EDN ZHVADJ
DOI 10.5281/zenodo.15147790
УДК 633.81:57.085.2

Тевфик А. Ш., Егорова Н. А.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO THYMUS PSEUDONUMMULARIUS* KLOK. ET SCHOST.

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Реферат. *Представители Thymus L. являются перспективными лекарственными и ароматическими растениями, сырье и эфирное масло которых широко используется в фармацевтическом и косметологическом производстве, пищевой промышленности. Известно, что биотехнологии клонального микроразмножения* in vitro *позволяют существенно ускорить и повысить эффективность селекционно-семеноводческой работы. Цель исследования – изучить влияние состава питательной среды и условий культивирования на развитие эксплантов на основных этапах размножения* in vitro *и разработать методику клонального микроразмножения Thymus pseudonummularius Klok. et Schost. В статье представлено сравнение культивирования эксплантов тимьяна на шести вариантах питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) и в различных культуральных сосудах (банки, пробирки и колбы). Анализ влияния состава регуляторов роста на развитие эксплантов на этапе введения в культуру* in vitro *показал преимущество использования кинетина – в этом случае коэффициент размножения был выше в 1,2–1,7 раза по сравнению с 6-бензиламинопурином (БАП) и тидиазуроном (ТДЗ). На оптимальной питательной среде (МС с 1,0 мг/л кинетина) отметили увеличение этого показателя в 1,8 раза при культивировании в пробирках, закрытых фольгой, по сравнению с ватно-марлевыми пробками. Отмечено, что при культивировании на втором этапе клонального микроразмножения T. pseudonummularius при добавлении в питательную среду ТДЗ или БАП формировались короткие витрифицированные (12,9–40,1 %) микропобеги длиной 0,5–1,4 см. На этапе собственно микроразмножения максимальный коэффициент размножения (11,2) был получен на среде МС без регуляторов роста при использовании в качестве культурального сосуда банок. Выявлено, что для активного корнеобразования микропобегов их необходимо переносить на питательную среду ½ МС с 1,0 мг/л ИМК, на которой отмечено 100 % укоренение побегов и формирование до 9,2 корней/побег длиной 2,7 см. Частота адаптации микрорастений* ex vitro *на субстрате, состоящем из торфа и перлита (1:1), составила 67,5 %. Разработана методика микроразмножения T. pseudonummularius, которая позволит быстро размножить, а также депонировать ценные образцы* in vitro.

Ключевые слова*: Thymus pseudonummularius Klok. et Schost., клональное микроразмножение, эксплант, in vitro, питательная среда, культуральный сосуд.*

Для цитирования: *Тевфик А. Ш., Егорова Н. А. Разработка методики микроразмножения in vitro Thymus pseudonummularius Klok. et Schost. // Таврический вестник аграрной науки. 2025. № 1(41). С. 216–228. EDN: ZHVADJ. DOI: 10.5281/zenodo.15147790.*

For citation: *Tevfik A. Sh., Yegorova N. A. Development of a method for in vitro micropropagation of Thymus pseudonummularius Klok. et Schost. // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2025. No. 1(41). P. 216–228. EDN: ZHVADJ. DOI: 10.5281/zenodo.15147790.*

Введение

Для развития экономики России, в частности, пищевой, парфюмерно-косметической и фармацевтической промышленности, необходимо использование местных ресурсов, которые могли бы удовлетворить потребности и заменить

импортное дорогостоящее сырье. Среди широко распространенных эфиромасличных растений выделяются представители семейства Яснотковых (Lamiaceae). Особое место в этом семействе занимают растения рода тимьян (*Thymus* L.), насчитывающего около 400 видов, которые произрастают почти по всей Евразии, в Северной Африке, на Канарских островах и даже в Гренландии. Первые упоминания о тимьяне как о лекарственном средстве появились в третьем тысячелетии до нашей эры. Древние шумеры применяли его как антисептическое средство, а египтяне – при бальзамировании. Целебные свойства тимьяна были описаны еще в работах Теофраста, Авиценны и Диоскорида [1, 2].

Если говорить о применении тимьяна в официальной медицине, то он входит в состав лекарственных средств для лечения заболеваний верхних дыхательных путей, бронхитов, пневмонии. Его экстракт содержится в «Пертуссине» – широко известном препарате от кашля. Тимьян обладает также болеутоляющим действием при радикулитах и невритах, используется как лактогенное средство. Его эфирное масло служит источником тимола, широко применяемого для дезинфекции слизистой оболочки полости рта, также он является одним из компонентов жидкости Гартмана, применяемой в стоматологии как обезболивающее, используется при лечении грибковых заболеваний кожи как антифунгальное средство, при желудочно-кишечных расстройствах и при метеоризме как вяжущее, обладает также противоглистным свойством. В народной медицине рекомендуют использовать тимьян благодаря мочегонному, противосудорожному, успокаивающему и ранозаживляющему действию [3–5].

В Фармакопею России и других стран из многочисленных видов тимьяна включены только *Thymus vulgaris* L. и *Thymus serpyllum* L. [6], как наиболее изученные. Существуют и другие перспективные виды тимьяна, которые можно использовать как сырье для производства лекарственных препаратов. Одним из них является *Thymus pseudonummularius* Klok. et Schost. – эндемик западной части Главного Кавказского хребта [7–9].

В ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводится селекционная работа по получению новых сортов тимьяна [10]. Для ускорения размножения перспективных образцов, обладающих комплексом полезных признаков, наиболее эффективно применение клонального микроразмножения. Совместная деятельность биотехнологов и селекционеров позволит успешно решать размножения селекционного материала в более короткие сроки в достаточном количестве для его дальнейшего изучения, оздоровления растений от различных инфекций и депонирования ценных образцов *in vitro* [11, 12]. Имеется немало научных работ, в которых описаны биотехнологические приемы для микроразмножения и сохранения ряда эфиромасличных культур [12, 13]. Что касается тимьяна, то в литературе имеются фрагментарные данные об отдельных этапах клонального микроразмножения некоторых видов, не произрастающих в России [14–21]. При этом в большинстве работ представлены весьма противоречивые данные о составе питательных сред для отдельных этапов микроразмножения. Так, по данным некоторых исследователей экспланты тимьяна необходимо культивировать на безгормональной среде [16, 22]. Имеются публикации, свидетельствующие о повышении коэффициента размножения на питательных средах с цитокининами: изопентиладенином [23], совместном применении БАП и кинетина [24], БАП [25, 26], кинетина или аденина [14], а также БАП с ауксинами [19, 27]. Однако, в литературных источниках, касающихся изучения развития представителей *Thymus in vitro,* нет данных о комплексном влиянии условий культивирования на морфогенетический потенциал эксплантов на каждом этапе клонального микроразмножения. В связи с отсутствием

единых методических подходов применение имеющихся протоколов размножения тимьяна при работе с новыми видами или образцами затруднено. Кроме того, анализ доступных литературных источников показал, что исследования, касающиеся размножения *in vitro T. pseudonummularius* не проводились.

Цель исследований – изучение влияния состава питательной среды и условий культивирования на развитие эксплантов на основных этапах размножения *in vitro* и разработка методики клонального микроразмножения *Thymus pseudonummularius* Klok. et Schost.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований служили ткани и органы растений тимьяна ложномонетного (*Thymus pseudonummularius* Klok. et Schost.) из коллекции эфиромасличных, пряноароматических и лекарственных растений [https://ckp-rf.ru/usu/507515] ФГБУН «НИИСХ Крыма». Исходные растения выращивали в условиях закрытого грунта. В работе использовали общепринятые и разработанные авторами методики культивирования органов и тканей растений [28, 29]. В качестве первичных эксплантов использовали верхушки побегов (ВП) и сегменты стебля с узлом (У) длиной 8–10 мм. Для стерилизации растительного материала применяли следующие антисептики: этанол («Росспиртпром», Россия) и «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) [28] без регуляторов роста (БГ) и с добавлением тидиазурона (ТДЗ), гиббереллловой кислоты ($ГК_3$), кинетина (Кин), 6-бензиламинопурина (БАП), β-индолил-3-масляной кислоты (ИМК), β-индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Для культивирования *in vitro* в различных опытах использовали: пробирки (16 × 150 мм), закрытые фольгой (ПФ) или ватно-марлевыми пробками (ПВМ), стеклянные банки (250 мл), закрытые фольгой (БФ) или колбы (200 мл), закрытые ватно-марлевыми пробками (КВМ). 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 (шт./эксплант) и длину побегов (см), количество узлов (шт./побег), количество витрифицированных побегов (%), частоту ризогенеза (%), количество (шт./эксплант) и длину корней (см). 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 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

При разработке клонального микроразмножения на каждом этапе (введение, собственно микроразмножение или укоренение) необходимо отдельно подбирать как состав питательной среды, так и оптимальные условия культивирования (продолжительность цикла выращивания, культуральный сосуд и так далее) [22, 30, 31]. В ходе экспериментов по изучению особенностей клонального микроразмножения *T. pseudonummularius* на этапе введения в культуру *in vitro* проанализировано влияние двух цитокининов (БАП и Кин) и гиббереллловой кислоты в составе питательной среды на морфогенез эксплантов. Изучение зависимости количества жизнеспособных эксплантов от состава регуляторов роста в питательной среде показало, что максимальных значений этот показатель достигал при добавлении 1,0 мг/л Кин

совместно с $ГК_3$ (таблица 1). Как видно из представленных данных, достоверных различий по числу развивающихся эксплантов и частоте множественного побегообразования на анализируемых питательных средах не отмечалось.

Таблица 1 – Влияние состава питательной среды на развитие эксплантов *T. pseudonummularius* на этапе введения в культуру *in vitro*

Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Количество жизнеспособных эксплантов, %	Количество развивающихся эксплантов, %	Частота множественного побегообразования, %
БГ	69,1 ± 9,3	99,2 ± 8,2	97,3 ± 9,1
Кин – 1,0; $ГК_3$ – 1,0	91,1 ± 8,9	97,5 ± 8,8	92,3 ± 9,4
Кин – 1,0	79,8 ± 8,3	94,5 ± 9,9	91,4 ± 9,4
ТДЗ – 1,0	88,0 ± 9,1	95,0 ± 9,1	94,1 ± 9,2
БАП –1,0	85,3 ± 7,8	93,8 ± 8,8	98,2 ± 9,1

Максимальное количество побегов на эксплант (4,0 шт.) образовалось на безгормональной среде (рисунок 1). Однако, в связи с тем, что на безгормональной среде было получено минимальное в данном опыте количество жизнеспособных эксплантов, она является неэффективной при введении в культуру *in vitro*. Большее число узлов на побеге (2,0 шт.) и длина микропобегов (1,9 см) отмечены на среде с кинетином.

Сравнение коэффициента размножения также показало преимущество культивирования на питательной среде с 1,0 мг/л Кин. Использование этой среды способствовало повышению данного параметра в 1,2–1,7 раза по сравнению с другими вариантами среды. Кроме того, следует отметить, что введение в состав среды двух других цитокининов вызывало витрификацию побегов с частотой 23,2–32,4 %.

Для анализа 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 количества побегов от типа пробки показал увеличение этого показателя при использовании фольги для закрытия пробирок при культивировании на средах с кинетином и на безгормональной питательной среде. Использование двух других цитокининов, наоборот, способствовало повышению этого показателя в пробирках с ватно-марлевыми пробками (рисунок 1).

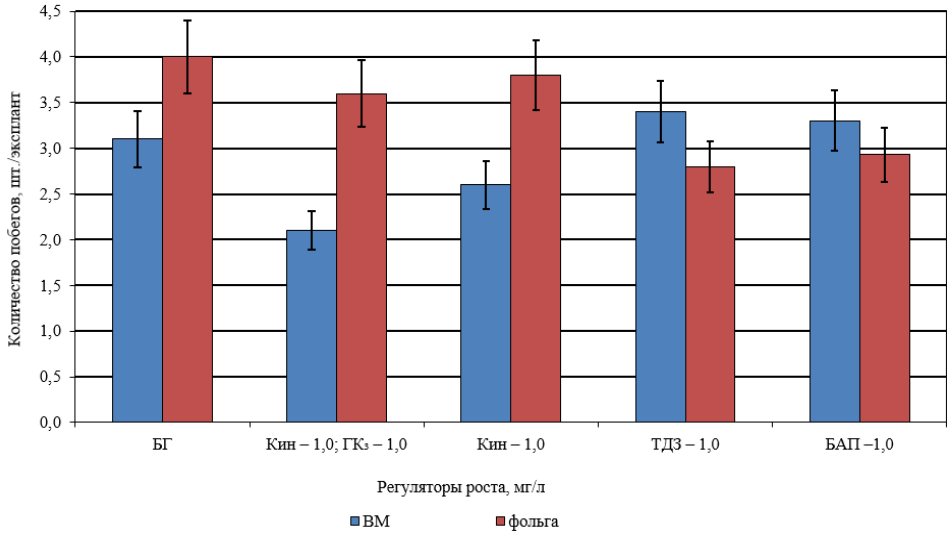


Рисунок 1 – Влияние состава регуляторов роста в питательной среде и типа пробки на количество побегов на эксплант при введении в культуру *in vitro* *T. pseudonummularius*

Анализ длины микропобегов в зависимости от типа пробки выявил тенденцию повышения этого параметра при использовании фольги во всех вариантах опыта (рисунки 2, 3). Сравнение коэффициента размножения на оптимальной питательной среде (МС с 1,0 мг/л Кин) показало его увеличение в 1,8 раза при культивировании в пробирках, закрытых фольгой, по сравнению с ватно-марлевыми пробками.

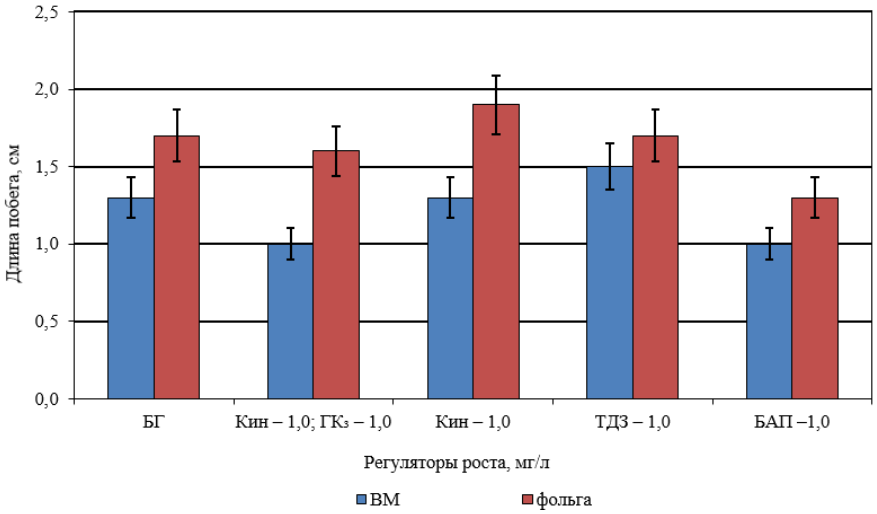


Рисунок 2 – Влияние состава регуляторов роста в питательной среде и типа пробки на длину побега при введении в культуру *in vitro* *T. pseudonummularius*



А **Б**

Рисунок 3 – Развитие микропобегов *T. pseudonummularius* при введении в культуру *in vitro* в пробирках, закрытых фольгой или ватно-марлевыми пробками, на питательной среде МС с 1,0 мг/л Кин (А) и с 1,0 мг/л ТДЗ (Б)

Как показали наши исследования, на следующем, втором этапе собственно микроразмножения, частота множественного побегообразования была высокой (74,1–98,0 %) во всех вариантах опыта. Однако при культивировании на средах с БАП и ТДЗ отметили тенденцию снижения этого показателя. В ходе сравнения морфометрических показателей выявлено, что максимальное количество побегов на эксплант в большинстве вариантов опыта было получено на среде с добавлением ТДЗ (таблица 2).

При анализе зависимости коэффициента размножения от состава регуляторов роста следует отметить, что использование двух цитокининов (БАП и ТДЗ) в концентрации 1,0 мг/л позволило получить максимальный коэффициент размножения. Однако это вызывало витрификацию микропобегов с частотой 12,9–40,1 % (рисунок 4).

Таблица 2 – Влияние состава питательной среды и типа культурального сосуда на развитие эксплантов *T. pseudonummularius* на втором этапе микроразмножения

Культуральный сосуд	Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Частота множественного побегообразования, %	Количество побегов, шт./ эксплант	Длина побега, см	Частота корнеобразования, %	Количество корней, шт./ побег
Пробирки с ватно-марлевыми пробками	БГ	87,3 ± 9,1	3,5 ± 0,5	2,0 ± 0,2	26,3 ± 2,5	2,8 ± 0,3
	Кин – 1,0	92,1 ± 9,4	2,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2	28,1 ± 2,3	1,8 ± 0,1
	Кин–1,0; $ГК_3$–1,0	91,4 ± 9,4	3,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2	15,0 ± 1,5	1,5 ± 0,2
	Кин–1,0; ИУК–0,5	84,1 ± 9,2	2,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2	33,1 ± 3,3	1,8 ± 0,1
	ТДЗ – 1,0	88, 2± 9,1	5,6 ± 0,7	1,4 ± 0,1	0	0
	БАП –1,0	87,3 ± 9,1	1,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0	0
Пробирки с фольгой	БГ	92,3 ± 9,4	4,8 ± 0,4	2,4 ± 0,2	40,8 ± 4,1	3,5 ± 0,3
	Кин – 1,0	91,4 ± 9,4	4,1 ± 0,3	3,3 ± 0,2	45,7 ± 5,1	1,8 ± 0,2
	Кин–1,0; $ГК_3$–1,0	94,1 ± 9,2	5,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	39,3 ± 3,8	1,7 ± 0,3
	Кин–1,0; ИУК–0,5	98,2 ± 9,1	4,1 ± 0,3	3,3 ± 0,2	55,9 ± 6,1	1,8 ± 0,2
	ТДЗ – 1,0	87,1 ± 9,1	5,9 ± 0,6	1,3 ± 0,1	0	0
	БАП –1,0	82,3 ± 9,4	2,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0	0
Колбы	БГ	95,4 ± 9,4	2,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1	33,1 ± 3,5	1,5 ± 0,1
	Кин – 1,0	97,3 ± 9,1	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,2	23,2 ± 2,3	0
	Кин–1,0; $ГК_3$–1,0	92,3±9,4	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	20,8 ± 2,3	0
	Кин–1,0; ИУК–0,5	91,1 ± 9,4	2,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	25,6 ± 2,3	2,8 ± 0,2
	ТДЗ – 1,0	74,1 ± 9,2	6,6 ± 0,7	1,4 ± 0,1	0	0
	БАП –1,0	78,2 ± 9,1	10,1 ± 1,2	1,1 ± 0,2	0	0
Банки	БГ	97,3 ± 9,1	5,3 ± 0,4	2,0 ± 0,2	46,8 ± 2,1	3,5 ± 0,3
	Кин – 1,0	92,3 ± 9,4	4,6 ± 0,2	2,0 ± 0,2	51,6 ± 2,1	2,8 ± 0,1
	Кин–1,0; $ГК_3$–1,0	91,4 ± 9,4	4,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2	46,3 ± 9,8	1,5 ± 0,2
	Кин–1,0; ИУК–1,0	89,1 ± 9,2	3,0 ± 0,2	1,7 ± 0,2	63,1 ± 6,1	4,3 ± 0,4
	ТДЗ – 1,0	88,2 ± 9,1	13,4 ± 1,2	1,0 ± 0,2	0	0
	БАП –1,0	87,3 ± 9,1	12,1 ± 0,7	0,5 ± 0,1	0	0

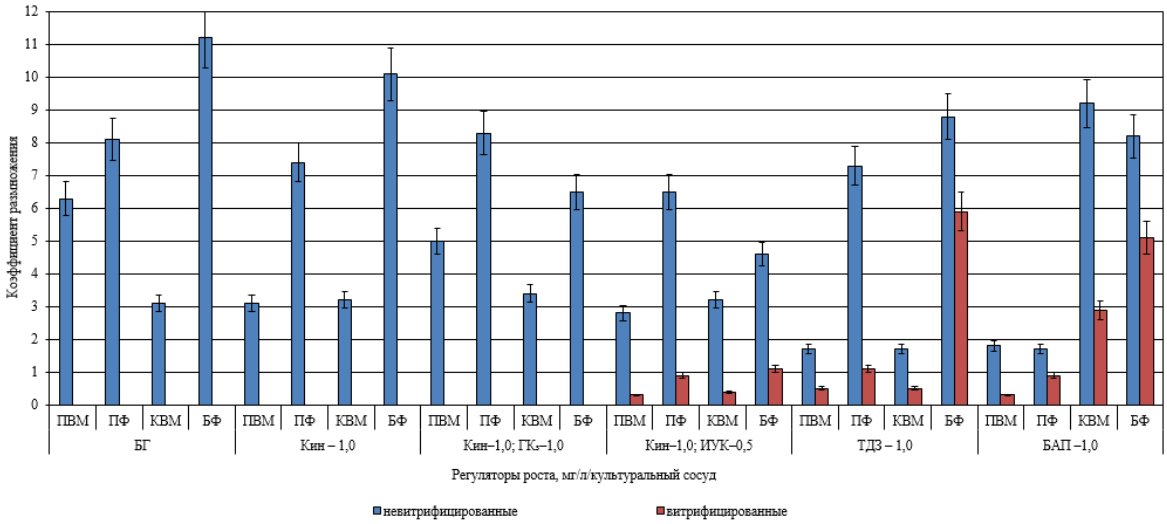


Рисунок 4 – Коэффициент размножения *T. pseudonummularius* в зависимости от состава питательной среды и культурального сосуда на этапе собственно микроразмножения

В связи с тем, что при выборе оптимальной питательной среды мы учитывали комплекс параметров, при пересчете коэффициента размножения без учета оводненных микропобегов, можно сделать вывод, что в большинстве вариантов

опыта наибольшего значения он достигал на питательной среде без регуляторов роста. Поэтому мы считаем эту среду оптимальной для второго этапа клонального микроразмножения.

Изучение влияния культурального сосуда на морфометрические параметры показало, что максимальное количество побегов на эксплант получали при культивировании в банках (см. таблицу 2, рисунок 5). При этом большую длину микропобегов наблюдали при культивировании в пробирках, закрытых фольгой.

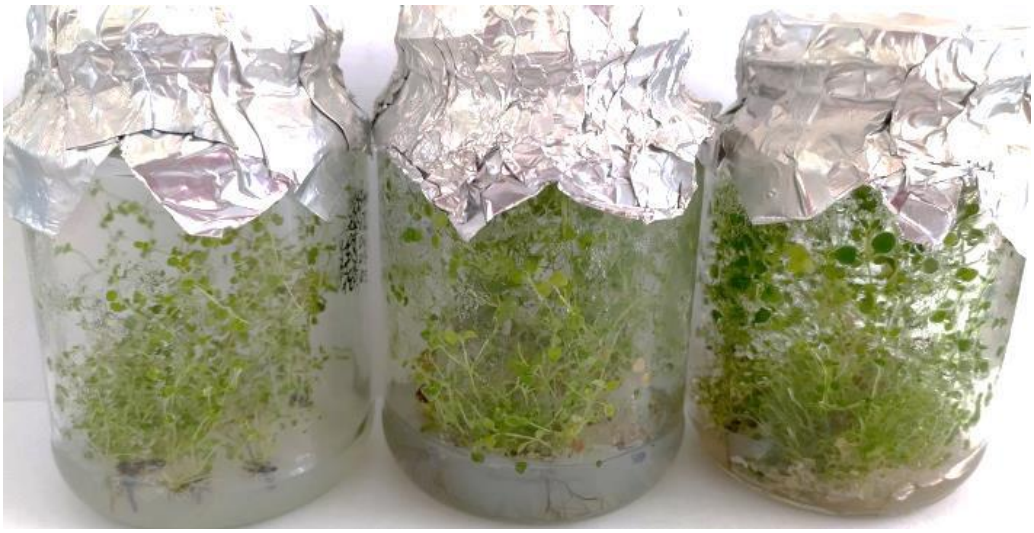


Рисунок 5 – Микропобеги *T. pseudonummularius* при культивировании в банках на питательной среде МС без регуляторов роста на втором этапе клонального микроразмножения

Анализ зависимости коэффициента размножения от культурального сосуда показал, что культивирование в банках на оптимальной питательной среде (МС без регуляторов роста) позволило повысить этот показатель в 1,4 раза по сравнению с пробирками, закрытыми фольгой, в 3,6 раза при сопоставлении с колбами и в 1,8 раза относительно культивирования на аналогичной питательной среде, но в пробирках, закрытых ватно-марлевыми пробками (см. рисунок 4). Это свидетельствует о целесообразности использования для микроразмножения *T. pseudonummularius* банок.

Известно, что у некоторых видов растений на этапе собственно микроразмножения наблюдаются процессы как множественного побегообразования, так и ризогенеза *in vitro* [12, 32]. Подобное явление отмечали и у *T. pseudonummularius* (см. таблицу 2). Так, на 40-е сут было получено от 1,5 до 4,3 корня на эксплант. Однако частота ризогенеза была невысокой (15,0–63,1 %). Следует отметить, что использование в составе питательных сред БАП или ТДЗ ингибировало образование корней во всех вариантах опыта.

Изучение влияния культурального сосуда на частоту корнеобразования показало, что использование банок и пробирок, закрытых фольгой, повышало этот показатель в 1,7–4,2 раза в зависимости от питательной среды (см. таблицу 2). Однако даже максимальная частота ризогенеза, полученная на средах для второго этапа клонального микроразмножения, является недостаточной. Поэтому мы проанализировали влияние на индукцию ризогенеза у микропобегов питательных сред с добавлением ауксинов, а также при снижении концентрации макро- и микросолей на отдельном, третьем этапе микроразмножения (таблица 3).

Таблица 3 – Параметры корнеобразования микропобегов на третьем этапе клонального микроразмножения *T. pseudonummularius*

Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Частота корнеобразования, %	Количество корней, шт./побег	Длина корня, см
БГ	81,4±8,6	3,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2
МС+Кин – 1,0	55,7±5,3	3,1 ± 0,3	2,2 ± 0,2
МС+ИМК – 1,0	100	2,8 ± 0,3	2,2 ± 0,2
МС+ИУК – 1,0	100	3,5 ± 0,4	2,2 ± 0,2
МС+НУК – 0,5	100	4,3 ± 0,5	1,7 ± 0,1
½ БГ	85,4±8,9	3,8 ± 0,4	2,2 ± 0,2
½ МС+ИМК – 1,0	100	9,3 ± 0,9	2,6 ± 0,3
½ МС+ИУК – 1,0	100	8,5 ± 0,9	1,9 ± 0,2
½ МС+НУК– 0,5	100	9,9 ± 1,0	1,8 ± 0,1

В ходе опыта по подбору оптимальной среды для укоренения было выявлено, что использование только ауксинов в питательной среде вызывало 100 % частоту ризогенеза. Помимо добавления ИУК, ИМК и НУК в состав сред, мы проанализировали влияние концентрации макро- и микросолей в питательной среде МС. На частоту корнеобразования это не оказывало влияния, но при сравнении количества корней на микропобег были отмечены существенные различия. Так, на среде с ½ МС и 1,0 мг/л ИМК было получено в 3,3 раза больше корней, чем при таком же гормональном составе, но с полным набором солей. На аналогичной питательной среде, но с ИУК, также было получено максимальное количество корней на эксплант, но меньшей длины (1,8 см). Проанализировав все параметры на этапе ризогенеза *in vitro,* мы рекомендуем использовать среду с ½ МС и 1 мг/л ИМК для укоренения микропобегов.

На заключительном этапе микроразмножения при адаптации *ex vitro* использовали побеги длиной 5–10 см с 5–7 корнями, которые пересаживали в стерильный субстрат, состоящий из торфа и перлита (1:1), ранее рекомендованный для тимьяна обыкновенного [29]. Это позволило получить приживаемость растений на уровне 67,5 %. Таким образом, нами впервые подобраны оптимальные режимы для каждого конкретного этапа микроразмножения *T. pseudonummularius* Использование этой биотехнологической методики микроразмножения тимьяна позволяет получить коэффициент размножения на уровне 11,2 (за одно субкультивирование) на втором этапе размножения *in vitro*. Анализ литературных источников показал, что для других видов данного рода этот основной показатель был несколько ниже и не превышал 6,4 у *T. bleicherianus* [20], 6,6 – у *T. hyemalis* [18] и 7,3 – у *T. broussonetii* [19].

Выводы

В результате исследований выявлены особенности развития эксплантов *T. pseudonummularius* в зависимости от гормонального состава питательной среды и условий культивирования на основных этапах клонального микроразмножения, что позволило впервые разработать методику размножения *in vitro* для этого ценного вида.

Установлено, что оптимальной питательной средой у тимьяна ложномонетного на этапе введения эксплантов в асептическую культуру является МС с 1 мг/л Кин. Культивирование в пробирках, закрытых фольгой, позволило повысить коэффициент размножения в 1,8 раза по сравнению с ватно-марлевыми пробками.

Показано, что максимальный коэффициент размножения на этапе собственно микроразмножения *T. pseudonummularius* получен на среде МС без регуляторов

роста (11,2 за одно субкультивирование). Выявлено, что культивирование в банках способствовало повышению коэффициента размножения в 1,4 раза по сравнению с пробирками, закрытыми фольгой, в 3,6 раза при сопоставлении с колбами и в 1,8 раза с пробирками, закрытыми ватно-марлевыми пробками. Установлено, что на этапе укоренения необходимо использовать среду ½ МС с 1 мг/л ИМК, которая позволила получить 100 % укоренение микропобегов и увеличить количество корней до 3,3 раза, по сравнению с другими вариантами опыта.

Результаты исследования явились основой разработки биотехнологической методики ускоренного размножения *T. pseudonummularius*, которая может быть использована не только для быстрой мультипликации растений ценных образцов, но и при создании коллекции *in vitro*.

Литература

1. 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.
2. 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.
3. Ouakouak H., Benarfa A., Messaoudi M., Begaa S., Sawicka B., Benchikha N., Simal-Gandara J. Biological properties of essential oils from *Thymus algeriensis* // Plants. 2021. Vol. 10. Art. No. 786. DOI: 10.3390/plants10040786.
4. Afonso A. F., Pereira O. R., Cardoso S. M. Health-promoting effects of *Thymus* phenolic-rich extracts: antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral properties // Antioxidants. 2020. Vol. 9. No. 9. P. 814–834. DOI: 10.3390/antiox9090814.
5. Kryvtsova M. V., Salamon I., Koscova J., Bucko D., Spivak M. Antimicrobial, antibiofilm and biochemichal 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.
6. Винокурова О. А., Тринеева О. В., Сливкин А. И. Сравнительная характеристика различных видов тимьяна: состав, свойства, применение (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4 (17). С. 134–150.
7. Васюков В. М. Обзор рода *Thymus* (Lamiaceae) российского Кавказа // Ботанический журнал. 2022. Т. 107. № 5. С. 453–465. DOI: 10.31857/S000681362205009X
8. Касумов Ф. Ю. Эфиромасличные виды рода *Thymus* L. флоры Кавказа и пути их рационального использования. Баку: Элм, 2011. 404 с.
9. Клоков М. В. Расообразование в роде тимьянов – *Thymus* L. на территории Советского Союза. Киев: Наукова Думка, 1973. 190 с.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Егорова Н. А., Якимова О. В. Влияние длительного субкультивирования на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. и *Origanum vulgare* L. // Вестник Томского государственного университета. Серия «Биология». 2019. № 47. С. 22–39. DOI: 10.17223/19988591/47/2.
14. 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.
15. Asensio E., de Medinacelli Juan-Méndez R., Juan-Vicedo J. *In vitro* propagation and phytochemistry of thymol-producing plants from a horticultural form of *Thymus* × *josephi-angeli* Mansanet & Aguil. (Lamiaceae) // Horticulturae. 2022. Vol. 8. Art. No. DOI: 10.3390/horticulturae8121188.
16. Tsoktouridis G., Krigas N., Sarropoulou V., Kampouropoulou S., Papanastasi K., Grigoriadou K., Menexes G. C., Maloupa E. 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. 2019. Vol. 55. P. 647–658. DOI: 10.1007/s11627-019-10000-y.

17. 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 // 3 Biotech. 2018. Vol. 8. Art. No. 180. DOI: 10.1007/s13205-018-1206-2.

18. Nordine A., Bousta D., El Khanchoufi A., El Meskaoui A. An efficient and rapid *in vitro* propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region // Int. J. Pharm. Biosci. Technol. 2013. Vol. 1 (3). P. 118–129.

19. Nordine A., Mohammed H., Meskaoui A. *In vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis of *Thymus broussonetii* – a vulnerable aromatic and medicinal plant species // IJPRBS. 2014. Vol. 3 (1). P. 425–439.

20. Nordine A., Meskaoui A. Rapid *in vitro* regeneration and clonal multiplication of *Thymus bleicherianus* Pomel, a rare and threatened medicinal and aromatic plant in Morocco // Med Aromat Plants. 2014. Vol. 3. No. 1. P. 145. DOI: 10.4172/2167-0412.1000145.

21. Alkowni 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.

22. Егорова Н. А., Тевфик А. Ш. Клональное микроразмножение некоторых видов рода *Thymus* L. // Turczaninowia. 2023. Т. 26. № 3. P. 5–13. DOI: 10.14258/turczaninowia.26.3.1.

23. Kulpa D., Wesołowska A., Jadczak P. Micropropagation and composition of essentials oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) // Not Bot Horti Agrobo. 2018. Vol. 46(2). P. 525–532. DOI: 10.15835/nbha46211020.

24. 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. 2020. Vol. 56. P. 652–661. DOI: 10.1007/s11627-020-10094-9.

25. 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.

26. El-Banna H. Y. Micropropagation of thyme plant (*Thymus vulgaris*). J. Plant Production. 2017. Vol. 8 (11). P. 1221–1227. DOI: 10.21608/JPP.2017.41294.

27. 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.

28. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наукова думка, 1980. 488 с. 30.

29. Тевфик А. Ш., Егорова Н. А. Клональное микроразмножение тимьяна обыкновенного *in vitro*: методические рекомендации. Симферополь: Ариал, 2021. 28 с.

30. George E. F., Hall M. A., Klerk G. D. Plant tissue culture procedure – background // In book: Plant propagation tissue culture (3rd ed) / Ed. by George E. F., Hall M. A., Klerk G. D. Dordrecht: Springer, 2008. P. 1–28. DOI: 10.1007/978-1-4020-5005-3_1.

31. Cardoso J. C., Sheng Gerald L. T., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the twenty-first century // In book: Plant cell culture protocols (4th ed) – part of the book series "Methods in Molecular Biology" (Vol. 1815) / Ed. by Loyola-Vargas V. M., Ochoa-Alejo N. New York: Humana Press, 2018. P. 17–46. DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4_2.

32. Tevfik A. Sh., Yegorova N. A. Clonal micropropagation of *Thymus vulgaris* L. // E3S Web of Conferences: Topical Problems of Agriculture, Civil and Environmental Engineering (TPACEE 2020). 2020. Vol. 224(2). Art. No. 04001. DOI: 10.1051/e3sconf/202022404001.

References

1. 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.

2. 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.

3. Ouakouak H., Benarfa A., Messaoudi M., Begaa S., Sawicka B., Benchikha N., Simal-Gandara J. Biological properties of essential oils from *Thymus algeriensis* // Plants. 2021. Vol. 10. Art. No. 786. DOI: 10.3390/plants10040786.

4. Afonso A. F., Pereira O. R., Cardoso S. M. Health-promoting effects of *Thymus* phenolic-rich extracts: antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral properties // Antioxidants. 2020. Vol. 9. No. 9. P. 814–834. DOI: 10.3390/antiox9090814.

5. Kryvtsova M. V., Salamon I., Koscova J., Bucko D., Spivak M. Antimicrobial, antibiofilm and biochemichal 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.

6. Vinokurova O. A., Trineeva O. V., Slivkin A. I. Comparative characteristics of different types of thyme: the composition, properties and application (review) // Drug Development & Registration. 2016. No. 4 (17). P. 134–150.

7. Vasjukov V. M. Review of the genus *Thymus* (Lamiaceae) of the Russian Caucasus // Botanicheskii Zhurnal. 2022. Vol. 107. No. 5. P. 453–465. DOI: 10.31857/S000681362205009X.

8. Kasumov F. Yu. Essential oil-bearing species of the genus *Thymus* L. of the Caucasian flora and ways of their rational use. Baku: Alm, 2011. 404 p.

9. Klokov M. V. Race formation in genus *Thymus* L. on the territory of the Soviet Union. Kiev: Naukova Dumka, 1973. 190 p.

10. Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V. Actual and contemporary directions of biochemical research of oil-bearing aromatic plants (review, part II). 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.

11. 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 / Ed. by I.V. Mitrofanova. Simferopol: Arial, 2018. P. 27–126. DOI: 10.32514/978-5- 907118-87-4.

12. 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.

13. Yegorova N. A., Yakimova O. V. The effect of long-term subcultivation on clonal micropropagation of *Melissa officinalis* L. and *Origanum vulgare* L // Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology. 2019. No. 47. P. 22–39. DOI: 10.17223/19988591/47/2.

14. 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.

15. Asensio E., de Medinacelli Juan-Méndez R., Juan-Vicedo J. *In vitro* propagation and phytochemistry of thymol-producing plants from a horticultural form of *Thymus* × *josephi-angeli* Mansanet &Aguil. (Lamiaceae) // Horticulturae. 2022. Vol. 8. Art. No. 1188. DOI: 10.3390/horticulturae8121188.

16. Tsoktouridis G., Krigas N., Sarropoulou V., Kampouropoulou S., Papanastasi K., Grigoriadou K., Menexes G. C., Maloupa E. 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. 2019. Vol. 55. P. 647–658. DOI: 10.1007/s11627-019-10000-y.

17. 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 // 3 Biotech. 2018. Vol. 8. Art. No. 180. DOI: 10.1007/s13205-018-1206-2.

18. Nordine A., Bousta D., El Khanchoufi A., El Meskaoui A. An efficient and rapid *in vitro* propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region // Int. J. Pharm. Biosci. Technol. 2013. Vol. 1 (3). P. 118–129.

19. Nordine A., Mohammed H., Meskaoui A. *In vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis of *Thymus broussonetii* – a vulnerable aromatic and medicinal plant species // IJPRBS. 2014. Vol. 3 (1). P. 425–439.

20. Nordine A., Meskaoui A. Rapid *in vitro* regeneration and clonal multiplication of *Thymus bleicherianus* Pomel, a rare and threatened medicinal and aromatic plant in Morocco // Med Aromat Plants. 2014. Vol. 3. No. 1. P. 145. DOI: 10.4172/2167-0412.1000145.

21. Alkowni 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.

22. Yegorova N. A., Tevfik A. Sh. Clonal micropropagation of some species of the genus *Thymus* L. // Turczaninowia. 2023. Vol. 26. No. 3. P. 5–13. DOI: 10.14258/turczaninowia.26.3.1

23. Kulpa D., Wesołowska A., Jadczak P. Micropropagation and composition of essentials oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) // Not Bot Horti Agrobo. 2018. Vol. 46(2). P. 525–532. DOI: 10.15835/nbha46211020.

24. 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. 2020. Vol. 56. P. 652–661. DOI: 10.1007/s11627-020-10094-9.

25. 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* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2023. No. 1(33). P. 113–124. DOI: 10.5281/zenodo.7898524. EDN: HRKDCJ.

26. 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.

27. 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.

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

29. Tevfik A. Sh., Egorova N. A. Clonal micropropagation of *Thymus vulgaris* L. *in vitro*: guidelines. Simferopol: Arial, 2021. 28 p.

30. George E. F., Hall M. A., Klerk G. D. Plant tissue culture procedure – background // In book: Plant propagation tissue culture (3rd ed) / Ed. by George E. F., Hall M. A., Klerk G. D. Dordrecht: Springer, 2008. P. 1–28. DOI: 10.1007/978-1-4020-5005-3_1.

31. Cardoso J. C., Sheng Gerald L. T., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the twenty-first century // In book: Plant cell culture protocols (4th ed) – part of the book series "Methods in Molecular Biology" (Vol. 1815) / Ed. by Loyola-Vargas V. M., Ochoa-Alejo N. New York: Humana Press, 2018. P. 17–46. DOI: 10.1007/978-1-4939-8594-4_2.

32. Tevfik A. Sh., Yegorova N. A. Clonal micropropagation of *Thymus vulgaris* L. // E3S Web of Conferences: Topical Problems of Agriculture, Civil and Environmental Engineering (TPACEE 2020). 2020. Vol. 224(2). Art. No. 04001. DOI: 10.1051/e3sconf/202022404001.

UDC 633.81:57.085.2

Tevfik A. Sh., Yegorova N. A.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF *THYMUS PSEUDONUMMULARIUS* KLOK. ET SCHOST.

Summary. *Representatives of the genus Thymus L. are promising medicinal and aromatic plants, the raw materials and essential oil of which are widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries, as well as in the food industry. It is known that biotechnologies of clonal micropropagation in vitro can significantly accelerate and improve the efficiency of seed breeding. The objective of the research was twofold: firstly, to study the effect of culture medium composition and cultivation conditions on the development of Thymus pseudonummularius Klok. et Schost. explants at the main stages of propagation in vitro; and secondly, to develop a technique for its clonal micropropagation. The article presents a comparison of the cultivation of thyme explants on six variants of the Murashige and Skoog (MS) culture medium and in different culture vessels (jars, test tubes and flasks). The analysis of the effect of the composition of the growth regulators on the development of explants at the stage of introduction culture in vitro showed the advantage of using kinetin – the multiplication index in this case was 1.2–1.7 times higher compared to 6-benzylaminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ). In the optimal culture medium (MS with 1.0 mg/l of kinetin), a 1.8-fold increase in this index was observed when explants were cultured in foil-covered tubes compared to those with cotton-gauze plugs. It was noted that at the second stage of clonal micropropagation, short (0.5–1.4 cm) vitrified (12.9-40.1 %) microshoots were formed when TDZ or BAP was added to the culture medium. At this stage, the maximum multiplication index (11.2) was obtained on MS medium without growth regulators when explants were cultured in jars. For active root formation, microshoots should be transferred to a ½ MS medium supplemented with 1 mg/l of IBA. Under these conditions, 100% rooting of shoots was observed, as well as the formation of up to 9.2 roots per shoot that measured 2.7 cm. The*

frequency of microplants adaptation ex vitro on a substrate consisting of peat and perlite (1:1) was 67.5 %. As a result, a technique for the T. pseudonummularius micropropagation has been developed, allowing for rapid propagation and conservation of valuable samples in vitro.

Keywords: *Thymus pseudonummularius Klok. et Schost., clonal micropropagation, explant, in vitro, culture medium, culture vessel.*

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.

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.), 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.

Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZW-2022-0008 "Исследование морфогенетических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических особенностей культивируемых тканей, органов и регенерантов для разработки клеточных технологий получения новых генотипов, микроразмножения и создания коллекций эфиромасличных растений in vitro" при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

Дата поступления в редакцию –15.01.2025.
Дата принятия к печати – 04.02.2025.