УДК 633.81:57.085.2
EDN ZSCEBK

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

ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ МОНАРДЫ ДВОЙЧАТОЙ НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Реферат. *Монарда двойчатая (Monarda didyma L.) является лекарственным, пряно-ароматическим и эфиромасличным растением семейства Lamiaceae. Листья и соцветия монарды отличаются высоким содержанием эфирного масла – до 3,0 %. Его наиболее ценные компоненты (тимол и карвакрол) обусловливают высокую бактерицидную, фунгицидную, противовоспалительную и антигельминтную активность, что способствует применению этого растения в медицине. Растительное сырье монарды также используют в косметологии и кулинарии. Известно, что клональное микроразмножение позволяет ускорять селекционный процесс, получать генетически однородный и оздоровленный посадочный материал, создавать коллекции in vitro ценных образцов и сортов. Цель исследования – изучение влияния состава питательной среды и типа экспланта на развитие микропобегов на первом этапе микроразмножения M. didyma in vitro. Исследования проводили в лаборатории биотехнологии в 2020–2021 гг. В результате экспериментов получены данные о морфогенезе двух типов эксплантов при их культивировании на 14-ти вариантах питательной среды Мурасиге и Скуга (МС). Анализ влияния гормонального состава среды на морфометрические показатели эксплантов показал преимущество использования в качестве регулятора роста кинетина по сравнению с 6-бензиламинопурином и тидиазуроном. Установлено, что оптимальной питательной средой на этапе введения является среда МС с 1,0 мг/л кинетина, на которой получено 2,9 микропобегов на эксплант длиной 2,7 см с 2,2–2,9 узлами. При сравнении морфогенетического потенциала двух типов эксплантов (верхушек побегов и сегментов стебля с узлом) не выявлено существенных различий по количеству побегов на эксплант и их длине. Показано, что на средах с кинетином и на безгормональной питательной среде происходило корнеобразование с частотой 42,1–60,6 %. Результаты исследований являются основой для разработки методики клонального микроразмножения M. didyma.*

Ключевые слова: *Monarda didyma L., клональное микроразмножение, эксплант, in vitro, питательная среда.*

Для цитирования: *Тевфик А. Ш., Егорова Н. А., Коваленко М. С. Особенности клонального микроразмножения монарды двойчатой на этапе введения в культуру in vitro // Таврический вестник аграрной науки. 2022. № 2(30). С. 132 –142. EDN: ZSCEBK.*

For citation: *Tevfik A. Sh., Yegorova N. A., Kovalenko M. S. Features of Monarda didyma clonal micropropagation at the stage of introduction into culture in vitro // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2022. No. 2(30). P. 132–142. EDN: ZSCEBK.*

Введение

Монарда двойчатая (*Monarda didyma* L.) – многолетнее травянистое растение семейства Lamiaceae, высотой 65–120 см. Надземные части растения содержат до 3 % эфирного масла, которое сосредоточено в основном в листьях и соцветиях. Благодаря широкому фармакологическому спектру действия монарда может использоваться как бактерицидное, противовирусное, противогрибковое, противомикоплазменное, антигельминтное, антисклеротическое, противоонкологическое, противовоспалительное

и обезболивающее средство [1–6]. Экстракты и эфирное масло монарды применяют при инфекционных заболеваниях верхних дыхательных путей и легких, а также при воспалениях слизистой оболочки полости рта и носоглотки. Кроме того, ряд исследователей отмечают седативное действие на центральную нервную систему, усиление действия антибиотиков и стимулирование регенерации поврежденных покровов кожи при использовании эфирного масла этого растения. Некоторые ученые в своих работах описывали высокую антиоксидантную активность эфирного масла монарды, которое способствовало нормализации ферментных окислительно-восстановительных реакций [7]. Есть сведения о его выраженном иммуномодулирующем действии. Монарда может быть востребована в качестве натурального ароматизатора, консерванта и антиоксиданта в пищевой и в ликёроводочной промышленности [1].

В ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводят селекционную работу по получению новых сортов монарды, в процессе которой необходимо быстро размножить перспективные образцы, обладающие комплексом полезных признаков [8]. Клональное микроразмножение является одним из наиболее востребованных биотехнологических приемов, который позволяет в более короткие сроки размножить в условиях *in vitro* селекционный материал в необходимом количестве для его дальнейшего изучения. Кроме того, широкое использование этой технологии на практике обусловлено оздоровлением растений от различных инфекций, получением генетически однородного посадочного материала и возможностью депонировать ценные образцы в виде медленно растущих коллекций *in vitro* [9]. В настоящее время активно разрабатывают и используют биотехнологические приемы для микроразмножения и сохранения ряда эфиромасличных культур [10–12]. В большинстве литературных источников, касающихся *Monarda didyma* L., представлены данные об изучении биохимического состава эфирного масла [13–17] или об интродукции этого растения [18]. В доступной литературе имеются лишь фрагментарные сведения о микроразмножении некоторых видов монарды [3]. Так, J. Žiarovska et al. провели исследования по оптимизации условий ПЦР для RAPD анализа размноженных *in vitro* растений *M. didyma* для выявления их генетической стабильности после субкультивирования [19].

Цель исследований – изучение влияния состава питательной среды и типа эксплантa на развитие микропобегов на первом этапе клонального микроразмножения *Monarda didyma* L.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований служили ткани и органы растений монарды двойчатой (*Monarda didyma* L.) из коллекции эфиромасличных, пряно-ароматических и лекарственных растений [https://ckp-rf.ru/usu/507515] ФГБУН «НИИСХ Крыма». Исследования проводили в лаборатории биотехнологии в 2020–2021 гг. Исходные растения выращивали в условиях закрытого грунта. В работе использовали общепринятые методы культуры органов и тканей растений [20]. В качестве первичных эксплантов использовали верхушки побегов (ВП) и сегменты стебля с узлом (У) длиной 8–10 мм. Для стерилизации растительного материала использовали следующие антисептики: этанол («Росспиртпром», 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) [21] с добавлением тидиазурона (ТДЗ), гиббереллoвой кислоты ($ГК_3$), кинетина (Кин), 6-бензиламинопурина (БАП), β-индолил-3-масляной кислоты (ИМК), β-индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). 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 сут. При этом определяли количество и длину побегов, количество узлов на побег, количество витрифицированных побегов, частоту ризогенеза (количество побегов с корнями в % от общего числа культивируемых), количество и длину корней. Коэффициент размножения рассчитывали как произведение количества побегов (на эксплант) на число узлов на побеге. В статье использовали два показателя коэффициента размножения: теоретический (ТКР – с учетом витрифицированных побегов) и фактический (ФКР – без учета витрифицированных побегов).

В каждом варианте опыта анализировали не менее 20 эксплантов, повторность опыта двух–трехкратная. Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам, с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010). В таблицах представлены средние значения определений и их стандартные ошибки, а на графиках – средние значения и доверительные интервалы.

Результаты и их обсуждение

В ходе экспериментов подобраны условия получения асептической культуры растительного материала монарды. Установлено, что для оптимальных результатов (88,2 % стерильных эксплантов и 85,5 % жизнеспособных эксплантов) необходимо использовать последовательную стерилизацию 70 % этанолом (40 сек) и 0,3 % раствором препарата «ДезТаб» (10 мин).

При введении в культуру *in vitro* эксплантов (сегментов стебля с узлом или верхушек побегов) через одну–две недели наблюдали развитие основного или пазушных побегов, а также индукцию адвентивных почек и побегов. Одним из главных условий для эффективного формирования дополнительных побегов является состав регуляторов роста в питательной среде.

В данной работе представлены результаты анализа влияния состава 14 модификаций среды МС, различающихся составом и концентрацией цитокининов и ауксинов (рисунок 1, таблица 1).

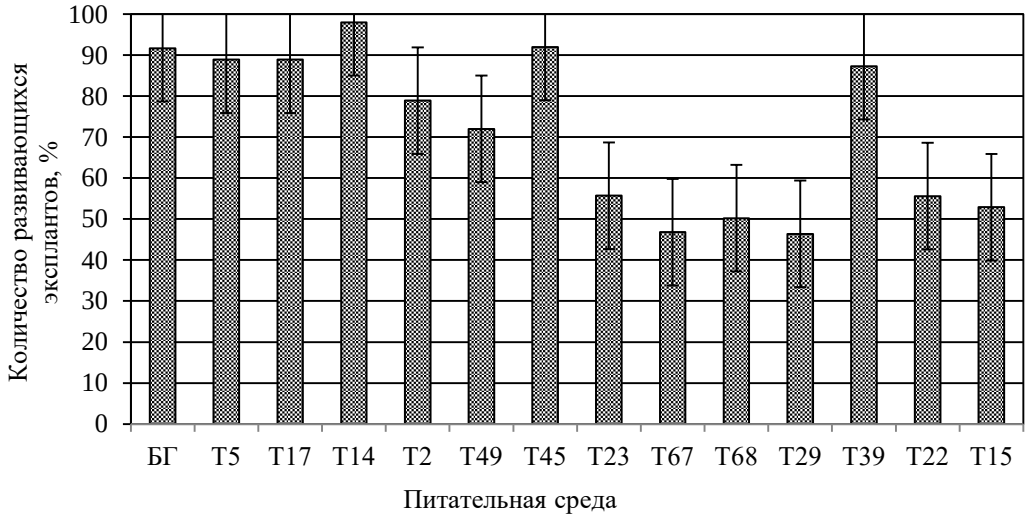

Рисунок 1 – Влияние состава питательной среды на количество развиваюшихся эксплантов при культивировании *M. didyma* на этапе введения *in vitro*

Примечание. *Здесь и далее: состав питательных сред указан в таблице 1.*

В процессе исследований выявлено, что на питательных средах, содержащих $ГК_3$ (Т45) или кинетин (отдельно или совместно с $ГК_3$, ИУК, ИМК), а также на среде

без регуляторов роста получено наибольшее количество развивающихся эксплантов (87,3–98,0 %). Вместе с тем, при культивировании эксплантов на питательных средах, дополненных ТДЗ и БАП, этот показатель снизился в 1,1–2,1 раза (см. рисунок 1).

Изучение влияния гормонального состава на морфометрические показатели эксплантов на этапе введения показало, что максимальное количество побегов на эксплант получено на питательных средах с БАП и ТДЗ (см. таблица 1). Так, питательные среды, содержащие ТДЗ, позволили увеличить этот показатель в 1,1–3,2 раза, а с БАП – в 1,5–2,8 раза по сравнению со средами, в состав которых входил один цитокинин кинетин.

Анализ влияния состава регуляторов роста на длину эксплантов показал, что культивирование на средах с кинетином, $ГК_3$ (Т45) и на безгормональной питательной среде способствовало увеличению длины микропобегов до 2,2–3,1 см. При этом использование в качестве цитокинина БАП снижало длину эксплантов до 2,0–2,1 см, ТДЗ – 1,0–1,6 см по сравнению со средой без регуляторов роста или с добавлением кинетина. Подобная тенденция отмечена и при изучении влияния регуляторов роста на количество узлов на побеге.

Таблица 1 – Влияние состава питательной среды на развитие эксплантов при введении в культуру *in vitro M. didyma*

№ питательной среды	Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Количество побегов, шт. на эксплант	Длина побега, см	Количество узлов, шт. на побег
БГ	–	2,0 ± 0,2	3,0 ± 0,3	2,1 ± 0,2
Т5	Кин – 1,0	2,9 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Т17	Кин – 1,0 + $ГК_3$ – 1,0	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Т14	Кин – 1,0 + ИУК – 0,5	2,5 ± 0,3	2,5 ± 0,3	1,8 ± 0,1
Т39	Кин – 1,0 + ИМК – 0,5	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,5	2,2 ± 0,3
Т2	БАП – 1,0	4,4 ± 0,5	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Т49	ТДЗ – 1,0	3,2 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1
Т45	$ГК_3$ – 1,0	1,7 ± 0,1	3,1 ± 0,4	2,1 ± 0,2
Т23	Кин – 3,0	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,1 ± 0,3
Т67	Кин – 1,0 + ТДЗ – 0,5	4,6 ± 0,6	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Т68	Кин – 1,0 + БАП – 1,0	5,9 ± 0,6	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1
Т29	ТДЗ – 1,0 + $ГК_3$ – 1,0	7,7 ± 0,9	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Т22	БАП – 1,0 + ИУК – 0,5	4,4 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3
Т15	БАП – 1,0 + $ГК_3$ – 1,0	4,7 ± 0,4	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,3

На рисунке 2 продемонстрировано развитие эксплантов *M. didyma* на различных питательных средах на 30 сут культивирования. Так, видно, что среды с БАП и ТДЗ стимулировали активное адвентивное побегообразование у эксплантов, а среда с кинетином позволила получить большую длину побегов.

Следует отметить, что при культивировании эксплантов на питательных средах, содержащих БАП и ТДЗ, часть образовавшихся побегов были оводненными (17,4–50,5 %), что, в свою очередь, значительно снижало количество побегов, которые можно использовать для дальнейшего микроразмножения. О витрификации побегов при микроразмножении отдельных видов растений упоминается в работах некоторых ученых [22–26], которые связывают такие физиологические, морфологические и анатомические изменения развития растений *in vitro* с низкой эффективностью фотосинтеза и нарушением работы устьичного аппарата. Это может быть обусловлено высокой влажностью и избытком сахаров или минеральных веществ у растений при культивировании *in vitro*. Для более корректной оценки эффективности использования цитокининов у монарды на этапе введения в культуру *in vitro* мы рассчитывали два показателя коэффициента размножения: теоретический (с учетом витрифицированных побегов) и фактический (без учета витрифицированных побегов).

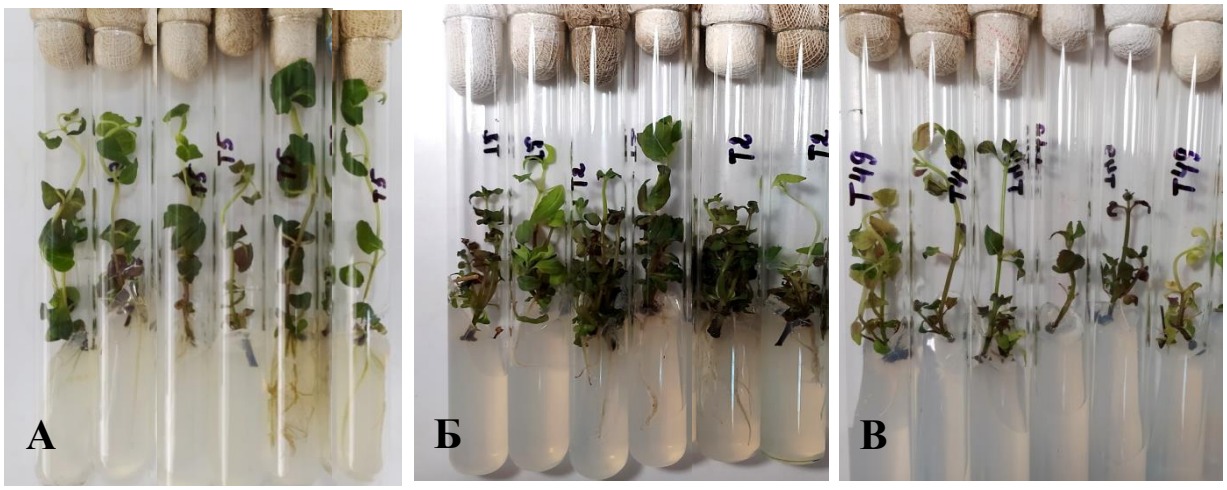

Рисунок 2 – Развитие эксплантов *M. didyma* на первом этапе клонального микроразмножения на питательной среде МС с 1 мг/л Кин (А), 1 мг/л БАП (Б) и 1 мг/л ТДЗ (В)

В результате изучения влияния гормонального состава питательной среды на коэффициент размножения показано, что при использовании ТДЗ или БАП совместно с $ГК_3$ и ИУК (среды Т15, Т22 и Т29) происходило значительное повышение теоретического коэффициента размножения (в 1,4–2,4 раза) по сравнению с применением в составе среды кинетина (рисунок 3). Однако на этих питательных средах частота образования оводненных побегов была высокой (29,4–50,5 %). При этом на всех питательных средах, содержащих в качестве цитокинина кинетин, это нежелательное явление не выявлено.

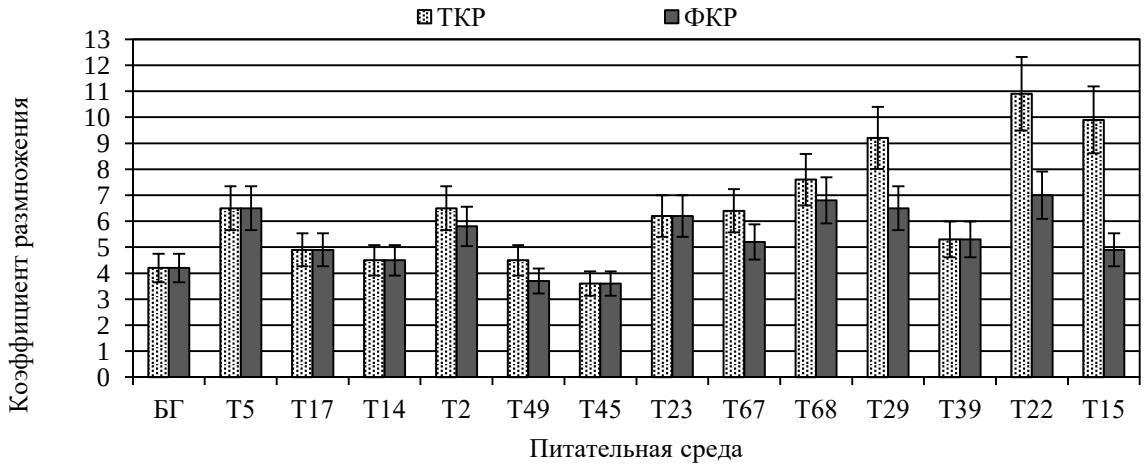

Рисунок 3 – Влияние состава питательной среды на коэффициент размножения *M. didyma*

Примечание. *ТКР – теоретический коэффициент размножения, ФКР – фактический коэффициент размножения.*

Следует отметить, что культивирование на содержащих кинетин питательных средах позволило получить темно-зеленые микропобеги с большим количеством узлов и таким образом размножать *M. didyma,* используя два метода – микрочеренкования и индукции адвентивных побегов. Поэтому для лучшего развития эксплантов и

последующего размножения на этапе введения необходимо использовать питательную среду МС, содержащую 1,0 мг/л кинетина.

Изучение влияния типа экспланта на морфометрические показатели эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* показало, что сегменты стебля с узлом и верхушки побегов не имели существенных различий при культивировании на большинстве питательных сред. При культивировании на питательной среде с БАП из верхушек побегов было получено в 1,4 раза больше побегов на эксплант, чем из сегментов стебля с узлом (рисунок 4). При сравнении длины побегов при культивировании разных типов эксплантов отмечена тенденция увеличения этого показателя при использовании верхушек побега (рисунок 5).

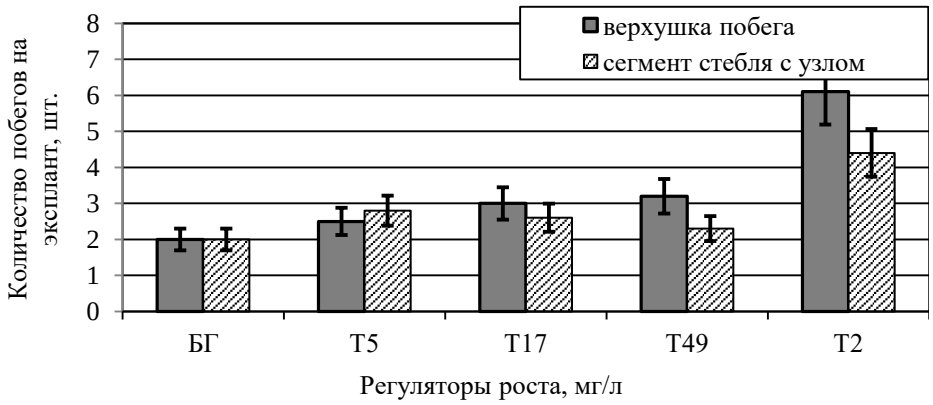

Рисунок 4 – Влияние типа экспланта и состава питательной среды на количество побегов на эксплант при введении *M. didyma* в культуру *in vitro*

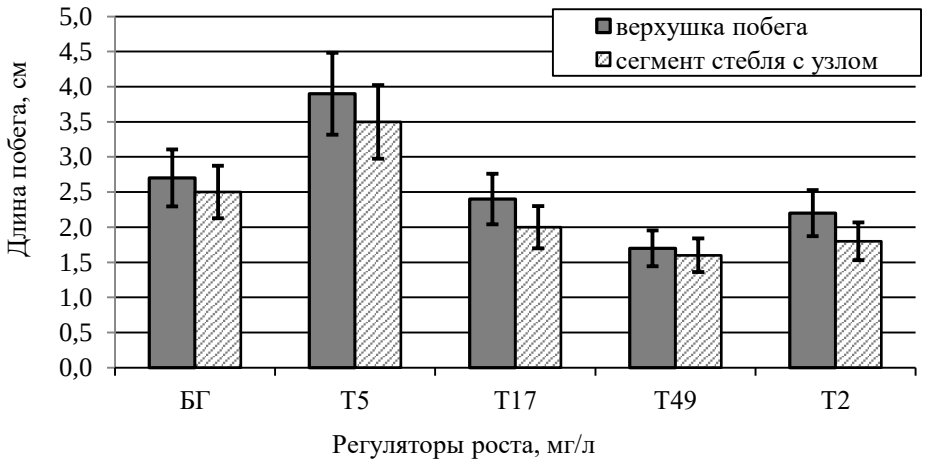

Рисунок 5 – Влияние типа экспланта и состава питательной среды на длину побега при введении *M. didyma* в культуру *in vitro*

При сравнении коэффициентов размножения у изучаемых эксплантов на оптимальной питательной среде (Т5) существенных различий не отметили. В связи с этим использование двух типов эксплантов целесообразно для клонального микроразмножения монарды, так как позволяет получить больше эксплантов с одного растения и быстрее размножить ценные образцы.

Установлено, что на питательных средах, изученных на этапе введения в культуру *in vitro,* было отмечено корнеобразование у микропобегов с частотой до 60,6 % (таблица 2). Максимального значения этот показатель достигал при культивировании на питательной среде без регуляторов роста. Из трех используемых

цитокининов наибольшая частота ризогенеза была получена при введении в состав среды кинетина. Так, культивирование на питательных средах с кинетином увеличило частоту ризогенеза в 1,6–2,2 раза по сравнению с БАП. Наименьшая частота корнеобразования была на питательных средах с добавлением ТДЗ и $ГК_3$ (до 17,6 %).

Таблица 2 – Влияние состава питательной среды на укоренение микропобегов *M. didyma* при введении эксплантов *in vitro*

№ питательной среды	Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Частота корнеобразования, %	Количество корней, шт. на эксплант	Длина корня, см
БГ	–	60,6 ± 5,6	3,5 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Т5	Кин –1,0	50,0 ± 4,5	4,0 ± 0,4	3,4 ± 0,3
Т17	Кин –1,0 + $ГК_3$ – 1,0	7,2 ± 1,3	3,2 ± 0,4	2,8 ± 0,3
Т14	Кин –1,0 + ИУК–0,5	42,1 ± 4,4	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,3
Т2	БАП –1,0	26,3 ± 2,6	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2
Т49	ТДЗ – 1,0	17,6 ± 2,0	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,2
Т45	$ГК_3$ – 1,0	3,8 ± 3,4	2,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2
Т23	Кин – 3,0	47,1 ± 4,5	3,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3
Т67	Кин – 1,0 + ТДЗ – 0,5	0	0	0
Т68	Кин – 1,0 + БАП –1,0	50,3 ± 4,6	3,1 ± 0,4	2,6 ± 0,3
Т29	ТДЗ – 1,0 + $ГК_3$ – 1,0	0	0	0
Т39	Кин – 1,0 + ИМК – 0,5	57,1 ± 5,6	3,2 ± 0,4	3,4 ± 0,4
Т22	БАП – 1,0 + ИУК – 0,5	20,0 ± 2,3	2,1 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Т15	БАП – 1,0 + $ГК_3$ – 1,0	16,7 ± 2,2	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1

При анализе зависимости количества и длины корней от гормонального состава питательной среды также отмечена тенденция повышения этих показателей при использовании кинетина и среды без регуляторов роста по сравнению с использованием БАП и ТДЗ. Это может позволить исключить специальный третий этап микроразмножения, объединив этап собственно микроразмножения с этапом ризогенеза. Такая возможность выявлена и у некоторых других видов эфиромасличных растений [11, 12].

Выводы

В результате исследований выявлены особенности морфогенеза эксплантов *M. didyma* на первом этапе клонального микроразмножения *in vitro* в зависимости от состава регуляторов роста в питательной среде и типа экспланта. Выявлено, что применение трех типов цитокининов по отдельности при введении в культуру *in vitro* вызывало разные морфогенетические реакции эксплантов. Показано, что БАП и ТДЗ стимулировали адвентивное побегообразование у основания эксплантов, однако большая часть образовавшихся микропобегов была оводненной (17,4–50,5 %). Установлено, что использование в качестве цитокинина кинетина способствовало увеличению длины побегов в 1,2–3,0 раза по сравнению с применением БАП или ТДЗ. Показана эффективность культивирования эксплантов монарды на этапе введения в культуру *in vitro* на питательной среде МС с 1,0 мг/л кинетина, что позволяет получить высокий коэффициент размножения 6,6. Выявлена целесообразность использования на первом этапе клонального микроразмножения *in vitro* двух типов эксплантов (верхушек побегов и сегментов стебля с узлом). Установлено, что при культивировании на безгормональной питательной среде и на средах с кинетином происходило укоренение микропобегов с частотой 42,1–60,6 %, при этом формировалось 2,8–4,0 корней (на побег). Полученные данные являются основой для разработки методики клонального микроразмножения *Monarda didyma* L.

Литература

1. Бедуленко М. А. Интродукция, экологический аспект и современные направления изучения и применения лекарственного, пряно-ароматического и эфирномасличного растения *Monarda fistulosa* L. (обзор) // Труды БГУ. 2013. Т. 8. Ч. 2. С. 52–60.
2. Adebayo O., Dang T., Bélanger A., Khanizadeh Sh. Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea* // Journal of Food Research. 2013. Vol. 2. No. 1. P. 217–226. DOI: 10.5539/JFR.V2N1P217.
3. Moeller E. L. Induction of autotetraploidy and characterization of the effects of genome duplication on native ornamental species *Monarda punctata* and *Monarda fistulosa* (Lamiaceae) // Thesis for degree of Master of Science in Plant Agriculture. Guelph, Ontario, Canada, 2015. 129 p.
4. Ricci D., Epifano F., Fraternale D. The essential oil of *Monarda didyma* L. (Lamiaceae) exerts phytotoxic activity *in vitro* against various weed seeds open access // Molecules. 2017. Vol. 22(2). P. 222–231. DOI: 10.3390/molecules22020222.
5. Côté H., Pichette A., St-Gelais A., Legault J. The biological activity of *Monarda didyma* L. essential oil and its effect as a diet supplement in mice and broiler chicken // Molecules. 2021. Vol. 26. P. 3368. DOI: 10.3390/molecules26113368.
6. Zaimenko N. V., Hnatyuk N. O., Ivanytska B. O. Allelopathic activity of secretions of plant mass and soil from the form of Monarda (*Monarda didyma* L.) // Ukrainian Journal of Ecology. 2020. Vol. 10 (2). P. 141–145. DOI: 10.15421/2020_77.
7. Fraternale D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D., Epifano F., Burini G., Curini M. Chemical composition, antifungal and *in vitro* antioxidant properties of *Monarda didyma* L. essential oil // Journal of Essential Oil Research. 2006. Vol. 18. No. 5. P. 581–585. DOI: 10.1080/10412905.2006.9699174.
8. Невкрытая Н. В., Мишнев А. В. Актуальные направления биохимических исследований эфиромасличных растений (обзор, часть 2). Анализ содержания и компонентного состава эфирного масла в растениях для целей селекции и семеноводства // Таврический вестник аграрной науки. 2019. № 1(17). С. 71–82. DOI: 10.33952/2542-0720-2019-1-17-71-82.
9. Cardoso J. C., Gerald L. T. S., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Plant cell culture protocols (4th edition) // Ed. by Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. NY: Humana Press, 2018. P. 17–46.
10. Митрофанова И. В., Митрофанова О. В., Иванова Н. Н., Егорова Н. А., Кузьмина Т. Н., Лесникова-Седошенко Н. П., Тевфик А. Ш., Челомбит С. В. Этапы регенерации *in vitro* декоративных, ароматических и плодовых культур // В книге: Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур. Симферополь: Ариал, 2018. С. 27–126.
11. 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.
12. Тевфик А. Ш., Егорова Н. А. Влияние условий культивирования и гормонального состава питательной среды на микроразмножение *in vitro* тимьяна обыкновенного // Таврический вестник аграрной науки. 2019. № 1(17). С. 92–102. DOI: 10.33952/2542-0720-2019-1-17-93-102.
13. Markovska O. Y., Svydenko L. V., Dudchenko V. V., Sydiakina O. V. Morphobiological and biochemical characteristics of *Monarda* L. varieties under conditions of the Southern steppe of Ukraine // Journal of Ecological Engineering. 2020. Vol. 21(8). P. 99–107. DOI: 10.12911/22998993/127093.
14. Дмитриева В. Л., Дмитриев Л. Б. Изучение состава эфирных масел эфиромасличных растений Нечерноземной зоны России // Известия ТСХА. 2011. Вып. 3. С. 106–119.
15. Мяделец М. А., Домрачев Д. В., Крикливая А. Н., Высочина Г. И. Зависимость состава эфирного масла *Monarda didyma* L. (Lamiaceae) от возраста растений и характера сырья // Химия растительного сырья. 2014. № 1. С. 215–219. DOI: 10.14258/jcprm.1401215.
16. Красюк Е. В., Пупыкина К. А. Сезонная динамика накопления эфирных масел в видах монарды, интродуцированных в Республике Башкортостан // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). Фармацевтические науки. 2015. № 3. С. 154–155.
17. Федотов С. В. Эфирные масла монард видов *Monarda fistulosa* L., *Monarda didyma* L., *Monarda citriodora* Cervantes ex Lag., их хемотипы и биологическая активность // Сборник научных трудов ГНБС. 2015. Т. 141. С. 131–147.
18. Ciurușniuc A. M., Robu T. Study of the behaviour of cultivated species of the genus *Monarda* L. in Vaslui county, to introduce them in cultivation as medicinal, aromatic and decorative plants // Lucrări Ştiinţifice. 2012. Vol. 55 (2). P. 309–312.
19. Žiarovska J., Bezo M., Hrdlickova M., Fernandez E. Standardization and reproducibility of random marker based analysis of micropropagated crimson beebalm // Genetika. 2014. Vol. 46. No. 3. P. 855–864. DOI: 10.2298/GENSR1403855Z.
20. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наукова думка, 1980. 488 с.

21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. № 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

22. Hazarika B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants // Scientia Horticulturae. 2006. Vol. 108(2). P. 105–120. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.01.038.

23. 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. DOI: 10.26897/0021-342X-2017-5-17-28.

24. Ziv M. Quality of micropropagated plants – vitrification // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 1991. Vol. 27 (2). P. 64–69. DOI: 10.1007/BF02632130.

25. Матушкина О.В., Пронина И.Н., Ткачёв Е.Н. Витрификация побегов *in vitro*: анатомическое строение и возможные пути решения проблемы // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 9. С. 58–60.

26. Chiruvella K. K., Mohammed A., Ghanta R. G. Phenotypic aberrations during micropropagation of *Soymida febrifuga* (Roxb.) Adr. Juss. // Notulae Scientia Biologicae. 2014. No. 6(1). P. 99–104. DOI: 10.15835/NSB619202.

References

1. Bedulenko M. A. Introduction, environmental aspect and modern trends of study and application of medicinal, aromatic and essential oils *Monarda fistulosa* L. (review) // Proceedings of the Belarusian State University. 2013. Vol. 8. Part 2. P. 52–60.

2. Adebayo O., Dang T., Bélanger A., Khanizadeh Sh. Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea* // Journal of Food Research. 2013. Vol. 2. No. 1. P. 217–226. DOI: 10.5539/JFR.V2N1P217.

3. Moeller E. L. Induction of autotetraploidy and characterization of the effects of genome duplication on native ornamental species *Monarda punctata* and *Monarda fistulosa* (Lamiaceae) // Thesis for degree of Master of Science in Plant Agriculture. Guelph, Ontario, Canada, 2015. 129 p.

4. Ricci D., Epifano F., Fraternale D. The essential oil of *Monarda didyma* L. (Lamiaceae) exerts phytotoxic activity *in vitro* against various weed seeds open access // Molecules. 2017. Vol. 22(2). P. 222–231. DOI: 10.3390/molecules22020222.

5. Côté H., Pichette A., St-Gelais A., Legault J. The biological activity of *Monarda didyma* L. essential oil and its effect as a diet supplement in mice and broiler chicken // Molecules. 2021. Vol. 26. P. 3368. DOI: 10.3390/molecules26113368.

6. Zaimenko N. V., Hnatyuk N. O., Ivanytska, B. O. Allelopathic activity of secretions of plant mass and soil from the form of Monarda (*Monarda didyma* L.) // Ukrainian Journal of Ecology. 2020. Vol. 10 (2). P. 141–145. DOI: 10.15421/2020_77.

7. Fraternale D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D., Epifano F., Burini G., Curini M. Chemical composition, antifungal and *in vitro* antioxidant properties of *Monarda didyma* L. essential oil // Journal of Essential Oil Research. 2006. Vol. 18. No. 5. P. 581–585. DOI: 10.1080/10412905.2006.9699174.

8. Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V. Actual and contemporary directions of biochemical research of oil-bearing aromatic plants (review, part 2). Analysis of the content and component composition of the essential oil in plants for the purpose of breeding and seed growing // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2019. No. 1(17). P. 71–82. DOI: 10.33952/2542-0720-2019-1-17-71-82.

9. Cardoso J. C., Gerald L. T. S., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Plant cell culture protocols (4th edition) // Ed. by Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. NY: Humana Press, 2018. P. 17–46.

10. Mitrofanova I. V., Mitrofanova O. V., Ivanova N. N., Yegorova N. A., Kuzmina T. N., Lesnikova-Sedoshenko N. P., Tevfik A. Sh., Chelombit S. V. Stages of *in vitro* regeneration of decorative, aromatic and fruit crops // In book: Fundamentals of the creation of an *in vitro* genebank of species, varieties and forms of decorative, aromatic and fruit crops. Simferopol: Arial, 2018. P. 27–126.

11. 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.

12. Tevfik A. Sh., Yegorova N. A. Influence of cultivation conditions and culture medium gormonal compositions on the micropropagation *Thymus vulgaris* L. *in vitro* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2019. No. 1(17). P. 92–102. DOI: 10.33952/2542-0720-2019-1-17-93-102.

13. Markovska O. Y., Svydenko L. V., Dudchenko V. V., Sydiakina O. V. Morphobiological and biochemical characteristics of *Monarda* L. varieties under conditions of the Southern steppe of Ukraine // Journal of Ecological Engineering. 2020. Vol. 21(8). P. 99–107. DOI: 10.12911/22998993/127093.

14. Dmitrieva V. L., Dmitriev L. B. Studying the composition of essential oils of essential oil plants of the non-black earth zone of Russia // Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy. 2011. No. 3. P. 106–119.

15. Myadelets M. A., Domrachev D. V., Kriklivaya A. N., Vysochina G. I. Dependence of the composition of essential oil of *Monarda didyma* L. (Lamiaceae) from the age and nature of plant materials // Khimija rastitel'nogo syr'ja (Chemistry of plant raw material). 2014. No. 1. P. 215–219. DOI: 10.14258/jcprm.1401215.

16. Krasyuk E. V., Pupykina K. A. Seasonal dynamics of accumulation of essential oils in species of Monarda introduced in the Republic of Bashkortostan // Eurasian Union of Scientists (EUS). Pharmaceutical Sciences. 2015. No. 3. P. 154 –155.

17. Fedotov S. V. Monarda essential oils of *Monarda fistulosa* L., *Monarda didyma* L., *Monarda citriodora* Cervantes ex Lag., their chemotypes and biological activity // Works of the State Nikit. Botan. Gard. 2015. Vol. 141. P. 131–147.

18. Ciurușniuc A. M., Robu T. Study of the behaviour of cultivated species of the genus *Monarda* L. in Vaslui county, to introduce them in cultivation as medicinal, aromatic and decorative plants // Lucrări Ştiinţifice. 2012. Vol. 55 (2). P. 309–312.

19. Žiarovska J., Bezo M., Hrdlickova M., Fernandez E. Standardization and reproducibility of random marker based analysis of micropropagated crimson beebalm // Genetika. 2014. Vol. 46. No. 3. P. 855–864. DOI: 10.2298/GENSR1403855Z.

20. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polishchuk V. E. Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry. Kiev: Naukova dumka, 1980. 488 p.

21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. № 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

22. Hazarika B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants // Scientia Horticulturae. 2006. Vol. 108(2). P. 105–120. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.01.038.

23. 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. DOI: 10.26897/0021-342X-2017-5-17-28.

24. Ziv M. Quality of micropropagated plants – vitrification // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 1991. Vol. 27 (2). P. 64–69. DOI: 10.1007/BF02632130.

25. Matushkina O. V., Pronina I. N., Tkachyov E. N. Shoot vitrification *in vitro*: anatomic structure and possible ways of the problem solution // Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex. 2012. No. 9. P. 58-60.

26. Chiruvella K. K., Mohammed A., Ghanta R. G. Phenotypic aberrations during micropropagation of *Soymida febrifuga* (Roxb.) Adr. Juss. // Notulae Scientia Biologicae. 2014. No. 6(1). P. 99–104. DOI: 10.15835/NSB619202.

UDC 633.81:57.085.2

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

FEATURES OF MONARDA DIDYMA CLONAL MICROPROPAGATION AT THE STAGE OF INTRODUCTION INTO CULTURE *IN VITRO*

Summary. *Monarda didyma L. is a medicinal, aromatic and essential oil plant of the Lamiaceae family. The content of essential oil in the leaves and inflorescences of Monarda is rather high – up to 3.0 %. Its most valuable components (thymol and carvacrol) cause high bactericidal, fungicidal, anti-inflammatory and anthelmintic activity, which contributes to the use of this plant in medicine. Moreover, Monarda raw materials are used in cosmetology and cooking. It is known that clonal micropropagation allows us to speed up breeding process, obtain genetically homogeneous and healthy planting material, create in vitro collections of valuable samples and cultivars. The aim of the research was to study the influence of the culture medium composition and explant type on the microshoots development at the first stage of M. didyma L. micropropagation in vitro. The studies were carried out in 2020–2021 in the Laboratory of Biotechnology. The experiments have resulted in obtaining data on the morphogenesis of two explant types during their cultivation on 14 variants of Murashige and Skoog (MS) culture medium. An analysis of the effect of the medium hormonal composition on the explants morphometric parameters showed the advantage of using kinetin as growth regulators compared to 6-benzylaminopurine and thidiazuron. It has been established that the optimal culture medium at the introduction stage is MS medium with 1.0 mg/l kinetin. In this variant, we obtained 2.9 microshoots per explant (length – 2.7 cm; number of nodes –*

2.2-2.9). When comparing the morphogenetic potential of two explant types (shoot tips and stem segments with a node), no significant differences in the number of shoots per explant and their length were found. It was shown that on media with kinetin and on a hormone-free culture medium, root formation occurred with a frequency of 42.1-60.6 %. The research results are the basis for the development of a protocol for M. didyma clonal micropropagation.

Keywords: *Monarda didyma L., clonal micropropagation, explant, in vitro, culture medium.*

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.ru.

Егорова Наталья Алексеевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, 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»; 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: mary-exo-l@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.ru.

Yegorova Natalia Alekseevna, Dr. Sc. (Biol.), chief researcher, 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-l@yandex.ru.

Дата поступления в редакцию – 21.02.2022.
Дата принятия к печати – 20.03.2022.