

УДК 633.81:57.085.2

DOI: 10.5281/zenodo.7898524

EDN HRKDCJ

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

**ВЛИЯНИЕ ЛИМИТИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЛАНТОВ
THYMUS SERPYLLUM L. И *THYMUS CAUCASICUS WILLD.* НА ПЕРВОМ
ЭТАПЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO***

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Реферат. Внимание исследователей давно привлекают представители рода *Thymus*, которые широко используют в фармацевтическом, косметологическом производстве и кулинарии. Решение многих проблем селекции растений невозможно без привлечения биотехнологических методов. Цель исследования – изучение влияния гормонального состава питательной среды, типа экспланта и условий культивирования на развитие эксплантов на первом этапе клонального микроразмножения *Thymus serpyllum L.* и *Thymus caucasicus Willd. in vitro*. В качестве эксплантов использовали сегменты стебля с узлом или верхушки побегов. В статье представлены результаты анализа морфометрических параметров эксплантов при культивировании на 11-ти вариантах питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением кинетина, тидиазурона, 6-бензиламинопурина (БАП), гибберелловой кислоты и индолилуксусной кислоты. При культивировании этих типов эксплантов не выявлено существенных различий большинства анализируемых показателей. При сравнении различных регуляторов роста выявлено, что максимальное количество побегов было при использовании питательных сред, содержащих БАП, а максимальная длина побегов – на средах с добавлением кинетина. Установлено, что наиболее эффективной питательной средой на этапе введения эксплантов в культуру *in vitro* у *T. caucasicus* является МС, дополненная 1,0 мг/л кинетина, а для *T. serpyllum* – МС с 1,0 мг/л БАП. Показано, что культивирование эксплантов в пробирках, закрытых фольгой, способствовало увеличению коэффициента размножения до 1,4 раза по сравнению с пробирками с ватно-марлевыми пробками. Четырехфакторный дисперсионный анализ показал, что наибольшее влияние на количество и длину побегов при микроразмножении оказывал состав питательной среды (доля влияния – 48,2 и 52,6 % соответственно). При оптимальном сочетании изученных факторов коэффициент размножения на этапе введения в культуру *in vitro* у изученных видов составил 9,2–10,4. Результаты исследований являются основой для разработки методики клонального микроразмножения *T. serpyllum* и *T. caucasicus*.

Ключевые слова: тимьян ползучий (*Thymus serpyllum L.*), тимьян кавказский (*Thymus caucasicus Willd.*), клональное микроразмножение *in vitro*, питательная среда, регуляторы роста, эксплант.

Для цитирования: Тевфик А. Ш., Егорова Н. А., Коваленко М. С. Влияние лимитирующих факторов на развитие эксплантов *Thymus serpyllum L.* и *Thymus caucasicus Willd.* на первом этапе микроразмножения *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2023. № 1(33). С. 113–124. DOI: 10.5281/zenodo.7898524. EDN: HRKDCJ.

For citation: Teyfik A .Sh., Yegorova N. A., Kovalenko M. S. Influence of limiting factors on the development of *Thymus serpyllum L.* and *Thymus caucasicus Willd.* explants at the first stage of micropropagation *in vitro* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2023. No. 1(33). P. 113–124. DOI: 10.5281/zenodo.7898524. EDN: HRKDCJ.

Введение

Тимьян (*Thymus*) – многолетний полукустарник из семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), сотни лет назад получивший широкое признание в народной медицине. В Древней Греции и Риме тимьян считался символом силы и мужества. С появлением монастырей это растение стало одной из популярнейших культур в монастырских садах. Ареал обитания разных видов тимьяна очень широк – это страны Средиземноморья и Скандинавии, Германия, Молдова, Украина и др. В России тимьян встречается в средней полосе европейской части, на Урале, в Сибири [1, 2].

Растительное сырье тимьяна содержит много биологически активных веществ – эфирного масла, смол, дубильных веществ, флавоноидов и др. Биологическая активность разных видов рода *Thymus* связана, прежде всего, с присутствием фенольных соединений. Так, антимикробное, противовоспалительное, антигельминтное, антиоксидантное, спазмолитическое и ранозаживляющее свойства обусловлены высоким содержанием карвакрола и тимола [3, 4]. Препараты тимьяна используют в качестве антисептических средств для полости рта, при заболеваниях верхних дыхательных путей и бронхитах, при гастритах, колитах, спазмах кишечника, при невралгии и неврозах различной этиологии. В виде мазей, примочек и компрессов препараты из сырья тимьяна применяют при болях в суставах, ревматизме, различных кожных заболеваниях и укусах насекомых [5–8]. Препараты из сырья тимьяна также эффективны при воспалительных процессах, усугубляемых патогенной микрофлорой, нечувствительной к антибиотикам [9, 10]. Тимьян ползучий включен в фармакопеи многих стран, в том числе и России [1, 2].

Вегетативное размножение многих видов растений, в том числе и ценных сельскохозяйственных культур, нередко сопровождается накоплением и передачей грибной, бактериальной и вирусной инфекции. Кроме того, к недостаткам этого метода можно отнести трудоемкость и сезонность производства, что приводит порой к невозможности получения достаточного количества посадочного материала. Поэтому селекционеры нередко прибегают к биотехнологическому методу клонального микроразмножения, позволяющему увеличить коэффициент размножения культур, снизить энергоемкость, проводить исследования круглый год, что в результате способствует значительному ускорению селекционного процесса [11, 12]. При анализе доступных литературных данных по изучению тимьяна в культуре *in vitro* выявлено, что большинство публикаций касаются видов, которые не произрастают в России. Кроме того, ряд исследователей используют в качестве исходных эксплантов проростки, развившиеся из семян *in vitro* [13–17], что не позволяет получить идентичный родительским формам растительный материал. В других работах микроразмножение разных видов тимьяна включает стадию каллусогенеза *in vitro*: *T. persicus* [18], *T. vulgaris* [19], *T. syriacus*, *T. majorana*, *T. incanus*, *T. fruticosus*, *T. capitatus* [20], что не исключает появление измененных соматоклональных вариантов. Изучению особенностей реализации морфогенетического потенциала тимьяна ползучего в культуре *in vitro* посвящены лишь единичные работы [17, 21]. Сведений о клональном микроразмножении тимьяна кавказского в доступных научных публикациях не выявлено.

Поэтому **цель исследований** – изучение влияния гормонального состава питательной среды, типа экспланта и условий культивирования на развитие эксплантов на первом этапе клонального микроразмножения *Thymus serpyllum* L. и *Thymus caucasicus* Willd. *in vitro*.

Материалы и методы исследований

Материалом служили ткани и органы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна кавказского (*Thymus caucasicus* Willd.). Исходные донорные

растения выращивали в условиях закрытого грунта. Растения *T. serpyllum* были получены из коллекции генофонда пряноароматических, эфиромасличных и лекарственных растений ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» (УНУ №507515), а *T. caucasicus* – из коллекции Южно-Уральского ботанического сада-института – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр РАН».

В работе использовали общепринятые методы культуры органов и тканей растений [22], а также разработанные для некоторых видов эфиромасличных растений [23, 24]. Для стерилизации растительного материала применяли следующие антисептики: «Фармасепт» – 96 % C_2H_5OH («Виват», Украина) и «Дез Таб» – 43 % $C_3O_3N_3Cl_3$, 20 % $NaC_3O_3N_3Cl_2$ («Ахлор Донге ЛТД», КНР). В качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом или верхушки побегов (8–10 мм). Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [25] с добавлением тидиазурона (ТДЗ), гибберелловой кислоты (ГК₃), кинетина (кин.), 6-бензиламинопурина (БАП) и индолилуксусной кислоты (ИУК) (Sigma, США) в пробирках, закрытых фольгой или ватно-марлевыми пробками. В пробирки с 10 мл питательной среды помещали два 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 35–40 сутки культивирования. При этом определяли количество жизнеспособных и развивающихся эксплантов, количество и длину побегов, количество узлов на побег, частоту витрификации. Коэффициент размножения рассчитывали как произведение количества побегов (на эксплант) 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 [26] с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010).

Результаты и их обсуждение

Основным условием при введении первичных эксплантов в культуру *in vitro* является подбор стерилизующего вещества, которое должно не только освободить органы и ткани от контаминации, но и способствовать максимальному сохранению жизнеспособности клеток растения. Литературные данные о получении асептической культуры эксплантов тимьяна весьма противоречивы относительно типов, концентраций и экспозиций стерилизующих агентов [18, 20].

Для оптимизации условий получения асептической культуры тимьяна проведен анализ 17 вариантов режимов стерилизации растительного материала с применением разных концентраций и сочетаний препаратов «Фармасепт» и «Дез Таб». Лучший результат выявлен при последовательном использовании 70 % «Фармасепта» (40 сек.) и 0,3 % раствора препарата «ДезТаб» (10 мин.). Такая схема стерилизации позволила получить максимальное количество стерильных (87,3–94,2 %) и жизнеспособных развивающихся эксплантов (78,1–87,5 %).

Через две–три недели культивирования после введения *in vitro* у эксплантов (сегментов стебля с одним узлом) наблюдали развитие основного и пазушных побегов. У *T. caucasicus* и *T. serpyllum* уже на первом этапе клонального микроразмножения отмечали образование адвентивных почек и побегов (рисунок 1).

При клональном микроразмножении на реализацию морфогенетического потенциала эксплантов в культуре *in vitro* влияют многие факторы, одним из которых является гормональный состав питательной среды. С целью изучения зависимости морфометрических показателей развития эксплантов от состава регуляторов роста их культивировали на питательной среде МС с добавлением ТДЗ, кинетина, БАП, ГК₃ и ИУК. Выбор анализируемых сред основан на наших предыдущих исследованиях *T. vulgaris* [27].

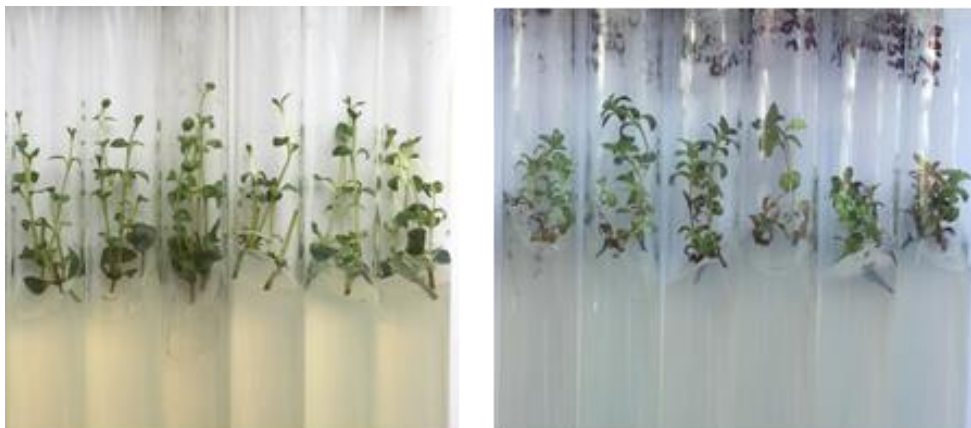


Рисунок 1 – Микропобеги *Thymus caucasicus* (слева) и *Thymus serpyllum* (справа) при микроразмножении *in vitro*

При анализе развития эксплантов на 11-ти модификациях питательной среды МС выявлено, что при культивировании тимьяна ползучего на средах с БАП формировалось большее количество микропобегов на эксплант (3,7–7,3 шт./эксплант) по сравнению со средами с кинетином или ТДЗ (1,8–2,5 шт./эксплант) (рисунок 2). В то же время у *T. caucasicus* на большинстве питательных сред отметили лишь тенденцию повышения данного параметра на средах с БАП. Следует отметить, что добавление ГК₃ в питательную среду с БАП позволило получить у *T. serpyllum* максимальное количество побегов на эксплант, однако часть микропобегов (31,2 %) была витрифицированной. Подобная тенденция к увеличению количества микропобегов при использовании БАП отмечена и у эксплантов *T. caucasicus*.

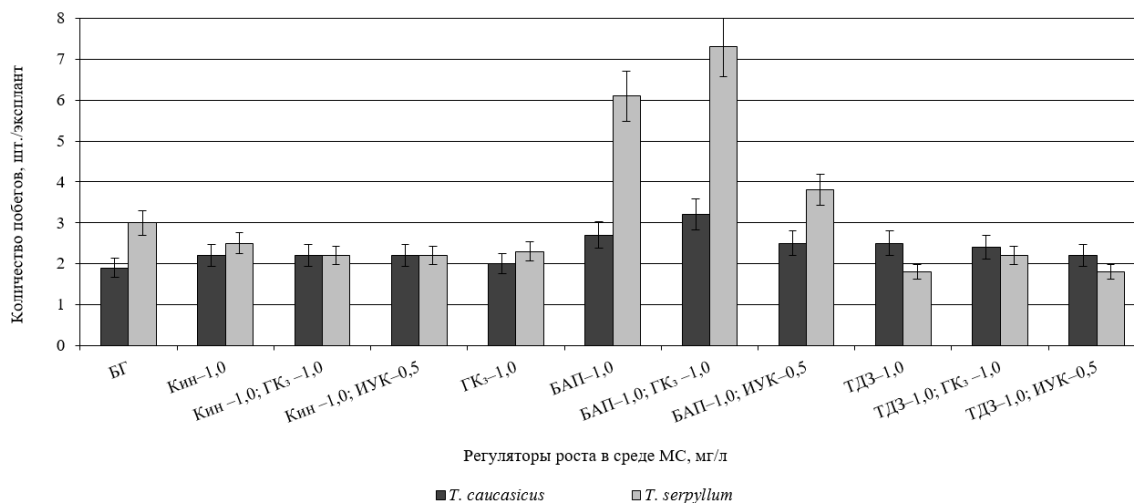


Рисунок 2 – Влияние гормонального состава питательной среды и генотипа на количество побегов на этапе введения тимьяна в культуру *in vitro*

При анализе длины развивающихся из эксплантов побегов выявлены существенные различия в зависимости от состава регуляторов роста в питательной среде (рисунок 3).

Так, при использовании в питательной среде МС в качестве цитокинина кинетина отметили увеличение длины эксплантов у тимьяна кавказского (в 1,7–7,0 раза) и тимьяна ползучего (в 1,6–5,3 раза) по сравнению с другими

модификациями среды МС. Аналогичные результаты получены при сравнении влияния регуляторов роста на количество узлов на побеге (рисунок 4).

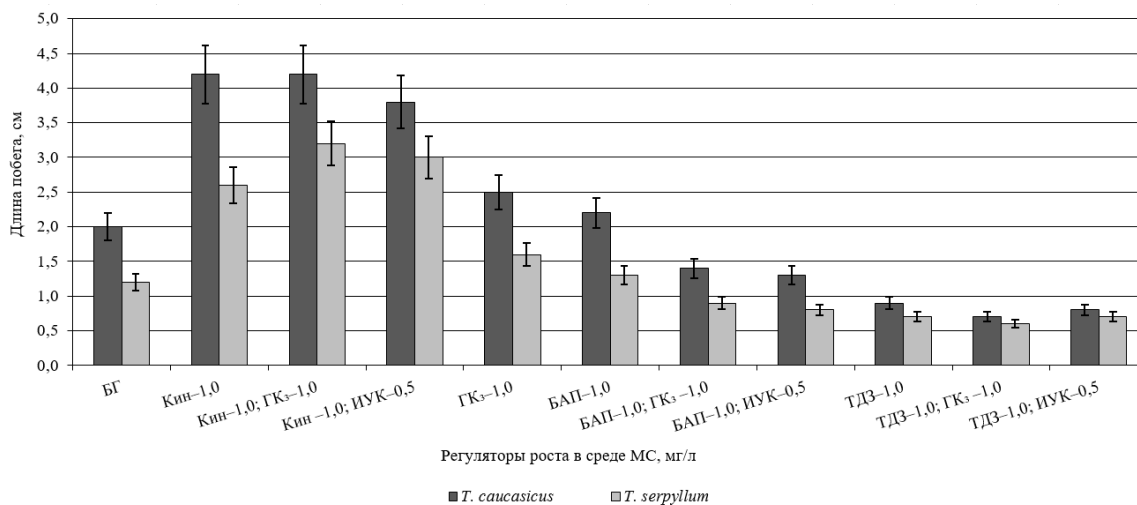


Рисунок 3 – Влияние гормонального состава питательной среды и генотипа на длину микропобегов тимьяна на этапе введения в культуру *in vitro*

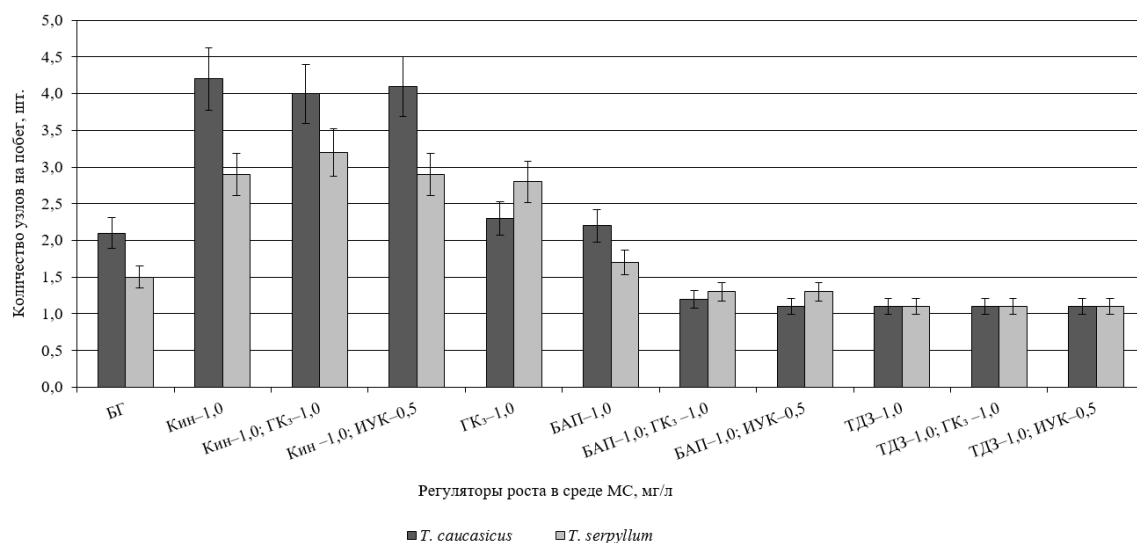


Рисунок 4 – Влияние гормонального состава питательной среды и генотипа на количество узлов (на побег) на этапе введения тимьяна в культуру *in vitro*

Анализ изменения важнейшего параметра при микроразмножении *in vitro* – коэффициента размножения в зависимости от гормонального состава питательной среды (рисунок 5) показал, что использование ТДЗ при введении в культуру *in vitro* эксплантов *T. caucasicus* и *T. serpyllum* нецелесообразно. На средах с этим регулятором роста отмечен минимальный коэффициент размножения (2,0–2,8). При культивировании *T. caucasicus* на питательных средах МС с 1,0 мг/л кинетина или с 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК₃ или 0,5 мг/л ИУК коэффициенты размножения достоверно не отличались. Поэтому для данного вида целесообразно использовать среду более простого состава – МС с 1,0 мг/л кинетина, на которой коэффициент размножения достигал 9,2. У *T. serpyllum* максимальный коэффициент размножения (10,4) получен на питательной среде МС с другим цитокинином – 1,0 мг/л БАП.

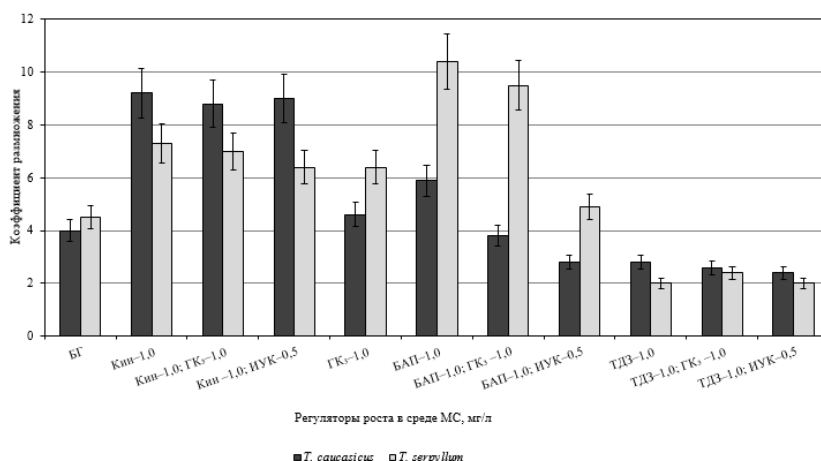


Рисунок 5 – Влияние гормонального состава питательной среды и генотипа на коэффициент размножения двух видов тимьяна на этапе введения в культуру *in vitro*

Изучение влияния генотипа на морфометрические показатели при микроразмножении показало, что наибольшее количество побегов, особенно на средах с БАП, было у *T. serpyllum* (1,8–7,3 шт./эксплант) (см. рисунок 2). При сравнении длины побегов была выявлена иная тенденция. В зависимости от состава питательной среды этот показатель был выше в 1,2–4,2 раза у *T. caucasicus* по сравнению у *T. serpyllum* (см. рисунок 3). Сравнение коэффициентов размножения у изученных видов тимьяна достаточно проблематично, так как для эффективного развития эксплантов необходимы различные цитокинины. Например, на средах с добавлением БАП этот параметр выше у *T. serpyllum* (в 1,8–2,5 раза), тогда как на средах с кинетином, наоборот, коэффициент размножения выше у *T. caucasicus* (в 1,3–1,4 раза). Тем не менее, на оптимальных питательных средах коэффициенты размножения у двух изученных видов достоверно не отличались и достигали: у *T. caucasicus* – 9,2, а у *T. serpyllum* – 10,4 (см. рисунок 5).

При анализе влияния типа экспланта на морфометрические показатели микропобегов на этапе введения в асептическую культуру у двух изученных видов тимьяна не выявлено существенных различий (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние типа экспланта и генотипа на развитие эксплантов на этапе введения тимьяна в культуру *in vitro* (среда МС с 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК₃)

Параметр	<i>T. caucasicus</i>		<i>T. serpyllum</i>	
	верхушка побега	сегмент стебля с узлом	верхушка побега	сегмент стебля с узлом
Количество побегов, шт. на эксплант	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2
Количество узлов, шт. на побег	4,0 ± 0,3	3,7 ± 0,2	2,2 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Длина микропобега, см	4,5 ± 0,3	4,3 ± 0,3	1,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2
Коэффициент размножения	6,8 ± 0,5	8,1 ± 0,7	5,9 ± 0,6	7,0 ± 0,6

Вместе с тем, у *T. serpyllum* отметили достоверное увеличение длины побега и количества узлов на побег при использовании в качестве эксплантов сегментов стебля с одним узлом. Сравнение коэффициента размножения при использовании

разных типов эксплантов не выявило достоверных различий. Поэтому для клонального микроразмножения *T. caucasicus* и *T. serpyllum* целесообразно использовать как верхушки побегов, так и сегменты стебля с узлом, что позволяет получить больше эксплантов с одного растения и быстрее размножить ценные образцы.

При оптимизации условий культивирования в процессе клонального микроразмножения важно подобрать тип культурального сосуда, а иногда и тип пробки. С целью изучения влияния условий культивирования на этапе введения в культуру *in vitro* экспланты тимьяна помещали на питательные среды в пробирки, закрытые ватно-марлевыми пробками или фольгой. Анализ зависимости длины побегов от типа пробки показал достоверное увеличение этого показателя у обоих видов в 1,3–1,8 раза при использовании фольги по сравнению с ватно-марлевыми пробками (таблица 2, рисунок 6).

Подобную тенденцию отмечали при анализе зависимости количества узлов на побег от типа пробки. При этом на количество образовавшихся побегов этот фактор не оказывал существенного влияния. Следует отметить, что при использовании фольги отметили тенденцию повышения коэффициента размножения (на 26–36 %), поэтому на этапе введения рекомендуется использовать этот тип пробки. Такие различия морфометрических параметров побегов могут быть обусловлены разным уровнем влажности и составом воздуха в пробирках при использовании различных пробок.

Таблица 2 – Влияние типа пробки и генотипа на развитие побегов при введении тимьяна в культуру *in vitro* (среда МС с 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГКЗ)

Вид	Тип пробки	Количество побегов, шт. на эксплант	Длина побега, см	Количество узлов, шт. на побег	Коэффициент размножения
<i>T. caucasicus</i>	фольга	2,2 ± 0,1	4,2 ± 0,2	3,7 ± 0,2	8,1 ± 0,7
	ватно-марлевая	2,0 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,2 ± 0,2	6,4 ± 0,6
<i>T. serpyllum</i>	фольга	2,2 ± 0,1	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,2	6,0 ± 0,6
	ватно-марлевая	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	4,4 ± 0,4



Рисунок 6 – Развитие микропобегов *T. serpyllum in vitro* при использовании разных типов пробок

Проведен четырехфакторный дисперсионный анализ влияния различных факторов (генотипа, гормонального состава питательной среды, типа экспланта и типа пробки) на морфометрические показатели развития эксплантов тимьяна при культивировании на первом этапе клонального микроразмножения (рисунок 7).

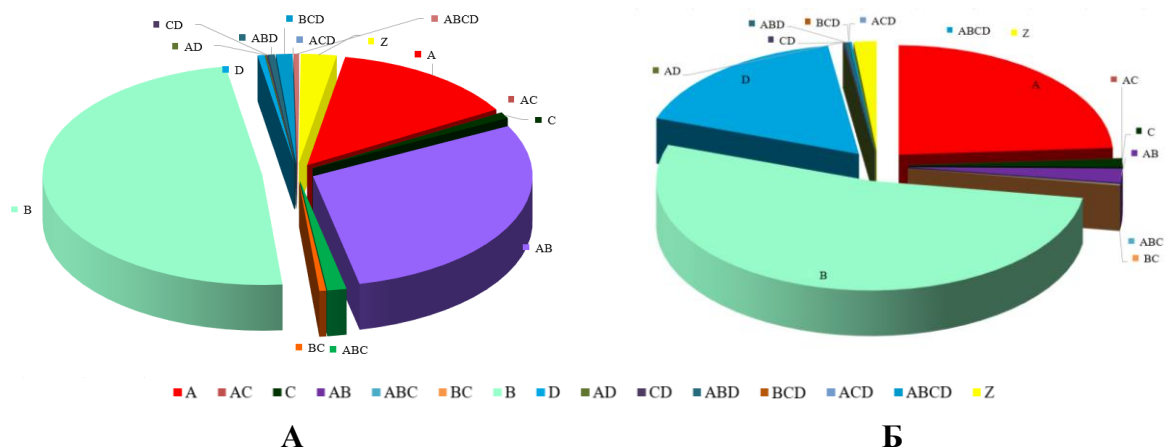


Рисунок 7 – Доля влияния фактора (генотипа, питательной среды, типа экспланта и типа пробки) на количество побегов (А) и длину побега (Б) на первом этапе микроразмножения тимьяна

Примечание. А – генотип; В – питательная среда; С – тип экспланта; D – тип пробки; АВ – генотип/питательная среда; АС – генотип/тип экспланта; АД – генотип/тип пробки; АВС – генотип/питательная среда/тип экспланта; ABD – генотип/питательная среда/тип пробки; ACD – генотип/тип экспланта/тип пробки; ABCD – генотип/питательная среда/тип экспланта/тип пробки; ВС – питательная среда/тип экспланта; BD – питательная среда/тип пробки; BCD – питательная среда/тип экспланта/тип пробки; CD – тип экспланта/тип пробки; Z – неучтенный фактор

Установлено, что на количество побегов (шт./эксплант) наибольшее влияние оказал состав питательной среды и взаимодействие генотипа и состава питательной среды (доля влияния соответственно 48,2 и 28,8 %). На длину побегов наибольшее влияние также оказал состав питательной среды (доля влияния 52,6 %) и меньшее – генотип (доля влияния 23,9 %). При анализе зависимости длины побега от лимитирующих факторов было выявлено существенное влияние типа пробки (17,3 %), что подтверждает данные о том, что использование фольги для закрытия пробирок способствовало удлинению побегов, а значит при последующем микрочеренковании – повышению коэффициента размножения. Проведенный анализ подтвердил отсутствие существенного влияния типа экспланта на микроразмножение тимьяна при введении в культуру *in vitro*. Это свидетельствует о том, что при введении в культуру *in vitro* целесообразно использовать как верхушки побега, так и сегменты стебля с узлом.

Выводы

В результате исследований выявлены особенности морфогенеза эксплантов *T. serpyllum* и *T. caucasicus* на первом этапе клонального микроразмножения *in vitro* в зависимости от состава регуляторов роста в питательной среде и условий культивирования. Подобраны режимы стерилизации, позволяющие получить до 87,3–94,2 % асептических эксплантов. Выявлена эффективность использования при введении в культуру *in vitro* двух типов эксплантов – верхушек побегов и сегментов стебля с узлом. При сравнении действия различных регуляторов роста в составе питательной среды МС показано, что культивирование эксплантов (сегментов стебля с узлом) на средах с кинетином способствовало увеличению длины микропобегов в 1,6–6,0 раза по сравнению с использованием БАП или ТДЗ. Установлено, что на первом этапе клонального микроразмножения оптимальной питательной средой для эксплантов *T. caucasicus* является среда МС с добавлением 1,0 мг/л кинетина, а для *T. serpyllum* – 1,0 мг/л БАП. Выявлено, что культивирование в пробирках, закрытых фольгой, позволило увеличить длину микропобегов в 1,3–1,8 раза и коэффициент размножения в 1,3–1,4 раза, по сравнению с пробирками,

закрытыми ватно-марлевыми пробками. Четырехфакторный дисперсионный анализ показал, что на количество побегов при микроразмножении наибольшее влияние оказал состав питательной среды и взаимодействие генотипа и состава питательной среды (доля влияния соответственно 48,2 и 28,8 %). Длина побегов в большей мере зависела от состава питательной среды, генотипа и типа пробки (доля влияния соответственно 52,6; 23,9 и 17,3 %). При оптимальном сочетании изученных факторов коэффициенты размножения у *T. caucasicus* и *T. serpyllum* достигали соответственно – 9,2 и 10,4. Проведенное исследование является основой для дальнейшей разработки методики клонального микроразмножения этих видов тимьяна.

Литература

1. Алексеева Л. И., Тетерюк Л. В. Фенольные соединения *Thymus talijevii* Klok. et Schost. // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 65–68.
2. Анищенко И. Е., Кучерова С. В., Жигунов О. Ю. Тимьян – ценная пряно-ароматическая культура и её применение // Известия Оренбургского Государственного аграрного университета. 2016. № 4 (60). С. 63–65.
3. Брага П. К. Тимол: антибактериальная, противогрибковая и антиоксидантная активность // Гинекология. 2009. № 4 С. 61–66.
4. Kryvtsova M. V., Salamon I., Koscova J., Bucko D., Spivak M. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections // Biosystems Diversity. 2019. Vol. 27. No. (3). P. 270–275. DOI: 10.15421/011936.
5. Achoub H., Zaiter L., Benayache F., Benayache S., Chalchat J.C., Chalard P., Figueredo G., Akkal S. Chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Thymus ciliatus* (Desf.) // Acta Scientifica Naturalis. 2019. Vol. 6(2). P. 62–70. DOI: 10.2478/asn-2019-0019.
6. Aljabeili H. S., Barakat H., Abdel-Rahman H. A. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of *Thyme* essential oil (*T. vulgaris*) // Food and Nutrition Sciences. 2018. Vol. 9. P. 433–446. DOI: 10.4236/fns.2018.95034.
7. 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.
8. Ouakouak H., Benarfa A., Messaoudi M., Begaa S., Sawicka B., Benchikha N., Simal-Gandara J. Biological properties of essential oils from *Thymus algeriensis* Boiss // Plants. 2021. Vol. 10. Iss. 4. P. 786. DOI: 10.3390/plants10040786.
9. Piatkowska E., Rusiecka-Ziółkowska J. Influence of essential oils on infectious agents // Adv. Clin. Exp. Med. 2016. Vol. 25. P. 989–995. DOI: 10.17219/acem/31287.
10. Sienkiewicz M., Denys P., Kowalczyk E. Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils // Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol. 2011. Vol. 17. Iss. 1–2. P. 40–44.
11. Cardoso J. C., Gerald L. T. S., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the twenty-first century // In book: Plant cell culture protocols (4th edition) / Eds.: Loyola-Vargas V. M., Ochoa-Alejo N. New York: Humana Press, 2018. P. 17–46.
12. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт, 2020. 333 с.
13. El-Banna H. Micropropagation of thyme plant (*Thymus vulgaris*) // J. Plant Production. 2017. Vol. 8 (11). P. 1221–1227. DOI: 10.21608/jpp.2017.41294.
14. Bekircan T., Yaşar A., Yıldırım S., Sökmen M., Sökmen A. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. Hal. shoots // Biotech. 2018. Vol. 8. Art. No. 180. DOI: 10.1007/s13205-018-1206-2.
15. Kulpa D., Wesółowska A., Jadcak P. Micropropagation and composition of essential oils in garden *Thyme* (*Thymus vulgaris* L.) // Not Bot Horti Agrobi. 2018. Vol. 46(2). P. 525–532. DOI: 10.15835/nbha46211020.
16. Ansari Z. N. E., Boussaoudi I., Benkaddour R., Hamdoun O., Lemrini M., Martin P., Badoc A., Lamarti A. Conservation of *Thymus pallidus* Cosson ex Batt. by shoot tip and axillary bud *in vitro* culture // J Plant Biotechnol. 2020. Vol. 47. P. 53–65. DOI:10.5010/JPB.2020.47.1.053.
17. Khajuria A. K., Bisht N. S., Bhagat N. In vitro organogenesis and plant regeneration of *Thymus serpyllum* L.: an important aromatic medicinal plant // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2021. DOI: 10.1007/s11627-020-10094-9.
18. 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. DOI: 10.1590/1984-70332016v16n1a8.

19. Ansari Z. N., Mihyaoui A. El, Boussaoudi I., Benkaddour R., Hamdoun O., Tahiri H., Badoc A., Oualkadi A., Lamarti A. Effect of macronutrients, cytokinins and auxins, on *in vitro* organogenesis of *Thymus vulgaris* // American Journal of Plant Sciences. 2019. Vol. 10. P. 1482–1502. DOI: 10.4236/ajps.2019.109105.
20. Alcorni R., Solyman E., Qauod H. Introducing some of threatened *Thymus* species to *in vitro* tissue culturing as an approach for their conservation // Pak. J. Bot. 2017. Vol. 49 (1). P. 259–264.
21. Sargsyan E., Vardanyan A., Ghalachyan L., Bulgadaryan S. Cultivation of thymus by *in vitro* and hydroponics combined method // International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering. 2011. Vol. 5. No. 8. P. 426–429.
22. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наукова думка, 1980. 488 с.
23. Егорова Н. А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: Автограф, 2021. 315 с. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.
24. Тевфик А. Ш., Егорова Н. А. Клональное микроразмножение тимьяна обыкновенного *in vitro*: методические рекомендации. Симферополь: Ариал, 2021. 28 с.
25. 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. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
26. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
27. Тевфик А. Ш., Егорова Н. А., Загорская М. С. Особенности морфогенеза экплантов тимьяна обыкновенного на первом этапе клонального микроразмножения // Таврический вестник аграрной науки. 2018. № 2(14). С.118–127.

References

1. Alekseeva L. I., Teteryuk L. V. Phenolic compounds *Thymus talijevii* Klok. et Schost. // Khimija rastitel'nogo syr'ja (Chemistry of plant raw material). 2008. No. 4. P. 65–68.
2. Anishchenko I. Y., Kucheroва S. V., Zhigunov O. Yu. Characteristics of thyme as a valuable aromatic plant and its use // Izvestia Orenburg State Agrarian University. 2016. No. 4 (60). P. 63–65.
3. Braga P. K. Thymol: antibacterial, antifungal and antioxidant activity // Gynecology. 2009. No. 4. P. 61–66.
4. Kryvtsova M. V., Salamon I., Koscova J., Bucko D., Spivak M. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections // Biosystems Diversity. 2019. Vol. 27. No. (3). P. 270–275. DOI: 10.15421/011936.
5. Achoub H., Zaiter L., Benayache F., Benayache S., Chalchat J. C., Chalard P., Figueredo G., Akkal S. Chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Thymus ciliatus* (Desf.) // Acta Scientifica Naturalis. 2019. Vol. 6(2). P. 62–70. DOI: 10.2478/asn-2019-0019.
6. Aljabeili H. S., Barakat H., Abdel-Rahman H. A. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of *Thyme* essential oil (*T. vulgaris*) // Food and Nutrition Sciences. 2018. Vol. 9. P. 433–446. DOI: 10.4236/fns.2018.95034.
7. 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.
8. Ouakouak H., Benarfa A., Messaoudi M., Begaa S., Sawicka B., Benchikha N., Simal-Gandara J. Biological properties of essential oils from *Thymus algeriensis* Boiss // Plants. 2021. Vol. 10. Iss. 4. P. 786. DOI: 10.3390/plants10040786.
9. Piatkowska E., Rusiecka-Ziólkowska J. Influence of essential oils on infectious agents // Adv. Clin. Exp. Med. 2016. Vol. 25. P. 989–995. DOI: 10.17219/acem/31287.
10. Sienkiewicz M., Denys P., Kowalczyk E. Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils // Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol. 2011. Vol. 17. Iss. 1–2. P. 40–44.
11. Cardoso J. C., Gerald L. T. S., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the Twenty-First Century // In book: Plant cell culture protocols (4th edition) / Eds.: Loyola-Vargas V. M., Ochoa-Alejo N. New York: Humana Press, 2018. P. 17–46.
12. Kalashnikova E.A. Plant cell engineering. Moscow: Yurayt, 2020. 333 p.
13. El-Banna H. Micropropagation of thyme plant (*Thymus vulgaris*) // J. Plant Production. 2017. Vol. 8 (11). P. 1221–1227. DOI: 10.21608/jpp.2017.41294.
14. Bekircan T., Yaşar A., Yıldırım S., Sökmen M., Sökmen A. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. shoots // Biotech. 2018. Vol. 8. Art. No. 180. DOI: 10.1007/s13205-018-1206-2.
15. Kulpa D., Wesołowska A., Jadcak P. Micropropagation and composition of essentials oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) // Not Bot Horti Agrobi. 2018. Vol. 46(2). P. 525–532. DOI: 10.15835/nbha46211020.

16. Ansari Z. N. E., Boussaoudi I., Benkaddour R., Hamdoun O., Lemrini M., Martin P., Badoc A., Lamarti A. Conservation of *Thymus pallidus* Cosson ex Batt. by shoot tip and axillary bud *in vitro* culture // J Plant Biotechnol. 2020. Vol. 47. P. 53–65. DOI:10.5010/JPB.2020.47.1.053.
17. Khajuria A. K., Bisht N. S., Bhagat N. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Thymus serpyllum* L.: an important aromatic medicinal plant // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2021. DOI: 10.1007/s11627-020-10094-9.
18. 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. DOI: 10.1590/1984-70332016v16n1a8.
19. Ansari Z. N., Mihyaoui A. El, Boussaoudi I., Benkaddour R., Hamdoun O., Tahiri H., Badoc A., Oualkadi A., Lamarti A. Effect of macronutrients, cytokinins and auxins, on *in vitro* organogenesis of *Thymus vulgaris* // American Journal of Plant Sciences. 2019. Vol. 10. P. 1482–1502. DOI: 10.4236/ajps.2019.109105.
20. Alcowni R., Solyman E., Qauod H. Introducing some of threatened thymus species to *in vitro* tissue culturing as an approach for their conservation // Pak. J. Bot. 2017. Vol. 49 (1). P. 259–264.
21. Sargsyan E., Vardanyan A., Ghalachyan L., Bulgadaryan S. Cultivation of thymus by *in vitro* and hydroponics combined method // International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering. 2011. Vol. 5. No. 8. P. 426–429.
22. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polishchuk V. E. Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry. Kiev: Naukova dumka, 1980. 488 p.
23. Yegorova N. A. Biotechnology of essential oil plants: creation of new forms and micropropagation *in vitro*. Simferopol: Avtograf, 2021. 315 p. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.
24. Tevfik A. Sh., Yegorova N. A. Clonal micropropagation of *Thymus vulgaris* L. *in vitro*: guidelines. Simferopol: Arial, 2021. 28 p.
25. 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. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
26. Lakin G. F. Biometrics: Textbook for biologists. Moscow: Vysshaya shkola, 1990. 352 p.
27. 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.

UDC 633.81:57.085.2

Tevfik A. Sh., Yegorova N. A., Kovalenko M. S.

INFLUENCE OF LIMITING FACTORS ON THE DEVELOPMENT OF *THYMUS SERPYLLUM* L. AND *THYMUS CAUCASICUS* WILLD. EXPLANTS AT THE FIRST STAGE OF MICROPROPAGATION *IN VITRO*

Summary. The attention of researchers has long been attracted by representatives of the genus *Thymus*. They are widely used in pharmaceutical, cosmetic and culinary industries. Many plant breeding problems cannot be solved without the use of biotechnological methods. This research was aimed to study the influence of the culture medium hormonal composition, explant type and cultivation conditions on the development of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus caucasicus* Willd. explants at the first stage of clonal micropropagation *in vitro*. Stem segments with a node and shoot tips were used as explants. The following article presents the results of analysis of explants morphometric parameters during cultivation on 11 variants of Murashige and Skoog (MS) culture medium with the addition of kinetin, thidiazuron, 6-benzylaminopurine (BAP), gibberellic or indoleacetic acids. When cultivating these types of explants, no significant differences in most of the analyzed parameters were found. When comparing different growth regulators, the maximum number of shoots was obtained in culture media containing BAP; the maximum length of shoots – in media with the addition of kinetin. At the stage of introduction explants into *in vitro* culture, the most effective culture medium for *T. caucasicus* was MS with 1.0 mg/l of kinetin, for *T. serpyllum* – MS with 1.0 mg/l of BAP. Cultivation of explants in test tubes covered with foil contributed to an increase in the multiplication index up to 1.4 times compared to those with cotton-gauze plugs (stoppers).

*A four-factor analysis of variance showed that during micropropagation, the culture medium composition had the greatest influence on the number and length of shoots (the share of influence was 48.2 and 52.6%, respectively). Multiplication indexes of *T. caucasicus* and *T. serpyllum* reached 9.2–10.4 when the studied factors were optimally combined. The research results are the basis for the development of clonal micropropagation methods for *T. serpyllum* and *T. caucasicus*.*

Keywords: *Thymus serpyllum L., Thymus caucasicus Willd., clonal micropropagation in vitro, culture medium, growth regulators, explant.*

Тевфик Арзы Шевкиевна, кандидат биологических наук, старший 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.

Коваленко Мария Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; 295453, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: mary-exo-1@yandex.ru.

Tevfik Arzy Shevkievna, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher of the 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 the 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.

Kovalenko Maria Sergeevna, junior researcher of the Laboratory of biotechnology, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”; 150, Kievskaya str., Simferopol, Republic of Crimea, 295493, Russia; e-mail: mary-exo-1@yandex.ru.

Дата поступления в редакцию – 27.02.2023.

Дата принятия к печати – 28.03.2023.