цель исследования – получение асептической культуры *in vitro* и изучение влияния типа экспланта и состава питательной среды на морфогенез эксплантов на первом этапе клонального микроразмножения *Thymus vulgaris* L. В изолированную культуру вводили верхушки побегов и сегменты стебля с узлом (8–10 мм). В статье представлены результаты исследований по стерилизации и культивированию эксплантов на двенадцати вариантах питательной среды Мурасиге и Скуга. Установлено, что последовательная стерилизация 70 % этанолом (40 сек.) и 0,3 % раствором препарата «ДезТаб» (3 мин) позволила получить максимальное количество стерильных (94,2 %) и жизнеспособных (90,5 %) эксплантов. При изучении влияния гормонального состава питательной среды на морфометрические показатели эксплантов выявлено лучшее развитие эксплантов при культивировании на средах, содержащих кинетин, по сравнению с БАП и ТДЗ. Установлено, что оптимальной питательной средой на этапе введения является среда МС с 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГКз, на которой были получены микропобеги длиной 1,7–2,0 см с 2,2–2,9 узлами. Анализ влияния типа экспланта показал, что из верхушек побегов на большинстве питательных сред развивались более длинные микропобеги с большим числом узлов по сравнению с сегментами стебля с узлом. Однако количество побегов, формирующихся из эксплантов верхушек, было меньше, чем из сегментов стебля. Результаты исследований являются основой для разработки методики клонального микроразмножения *Thymus vulgaris* L.

**Ключевые слова:** *Thymus vulgaris*, клональное микроразмножение, эксплант, *in vitro*.

### Введение

Тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris* L.) ценное эфиромасличное, лекарственное и пряно-ароматическое растение, которое издавна используется в терапии различных заболеваний. Особенный интерес к данной культуре обуславливается наличием в эфирном масле этого растения тимола, который имеет антимикробную и антимикотическую активность [1–4]. Кроме того, при использовании эфирного масла тимьяна происходит лучшее проникновение антибиотиков, что позволяет снизить дозы этих препаратов, а в некоторых случаях и заменить их благодаря бактерицидному действию фенольных соединений. Настои из растительного сырья тимьяна применяют при заболеваниях органов дыхания, в качестве отхаркивающего средства, для снятия спазмов желудочно-кишечного тракта [5]. Эфирное масло тимьяна используют как обезболивающее средство при ревматизме, артрите, мышечных болях. Кроме того, известно об антиоксидантном действии этого эфирного масла [6].

В ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводят селекционную работу по получению новых сортов тимьяна, в процессе которой необходимо быстро размножить единичные перспективные образцы, обладающие комплексом полезных признаков. В связи с этим весьма актуально применение биотехнологических методов, позволяющих в условиях *in vitro* в более короткие сроки размножить ценный селекционный материал в достаточном количестве для его дальнейшего изучения. Наряду с этим, клональное

размножение – высокоэффективная экологически чистая технология в сельском хозяйстве, которая широко используется на практике и имеет много преимуществ – получение генетически однородного посадочного материала, оздоровление растений от различных инфекций и создание депонированных коллекций *in vitro* [7]. Однако при введении в культуру *in vitro* тимьяна и дальнейшем культивировании исследователи часто сталкивались с высокой частотой контаминации эксплантов у *Thymus moroderi* Pau ex Martinez [8], *Thymus bleicherianus* Pomel [9], *Thymus caespititius* Brot. [10], большим количеством потемневших эксплантов, что обусловлено высокой концентрацией фенольных соединений, тормозящих их развитие *in vitro* [8, 9], низкой приживаемостью и витрификацией побегов. Анализ литературных источников показал, что сведения о приемах микроразмножения тимьяна *in vitro* достаточно противоречивы. Кроме того, биотехнологические исследования проводятся в основном с видами тимьяна, которые не выращивают в нашем регионе: *Thymus mastichina* [11], *Thymus hyemalis* Lange [12], *Thymus serpyllum* L. [13], *Thymus broussonetii* Boiss. [14], *T. moroderi* [8], *Th. bleicherianus* [9], *Thymus syriacus* Boiss., *Thymus fruticosus* (L.) Link, *Thymus majorana* (L.) Kuntze, *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans & Link [15], *Thymus persicus* (Roniger ex Reach F.) Jalas [16].

В связи с этим **цель исследования** – получение асептической культуры и изучение влияния типа экспланта и состава питательной среды на развитие эксплантов на первом этапе клонального микроразмножения *Thymus vulgaris in vitro*.

#### Материалы и методы

Материалом для исследований служили ткани и органы растений тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.) образца №20841 из коллекции ФГБУН «НИИСХ Крыма». В качестве первичных эксплантов использовали верхушки побегов (ВП) и сегменты стебля с узлом (У) длиной 8–10 мм. В работе использовали общепринятые методы культуры органов и тканей растений [17, 18]. Для стерилизации растительного материала использовали следующие антисептики: «Фармасепт» – 96 %  $C_2H_5OH$  («Виват», Украина); «Брадофен 10Н» («ФЛОРИН АО», Венгрия), «Белизна» – 7 %  $NaOCl$  («Пензхимпром», Россия), «Доместос» – 5 %  $NaOCl$  («Юнилевер Русь», Россия); «ДезТаб» – 43 %  $C_3O_3N_3Cl_3$ , 20 %  $NaC_3O_3N_3Cl_2$  («Ахлор Донге ЛТД», КНР). Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [19] с добавлением тидиазурона (ТДЗ), гибберелловой кислоты (ГК<sub>3</sub>), кинетина, БАП и ИУК («Sigma», США) в пробирках, закрытых фольгой. Культивирование проводили в культуральной комнате при температуре 24–26 °С, относительной влажности воздуха 70 % и освещенности 2000–3000 люкс с фотопериодом 16 часов. На 40-е сутки культивирования определяли морфометрические параметры развивающихся эксплантов (частоту множественного побегообразования, количество и длину побегов, количество узлов на побег и др.). Коэффициент размножения рассчитывали как произведение количества побегов на количество узлов на побеге. В каждом варианте опыта анализировали не менее 30 эксплантов, повторность опыта двух-трехкратная. Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам [20], с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010).

#### Результаты и их обсуждение

Отсутствие патогенов – основное требование при введении первичного экспланта в условия *in vitro*, что обычно достигается поверхностной стерилизацией исходного растительного материала дезинфицирующими средствами. Подбранное вещество, обладающее стерилизующим эффектом, должно не только освобождать экспланты от контаминации, но и максимально сохранять жизнеспособность клеток растения [21]. Сведения о получении асептической культуры эксплантов тимьяна

весьма противоречивы относительно типов, концентраций и экспозиций стерилизующих веществ [8, 13, 15, 16]. В наших экспериментах мы использовали ступенчатую стерилизацию: вначале обработку 70 % этанолом (40 сек.), а затем обработку одним из стерилизующих веществ (таблица 1).

**Таблица 1 – Влияние вариантов стерилизации на количество стерильных и жизнеспособных эксплантов тимьяна *in vitro***

Стерилизующий препарат*	Концентрация, %	Экспозиция, мин	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
«Брадофен»	33	10	17,1 ± 1,8	0,0
	50	10	20,4 ± 1,9	0,0
	66	10	58,2 ± 5,2	0,0
«Белизна»	100	8	40,3 ± 4,1	10,2 ± 1,0
		10	42,0 ± 3,9	9,6 ± 1,1
		12	63,1 ± 6,6	0,0
«Доместос»	50	5	42,1 ± 3,4	38,4 ± 3,1
		7	50,8 ± 5,5	34,1 ± 3,3
		10	59,8 ± 5,6	19,1 ± 1,1
		12	62,2 ± 6,5	22,9 ± 2,7
	100	3	78,2 ± 6,7	28,2 ± 2,2
		5	90,8 ± 8,8	10,3 ± 0,9
		7	91,3 ± 7,7	6,5 ± 0,6
«ДезТаб»	3	3	94,2 ± 8,4	90,5 ± 9,6
	5	5	95,9 ± 9,9	79,3 ± 7,8

\*Примечание: экспланты предварительно выдерживали в 70% этаноле в течение 40 сек.

Изучение влияния 12 вариантов стерилизации на количество стерильных и жизнеспособных эксплантов тимьяна показало, что стерилизующие вещества значительно отличались по своему действию на растительный материал. Так, во всех вариантах с препаратом «Брадофен» отметили 100 % потемнение эксплантов уже на вторые-шестые сутки. Использование «Белизны» способствовало сохранению жизнеспособности до пяти-десяти суток. Однако практически все режимы стерилизации с этим веществом также полностью подавляли развитие эксплантов. При стерилизации «Доместосом» получены жизнеспособные экспланты, однако их количество не превышало 6,5–38,4 %. Установлено, что оптимальные результаты (94,2 % стерильных эксплантов и 90,5 % жизнеспособных эксплантов) получены при последовательной стерилизации 70 % этанолом (40 сек.) и 0,3 % раствором препарата «ДезТаб» (3 мин).

В зарубежных публикациях сообщается об использовании в составе среды поливинилпирролидона [9], аскорбиновой и лимонной кислоты [11] для преодоления проявлений окисления фенольных соединений при введении эксплантов *in vitro*. В наших исследованиях мы использовали погружение эксплантов тимьяна в раствор аскорбиновой кислоты (300 мг/л) перед помещением на питательную среду, однако эта обработка не была эффективной. Тем не менее, существенного потемнения питательной среды при выделении фенольных соединений не отметили.

При введении в культуру *in vitro* через две-три недели у испытанных типов эксплантов (сегментов стебля с узлом и верхушек побегов) наблюдали развитие основного или пазушных побегов, индукцию адвентивных почек и побегов. Кроме того, на некоторых питательных средах отмечены единичные проявления каллусообразования (Т26 и Т31) и ризогенеза (Т17 и БГ).

Судя по литературным данным, некоторые виды тимьяна хорошо развивались на безгормональной питательной среде [8, 13, 22]. В ходе наших экспериментов

получены низкие показатели развившихся сегментов стебля с узлом (62,2 %) и верхушек побега (78,3 %), а также частота множественного побегообразования (69,1 % и 80,3 %, соответственно) на питательной среде без регуляторов роста (рисунок 1, 2А). Вместе с тем при культивировании эксплантов на безгормональной среде получены микропобеги с 2,3 (из верхушек побегов) и 1,7 (из сегментов стебля с узлом) узлами, но с небольшим количеством побегов на эксплант – 1,2 и 1,8 шт./эксплант, что снижало коэффициент размножения на первом этапе клонального микроразмножения.

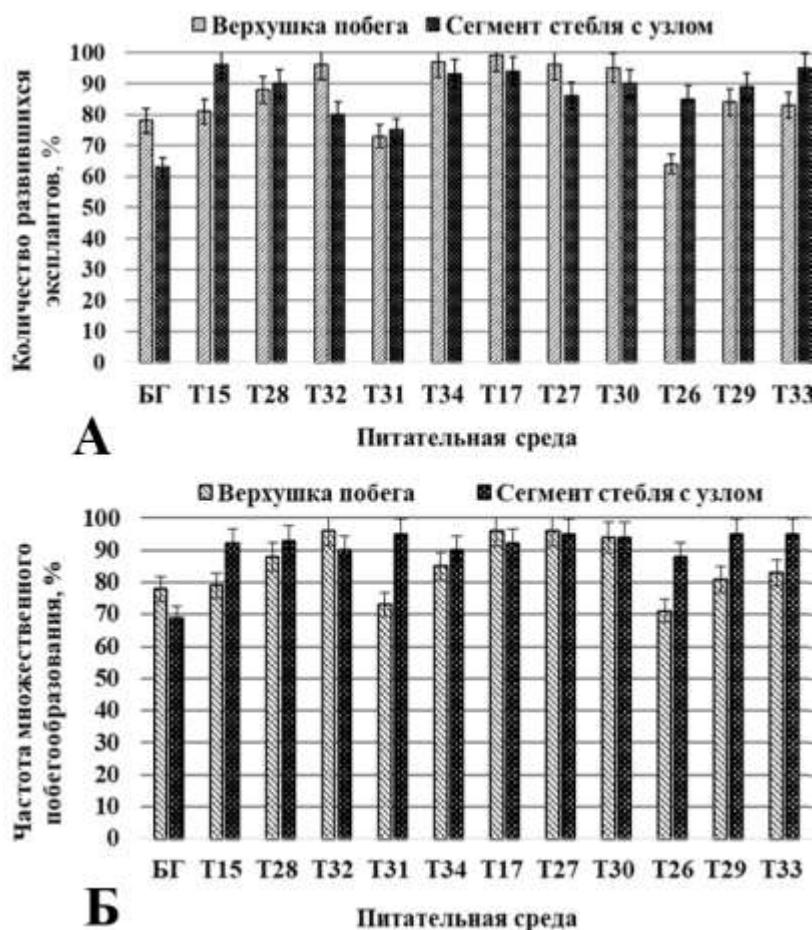
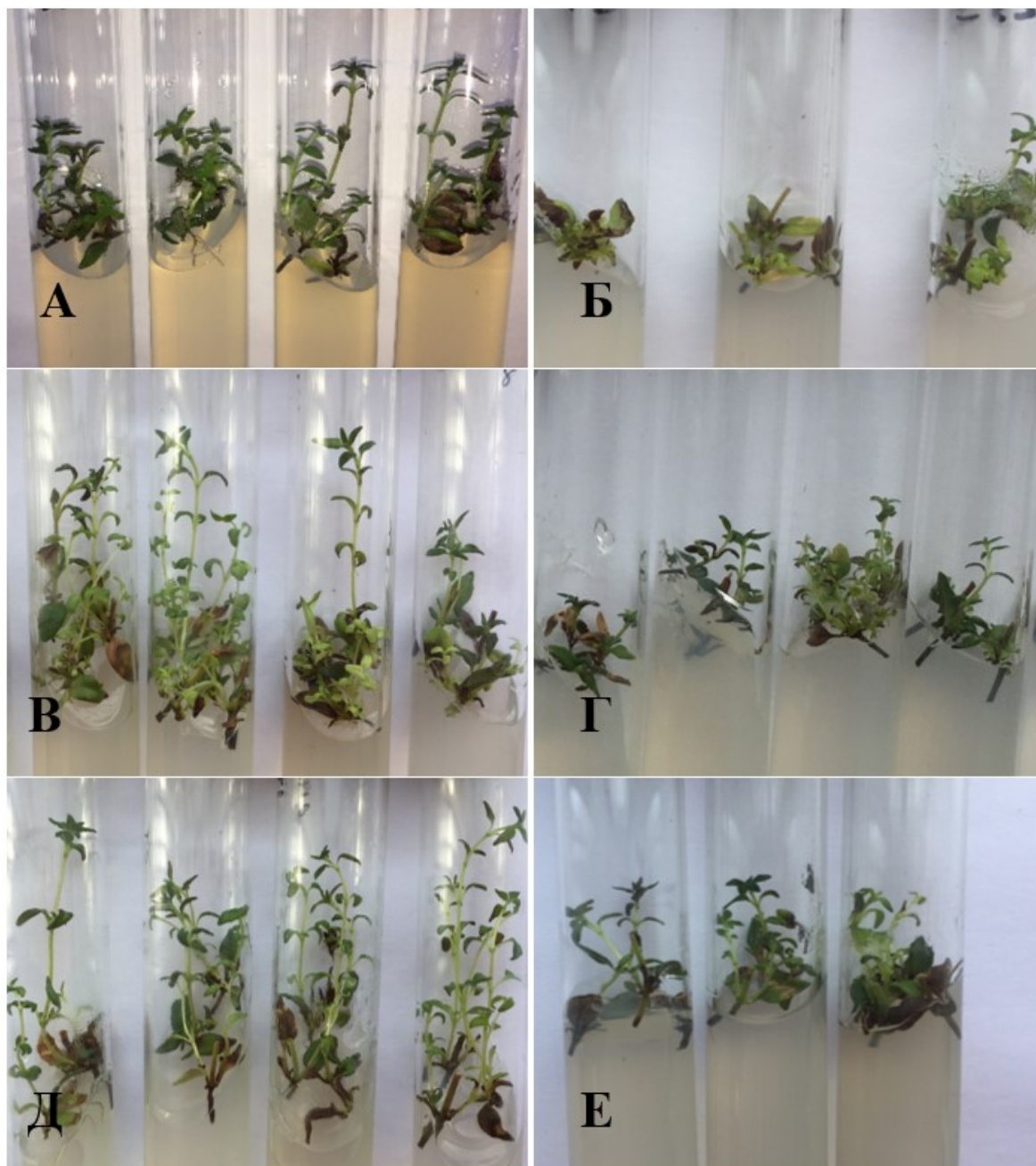


Рисунок 1 – Влияние типа экспланта и состава питательной среды на количество развившихся эксплантов (А) и частоту множественного побегообразования (Б) при культивировании тимьяна *in vitro*

Примечание: состав питательных сред см. в таблице 2.

В ходе проведения экспериментов проанализировано влияние трех цитокининов (БАП, ТДЗ и кинетин) при их введении в питательную среду совместно с ИУК и ГК<sub>3</sub> (таблица 2). Изучаемые в работе типы и концентрации регуляторов роста выбраны на основании наших предварительных исследований. Максимальное количество побегов на эксплант (3,1–3,4 шт.) выявлено на средах с БАП – Т15, Т28 и ТДЗ – Т29 (только у сегментов стебля с узлом). Однако большинство полученных микропобегов на этих и других питательных средах, содержащих БАП и ТДЗ, были витрифицированными, имели желто-зеленую окраску, укороченные междоузлия или длину до 0,9 см (рисунок 2), что не позволяло их использовать для дальнейшего субкультивирования.





**Рисунок 2 – Экспланты тимьяна на 40 сут культивирования на различных питательных средах: БГ (А); Т29 (Б); Т15 (В); Т31 (Г); Т17 (Д); Т26 (Е)**

*Примечание: состав питательных сред см. в таблице 2.*

При применении более низкой концентрации БАП (Т32) отмечена большая длина побегов и число узлов. Совместное добавление в питательную среду БАП, ИУК и ГК<sub>3</sub> (Т31) значительно снижало количество развившихся эксплантов и число образовавшихся побегов на эксплант. Следует отметить, что при использовании питательных сред, содержащих ТДЗ, экспланты начинали развиваться на 25–28 сутки после введения, тогда как на средах, содержащих кинетин и БАП, этот процесс начинался на 8–15 сутки. Более длительное культивирование на средах Т29 и Т33 (30 суток) вызывало активное множественное побегообразование.

В результате исследований на всех питательных средах, содержащих один цитокинин – кинетин, получено максимальное количество регенерировавших микропобегов из верхушек побегов (95,1–98,2 %). Подобная тенденция наблюдалась и при изучении зависимости множественного побегообразования от состава питательной среды (см. рисунок 1Б). Вместе с тем, культивирование эксплантов на содержащих кинетин питательных средах (Т17, Т30) позволило получить темно-зеленые микропобеги длиной 2–2,5 см с 2,1–3,6 узлами (см. рисунок 2Д). При этом на питательной среде Т30 отмечены максимальные значения длины побегов и количества узлов на побег. Однако в связи с тем, что количество образовавшихся побегов на эксплант на среде с ИУК было невысоким (1,1–1,8 штук), коэффициент размножения при культивировании верхушечных почек на среде Т17 был выше.

**Таблица 2 – Влияние типа экспланта и состава питательной среды на развитие эксплантов при введении в культуру *in vitro* тимьяна**

№ питательной среды	Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Количество побегов на эксплант, шт.		Длина побегов, см		Количество узлов на побег, шт.	
		ВП	У	ВП	У	ВП	У
БГ	–	1,2 ± 0,07	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Т15	БАП – 1,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,1
Т28	БАП – 2,0; ГК <sub>3</sub> – 2,0	3,3 ± 0,3	3,4 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Т32	БАП – 0,5; ГК <sub>3</sub> – 1,0	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,9 ± 0,1	2,4 ± 0,3	1,7 ± 0,1
Т31	БАП – 1,0; ИУК – 0,5; ГК <sub>3</sub> – 1,0	1,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Т26	БАП – 1,0; кинетин – 1,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0	2,0 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Т17	кинетин – 1,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,2
Т27	кинетин – 2,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Т34	кинетин – 3,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1
Т30	кинетин – 1,0; ИУК – 0,5; ГК <sub>3</sub> – 1,0	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	3,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2
Т29	ТДЗ – 1,0; ГК <sub>3</sub> – 1,0	1,8 ± 0,1	3,2 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,1
Т33	ТДЗ – 0,5; ГК <sub>3</sub> – 1,0	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1

*Примечание:* ВП – верхушки побегов; У – сегмент стебля с узлом.

Показано, что совместное применение БАП и кинетина (среда Т26) также способствовало образованию у основания эксплантов множества мелких побегов, не способных в дальнейшем регенерировать в полноценные побеги с несколькими узлами (см. рисунок 2Е). При этом на питательной среде, содержащей два цитокинина, отметили большую длину побегов (1,2 см), полученных из верхушек побегов, по сравнению с побегами, которые культивировались на средах только с БАП (Т15, Т28, Т31).

Таким образом, наши исследования показали, что для получения полноценных побегов для дальнейшего субкультивирования необходимо добавление в питательную среду кинетина. Применение данного регулятора роста позволило получить высокие показатели длины эксплантов и количества узлов на побег и таким образом размножить *T. vulgaris*, используя методы микрочеренкования, а также адвентивного побегообразования. Поэтому для лучшего развития эксплантов и последующего размножения на этапе введения необходимо использовать

питательную среду T17, содержащую 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК<sub>3</sub>. Однако анализ научных публикаций показал, что для большинства видов тимьяна требовалось добавление в питательную среду другого цитокинина – БАП. Так, некоторые зарубежные ученые на первом этапе микроразмножения максимальные морфометрические показатели получили при использовании среды с 0,1-2,0 мг/л БАП [9, 11, 16] или этого гормона совместно с 0,2 мг/л НУК [14].

Изучение влияния типа экспланта на частоту множественного побегообразования показало, что сегменты стебля с узлом и верхушки побегов имели различия при культивировании на питательных средах, содержащих разные цитокинины. Так, сегменты стебля с узлом характеризовались более высокой частотой множественного побегообразования на средах с 1,0 мг/л БАП или 0,5–1,0 мг/л ТДЗ (90,1–95,5 %) по сравнению с верхушками побегов (79,3–84,4 %). Вместе с тем, при культивировании на питательных средах с кинетином существенных различий по частоте множественного побегообразования у изучаемых типов эксплантов не отметили (см. рисунок 1).

На большинстве питательных сред из верхушек побегов развивалось меньшее число микропобегов, но с большей длиной и количеством узлов по сравнению с сегментами стебля с узлом (см. таблицу 2). Однако при сравнении коэффициентов размножения у изучаемых эксплантов практически на всех питательных средах существенных различий не отметили. В связи с этим использование двух типов эксплантов целесообразно для клонального микроразмножения тимьяна, так как позволяет получить больше эксплантов с одного растения и быстрее размножить ценные образцы.

### Выводы

В результате исследований выявлены особенности морфогенеза эксплантов тимьяна обыкновенного на этапе введения в культуру *in vitro* в зависимости от типа экспланта и состава регуляторов роста в питательной среде.

Установлено, что последовательная стерилизация 70 % этанолом (40 сек.) и 0,3 % раствором препарата «ДезТаб» в течение 3 мин позволила получить максимальное количество стерильных (94,2 %) и жизнеспособных (90,5 %) эксплантов.

Изучение влияния двенадцати модификаций питательной среды Мурасиге и Скуга на развитие эксплантов тимьяна показало, что при их культивировании на питательных средах с БАП и ТДЗ образовывалось от 1,2 до 3,2 мелких витрифицированных почек, неспособных регенерировать в полноценные микропобеги.

Выявлена эффективность использования для введения *in vitro* верхушек побегов и сегментов стебля питательной среды МС с добавлением 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК<sub>3</sub>. При сравнении морфогенетического потенциала двух типов эксплантов установлено, что из верхушек побегов развивалось меньшее число микропобегов, но с большей длиной и количеством узлов по сравнению с сегментами стебля с узлом.

*Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику ФГБУН «НИИСХ Крыма» Платоновой Татьяне Витальевне за любезно предоставленный растительный материал.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-416-910008 p\_a.*

## Литература

1. Старчак Ю. А., Бубенчикова А. Н. Антимикробная активность водных извлечений и эфирных масел тимьянов флоры средней полосы европейской части России // Ученые записки Орловского государственного университета. 2014. № 6 (62). С. 144–147.
2. Паштецкий В. С., Невкрытая Н. В., Мишнева А. В., Назаренко Л. Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь: ИТ «Ариал», 2017. 244 с.
3. Javed H., Erum Sh., Tabassum S., Ameen F. An overview on medicinal importance of *Thymus vulgaris* // Journal of Asian Scientific Research. 2013. Vol. 3. No. 10. P. 974–982.
4. 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. Pr. Croatia: National and University Library in Zagreb, 2017. P. 107–126.
5. Дудченко Л. Ароматы здоровья. Киев: Глобус, 1997. 152 с.
6. 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.
7. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений: Учебное пособие. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. 318 с.
8. Marco-Medina A., Casas J. L. *In vitro* multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex Martinez, an endemic Spanish plant // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2015. Vol. 120. P. 99–108.
9. Nordine A., Meskaoui A. Rapid *in vitro* regeneration and clonal multiplication of *Thymus bleicherianus* Pomel, a rare and threatened medicinal and aromatic plant in Morocco // Med Aromat Plants. 2014. Vol. 3. No. 1. P. 145.
10. Mendes M. L. Molecular and biotechnological approaches to essential oils production in *Thymus caespitosus* especialmente // elaborada para a obtenção do grau de doutorem Biologia, na especialidade de Biotecnologia. 2014. 140 p.
11. Mendes M., Romano A. *In vitro* cloning of *Thymus mastichina* L. field-grown plants // Acta Hort. 1999. No. 502. P. 303–306.
12. Nordine A., Bousta D., Khanchoufi A., Meskaoui A. An efficient and rapid *in vitro* propagation system of *Thymus huemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region // Int. J. Pharm. Biosci. Technol. 2013. Vol. 1. No. 3. P. 118–129.
13. Пат. 29919 Республика Казахстан, МПК АО1Н 4/00. Способ микрклонального размножения тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) *in vitro*. Кириллов В. Ю., Стихарева Т. Н., Муканов Б. М., Манабаева А. У., Дауленова М. Ж.; заявитель и патентообладатель ТОО «Казахский научно-исследовательский институт лесного хозяйства и агролесомелиорации». – №2014/0889.1; заявл. 30.06.2014 (45); опубл. 15.06.2015, Бюл. № 6. 4 с.
14. Nordine A., Bousta D., 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.
15. Raed Alcowani, Estra Solyman, Hassan Abu Qauod. Introducing some of threatened *Thymus* species to *in vitro* tissue culturing as an approach for their conservation // Pak. J. Bot. 2017. Vol. 49. No. 1. P. 259–264.
16. 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.
17. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наукова думка. 1980. 488 с.
18. Калашникова Е. А., Кочиева Е. З., Миронова О. Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии (Учебник и учеб. пособия для студентов высших учеб. заведений). М.: Колос С, 2006. 144 с.
19. 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.
20. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
21. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
22. Coelho N. R. *In vitro* propagation protocol for *Thymus lotocephalus* // Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability of endangered species endemic from Algarve region in Tese para obtenção do grau de Doutorem Ciências Biológicas (Especialidade em Biotecnologia) Faro. 2014. P. 43–54.

## References

1. Starchak Yu. A., Bubenchikova V. N. Antimicrobial activity of aqueous extracts and essential oils of Thymes flora middle zone of European part of Russia // Scientific Notes of Orel State University. Vol. 6. No. 62. 2014. P. 144–147.
2. Pashtetskii V. S., Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V., Nazarenko L. G. Essential oil industry in the Crimea. Yesterday, today, tomorrow. Simferopol: IT Arial, 2017. 244 p.



3. Javed H., Erum Sh., Tabassum S., Ameen F. An overview on medicinal importance of *Thymus vulgaris* // Journal of Asian Scientific Research. 2013. Vol.3, No. 10. P. 974-982.
4. 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. Pr. Croatia: National and University Library in Zagreb, 2017. P. 107–126.
5. Dudchenko L. Aromaty zdorovja [Health fragrances], Kiev: Globus, 1997. 152 p. (in Russ.).
6. 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.
7. Kalashnikova E. A. Cell engineering of plants: Textbook. M.: Publishing house RGAU-MSHA, 2012. 318 p.
8. Marco-Medina A., Casas J. L. In vitro multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex Martinez, an endemic Spanish plant // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2015. Vol. 120. P. 99–108.
9. Nordine A., Meskaoui A. Rapid in vitro regeneration and clonal multiplication of *Thymus bleicherianus* Pomel, a rare and threatened medicinal and aromatic plant in Morocco // Med Aromat Plants. 2014. Vol. 3. No. 1. P. 145.
10. Mendes M.L. Molecular and biotechnological approaches to essential oils production in *Thymus caespitosus* especialmente // elaborada para obtenção do grau de doutorem Biologia, na especialidade de Biotecnologia. 2014. 140 p.
11. Mendes M., Romano A. In vitro cloning of *Thymus mastichina* L. field-grown plants // Acta Hort. 1999. No. 502. P. 303–306.
12. Nordine A., Bousta D., Khanchoufi A., Meskaoui A. An efficient and rapid in vitro propagation system of *Thymus huemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region // Int. J. Pharm. Biosci. Technol. 2013. Vol. 1. No. 3. P. 118–129.
13. Pat. 29919 Republic of Kazakhstan, IPC AO1H 4/00. The method of microclonal reproduction of thyme creeping (*Thymus serpyllum* L.) in vitro. Kirillov V. Yu., Stikhareva T. N., Mukanov B. M., Manabaeva A. U., Daulenova M. Zh.; applicant and patent owner of LLP Kazakh Research Institute of Forestry and Agroforestry. №2014 / 0889.1; claimed. 30.06.2014 (45); publ. 15.06.2015, Bul. No. 6. 4 p.
14. Nordine A., Bousta D., 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.
15. Raed Alcowni, Estra Solyman, Hassan Abu Qauod Introducing some of threatened *Thymus* species to in vitro tissue culturing as an approach for their conservation // Pak. J. Bot. 2017. Vol. 49. No. 1. P. 259–264.
16. 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.
17. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polishchuk V. E. Metody kul'tury tkanei v fiziologii i biokhimii rastenii [Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry]. Kiev, "Naukova dumka" Publ. 1980. 488 p.
18. Kalashnikova E. A., Kochieva E. Z., Mironova O. Yu. Workshop on agricultural biotechnology (Textbook for students of higher educational institutions). Moscow: Kolos, 2006. 144 p.
19. 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.
20. Lakin G. F., Biometrics. Moscow, "Vysshaya shkola", 1990. 352 p.
21. Butenko R. G. Cell biology of higher plants in vitro and biotechnology on their base. Training manual. Moscow, FBK-PRESS Publ., 1999. 160 p.
22. Coelho N. R. In vitro propagation protocol for *Thymus lotocephalus* // Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability of endangered species endemic from Algarve region in Tese para obtenção do grau de Doutorem Ciências Biológicas (Especialidade em Biotecnologia) Faro, 2014. P. 43–54.

UDC 633.81:57.085.2

Tevfik A. Sh., Yegorova N. A., Zagorskaya M. S.  
**PECULIARITIES OF *THYMUS VULGARIS* L. EXPLANTS MORPHOGENESIS AT THE  
FIRST STAGE OF CLONAL MICROPROPAGATION**

**Summary.** The aim of the study was to obtain an aseptic culture in vitro and to study the effect of explant type and culture medium composition on the explant morphogenesis at the first stage of clonal micropropagation of *Thymus vulgaris*. The shoot tips and stem segments with a node (8–10 mm) were introduced into an isolated culture. Research findings

*on sterilization and cultivation explants on 12 modifications of Murashige and Skoog culture medium are presented in the article. It was found that sequential sterilization with 70 % ethanol (40 sec) and 0.3 % solution of DesTab (3 min) allowed obtaining the maximum amount of sterile (94.2 %) and viable (90.5 %) explants. When studying the influence of the culture medium hormonal composition on the morphometric parameters of explants, the best development of the explants was revealed on medium containing Kinetin, as compared with BAP and TDZ. It was found that the optimal composition of culture medium at the introduction stage is the MS medium with 1.0 mg/l of Kinetin and 1.0 mg/l of GA<sub>3</sub>, at which microshoots 1.7–2.0 cm long with 2.2–2.9 nodes were obtained. Analysis of the effect of explant type showed that from the shoot tips, compared to stem segments with a node, longer microshoots with a greater number of nodes developed on most culture media. However, the number of shoots formed from the explants of the shoot tips was less than from the segments of the stem. The results of the studies are the basis for development of the *T. vulgaris* clonal micropropagation methods.*

**Keywords:** *Thymus vulgaris, clonal micropropagation, explant, in vitro.*

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.

Загорская Маргарита Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: zagorskayamargo@gmail.com.

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

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

Zagorskaya Margarita Sergeevna, junior researcher fellow of Laboratory of biotechnology, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”, 150 Kievskaya str., Simferopol, Republic of Crimea, 295493, Russia; e-mail: zagorskayamargo@gmail.com.

*Дата поступления в редакцию – 20.06.2018.*

*Дата принятия к печати – 25.06.2018.*