



УДК 582.949.27:58.085+57.085.2+633.81

Клональное микроразмножение некоторых видов рода *Thymus* L.

Н. А. Егорова^{1,2*}, А. Ш. Тевфик^{1,3}

¹ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, ул. Киевская, д. 150,
г. Симферополь, 295043, Республика Крым, Россия

² E-mail: yegorova.na@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5455-3044>

³ E-mail: tevfik.arzy@yandex.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-8359-2926>

* Автор для переписки

Ключевые слова: размножение *in vitro*, состав питательной среды, условия культивирования, эксплант.

Аннотация. Целью работы было изучение влияния факторов культивирования на развитие эксплантов для оптимизации протокола клонального микроразмножения *in vitro* четырех видов рода *Thymus* L. (тимьян), ценных эфиромасличных и лекарственных растений. Подобраны условия, обеспечивающие получение до 94,2 % стерильных эксплантов. Установлено, что при введении в культуру *in vitro* целесообразно использовать верхушки побегов и сегменты стебля с узлом (выделенные из донорных растений) и культивировать их в закрытых фольгой пробирках. Определены оптимальные питательные среды для первого этапа микроразмножения: для *Thymus serpyllum* L. – среда Мурасиге и Скуга (МС) с 1,0 мг/л бензиламинопурина (БАП), для *T. vulgaris* L. ‘Горный Бальзам’, *T. × citriodorus* (Pers.) Schreb. ‘Doone Valley’, *T. caucasicus* Willd. ex Ronniger – МС с 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л гибберелловой кислоты (ГК₃). На 2-м этапе клонального микроразмножения целесообразно культивировать экспланты *T. caucasicus* и *T. serpyllum* в течение 40 суток, а *T. vulgaris* и *T. × citriodorus* – в течение 60 суток. Максимальный коэффициент размножения при рекомендованной продолжительности культивирования был получен для *T. × citriodorus* (9,9) на среде МС без гормонов, *T. caucasicus* (16,1) и *T. vulgaris* (10,0) – на среде МС с 1,0 мг/л кинетина, а *T. serpyllum* (6,8) – на среде МС с 1,0 мг/л БАП. При сравнении разных культуральных сосудов (пробирки, банки и колбы) выявлена эффективность использования банок, что позволило увеличить коэффициент размножения до 2,1–5,7 раза. Выявлено, что при культивировании микропобегов четырех видов тимьяна на среде МС с 1,0 мг/л индолилмасляной кислоты частота укоренения достигала 84,6–98,9 %. Частота адаптации *ex vitro* при использовании смеси торфа и перлита (1 : 1) составила от 62,8 до 89,5 %.

Clonal micropropagation of some species of the genus *Thymus* L.

N. A. Yegorova, A. Sh. Tevfik

Research Institute of Agriculture of Crimea, Kievskaya St. 150, Simferopol, 295043, Russian Federation

Keywords: culture medium composition, cultivation conditions, explant, propagation *in vitro*.

Summary. The aim of the work was to study the influence of cultivation factors on the explants development to optimize the protocol of *in vitro* clonal micropropagation of four species of the genus *Thymus* L., valuable essential oil and medicinal plants. Conditions that ensure the production of up to 94.2 % of sterile explants were selected. It has been established that, when introduced into *in vitro* culture, it is advisable to use shoot tips and stem segments with a node (isolated from donor plants) and cultivate them in foil-covered test tubes. The optimal culture media for the first stage of micropropagation were determined: Murashige and Skoog (MS) medium with 1.0 mg/l benzylaminopurine (BAP)

for *Thymus serpyllum* L. or MS with 1.0 mg/l kinetin and 1.0 mg/l gibberellic acids (GA₃) for *T. vulgaris* L. 'Gorny Balzam', *T. × citriodorus* (Pers.) Schreb. 'Doone Valley', *T. caucasicus* Willd. ex Ronniger. At the second stage of clonal micropropagation, it is advisable to cultivate *T. caucasicus* and *T. serpyllum* explants during 40 days, but *T. vulgaris* and *T. × citriodorus* – during 60 days. The maximum multiplication index at the recommended cultivation duration was obtained for *T. × citriodorus* (9.9) on MS medium without hormones, *T. caucasicus* (16.1) and *T. vulgaris* (10.0) – on MS medium with 1.0 mg/l kinetin., and *T. serpyllum* (6.8) on MS medium with 1.0 mg/l BAP. When comparing different culture vessels (tubes, jars and flasks), the effectiveness of jars was revealed. This type of culture vessels made it possible to increase the multiplication index up to 2.1–5.7 times. It was revealed that when microshoots of four thyme species were cultivated on MS medium with 1.0 mg/l IBA, the rooting rate reached 84.6–98.9 %. The frequency of adaptation *ex vitro* when using a mixture of peat and perlite (1:1) ranged from 62.8 to 89.5 %.

Введение

Многие виды рода *Thymus* L. (тимьян) являются перспективными лекарственными и ароматическими растениями, сырье и эфирное масло которых широко используется в фармацевтическом и косметологическом производстве, пищевой промышленности. Особую ценность эти виды имеют благодаря антисептическим, антигельминтным, противозудным, иммуномодулирующим и антирадикальным свойствам (Aljabeili et al., 2018). Применение эфирного масла тимьяна способствует лучшему проникновению антибиотиков, что позволяет снизить дозы или заменить их, благодаря бактерицидному действию фенольных соединений (Kryvtsova et al., 2019; Ouakouak et al., 2021). Наиболее значимыми для использования в медицине являются *T. vulgaris* L. и *T. serpyllum* L., которые входят в фармакопеи многих стран мира (Vinokurova et al., 2018). В эфирных маслах разных хемотипов этих видов содержатся фенолы тимол и карвакрол, а также терпеновые спирты линалоол и гераниол. Ряд других видов тимьяна также можно использовать в качестве сырья для лекарственных препаратов. Так, у *T. caucasicus* Willd. ex Ronniger выявлено наличие в эфирном масле 1,8-цинеола (21,5 %), тимола (12,6 %), неролидола (7,8 %), α-пинена (7,0 %) и др. (Asbaghian et al., 2011). Для декоративного садоводства и овощеводства представляет интерес *T. × citriodorus* (Pers.) Schreb., эфирное масло которого содержит до 15 % цитраля, что придаёт ему приятный лимонный аромат (Ntalli et al., 2020).

Решение многих проблем селекции растений, а также поддержания биоразнообразия природной флоры в настоящее время невозможно без привлечения биотехнологических методов. Одним из таких широко используемых приемов является клональное микроразмножение, которое позволяет быстро размножить ценные генотипы, получить генетически однородный,

оздоровленный посадочный материал, значительно увеличить коэффициент размножения растений, поддерживать коллекции генетической плазмы *in vitro* и др. (Cardoso et al., 2018).

Литературные данные, касающиеся исследований по клональному микроразмножению тимьяна, довольно противоречивы. Большинство ученых для выделения первичных эксплантов используют асептические проростки, полученные из семян (Banna, 2017; Bekircan et al., 2018; Kulpa et al., 2019; Ansari et al., 2020; Khajuria et al., 2021), которые у перекрестно опыляемых видов представляют генетически неоднородный материал. Известны исследования, касающиеся размножения *T. persicus* (Ronniger ex Reach. F.) Jalas (Bakhtiar et al., 2016), *T. vulgaris* (Ansari et al., 2019), *T. syriacus* Boiss., *T. majorana* (L.) Kuntze, *T. incanus* Sm., *T. fruticosus* (L.) Link, *T. capitatus* (L.) Hoffmanns et Link (Alcowni et al., 2017) с использованием каллусной культуры. Однако при регенерации путем непрямого органогенеза или соматического эмбриогенеза из-за соматической вариабельности соматических клеток *in vitro* могут появиться генетически измененные растения.

Очень разнообразны сведения о питательных средах для разных этапов микроразмножения с использованием в качестве эксплантов меристем, почек или сегментов стебля с узлом. Так, экспланты *T. sibthorpii* Benth. (Tsoktouridis et al., 2019) и *T. moroderi* Pau ex Martinez (Marco-Medina, Casas, 2015) хорошо развивались на питательной среде без гормонов. Для активного побегообразования *T. persicus* необходима среда MS с 2,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК (Bakhtiar et al., 2016), для *T. broussonetii* Boiss. – 1,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИУК (Nordine et al., 2014), а для *T. vulgaris* – 2,0 мг/л БАП (Banna, 2017). Z. N. Ansari et al. (2020) установили, что для *T. pallidus* Cosson ex Batt. максимальное количество побегов формировалось при использовании кинетина или аденина совместно с ГК₃. Некоторые исследователи

получили высокий коэффициент размножения для разных видов тимьяна на среде, содержащей 0,5 мг/л кинетина и 2,0 мг/л БАП (Khajuria et al., 2021) или 5,0 мг/л изопентиладенина (2ip) (Kulpa et al., 2018). Замена БАП на 2ip способствовало повышению коэффициента размножения для *T. × josephi-angeli* J. Mansanet et Aguil. (Asensio et al., 2022).

Кроме того, в имеющейся литературе практически нет данных о влиянии условий культивирования *in vitro* на морфогенетический потенциал эксплантов при размножении видов рода *Thymus*. Отсутствие единых методических приемов ограничивает применение имеющихся протоколов размножения тимьяна при работе с новыми видами или образцами. Поэтому целью данного исследования было изучение влияния факторов культивирования на развитие эксплантов для оптимизации протокола клонального микроразмножения *in vitro* четырех видов рода *Thymus*.

Материалы

Объекты. В качестве объектов для исследования использовали 4 вида тимьяна: *Thymus vulgaris* 'Горный Бальзам', *T. serpyllum*, *T. × citriodorus* (Pers.) Schreb. 'Doone Valley', *T. caucasicus* Willd. ex Ronniger. Донорные растения, размноженные зеленым черенкованием, выращивали в условиях закрытого грунта. *T. vulgaris* и *T. serpyllum* получены из коллекции генофонда пряно-ароматических, эфиромасличных и лекарственных растений ФГБУН «НИИСХ Крыма» (УНУ № 507515), а *T. × citriodorus* и *T. caucasicus* – из коллекции Южно-Уральского ботанического сада-института УФИЦ РАН.

Реагенты и оборудование. Для стерилизации растительного материала применяли этанол («Росспиртпром», Россия) и препарат ДезТаб («Ахлор Донге ЛТД», Китай), содержащий 43 % $C_3O_3N_3Cl_3$, 20 % $NaC_3O_3N_3Cl_2$ (активный хлор – 48–53 %). Все работы по стерилизации материала и субкультивированию проводили в условиях ламинарного бокса БАВип-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением кинетина (Кин.), тидиазурона (ТДЗ), бензиламинопурина (БАП), гибберелловой кислоты (GK_3) и индолилмасляной кислоты (ИМК) (Sigma, США), 2 % сахарозы и 0,8 % агар-агара (Fujian Putian, Китай). Питательные среды (рН = 5,6) автоклавируют

с использованием стерилизатора парового ГК-100-3 (Россия) при 121 °С в течение 20 мин. Для культивирования *in vitro* в различных опытах использовали: закрытые фольгой или ватно-марлевыми пробками пробирки (16 × 150 мм), закрытые фольгой стеклянные банки (250 мл) или колбы (200 мл). Культивирование осуществляли в культуральной комнате при температуре 24–26 °С, относительной влажности воздуха 70 % и освещенности 2–3 клк с фотопериодом 16 часов.

Статистическая обработка. При анализе морфометрических параметров развивающихся эксплантов определяли: количество (шт.) и длину (см) побегов, количество узлов на побег (шт.), количество оводненных побегов (%), коэффициент размножения (произведение количества побегов/эксплант на число узлов/побег). В каждом варианте опыта анализировали не менее 20 эксплантов, повторность опыта 2–3-кратная. Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам, с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010). Достоверность различий между вариантами рассчитывали по t-критерию Стьюдента при 5%-м уровне значимости. В таблицах и на графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Исполнение метода

Введение в культуру *in vitro*

1. **Стерилизация растительного материала.** Выделенные из донорных растений побеги нарезают на сегменты длиной 3–4 см, на 40 мин замачивают в мыльном растворе и 5–7 раз промывают проточной водой. Дальнейшую стерилизацию проводят в асептических условиях ламинарного бокса с последовательным использованием 70%-го этанола (40 сек) и 0,3%-го раствора препарата ДезТаб (10 мин). После этого растительный материал промывают 3 раза по 10 мин стерильной дистиллированной водой. При такой обработке получено максимальное количество жизнеспособных стерильных эксплантов тимьяна (до 94,2 %).

2. **Тип экспланта.** В культуру *in vitro* вводили верхушки побега и сегменты стебля с узлом (8–10 мм), из которых через 2–3 недели культивирования формировались основной и пазушные побеги. При анализе развития двух типов экспланта у большинства изученных генотипов не выявлено существенных различий морфометрических по-

казателей микроразмножения. Исключение составило только количество узлов на побег у *T. vulgaris* и *T. serpyllum*. При сравнении коэффициентов размножения не отмечено достоверных различий. В связи с этим для клонального микроразмножения этих видов тимьяна целесообразно использовать как верхушки побегов, так и сегменты стебля с узлом, что позволяет получить больше эксплантов с одного растения.

3. *Состав питательной среды.* В таблице 1 представлены данные о влиянии гормонального состава 5 вариантов питательной среды МС на морфометрические параметры эксплантов тимьяна. Выбор анализируемых сред основывался на наших предыдущих исследованиях, проведенных с *T. vulgaris* (Тевфик, Егорова, 2020). Уста-

новлено, что при культивировании *T. serpyllum* на средах с БАП получено больше микроразмножений (6,1 шт./эксплант) по сравнению с другими питательными средами (2,2–2,5 шт./эксплант). Подобная тенденция, направленная на увеличение числа побегов на один эксплант, отмечена при использовании этого цитокинина и для *T. caucasicus*. У остальных генотипов достоверных различий по данному параметру не выявлено. При анализе зависимости длины побегов от регуляторов роста в среде МС не выявлено существенных различий. Исключение составили *T. caucasicus* и *T. serpyllum*, для которых введение в состав питательной среды кинетина приводило к увеличению длины побегов в 1,6–2,7 раза по сравнению с другими регуляторами роста.

Таблица 1

Влияние генотипа и гормонального состава питательной среды на развитие эксплантов видов *Thymus* L. при введении в культуру *in vitro* (40 сут культивирования)

Вид тимьяна	Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Количество развивающихся эксплантов, %	Количество побегов на эксплант, шт.	Длина побега, см	Количество узлов на побег, шт.	Коэффициент размножения
<i>T. vulgaris</i>	–	87,5 ± 8,9 ^a	1,7 ± 0,1 ^c	1,6 ± 0,1 ^{cd}	1,8 ± 0,2 ^c	3,1 ± 0,2 ^d
	Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	82,1 ± 8,8 ^{ab}	2,2 ± 0,1 ^{bc}	2,7 ± 0,3 ^b	2,5 ± 0,2 ^{bc}	5,5 ± 0,4 ^{bc}
	Кин. – 1,0	86,1 ± 8,7 ^{ab}	1,8 ± 0,1 ^c	2,6 ± 0,3 ^b	2,4 ± 0,2 ^{bc}	4,3 ± 0,3 ^c
	ГК ₃ – 1,0	86,8 ± 8,9 ^a	1,8 ± 0,1 ^c	1,3 ± 0,1 ^d	1,6 ± 0,1 ^c	2,9 ± 0,3 ^{de}
	БАП – 1,0	83,0 ± 8,8 ^{ab}	1,7 ± 0,1 ^c	1,8 ± 0,1 ^c	2,0 ± 0,2 ^{bc}	3,6 ± 0,2 ^{cd}
<i>T. caucasicus</i>	–	90,2 ± 8,9 ^a	1,9 ± 0,1 ^c	2,0 ± 0,1 ^c	2,1 ± 0,2 ^{bc}	4,0 ± 0,3 ^{cd}
	Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	87,5 ± 8,8 ^a	2,2 ± 0,1 ^{bc}	4,2 ± 0,4 ^a	4,0 ± 0,4 ^{ab}	8,8 ± 0,6 ^{ab}
	Кин. – 1,0	92,5 ± 9,9 ^a	2,2 ± 0,1 ^{bc}	4,2 ± 0,4 ^a	4,2 ± 0,4 ^a	9,2 ± 0,6 ^{ab}
	ГК ₃ – 1,0	85,0 ± 9,1 ^{ab}	2,0 ± 0,2 ^c	2,5 ± 0,2 ^b	2,3 ± 0,2 ^{bc}	4,6 ± 0,4 ^c
	БАП – 1,0	83,8 ± 8,8 ^{ab}	2,7 ± 0,2 ^b	2,2 ± 0,1 ^{bc}	2,2 ± 0,2 ^{bc}	5,9 ± 0,5 ^{bc}
<i>T. × citriodorus</i>	–	64,7 ± 7,6 ^{ab}	1,8 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,1 ^{de}	1,3 ± 0,1 ^{cd}	2,3 ± 0,3 ^{de}
	Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	78,1 ± 7,9 ^{ab}	1,9 ± 0,2 ^c	0,9 ± 0,1 ^e	1,1 ± 0,1 ^d	2,1 ± 0,2 ^e
	Кин. – 1,0	56,3 ± 6,5 ^b	2,0 ± 0,2 ^c	0,9 ± 0,1 ^e	1,1 ± 0,1 ^d	2,2 ± 0,2 ^e
	ГК ₃ – 1,0	70,9 ± 7,7 ^{ab}	2,0 ± 0,1 ^c	0,8 ± 0,1 ^e	1,1 ± 0,1 ^d	2,2 ± 0,2 ^e
	БАП – 1,0	42,5 ± 5,4 ^b	1,8 ± 0,2 ^c	0,7 ± 0,1 ^e	1,1 ± 0,1 ^d	2,0 ± 0,2 ^e
<i>T. serpyllum</i>	–	82,1 ± 8,8 ^{ab}	3,0 ± 0,3 ^b	1,2 ± 0,1 ^d	1,5 ± 0,2 ^{cd}	4,5 ± 0,4 ^c
	Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	80,9 ± 7,8 ^{ab}	2,2 ± 0,2 ^{bc}	3,2 ± 0,4 ^{ab}	3,2 ± 0,4 ^{ab}	7,0 ± 0,6 ^b
	Кин. – 1,0	87,5 ± 8,8 ^a	2,5 ± 0,3 ^{bc}	2,6 ± 0,3 ^{bc}	2,9 ± 0,2 ^b	7,3 ± 0,6 ^b
	ГК ₃ – 1,0	71,4 ± 7,7 ^{ab}	2,3 ± 0,2 ^{bc}	1,6 ± 0,2 ^{cd}	2,8 ± 0,2 ^b	6,4 ± 0,5 ^{bc}
	БАП – 1,0	87,5 ± 8,8 ^a	6,1 ± 0,6 ^a	1,3 ± 0,1 ^d	1,7 ± 0,2 ^c	10,4 ± 0,8 ^a

Примеч. Пробирки закрывали фольгой. В каждом столбце разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения ($p \leq 0,05$).

Сравнение коэффициента размножения в зависимости от гормонального состава среды МС не выявило достоверных различий при культивировании эксплантов *T. × citriodorus*. В то же время у *T. serpyllum* данный показатель был максимальным при использовании 1,0 мг/л БАП, а у *T. vulgaris* и *T. caucasicus* – по 1,0 мг/л кинетина

и ГК₃. Таким образом, при сопоставлении всех параметров на первом этапе размножения оптимальной питательной средой для *T. caucasicus*, *T. × citriodorus* и *T. vulgaris* является МС, дополненная 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК₃, а для *T. serpyllum* – 1,0 мг/л БАП.

4. *Тип пробки.* Анализ зависимости длины побегов от типа пробки показал увеличение этого показателя у *T. vulgaris*, *T. serpyllum* и *T. caucasicus* при использовании фольги в 1,4–1,7 раза по сравнению с ватно-марлевыми пробками (рис. 1). Подобная тенденция отмечена и при анализе числа узлов на побег. В результате использование фольги позволило повысить коэффициент размножения до 1,4 раза. Поэтому на этапе введения рекомендуется закрывать культуральные сосуды фольгой.

5. *Продолжительность культивирования.* Для всех изученных видов тимьяна на этапе введения в культуру *in vitro* рекомендуется культивировать экспланты в течение 40 сут.

2 этап клонального микро размножения

1. *Эксплант.* На этапе собственно микро размножения в качестве эксплантов используются сегменты стебля с 1 узлом, полученные после микро черенкования побегов, сформированных из верхушечных или пазушных меристем *in vit-*

ro. При культивировании сегментов стебля с 1 узлом, наряду с развитием пазушных побегов, у всех изученных видов наблюдается формирование 2–5 адвентивных побегов (рис. 2).

2. *Культуральный сосуд.* Сравнение коэффициента размножения в зависимости от культурального сосуда (табл. 2) показало достоверное его повышение в большинстве вариантов опыта при использовании банок. В других вариантах опыта отмечена тенденция повышения этого показателя. При максимальной продолжительности культивирования микро черенков в банках (70 сут) на большинстве вариантов сред коэффициент размножения был выше у *T. vulgaris* в 1,3–3,9 раза, у *T. caucasicus* в 1,4–3,6 раза, у *T. × citriodorus* в 1,5–5,7 раза, у *T. serpyllum* в 1,1–2,1 раза по сравнению с выращиванием микро черенков в пробирках или колбах. Поэтому у изученных видов тимьяна на 2 этапе микро размножения целесообразно культивировать экспланты в банках.

Таблица 2

Влияние гормонального состава питательной среды, культурального сосуда и длительности цикла выращивания на коэффициент размножения видов *Thymus* L. на этапе собственно микро размножения

Вид тимьяна	Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Пробирки		Банки		Колбы	
		40 сут	70 сут	40 сут	70 сут	40 сут	70 сут
<i>T. vulgaris</i>	–	2,2 ± 0,2 ^f	3,5 ± 0,3 ^e	4,6 ± 0,4 ^{de}	9,3 ± 0,9 ^{bc}	4,5 ± 0,4 ^{de}	4,5 ± 0,4 ^{de}
	Кин. – 1,0	2,3 ± 0,2 ^f	3,3 ± 0,3 ^{ef}	5,1 ± 0,4 ^d	12,8 ± 1,2 ^{ab}	2,0 ± 0,2 ^{fg}	4,3 ± 0,3 ^{de}
	Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	1,8 ± 0,2 ^{fg}	2,8 ± 0,2 ^{ef}	4,0 ± 0,3 ^{de}	10,8 ± 1,0 ^b	2,4 ± 0,2 ^f	3,8 ± 0,3 ^{de}
	БАП – 1,0	2,8 ± 0,2 ^{ef}	3,3 ± 0,3 ^{ef}	3,8 ± 0,3 ^{de}	4,7 ± 0,4 ^{de}	3,2 ± 0,3 ^{ef}	3,3 ± 0,3 ^{ef}
	ТДЗ – 1,0	2,8 ± 0,2 ^{ef}	3,0 ± 0,3 ^{ef}	2,5 ± 0,2 ^f	3,8 ± 0,3 ^{de}	2,8 ± 0,2 ^{ef}	3,0 ± 0,3 ^{ef}
<i>T. caucasicus</i>	–	6,3 ± 0,6 ^{cd}	8,5 ± 0,7 ^{bc}	14,5 ± 1,5 ^{ab}	15,5 ± 1,5 ^{ab}	5,3 ± 0,5 ^d	10,3 ± 1,0 ^b
	Кин. – 1,0	6,3 ± 0,6 ^{cd}	9,5 ± 0,8 ^{bc}	16,1 ± 1,5 ^a	17,8 ± 1,9 ^a	9,3 ± 1,1 ^{bc}	12,4 ± 1,1 ^{ab}
	Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	3,6 ± 0,3 ^e	5,7 ± 0,5 ^{cd}	10,3 ± 1,1 ^{bc}	12,4 ± 1,4 ^{ab}	3,6 ± 0,3 ^e	5,2 ± 0,4 ^d
	БАП – 1,0	3,0 ± 0,3 ^{ef}	5,3 ± 0,4 ^d	8,8 ± 1,0 ^{bc}	13,3 ± 1,0 ^{ab}	3,0 ± 0,2 ^{ef}	3,7 ± 0,3 ^{de}
	ТДЗ – 1,0	2,6 ± 0,2 ^f	4,6 ± 0,4 ^{de}	4,6 ± 0,5 ^{de}	7,3 ± 0,5 ^c	2,7 ± 0,2 ^{ef}	2,9 ± 0,2 ^{ef}
<i>T. × citriodorus</i>	–	1,8 ± 0,2 ^{fg}	3,5 ± 0,3 ^e	2,9 ± 0,2 ^{ef}	10,3 ± 0,9 ^b	1,4 ± 0,1 ^g	1,8 ± 0,2 ^{fg}
	Кин. – 1,0	1,8 ± 0,2 ^{fg}	2,8 ± 0,2 ^{ef}	2,2 ± 0,2 ^f	5,2 ± 0,4 ^d	2,0 ± 0,2 ^{fg}	2,8 ± 0,2 ^{ef}
	Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	2,2 ± 0,2 ^f	3,4 ± 0,3 ^{ef}	2,7 ± 0,2 ^{ef}	5,7 ± 0,4 ^{cd}	2,2 ± 0,2 ^f	2,7 ± 0,2 ^{ef}
	БАП – 1,0	1,4 ± 0,1 ^g	2,5 ± 0,2 ^f	2,2 ± 0,2 ^f	4,2 ± 0,3 ^{de}	2,2 ± 0,2 ^f	2,9 ± 0,2 ^{ef}
	ТДЗ – 1,0	1,4 ± 0,1 ^g	2,0 ± 0,2 ^{fg}	2,3 ± 0,2 ^f	5,1 ± 0,4 ^d	1,9 ± 0,2 ^{fg}	2,5 ± 0,2 ^f
<i>T. serpyllum</i>	–	6,4 ± 0,7 ^{cd}	6,4 ± 0,7 ^{cd}	5,1 ± 0,4 ^d	5,1 ± 0,4 ^d	3,7 ± 0,5 ^{de}	3,9 ± 0,4 ^{de}
	Кин. – 1,0	5,9 ± 0,5 ^{cd}	6,5 ± 0,6 ^{cd}	6,0 ± 0,5 ^{cd}	7,8 ± 0,7 ^{bc}	5,3 ± 0,5 ^d	7,8 ± 0,8 ^{bc}
	Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	4,6 ± 0,4 ^{de}	5,7 ± 0,4 ^{cd}	6,0 ± 0,4 ^{cd}	6,7 ± 0,6 ^{cd}	4,8 ± 0,4 ^{de}	5,3 ± 0,4 ^d
	БАП – 1,0	3,9 ± 0,4 ^{de}	4,8 ± 0,4 ^{de}	6,8 ± 0,6 ^{cd}	10,0 ± 0,8 ^b	4,4 ± 0,4 ^{de}	4,9 ± 0,4 ^{de}
	ТДЗ – 1,0	7,2 ± 0,7 ^{cd}	8,7 ± 0,7 ^{bc}	6,7 ± 0,5 ^{cd}	8,7 ± 0,6 ^{bc}	6,7 ± 0,5 ^{cd}	8,2 ± 0,6 ^{bc}

Примеч. Все типы культуральных сосудов закрывали фольгой. Достоверные ($p \leq 0,05$) различия обозначены разными буквами.

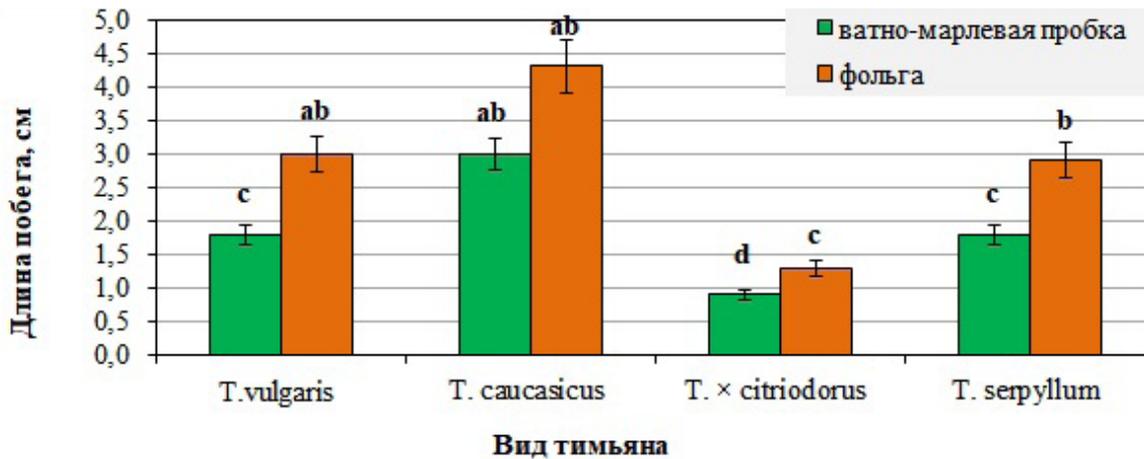


Рис. 1. Влияние генотипа и типа пробки на длину побегов при введении видов *Thymus* L. в культуру *in vitro* (культивирование в пробирках, среда МС с 1,0 мг/л Кин. и 1,0 мг/л ГК₃). Достоверные ($p \leq 0,05$) различия обозначены разными буквами.

3. *Состав питательной среды.* Состав регуляторов роста в среде МС, представленный в таблице 2, выбран на основании наших предыдущих исследований у *T. vulgaris* (Tevfik, Yegorova, 2020). Сравнение влияния гормонального состава питательной среды проведено в основном при анализе культивирования эксплантов в банках, которые мы рекомендовали в качестве культурального сосуда. Анализ коэффициента размножения (основного параметра на этом этапе микроразмножения) показал, что для культивирования эксплантов *T. caucasicus* и *T. vulgaris* наиболее эффективной является питательная среда МС с 1,0 мг/л кинетина (табл. 2). Следует отметить, что применение БАП или ТДЗ у *T. caucasicus* вызывало формирование оводненных побегов с частотой до 41,3–49,3 %, что свидетельствует о нецелесообразности использования этих цитокининов у данного вида. При культивировании эксплантов *T. serpyllum* максимальный коэффициент размножения получен на питательной среде МС с 1,0 мг/л БАП. У этого вида при использовании ТДЗ также выявлена высокая частота образования витрифицированных побегов (до 53,5 %). Сравнительный анализ влияния разного состава регуляторов роста в питательной среде на коэффициент размножения у *T. x citriodorus* на 40 сутки не выявил достоверных различий. Однако при более длительном культивировании эксплантов этого вида показана эффективность использования безгормональной среды МС, на которой коэффициент размножения достигал 10,3. Выявленные факты свидетельствуют о целесообразности культивирования эксплан-

тов *T. x citriodorus* на среде МС без гормонов, *T. caucasicus* и *T. vulgaris* – на среде МС с 1,0 мг/л кинетина, а *T. serpyllum* – на среде МС с 1,0 мг/л БАП.

4. *Продолжительность цикла выращивания.* В наших предыдущих исследованиях для *T. vulgaris* 'Крымрозовец' (Tevfik, Yegorova, 2020) была показана целесообразность увеличения продолжительности цикла выращивания для эффективного микроразмножения. В представленном опыте (рис. 3) при анализе культивирования эксплантов в течение 30–70 сут у изученных видов тимьяна выявлена различная динамика изменения коэффициента размножения в цикле выращивания. Так, у *T. caucasicus* и *T. serpyllum* за этот период произошло повышение данного параметра в 1,3 и 1,8 раза, однако достоверных различий не отмечено. В то же время у *T. vulgaris* и *T. x citriodorus* коэффициент размножения с 30 до 70 сут достоверно увеличился в 4,3 и 3,5 раза, соответственно. Однако после 60 сут не отмечено достоверного повышения этого параметра. Выявленные факты свидетельствуют о целесообразности использования для *T. vulgaris* и *T. x citriodorus* цикла выращивания продолжительностью 60 сут, а для *T. caucasicus* и *T. serpyllum* – 40 сут.

5. *Укоренение и адаптация к нестерильным условиям выращивания.* Укоренение *ex vitro* изученных видов тимьяна проводили на питательной среде, ранее оптимизированной для *T. vulgare* (Tevfik, Yegorova, 2020). Использование питательной среды МС с 1,0 мг/л ИМК приводи-

ло к укоренению микрочеренков *T. caucasicus* и *T. serpyllum* в 98,9 и 84,6 % случаев соответственно, а количество формирующихся корней достигало $7,3 \pm 0,6$ и $8,5 \pm 0,7$ шт. на эксплант. Культивирование *T. vulgaris* и *T. × citriodorus* на этой среде позволило получить 93,5 и 89,3 % укорененных микропобегов и количество корней $7,6 \pm 0,7$ и $6,5 \pm 0,7$ шт. на эксплант. При адаптации укоренен-

ных микропобегов четырех видов тимьяна к условиям выращивания *ex vitro* в качестве субстрата использовали смесь торфа и перлита (1 : 1). В этих условиях количество адаптированных микрорастений после двух месяцев выращивания составило у *T. caucasicus* 62,8 %, у *T. serpyllum* – 63,6 %, у *T. × citriodorus* – 83,6 %, а у *T. vulgaris* – 89,5 %.

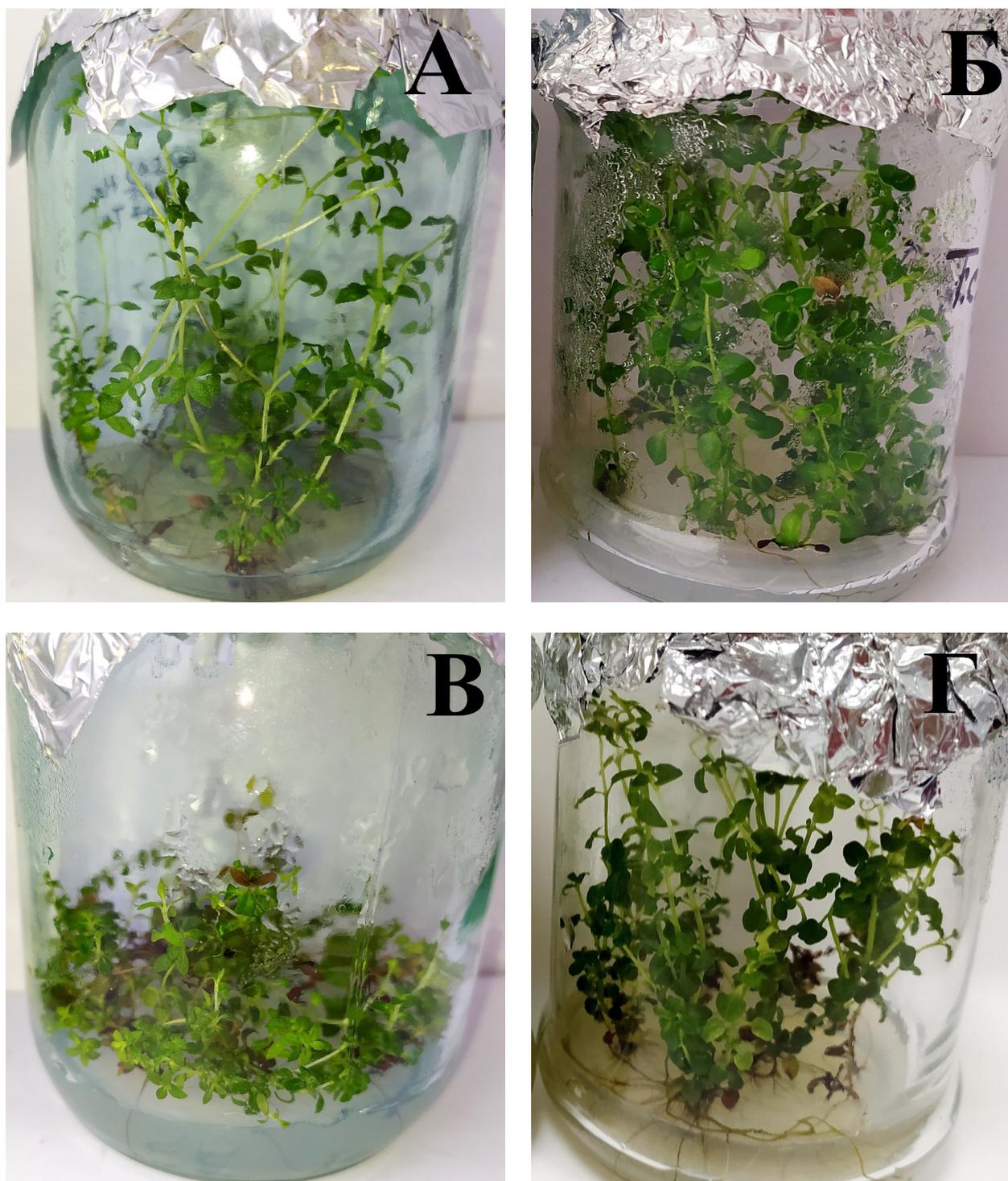


Рис. 2. Микропобеги *Thymus vulgaris* (А), *T. caucasicus* (Б), *T. serpyllum* (В), *T. × citriodorus* (Г) на втором этапе клонального микроразмножения.

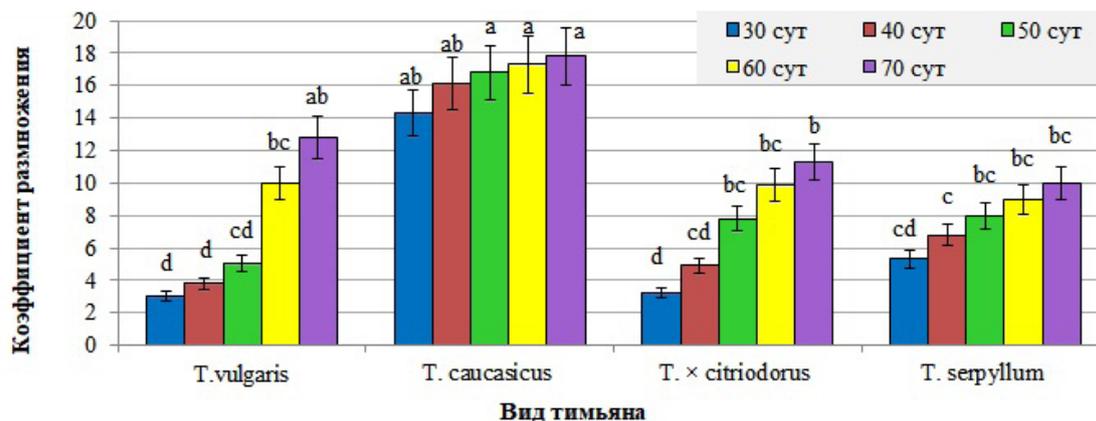


Рис. 3. Влияние генотипа и продолжительности цикла выращивания на коэффициент размножения видов *Thymus* L. на втором этапе микроразмножения *in vitro*. Достоверные ($p \leq 0,05$) различия обозначены разными буквами.

Заключение

В результате исследований выявлены эффективные сочетания различных факторов при микроразмножении тимьяна и впервые уточнены некоторые, ранее не освещенные в литературе, условия культивирования (длительность цикла выращивания, тип культурального сосуда и пробки), что способствовало максимальному проявлению морфогенетического потенциала эксплантов *in vitro*. Это позволило разработать эффективный протокол клонального микроразмножения четырех видов тимьяна. Подобраны режимы, позволяющие получать до 94,2 % стерильных эксплантов. Установлено, что на развитие эксплантов значительное влияние оказывал генотип, что обусловило особенности протокола для разных видов (например, различия состава питательной среды или продолжительности цикла выращивания). Показано, что на первом этапе микроразмножения экспланты *T. vulgaris*, *T. x citriodorus*, *T. caucasicus* необходимо культивировать на среде МС с добавлением 1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ГК₃, а экспланты *T. serpyllum* – 1,0 мг/л БАП. Показана эффективность использования в качестве эксплантов верхушек побегов и сегментов стебля с узлом, которые следует культивировать в закрытых фольгой пробирках. Установлено, что на 2-м этапе микроразмножения экспланты *T. caucasicus* и *T. vulgaris* целесообразно культивировать в стеклянных банках на среде МС с 1,0 мг/л кинетина, *T. x citriodorus* – на безгормональной среде МС, а *T. serpyllum* – на среде МС с 1,0 мг/л БАП. Выявлены различия в реализации морфогенетического потенциала между видами в цикле выращивания – если у одних видов

тимьяна образование и прирост побегов замедлялись на 40–50 сут, то у других в этот период только начиналось активное микроразмножение. Поэтому для *T. caucasicus* и *T. serpyllum* целесообразно использовать цикл выращивания продолжительностью 40 сут, а для *T. vulgaris* и *T. x citriodorus* – 60 сут, что обеспечило получение коэффициента размножения до 16,1; 6,8; 10,0 и 9,9, соответственно. Максимальную способность к размножению *in vitro* проявил *T. caucasicus*, у которого коэффициент размножения при сочетании оптимальных условий был в 1,4–1,8 раза выше, чем у трех других видов. Для дальнейшего укоренения микрорастения пересаживали на питательную среду МС с 1,0 мг/л ИМК, на которой у изученных видов тимьяна получена высокая частота ризогенеза (до 84,6–98,9 %). Установлено, при использовании смеси торфа и перлита (1 : 1) частота адаптации к нестерильным условиям выращивания *ex vitro* достигала 62,8–89,5 %. Разработанный протокол микроразмножения четырех видов рода *Thymus* может быть использован для ускоренного размножения ценных коллекционных или селекционных образцов, а также для массового получения посадочного материала новых сортов.

Благодарности

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ FNZW-2022-0008. В исследованиях использовались виды тимьяна из коллекции генофонда пряно-ароматических, эфиромасличных и лекарственных растений ФГБУН «НИИСХ Крыма» (УНУ № 507515), а также из коллекции Южно-Уральского ботанического сада-института УФИЦ РАН.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Alcowni R., Solyman E., Qauod H.** 2017. Introducing some of threatened *Thymus* species to *in vitro* tissue culturing as an approach for their conservation. *Pak. J. Bot.* 49(1): 259–264.
- Aljabeili H. S., Barakat H., Abdel-Rahman H. A.** 2018. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). *Food and Nutrition Sciences (FNS)* 9: 433–446. DOI: 10.4236/fns.2018.95034
- Ansari Z. N., Boussaoudi I., Benkaddour R., Hamdoun O., Lemrini M., Martin P., Badoc A., Lamarti A.** 2020. Conservation of *Thymus pallidus* Cosson ex Batt. by shoot tip and axillary bud *in vitro* culture. *J. Plant Biotechnol.* 47: 53–65. DOI: 10.5010/JPB.2020.47.1.053
- Ansari Z. N., El Mihaoui A., Boussaoudi I., Benkaddour R., Hamdoun O., Tahiri H., Badoc A., El Oualkadi A., Lamarti A.** 2019. Effect of macronutrients, cytokinins and auxins, on *in vitro* organogenesis of *Thymus vulgaris* L. *Am. J. Plant Sci.* 10: 1482–1502. DOI: 10.4236/ajps.2019.109105
- Asbaghian S., Shafaghat A., Zarea K., Kasimov F., Salimi F.** 2011. Comparison of volatile constituents, and antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Thymus caucasicus*, *T. kotschyanus* and *T. vulgaris*. *Nat. Prod. Commun.* 6(1): 137–140. DOI: 10.1177/1934578X1100600133
- Asensio E., Medinacelli Juan-Méndez R., Juan-Vicedo J.** 2022. *In vitro* Propagation and Phytochemistry of Thymol-Producing Plants from a Horticultural Form of *Thymus × josephi-angeli* Mansanet & Aguil. (Lamiaceae). *Horticulturae* 8: 1188. DOI: 10.3390/horticulturae8121188
- Bakhtiar Z., Mirjalili M. H., Sonboli A.** 2016. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 16: 48–54. DOI: 10.1590/1984-70332016v16n1a8
- Banna H. Y.** 2017. Micropropagation of thyme plant (*Thymus vulgaris*). *J. Plant Production, Mansoura Univ.* 8(11): 1221–1227. DOI: 10.21608/JPP.2017.41294
- Bekircan T., Yaşar A., Yıldırım S., Sökmen M., Sökmen A.** 2018. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. Shoots. *Biotech.* 8: 180. DOI: 10.1007/s13205-018-1206-2
- Cardoso J. C., Gerald L. T. Sh., Teixeira da Silva J. A.** 2018. Micropropagation in the twenty-first century. In: Víctor M. Loyola-Vargas, Neftalí Ochoa-Alejo (eds.). *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 1815, Chapter 2. Springer Science+Business Media, LLC. Pp. 17–46. DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4_2
- Khajuria A. K., Bisht N. S., Bhagat N.** 2021. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Thymus serpyllum* L.: an important aromatic medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 56: 652–661. DOI: 10.1007/s11627-020-10094-9
- Kryvtsova M. V., Salamon I., Koscova J., Bucko D., Spivak M.** 2019. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections. *Biosyst. Divers.* 27(3): 270–275. DOI: 10.15421/011936
- Kulpa D., Wesolowska A., Jadczyk P.** 2018. Micropropagation and composition of essential oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Not. Bot. Horti. Agrobot.* 46(2): 525–532. DOI: 10.15835/nbha46211020
- Marco-Medina A., Casas J. L.** 2015. *In vitro* multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex Martinez, an endemic Spanish plant. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 120: 99–108.
- Nordine A., Mohammed H., Meskaoui A.** 2014. *In vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis of *Thymus broussonetii* – a vulnerable aromatic and medicinal plant species. *IJPRBS* 3(1): 425–439.
- Ntalli N., Parlapani A. B., Tzani K., Samara M., Boutsis G., Dimou M., Menkissoglu-Spirodi U., Monokrousos N.** 2020. *Thymus Citriodorus* (Schreb) botanical products as ecofriendly nematicides with bio-fertilizing properties. *Plants* 9(2): 202. DOI: 10.3390/plants9020202
- Ouakouak H., Benarfa A., Messaoudi M., Begaa S., Sawicka B., Benchikha N., Simal-Gandara J.** 2021. Biological properties of essential oils from *Thymus algeriensis*. *Boiss. Plants* 10: 786. DOI: 10.3390/plants10040786
- Tevfik A. Sh., Yegorova N. A.** 2020. Clonal micropropagation of *Thymus vulgaris* L. *E3S Web of Conferences* 224(2): 04001. DOI: 10.1051/e3sconf/202022404001
- Tsoktouridis G., Krigas N., Sarropoulou V., Kampouroulou S., Papanastasi K., Grigoriadou K., Menexes G. C., Maloupa E.** 2019. Micropropagation and molecular characterization of *Thymus sibthorpii* Benth. (Lamiaceae), an aromatic-medicinal thyme with ornamental value and conservation concern. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 55: 647–658. DOI: 10.1007/s11627-019-10000-y
- Vinokurova O. A., Trineeva O. V., Slivkin A. I.** 2016. Comparative characteristics of different types of thyme: composition, properties and application (review). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv [Drug development and registration]* 4: 134–150. [In Russian] (Винокурова О. А., Тринева О. В., Сливкин А. И. Сравнительная характеристика различных видов тимьяна: состав, свойства, применение (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств, 2016. № 4. С. 134–150).