

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 633.81:57.085.2
doi: 10.17223/19988591/47/2

Н.А. Егорова, О.В. Якимова

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Влияние длительного субкультивирования на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. и *Origanum vulgare* L.

Изучена динамика морфометрических показателей развития эксплантов при длительном субкультивировании трех сортов *Melissa officinalis* L. (Цитронелла, Соборная, Крымчанка) и селекционного образца *Origanum vulgare* L. на втором этапе клонального микроразмножения. В качестве эксплантов на этом этапе использовали сегменты стебля с одним узлом, которые культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 0,5 мг/л БАП. Анализ морфогенеза эксплантов показал активное множественное побегообразование, при котором у мелиссы формировалось от 2,2 до 5,7, а у душицы – от 9,5 до 54,8 побега на эксплант. При микроразмножении наблюдали образование корней у микропобегов (у мелиссы с частотой 44,4–92,7%) и формирование оводненных микропобегов (у душицы с частотой 16,7–44,5%). Частота этих процессов зависела от вида или сорта и количества субкультивирований. Максимальные коэффициенты размножения у мелиссы сорта Цитронелла (до 12,0) отмечены в 3–5, а у Крымчанки (17,6) и Соборной (14,2) – в пятом субкультивировании. У *O. vulgare* наибольшее увеличение коэффициента размножения (до 74,1) выявлено в пятом пассаже, а в более поздних 12–13-м пассажах показано снижение этого показателя почти в 4 раза. Полученные данные свидетельствуют о возможности длительного микроразмножения душицы и мелиссы *in vitro* (как минимум, в течение 1–1,5 года), при этом максимальная эффективность этого процесса отмечена в течение пятого субкультивирования.

Ключевые слова: мелисса; душица; эксплант; размножение *in vitro*; множественное побегообразование; субкультивирование; коэффициент размножения.

Введение

В последние годы наряду с использованием традиционных для юга России эфиромасличных и лекарственных растений (лаванды, шалфея, розы эфиромасличной, кориандра) проводится активное исследование и внедрение в производство новых видов, в том числе представителей семейства *Lamiaceae* Mart. – *Melissa officinalis* и *Origanum vulgare* [1]. Мелисса лекар-

ственная (*Melissa officinalis* L.) – многолетнее эфиромасличное, лекарственное и пряно-ароматическое растение, имеющее разнообразные области применения: в качестве медоноса, пряности, в медицине как седативное, спазмолитическое и иммуномодулирующее средство, антидепрессант [2, 3]. Сырье мелиссы входит в состав ароматических чаев. Душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.) – перспективное лекарственное, эфиромасличное и пряно-ароматическое растение, которое широко используется в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, медицине, а также в качестве фитобиотика в производстве комбикормов для животных [4]. В диком виде *O. vulgare* произрастает в европейской части России, в Южной Сибири, на Кавказе, а также во многих странах Западной Европы, в Турции, Индии и других регионах [2, 4]. В России, особенно в южных областях, довольно активно проводится заготовка сырья душицы, что может привести к истощению запасов и сокращению численности растений. Поэтому так же, как и у ряда других лекарственных растений, возникает проблема сохранения биоразнообразия и расширения, а порой и восстановления дикорастущих популяций вида. Вместе с тем мелисса и душица используются не только как лекарственные растения, но и как ароматические для получения эфирных масел [1]. Особую ценность имеет эфирное масло душицы, в состав которого входят тимол и карвакрол. Имеются данные о том, что эфирные масла с высоким содержанием карвакрола превосходят по свойствам многие существующие антибиотики и антигистаминные препараты [5, 6]. Поэтому в настоящее время все большее внимание уделяется созданию на основе эфирных масел фитобиотиков – аналогов синтетических антибиотиков, применение которых имеет ряд негативных последствий.

В связи с низким содержанием эфирного масла в растительном сырье мелиссы и душицы в ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводится работа по созданию высокомасличных сортов с повышенным содержанием ценных компонентов в составе эфирного масла [1, 7]. Интенсификация такого рода исследований связана с необходимостью ускоренного размножения полученных селекционерами ценных гибридов, мутантных форм, отобранных уникальных генотипов. Для решения разнообразных задач экологии, селекции и семеноводства во многих странах мира эффективно используются биотехнологические приемы. Одним из наиболее широко востребованных является метод клонального микроразмножения, позволяющий быстро размножить перспективные селекционные образцы и новые сорта, получить оздоровленный посадочный материал, создавать коллекции генетической плазмы *in vitro* [8]. Такие технологии разработаны для многих сельскохозяйственных и цветочно-декоративных растений [9, 10]. Однако в литературе встречаются немногочисленные данные, касающиеся разработки отдельных элементов методик клонального микроразмножения у разных видов мелиссы [11–13] и душицы [14–18]. Так, проведены исследования по оптимизации питательных сред для основных этапов размножения *in vitro* [11, 13, 19], а также ис-

следования по укоренению и адаптации регенерантов *M. officinalis* [13, 20]. В качестве исходных эксплантов для микроразмножения Melissa или душицы использовали меристемы [14, 17], пазушные или верхушечные почки [11, 19–21], но чаще – сегменты стебля с узлом [11, 18, 22–24]. В литературе имеются данные о том, что максимальное количество побегов на эксплант (3,2–4,1 шт.) у Melissa развивалось при культивировании на питательной среде с 3,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 1,0 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК) [20]. Греческие исследователи наибольшую частоту множественного побегообразования и число побегов (до 4 шт.) наблюдали при культивировании микроразмножения *M. officinalis* на питательной среде с добавлением 1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП [11]. Ученые из Ирана у большинства из изученных 17 генотипов Melissa отметили хорошую регенерацию микроразмножения при использовании в составе питательной среды 2,0 мг/л БАП или 1,0 мг/л БАП с 0,5 мг/л ИМК [13]. Имеются работы по исследованию влияния происхождения донорного растения [14], типа экспланта [16, 18, 21] и питательных сред [15, 17, 21, 22] на развитие эксплантов на отдельных этапах микроразмножения представителей рода *Origanum*. Изучено влияние расположения пазушных почек на побеге донорного растения *O. vulgare* на их активацию *in vitro* и число микроразмножений [23]. Количество формирующихся при клональном размножении микроразмножений варьировало в зависимости от состава питательной среды, генотипа и используемых авторами методических подходов. Анализ развития микроразмножений *O. vulgare* в течение 4, 8, 12 недель культивирования в цикле выращивания показал, что после 12 недель на разных питательных средах развивалось от 2,1 до 3,9 побега на эксплант [15]. Аргентинские исследователи сообщали о культивировании микроразмножений душицы обыкновенной на питательных средах, дополненных 0,28 мкМ БАП с 0,53 мкМ или 5,83 мкМ НУК, на которых коэффициент размножения составил 22,2 и 20,2 соответственно [14]. С.Т. Oana et al. при использовании в составе питательной среды 1,0 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК получили высокую частоту множественного побегообразования (85,0%), при этом из одного микроразмножения формировалось 12,0 побега до 5,0 см длиной [21]. По данным D. Özkum, на втором этапе клонального микроразмножения *O. minutiflorum* лучшие результаты также достигнуты при использовании в составе питательной среды БАП (2,0 мг/л) и НУК (0,1 мг/л) [18]. В других исследованиях наибольшее количество побегов на втором этапе микроразмножения у *O. sipyleum* (до 7,8 шт. на эксплант) [17] и *O. majorana* (до 18,7 шт. на эксплант) [25] формировалось на среде МС, дополненной 1,0 мг/л БАП. Тем не менее многие вопросы клонального микроразмножения *M. officinalis* и *O. vulgare*, в частности, касающиеся развития эксплантов при длительном субкультивировании, почти не изучены. Однако это довольно важный вопрос, так как от способности микроразмножений продолжительное время сохранять регенерационный потенциал зависит эффективность биотехнологий размножения *in vitro*.

Цель данного исследования – изучение морфометрических показателей развития эксплантов при длительном субкультивировании сортов и селекционных образцов *M. officinalis* и *O. vulgare* на втором этапе клонального микроразмножения.

Материалы и методики исследования

Исходным материалом для исследований служили экспланты трех сортов *Melissa officinalis* L. (Цитронелла, Соборная, Крымчанка) и перспективного селекционного образца № 10 *Origanum vulgare* L. Донорные растения выращивали в условиях закрытого грунта. Для соблюдения условий асептики все работы по введению в культуру и микрочеренкованию побегов *in vitro* выполняли в условиях бокса БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Для стерилизации растительный материал предварительно промывали в мыльном растворе (15–20 мин) и ополаскивали в проточной и дистиллированной воде. Дальнейшую стерилизацию осуществляли в условиях ламинарного бокса. В качестве стерилизующих веществ для освобождения от экзогенной инфекции применяли 70%-ный этанол – 1 мин, и 50%-ный раствор препарата «Брадофен» 10 Н («ФЛОРИН АО», Венгрия) – 4 мин. Эксперименты проводили согласно общепринятым в биотехнологии растений методам культивирования тканей и органов *in vitro* [8, 9].

Для введения в культуру *in vitro* использовали пазушные меристемы с двумя листовыми примордиями (размером 0,4–1,0 мм, в зависимости от вида растения). Меристемы вычленили под стереоскопическим микроскопом МСП-1 (Россия) в асептических условиях ламинарного бокса. На втором этапе (собственно микроразмножения) в качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом (5–8 мм), полученные при микрочеренковании побегов, развившихся из почек при введении *in vitro*. При длительном пассировании после множественного побегообразования для дальнейшего субкультивирования отбирали хорошо развившиеся пазушные и адвентивные микропобеги, из которых выделяли микрочеренки 3–4-го ярусов. Экспланты помещали на поверхность агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [26] с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) и гибберелловой кислоты (ГК₃) («Sigma», США). Для введения в культуру *in vitro* меристем у Melissa использовали ранее оптимизированную питательную среду МС, дополненную 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК₃ [27], а у душицы – МС с 1,0 мг/л БАП [28]. При последующих субкультивированиях микрочеренки помещали на питательную среду МС с 0,5 мг/л БАП [27].

Культивирование проводили в колбах (душица) или стеклянных банках (Melissa) объемом 200 мл с 35 мл питательной среды. В каждый культуральный сосуд помещали по 3–4 экспланта. Анализ морфометрических показателей проводили на 30–35-е сутки культивирования. При этом определяли частоту множественного побегообразования (%), количество побегов

(шт./эксплант), длину побега (мм), количество узлов (шт./побег), частоту ризогенеза (%) и оводненных побегов (%). Частоту множественного побегообразования, ризогенеза и оводненных побегов (%) рассчитывали как отношение числа эксплантов соответственно – с несколькими побегами, корнями или витрифицированными побегами к общему числу анализируемых эксплантов, умноженное на 100. Коэффициент размножения рассчитывали как число микрочеренков, которое можно получить после одного субкультивирования. Для этого количество образующихся из одного экспланта побегов умножали на число узлов на побеге. При таком расчете не учитывали оводненные микропобеги. После анализа морфометрических параметров в асептических условиях побеги разрезали на микрочеренки с одним узлом и переносили в культуральные сосуды со свежей питательной средой.

Изолированные меристемы и побеги культивировали при $26 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 70%, освещенности 2–3 клк с 16-часовым фотопериодом. Опыты проведены в 3-кратной повторности (одновременно), при этом в каждом варианте анализировали не менее 20 эксплантов. Статистическая обработка данных проведена согласно общепринятым методам математической статистики при помощи стандартного пакета документов Microsoft Office Excel (2010). Статистическую значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0,05$. В таблицах и на графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты исследования и обсуждение

При исследовании изменений морфометрических параметров эксплантов в процессе клонального микроразмножения основное внимание нами уделено вопросам длительного субкультивирования для того, чтобы выяснить, как долго и эффективно можно проводить размножение *in vitro*.

В результате проведенных экспериментов у Melissa установлено, что при культивировании меристем на питательной среде МС с 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК₃ развитие основного, а иногда и адвентивных побегов началось на 7–10-е сутки. На 30–35-е сутки культивирования из одного экспланта формировалось от 1,3 шт. (у сорта Цитронелла) до 4,2 шт. (у сорта Соборная) побегов, а их длина варьировала от 5,8 до 8,2 мм.

В ходе дальнейшего микроразмножения на втором этапе в течение семи пассажей при культивировании сегментов стебля с узлом (полученных после микрочеренкования) на питательной среде МС с 0,5 мг/л БАП у изучаемых сортов формировались пазушные и адвентивные побеги. Как правило, пазушные побеги имели большую длину (40–80 мм) и 4–6 узлов, а адвентивные были более короткие (10–20 мм) с 1–2 узлами (рис. 1, А). Частота множественного побегообразования в зависимости от сорта и пассажа варьировала от 32,0 до 93,3% (табл. 1). В нескольких вариантах опыта отметили оводненные микропобеги, однако частота их образования не превышала

15,1–23,4%. Установлено, что у микропобегов сортов Соборная и Крымчанка большинство морфометрических параметров были выше в 1,3–2,5 раза по сравнению с сортом Цитронелла. В течение последовательных субкультивирований у изучаемых сортов выявили не только повышение частоты множественного побегообразования, но и в некоторых вариантах увеличение длины побегов. К пятому–седьмому пассажам у сортов наблюдали увеличение количества узлов на побеге.

Таблица 1 [Table 1]

Морфометрические показатели развития эксплантов при длительном субкультивировании сортов *Melissa officinalis* на втором этапе микроразмножения *in vitro*
[Morphometric parameters of explant development during long-term subcultivation of *Melissa officinalis* cultivars at the second stage of micropropagation *in vitro*]

Сорт [Cultivar]	Число субкультивирований [Number of subcultures]	Частота множественного побегообразования [Frequency of multiple shoot formation], %	Количество побегов, шт./эксплант [Number of shoots, pcs./ explant]	Количество узлов, шт./побег [Number of nodes, pcs./ shoot]	Длина побега, мм [Shoot length, mm]
Цитронелла [Tsitronella]	2	32,0±1,1 d	2,2±0,2 b	2,2±0,2 c	28,2±3,1 d
Соборная [Sobornaya]		83,3±9,2 ab	5,7±0,8 a	2,6±0,1 c	40,3±2,7 c
Крымчанка [Krymchanka]		50,0±4,3 c	5,4±0,4 a	2,6±0,1 c	45,8±2,9 bc
Цитронелла [Tsitronella]	3	93,3±6,6 a	5,5±0,6 a	2,8±0,3 bc	43,5±6,3 bc
Соборная [Sobornaya]		85,7±4,8 ab	3,6±0,4 ab	2,5±0,2 bc	29,0±2,5 d
Крымчанка [Krymchanka]		85,7±9,7 ab	4,9±0,6 ab	2,9±0,1 bc	29,2±1,7 d
Цитронелла [Tsitronella]	5	76,9±5,2 ab	4,7±0,2 a	2,9±0,2 bc	39,9±2,7 c
Соборная [Sobornaya]		92,8±7,1 a	5,2±0,5 a	3,7±0,2 ab	55,4±2,1 b
Крымчанка [Krymchanka]		75,1±10,3 ab	4,3±0,6 ab	4,1±0,2 a	73,8±2,6 a
Цитронелла [Tsitronella]	7	68,4±10,3 ab	3,3±0,4 b	3,5±0,2 ab	44,2±2,8 c
Соборная [Sobornaya]		50,0±3,2 c	2,6±0,4 b	3,2±0,2 b	44,8±6,1 bc
Крымчанка [Krymchanka]		68,8±4,2 b	3,3±0,4 b	3,1±0,2 bc	34,6±2,4 cd

Примечание. В каждом столбце разными буквами обозначены статистически значимые различия ($p < 0,05$) между сортами или субкультивированиями.

[*Note.* Statistically significant differences ($p < 0.05$) between cultivars or subcultures are indicated by different letters in each column].

Следует отметить, что уже на втором этапе микроразмножения на питательной среде с цитокинином у многих побегов развивались корни (см. рис. 1, А). Частота ризогенеза, в зависимости от сорта и пассажа, достигала 44,4–92,7%. Для укоренения микропобегов Melissa многие авторы использовали питательные среды с регуляторами роста ауксинового типа действия (ИУК, НУК, ИМК) [3, 13, 20]. G.I. Ghiorghita et al. сообщали об индукции ризогенеза у побегов *M. officinalis* на питательной среде с добавлением 1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л НУК [11]. При культивировании полученных из почек побегов на питательной среде без регуляторов роста S.M. Shakeri et al. отметили появление до 6–12 корней [19]. Выявленное в нашем исследовании спонтанное образование корней у побегов сортов Melissa на питательной среде для микроразмножения с БАП позволяет при высокой частоте ризогенеза исключить третий этап размножения и сразу переносить микро-растения с корнями на адаптацию *ex vitro*. Это может ускорить и удешевить технологию микроразмножения данного вида.

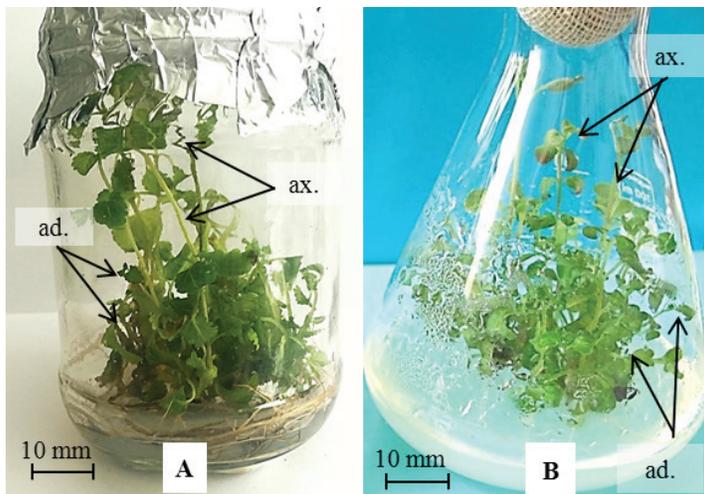


Рис. 1. Микропобеги на втором этапе микроразмножения *Melissa officinalis* (А) и *Origanum vulgare* (В). Стрелками обозначены пазушные (ax.) и адвентивные побеги (ad.). Автор фотографий – О.В. Якимова

[Fig. 1. Microshoots of *Melissa officinalis* (A) and *Origanum vulgare* (B) at the second stage of micropropagation. Arrows mark axillary (ax.) and adventitious shoots (ad.).
Photo by Olga V Yakimova]

При сравнении морфометрических показателей развития эксплантов (сегментов стебля с узлом) в разных пассажах установлено, что у изученных сортов количество побегов на эксплант варьировало от 2,2 до 5,7 шт., а количество узлов – от 2,2 до 4,1 шт. на побег. При этом длина побегов достигла 55,4–73,8 мм. У сорта Цитронелла максимальное значение изученных параметров (см. табл. 1) и коэффициент размножения (до 12,0) отметили в

третьем-пятом субкультивированиях (рис. 2). А у сортов Соборная и Крымчанка – в пятом пассаже, в котором коэффициенты размножения составили 14,2 и 17,6 соответственно. В седьмом субкультивировании у всех изученных сортов коэффициенты размножения снизились до 6,3–8,9 в зависимости от сорта.

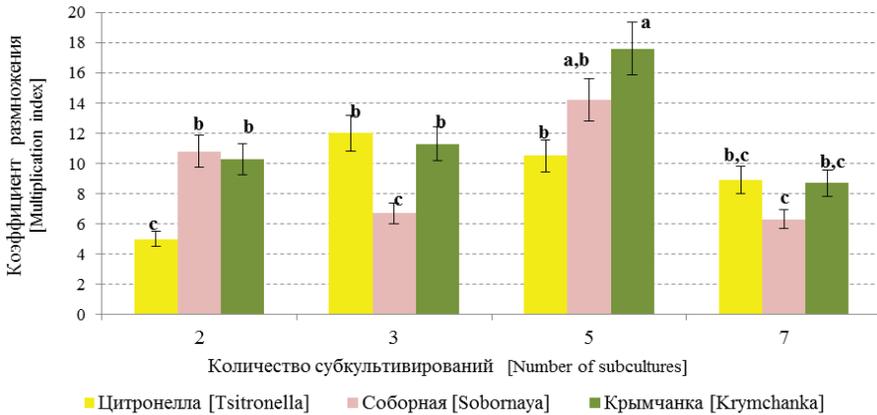


Рис. 2. Значение коэффициента размножения при длительном субкультивировании сортов *Melissa officinalis in vitro*. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) между сортами или субкультивированиями обозначены разными буквами
 [Fig. 2. The value of the multiplication index during long-term subcultivation of *Melissa officinalis* cultivars *in vitro*. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between cultivars or subcultures are indicated by different letters]

У *O. vulgare* при помещении меристем на питательную среду МС, содержащую 1,0 мг/л БАП, развитие побегов наблюдали через неделю культивирования. Из меристем уже на этапе введения развивалось до 4,5 побега на эксплант длиной 17,0 мм, а частота множественного побегообразования составила 66,6%.

На втором этапе собственно микроразмножения экспланты (сегменты стебля с одним узлом), выделенные из микропобегов, развившихся из меристем, культивировали на питательной среде МС с более низкой концентрацией БАП [28]. Рост пазушных побегов начинался на 5–7-е сутки, а развитие адвентивных – через 2–3 недели культивирования. Пазушные микропобеги достигали 50–85 мм и имели 5–9 узлов, а адвентивные – 7–15 мм (с 1–2 узлами) (рис. 1, В). На 35-е сутки культивирования эксплантов частота множественного побегообразования варьировала от 75,0 до 95,2%, а среднее количество побегов на эксплант составило от 9,5 до 54,8 шт. в зависимости от числа субкультивирований (табл. 2). При микроразмножении у отдельных побегов (от 5,2 до 28,5%, в разных пассажах) формировалось 2–3 небольших корня длиной до 2–3 см (см. рис. 1, В). Следует отметить, что при культивировании *in vitro* у душицы иногда отмечали появление оводненных микропобегов с утолщенными стекловидными аномальными стеблями и ли-

стями, которые невозможно использовать для дальнейшего размножения. Частота витрифицированных микропобегов составила 16,7–25,8%, однако в пятом пассаже достигла 44,5%. Из-за относительно высокой частоты витрификации побегов (особенно в некоторых пассажах) при расчете коэффициента размножения исключали оводненные побеги. Образование витрифицированных побегов встречается при микроразмножении многих видов растений. Это явление связывают с комплексом факторов – повышенной влажностью и неблагоприятным газовым составом в культуральном сосуде, составом питательной среды (высоким содержанием регуляторов роста и минеральных солей или низкой концентрацией агара), физиологическим возрастом экспланта, интенсивностью освещения, генотипом растения и некоторыми другими. На эти факторы, в частности, указывалось в работах по микроразмножению *Allium sativum* и *Agastache foeniculum* [29, 30]. Судя по полученным данным, у *O. vulgare* частота витрификации зависела от длительности культивирования. При этом максимальное количество оводненных побегов формировалось в 5-м субкультивировании, когда развивалось максимальное число побегов.

Таблица 2 [Table 2]

Морфометрические показатели развития эксплантов при длительном субкультивировании *Origanum vulgare* на втором этапе микроразмножения *in vitro*
[Morphometric parameters of explant development during long-term subcultivation of *Origanum vulgare* at the second stage of micropropagation *in vitro*]

Число субкультивирований [Number of subcultures]	Частота множественного побегообразования [Frequency of multiple shoot formation], %	Количество побегов, шт./эксплант [Number of shoots, pcs./ explant]	Количество узлов, шт./побег [Number of nodes, pcs./ shoot]	Длина побега, мм [Shoot length, mm]	Частота оводненных побегов [Frequency of hyperhydric shoots], %
3	90,9±6,2 a	32,3±5,6 b	1,8±0,1 b	20,8±1,6 b	16,7±1,5 c
5	83,3±10,1 a	54,8±5,1 a	2,4±0,3 ab	32,7±3,7 ab	44,5±5,1 a
6	94,4±5,6 a	27,9±1,2 b	2,1±0,2 a	29,2±2,7b	20,0±1,8 bc
7	95,2±4,7 a	33,1±2,7 b	2,4±0,2 a	28,7±1,8 b	18,5±1,2 c
10	90,5±4,0 a	22,9±3,6 bc	2,5±0,2 a	42,9±2,6 a	25,8±2,4 b
12	84,8±6,3 a	14,4±2,3 c	1,7±0,1 b	24,5±2,3 b	24,4±1,9 b
13	75,0±10,1 a	9,5±0,8 c	2,1±0,1 a	23,3±2,3 b	16,8±1,8 c

Примечание. В каждом столбце разными буквами обозначены статистически значимые различия ($p < 0,05$) между субкультивированиями.

[*Note.* Statistically significant differences ($p < 0.05$) between subcultures are indicated by different letters in each column].

Следует отметить довольно высокое число формирующихся побегов (9,5–54,8 шт. на эксплант, в зависимости от пассажа), выявленное у *O. vulgare* в наших экспериментах. У разных видов душицы на оптимальных

питательных средах, судя по литературным данным, из одного экспланта развивалось не более 4,0 [22], 4,2 [24], 12,0 [21], 22,2 побега [14]. Египетские ученые при введении в культуру *in vitro* сегментов стебля с почками у *O. majorana* получили до 18,7 побега на эксплант [25]. Интересные данные продемонстрированы для *O. sipyleum*, у которой на питательной среде для микроразмножения (МС с 1,0 мг/л БАП) формировалось 7,8 побега на эксплант, а на среде для укоренения (МС с 0,5 мг/л ИМК) – 23,7 побега [17].

При изучении влияния длительности культивирования на микроразмножение душицы *in vitro* провели 13 пассажей. Максимальное число побегов (54,8 шт./эксплант) и коэффициент размножения (74,1) получены в пятом субкультивировании (рис. 3). В седьмом пассаже коэффициент размножения понизился до 63,6, но статистически не значимо отличался от данного показателя в пятом пассаже. При дальнейших субкультивированиях коэффициент размножения снизился в десятом пассаже до 43,0. Наименьшие значения этого показателя (16,9–18,8) отмечены в поздних 12–13-м пассажах (через полтора года культивирования). При этом иногда формировались более тонкие и слабые микропобеги по сравнению с более ранними третьим–пятым пассажами. Полученные результаты свидетельствует о возможности эффективного субкультивирования душицы *in vitro* в течение семи–десяти пассажей. Однако, при необходимости, можно проводить размножение и более длительный период, учитывая относительно высокие коэффициенты размножения даже в поздних пассажах и отсутствие значительных признаков физиологического старения мериклонов.

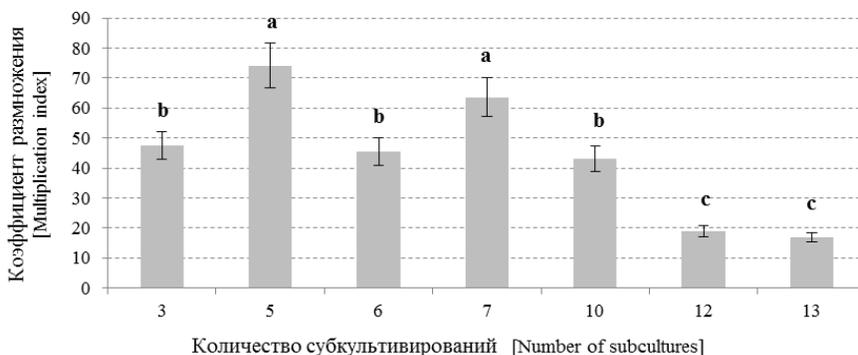


Рис. 3. Значение коэффициента размножения при длительном субкультивировании *Origanum vulgare in vitro*. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) между субкультивированиями обозначены разными буквами [Fig. 3. The value of the multiplication index during long-term subcultivation of *Origanum vulgare in vitro*. Statistically significant differences ($p < 0,05$) between subcultures are indicated by different letters]

Повышение коэффициента размножения к третьему–четвертому субкультивированию ранее показано для сортов лаванды [31] и розы эфиромасличной [32]. При микроразмножении пяти сортов и селекционных образцов

мяты в течение шести субкультивирований установлено, что коэффициент размножения увеличивался в 3–5-м пассажах, достигая 12,1–48,7 в зависимости от генотипа и длительности культивирования [33]. Однако у других эфиромасличных растений (фенхеля и шалфея), наоборот, отмечено снижение коэффициента размножения после третьего пассажа. А у сортов герани эфиромасличной этот показатель оставался достаточно стабильным в течение двух лет клонального микроразмножения [34]. Следует отметить, что сведений об эффективности размножения *in vitro* видов мелиссы и душицы при длительном культивировании очень мало. Так, у двух видов душицы *O. syriacum* и *O. ehrenbergii* при размножении на питательной среде с 1,0–2,0 мг/л БАП выявлено увеличение количества побегов (от 1,5–2,0 до 3,7–4,0 шт. на эксплант) в четвертом субкультивировании по сравнению с первым [22]. Для *O. sipyleum* установлено, что при введении в культуру апикальных верхушек на питательной среде МС с 1,0 мг/л БАП развивалось 3,7 побега на эксплант, а при следующем субкультивировании формировалось 7,8 побега на эксплант. Однако при этом снижалась их длина – с 1,8 до 1,2 см. При дальнейших субкультивированиях через каждые три недели развивалось по 8,0 побега на эксплант [17]. Однако такого длительного, как в нашем исследовании у *M. officinalis* и *O. vulgare*, анализа морфометрических параметров в течение 7–13 пассажей (т.е. при культивировании около полутора лет) ранее, судя по имеющимся литературным данным, у видов мелиссы и душицы не проводилось. Полученные результаты свидетельствуют о возможности продолжительного микроразмножения изученных видов при сохранении достаточно высоких (особенно у душицы) коэффициентов размножения. Это может быть полезным не только для получения больших объемов посадочного материала при минимальном числе исходных растений (а может, и при наличии единичного экземпляра), но и при разработке методик создания депонированных коллекций ценных генотипов *in vitro*.

Выводы

Выявлены особенности развития эксплантов *M. officinalis* и *O. vulgare* при длительном клональном микроразмножении. На втором этапе размножения *in vitro* наблюдали множественное побегообразование, ризогенез, а иногда развитие оводненных побегов. Частота изученных показателей варьировала в зависимости от вида или сорта растения и количества пассажей.

При сравнении двух видов растений в течение всего периода культивирования у душицы отмечены большее число побегов на эксплант (до 54,8 шт.) и частота витрификации (до 44,5%), тогда как для сортов мелиссы характерны более высокие значения длины побегов (до 73,8 мм) и числа узлов на них (до 4,1 шт.).

Анализ развития эксплантов мелиссы в течение семи пассажей показал, что максимальные значения коэффициента размножения у сорта Цитро-

нелла (до 12,0) выявлены в 3–5-м, а у сортов Соборная (14,2) и Крымчанка (17,6) – в 5-м субкультивировании.

При микроразмножении душицы в течение 13 пассажей обнаружено увеличение коэффициента размножения к 5-му пассажиру до 74,1. При дальнейших субкультивированиях, в 12–13-м пассажах, данный параметр снизился почти в 4 раза.

Проведенные исследования показали возможность длительного, более года, клонального размножения *M. officinalis* и *O. vulgare* в культуре *in vitro*. При этом выявленная у побегов Melissa способность к ризогенезу на питательной среде для размножения (с частотой 44,4–92,7%) позволяет исключить специальный этап укоренения *in vitro*.

Литература

1. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь : ИТ «Ариал», 2018. 320 с.
2. Атлас лекарственных растений России / под ред. А.В. Быкова. М. : Щербинская типография, 2006. 345 с.
3. Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H., Naseri B., Sadat-Hosseini M., Fayazi-Barjin A., Meftahizade H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review // Journal of Medicinal Plants Research. 2010. Vol. 4, № 25. PP. 2753–2759.
4. Garcia-Beltran J.M., Esteban M.A. Properties and application of plants of *Origanum* sp. genus // SM Journal of Biology. 2016. № 2 (1). 1006. PP. 1–10.
5. Derwich E., Benziane Z., Manar A., Boukir A., Taouil R. Phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* from Morocco // American-Eurasian Journal of Scientific Research. 2010. Vol. 5, № 2. PP. 120–129.
6. Chishti Sh., Kaloo Z.A., Sultan Ph. Medicinal importance of genus *Origanum*: A review // Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2013. Vol. 5 (10). PP. 170–177. doi: 10.5897/JPP2013.0285
7. Невкрытая Н.В., Аметова Э.Д., Марченко М.П. Итоги работы по созданию нового сорта *Melissa officinalis* L. // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Серия: «Биология, химия». 2014. Т. 27 (66), № 5. С. 110–118.
8. Davey M.R., Anthony P. Plant cell culture: essential methods. Singapore : Markono Print Media Pte. Ltd, 2010. 335 p.
9. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. К. : Наукова думка, 2005. 270 с.
10. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур / под ред. И.В. Митрофановой. Симферополь : АРИАЛ, 2018. 260 с.
11. Ghiorghita G.I., Maftai D.E.St., Nicuta D.N. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species // Analele Stiintifice ale Universitatii “Alexandru Ioan Cuza”, Genetica si Biologie Moleculara. 2005. Vol. 5. PP. 119–126.
12. Meftahizade H., Lofti M., Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. // African Journal of Biotechnology. 2010. Vol. 9, № 28. PP. 4314–4321. doi: 10.5897/AJB10.208
13. Mohebalipour N., Aharizad S., Mohammadi S.A., Motalibiazar A.R., Arefi H.M. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces // Journal of Food, Agriculture & Environment. 2012. Vol. 10 (1). PP. 280–286.
14. Goleniowski M.E., Flamarique C., Bima P. Micropropagation of *Oregano* (*Origanum vulgare* x *apalii*) from meristem tips // In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2003. Vol. 39. PP. 125–128. doi: 10.1079/IVP2002361

15. Bracamonte M.A., Bima P., Bongiovanni G., Golenowski M. Nutrition and micropropagation of *Origanum vulgare* x *apalii* // Molecular Medicinal Chemistry. 2006. Vol. 11. PP. 6–7.
16. Nanova Zh., Slavova Y. Mass vegetative propagation of winter marjoram (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) jetsvaart) // Bulgarian Journal of Agricultural Science, National Centre for Agrarian Sciences. 2006. Vol. 12. PP. 531–536.
17. Oluk E.A., Cakır A. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey // African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8 (21). PP. 5769–5772.
18. Özkum D. *In vitro* shoot regeneration of oregano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & Davis) // Hacettepe Journal of Biology and Chemistry. 2007. Vol. 35 (2). PP. 97–100.
19. Shakeri S.M., Kazemitabar S.K., Sinaki J.M. *In vitro* culture of *Melissa officinalis* without the use of hormones // International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 2013. Vol. 6 (20). PP. 1382–1387.
20. Meftahizade H., Moradkhani H., Naseri B., Lofti M., Naseri A. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes // Journal of Medicinal Plants Research. 2010. Vol. 4, № 3. PP. 240–246.
21. Oana C.T., Falticeanu M., Prisecaru M. Considerations regarding the effects of growth regulators over the *in vitro* morphogenetic reaction at *Origanum vulgare* L. // Journal Plant Development. 2008. Vol. 15. PP. 133–138.
22. El Beyrouthy M., Elian G., Abou Jaoudeh C., Chalak L. *In vitro* propagation of *Origanum syriacum* and *Origanum ehrenbergii* // Acta Horticultural. 2015. № 1083. PP. 169–172. doi: [10.17660/ActaHortic.2015.1083.19](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.19)
23. Fokina A.V., Satarova T.M., Smetanin V.T., Kucenko N.I. Optimization of microclonal propagation *in vitro* of oregano (*Origanum vulgare*) // Biosystems Diversity/ 2018. Vol. 26, № 2. PP. 98–102. doi: [10.15421/011815](https://doi.org/10.15421/011815)
24. Sevindik B., İzgu T., Şimşek O., Tutuncu M., Curuk P., Yılmaz O., Kaynak G., Kacar Y.A., Silva J.A.T., Mendi Y.Y. *In vitro* culture of turkish *Origanum sipyleum* L. // American Journal of Plant Biology. Special Issue: Plant Molecular Biology and Biotechnology. 2017. Vol. 2, № 5-1. PP. 32–36. doi: [10.11648/j.ajpb.s.2017020501.16](https://doi.org/10.11648/j.ajpb.s.2017020501.16)
25. Korkor A.M., Mohamed S.A., Abd El-kafie O.M., Gohar A.A. Adaptation of the *in vitro* culture of *Origanum majorana* L. for production of phenolic acids // IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2017. Vol. 12, № 2. PP. 30–38. doi: [10.9790/3008-1202013038](https://doi.org/10.9790/3008-1202013038)
26. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15, № 3. PP. 473–479.
27. Якимова О.В., Егорова Н.А. Влияние состава питательной среды, типа экспланта и генотипа на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2018. Т. 4 (70), № 1. С. 158–167.
28. Якимова О.В., Егорова Н.А. Влияние состава питательной среды и генотипа на клональное микроразмножение душицы *in vitro* // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2015. Вып. 4 (55). С. 304–309.
29. Liu M., Jiang F., Kong X., Tian J., Wu Z., Wu Zh. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. // Scientia Horticulturae. 2017. Vol. 217. PP. 285–296. doi: [10.1016/j.scienta.2017.02.010](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.010)
30. Поливанова О.Б., Чердниченко 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](https://doi.org/10.26897/0021-342X-2017-5-17-28)
31. Yegorova N.A., Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., Paliy A.E., Stavtseva I.V. Morphogenetic, physiological, and biochemical features of *Lavandula angustifolia* at long-

- term micropropagation *in vitro* // Russian Journal of Plant Physiology. 2019. Vol. 66, № 2. PP. 326–334. <https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443719010060>
32. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние сорта и факторов культивирования *in vitro* на клональное микроразмножение розы эфиромасличной // Бюллетень государственного Никитского ботанического сада. 2016. № 120. С. 36–43.
33. Zagorskaya M., Yegorova N. Effect of prolonged cultivation on the micropropagation *in vitro* of mint cultivars and breeding samples // BIO Web of Conferences. 2018. Vol. 11. Article Number 00049. doi: 10.1051/bioconf/20181100049
34. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Якимова О.В., Каменек Л.И., Кривоухатко А.Г. Некоторые аспекты клонального микроразмножения и сохранения *in vitro* эфиромасличных растений // Таврический вестник аграрной науки. 2015. № 1 (3). С. 18–24.

Поступила в редакцию 10.05.2019 г.; повторно 16.08.2019 г.;
принята 11.09.2019 г.; опубликована 27.09.2019 г.

Авторский коллектив:

Егорова Наталья Алексеевна – д-р биол. наук, доцент, зав. лабораторией биотехнологии отдела эфиромасличных и лекарственных культур, ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» (Россия, 295493, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150).

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-5455-3044>

E-mail: yegorova.na@mail.ru

Якимова Ольга Валерьевна – н. с. лаборатории биотехнологии отдела эфиромасличных и лекарственных культур, ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» (Россия, 295493, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1586-498X>

E-mail: olyayakimova@yandex.ru

For citation: Yegorova NA, Yakimova OV. 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;47:22-39. doi: 10.17223/19988591/47/2 In Russian, English Summary

Natalia A. Yegorova, Olga V. Yakimova

Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

The effect of long-term subcultivation on clonal micropropagation of *Melissa officinalis* L. and *Origanum vulgare* L.

In recent years, along with the use of essential oil and medicinal plants traditional for the south of Russia, there have been an active introduction of new species, including representatives of Lamiaceae family such as *Melissa officinalis* and *Origanum vulgare*, into production. These plant species are widely used in perfumery, cosmetics and food industries, as well as in medicine, because of the number of biologically active compounds. Therefore breeding work is being carried out to create cultivars with a high content of essential oil and valuable components in its composition. Currently, biotechnological techniques are used to address a wide range of challenges of ecology, plant breeding and seed production. One of the most popular methods is clonal micropropagation. Biotechnologies of micropropagation *in vitro* have been developed for many agricultural and flowering ornamental plants. However, for lemon balm and oregano, many issues relating to propagation in tissue and organ culture have not been studied enough. In particular, this applies to the study of long-term propagation *in vitro*. The aim of our investigation was to study the morphometric parameters of explant

development during long-term subcultivation of cultivars and breeding samples of *M. officinalis* and *O. vulgare* at the second stage of clonal micropropagation.

For studies, we used three cultivars of *Melissa officinalis* L. (Tsitronella, Sobornaya, Krymchanka) and breeding sample № 10 of *Origanum vulgare* L. When introduced *in vitro*, axillary meristems with 2 leaf primordia were isolated from plants. At the second stage (micropropagation itself), stem segments (5-8 mm) with one node, obtained by microcutting of shoots developed from meristems, were used as explants. Explants were cultivated on Murashige and Skoog (MS) culture medium (which we modified earlier for oregano and lemon balm) supplemented with BAP and GA₃. The meristems and shoots were cultivated at 26±2°C, 70% air humidity, 2-3 klx light intensity and 16-h photoperiod. After 30-35 days of cultivation, we determined the frequency of multiple shoot formation, the number and length of shoots, the number of nodes on the shoot, the frequency of rhizogenesis and hyperhydric shoots. The multiplication index was calculated as the number of microcuttings that were obtained after one subculture. To do this, the number of shoots formed on explants was multiplied by the number of nodes on a shoot. Hyperhydric microshoots were not taken into account. Then, we divided the shoots into microcuttings and transferred to a fresh culture medium. Experiments were repeated three times, and at least 20 explants were analyzed in each variation. The confidence of differences was assessed using Student's t-test, p<0.05. Mean values and standard errors are shown in tables and graphs.

As a result of the research, we showed that with the introduction of *M. officinalis* meristems to the MS culture medium with 1.0 mg/l BAP and 0.5 mg/l GA₃, the development of the main and sometimes adventitious shoots occurred on the 7th-10th day of cultivation. After 35 days of cultivation, 1.3 (Tsitronella cultivar) to 4.2 (Sobornaya cultivar) shoots were formed from one explant, and their length varied from 5.8 to 8.2 mm. For further micropropagation of lemon balm, microshoots obtained at the first stage were divided into one node segments and transferred to the MS medium with 0.5 mg/l BAP. Cultivation of microcuttings during seven passages led to the formation of axillary and adventitious shoots in the studied cultivars (See Fig. 1, A). The frequency of multiple shoot formation, depending on the cultivar and passage, varied from 32.0% to 93.3% (See Table 1). In some variants of the experiment, hyperhydric microshoots were formed with a frequency of 15.1-23.4%. The morphometric parameters of Sobornaya and Krymchanka cultivars were 1.3-2.5 times higher than those of Tsitronella. During successive subcultivations in all cultivars, we revealed an increase not only in multiple shoot formation frequency but also in the length of shoots in some variants. It should be noted that at the second stage of micropropagation on a culture medium with BAP, many shoots developed roots (See Fig. 1, A). The rhizogenesis frequency, depending on the cultivar and passage, reached 44.4-92.7%. The revealed spontaneous rooting of *M. officinalis* cultivars on a nutrient medium for micropropagation allows, at a high rhizogenesis frequency, excluding the third stage of propagation and immediately transferring microplants with roots for adaptation *ex vitro*. When comparing the morphometric parameters of the microcuttings development at different passages, we found that in the studied cultivars the number of shoots varied from 2.2 to 5.7 pcs./explants, and the number of nodes varied from 2.2 to 4.1 pcs./shoot. The length of the shoots reached 55.4-73.8 mm. In Tsitronella cultivar, the maximum value of the studied parameters (See Table 1) and the multiplication index (up to 12.0) (See Fig. 2) were noted in the 3rd-5th subcultivations. For Sobornaya and Krymchanka cultivars – in the fifth passage, in which the multiplication index was 14.2 and 17.6, respectively. In the seventh subcultivation, the multiplication indexes of all studied cultivars decreased to 6.3-8.9, depending on the genotype.

When meristems of *O. vulgare* were placed on MS culture medium, containing 1.0 mg/l BAP, after a month of cultivation, they developed up to 4.5 shoots per explant

of 17.0 mm long. The frequency of multiple shoot formation was 66.6%. At the second stage of micropropagation, explants (stem segments with one node) isolated from microshoots, developed from meristem, were cultured on MS medium with 0.5 mg/l BAP. The growth of the main shoot started on the 5th-7th day, and the development of adventitious shoots – in 2-3 weeks (See Fig. 1 B). On the 35th day of cultivation, the frequency of multiple shoot formation varied from 75.0 to 95.2%, and the number of shoots ranged from 9.5 to 54.8 per explant depending on the number of subcultures (See Table 2). During micropropagation, individual shoots (from 5.2 to 28.5%, in different passages) formed 2-3 roots up to 2-3 cm in length. Sometimes, when oregano was cultivated, the hyperhydric microshoots with thickened vitreous anomalous stems and leaves were noted; they cannot be used for further propagation. The frequency of vitrified microshoots was 16.7-25.8%. However, it reached 44.5% in the fifth passage. When studying the effect of cultivation duration on micropropagation of *O. vulgare in vitro*, 13 passages were conducted. The maximum number of shoots (54.8 pcs / explants) and the multiplication index (74.1) were obtained in the fifth subcultivation (See Fig. 3). With further subcultivations, the multiplication index decreased in the 10th passage up to 43.0. The lowest values of this parameter (16.9-18.8) were noted in the late 12th and 13th passages. Thus, the conducted studies indicate the possibility of long-term micropropagation of *O. vulgare* and *M. officinalis in vitro* (at least for 1-1.5 years), while the maximum efficiency of this process was observed during the fifth subcultivation.

The paper contains 3 Figures, 2 Tables and 34 References.

Key words: lemon balm; oregano; explants; propagation *in vitro*; multiple shoot formation; subculture; multiplication index.

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pashtetskiy VS, Nevkrytaya NV, Mishnev AV, Nazarenko LG. Efiromaslichnaya otrasl' Kryma. Vchera, segodnya, zavtra [Essential oil industry in the Crimea. Yesterday, today, tomorrow]. Simferopol: ARIAL Publ.; 2018. 320 p. In Russian
2. Atlas lekarstvennykh rasteniy Rossii [Atlas of medicinal plants of Russia]. Bykov AV, editor. Moscow: Shcherbinskaya tipografiya Publ.; 2006. 345 p. In Russian
3. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A, Meftahizade H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *J Medicinal Plants Research*. 2010;4(25):2753-2759.
4. Garcia-Beltran JM, Esteban MA. Properties and application of plants of *Origanum* sp. genus. *SM J Biology*. 2016;2(1006):1-10.
5. Derwich E, Benziane Z, Manar A, Boukir A, Taouil R. Phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* from Morocco. *American-Eurasian J Scientific Research*. 2010;5(2):120-129.
6. Chishti Sh, Kaloo ZA, Sultan Ph. Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. *J Pharmacognosy and Phytotherapy*. 2013;5(10):170-177. doi: [10.5897/JPP2013.0285](https://doi.org/10.5897/JPP2013.0285)
7. Nevkrytaya NV, Ametova ED, Marchenko MP. The outcome of the creating a new variety of *Melissa officinalis* L. *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Seriya: Biologiya, khimiya*. 2014;27(5):110-118. In Russian, English Summary
8. Davey MR, Anthony P. Plant cell culture: Essential methods. Singapore: Markono Print Media Pte. Ltd; 2010. 335 p.
9. Kushnir GP, Sarnats'ka VV. Mikroklonal'ne rozmnozheniya roslin. Teopiya i praktika [Microclonal propagation of plants. Theory and practice]. Kiev: Naukova dumka Publ.; 2005. 270 p. In Ukrainian

10. *Osnovy sozdaniya genobanka in vitro vidov, sortov i form dekorativnykh, aromaticheskikh i plodovykh kul'tur* [The basics of creation of *in vitro* genebank of species, varieties and forms of decorative, aromatic and fruit crops]. Mitrofanova IV, editor. Simferopol: ARIAL Publ.; 2018. 260 p. In Russian
11. Ghiorghita GI, Maftai DEST, Nicuta DN. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza", Genetica si Biologie Moleculara*. 2005;5:119-126.
12. Meftahizade H, Lofti M, Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. *African J Biotechnology*. 2010;9(28):4314-4321. doi: [10.5897/AJB10.208](https://doi.org/10.5897/AJB10.208)
13. Mohebalipour N, Aharizad S, Mohammadi SA, Motalibiazar AR, Arefi HM. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. *J Food, Agriculture & Environment*. 2012;10(1):280-286.
14. Goleniowski ME, Flamarique C, Bima P. Micropropagation of *Oregano* (*Origanum vulgare* x *apalii*) from meristem tips. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2003;39:125-128. doi: [10.1079/IVP2002361](https://doi.org/10.1079/IVP2002361)
15. Bracamonte MA, Bima P, Bongiovanni G, Golenowski M. Nutrition and micropropagation of *Origanum vulgare* x *apalii*. *Molecular Medicinal Chemistry*. 2006;11:6-7.
16. Nanova Zh, Slavova Y. Mass vegetative propagation of winter marjoram (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) jetsvaart). *Bulgarian J Agricultural Science, National Centre for Agrarian Sciences*. 2006;12:531-536.
17. Oluk EA, Cakir A. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. *African J Biotechnology*. 2009;8(21):5769-5772.
18. Özkum D. *In vitro* shoot regeneration of oregano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & Davis). *Hacettepe J Biology and Chemistry*. 2007;35(2):97-100.
19. Shakeri SM, Kazemitabar SK, Sinaki JM. *In vitro* culture of *Melissa officinalis* without the use of hormones. *International J Agriculture and Crop Sciences*. 2013;6(20):1382-1387.
20. Meftahizade H, Moradkhani H, Naseri B, Lofti M, Naseri A. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. *J Medicinal Plants Research*. 2010;4(3):240-246.
21. Oana CT, Falticeanu M, Prisecaru M. Considerations regarding the effects of growth regulators over the *in vitro* morphogenetic reaction at *Origanum vulgare* L. *J Plant Development*. 2008;15:133-138.
22. El Beyrouthy M, Elian G, Abou Jaoudeh C, Chalak L. *In vitro* propagation of *Origanum syriacum* and *Origanum ehrenbergii*. *Acta Horticultural*. 2015;1083:169-172. doi: [10.17660/ActaHortic.2015.1083.19](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.19)
23. Fokina AV, Satarova TM, Smetanin VT, Kucenko NI. Optimization of microclonal propagation *in vitro* of oregano (*Origanum vulgare*). *Biosystems Diversity*. 2018;26(2):98-102. doi: [10.15421/011815](https://doi.org/10.15421/011815)
24. Sevindik B, İzgu T, Şimşek O, Tutuncu M, Curuk P, Yılmaz O, Kaynak G, Kacar YA, Silva JAT, Mendi YY. *In vitro* culture of Turkish *Origanum sipyleum* L. *American J Plant Biology. Special Issue: Plant Molecular Biology and Biotechnology*. 2017;2(5-1):32-36. doi: [10.11648/j.ajpb.s.2017020501.16](https://doi.org/10.11648/j.ajpb.s.2017020501.16)
25. Korkor AM, Mohamed SA, Abd El-kafie OM, Gohar AA. Adaptation of the *in vitro* culture of *Origanum majorana* L. for production of phenolic acids. *IOSR J Pharmacy and Biological Sciences*. 2017;12(2):30-38. doi: [10.9790/3008-1202013038](https://doi.org/10.9790/3008-1202013038)
26. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-479.
27. Yakimova OV, Yegorova NA. Influence of nutrient medium composition, explant type and genotype on clonal micropropagation of *Melissa officinalis* L. *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya, khimiya = Scientific Notes of*

- V.I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry.* 2018;4(70)(1):158-167. In Russian, English Summary
28. Yakimova OV, Yegorova NA. The influence of the composition of the nutrient medium and genotype on clonal micropropagation of origanum *in vitro*. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Proceedings of the Kuban State Agrarian University.* 2015;55:304-309. In Russian, English Summary
 29. Liu M, Jiang F, Kong X, Tian J, Wu Z, Wu Zh. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. *Scientia Horticulturae.* 2017;217:285-296. doi: [10.1016/j.scienta.2017.02.010](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.010)
 30. Polivanova OB, Cherednichenko MJu. Ways of vitrification overcoming of *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (Lamiaceae) in *in vitro* culture. *Izvestiya Timiryazevskoy Sel'skokhozyaystvennoy Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy.* 2017;5:17-28. In Russian, English Summary. doi: [10.26897/0021-342X-2017-5-17-28](https://doi.org/10.26897/0021-342X-2017-5-17-28)
 31. Yegorova NA, Mitrofanova IV, Brailko VA, Grebennikova OA, Paliy AE, Stavtseva IV. Morphogenetic, physiological, and biochemical features of *Lavandula angustifolia* at long-term micropropagation *in vitro*. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2019;66(2):326-334. doi: [10.1134/S1021443719010060](https://doi.org/10.1134/S1021443719010060)
 32. Yegorova NA, Stavtseva IV, Mitrofanova IV. Influence of cultivar and cultivation factors *in vitro* on the essential oil rose clonal micropropagation. *Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Bulletin of the State Nikita Botanical Garden.* 2016;120:36-43. In Russian
 33. Zagorskaya M, Yegorova N. Effect of prolonged cultivation on the micropropagation *in vitro* of mint cultivars and breeding samples. *BIO Web of Conferences.* 2018;11:e00049. doi: [10.1051/bioconf/20181100049](https://doi.org/10.1051/bioconf/20181100049)
 34. Yegorova NA, Stavtseva IV, Yakimova OV, Kamenek LI, Krivohatko AG. Some aspects of clonal micropropagation and conservation *in vitro* of essential oil plants. *Tavrisheskiy Vestnik Agrarnoy Nauki = Taurida Herald of the Agrarian Sciences.* 2015;1(3):18-24. In Russian, English Summary

Received 10 May 2019; Revised 16 August 2019;
Accepted 11 September 2019; Published 27 September 2019

Yegorova Natalia A, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Head of the Laboratory of Biotechnology, Department of Essential Oil and Medicinal Crops, Research Institute of Agriculture of Crimea, 150 Kievskaya Str., Simferopol 295493, Russian Federation.

ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-5455-3044>

E-mail: yegorova.na@mail.ru

Yakimova Olga V, Researcher, Laboratory of Biotechnology, Department of Essential Oil and Medicinal Crops, Research Institute of Agriculture of Crimea, 150 Kievskaya Str., Simferopol 295493, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1586-498X>

E-mail: olyyakimova@yandex.ru