

УДК 633.81:57.085.2

**ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ, ТИПА ЭКСПЛАНТА
И ГЕНОТИПА НА КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ
*MELISSA OFFICINALIS L.***

Якимова О. В., Егорова Н. А.

***ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь,
Республика Крым, Россия
E-mail: olyyakimova@yandex.ru***

В результате исследований выявлены особенности влияния состава питательной среды, типа экспланта, генотипа и типа культурального сосуда на развитие микропобегов Melissa лекарственной (*Melissa officinalis L.*) на 1–3 этапах клонального микроразмножения. Показано, что на втором этапе микроразмножения для сортов Соборная и Крымчанка оптимальной была питательная среда МС с добавлением 0,5 мг/л БАП (коэффициенты размножения составили 19,9 и 17,6 соответственно), а для сорта Цитронелла – среда с добавлением 1,0 мг/л кинетина (коэффициент размножения 19,3). Для укоренения сортов Цитронелла и Соборная подобрана питательная среда МС, дополненная 0,5 мг/л НУК, а для сорта Крымчанка – 1,0 мг/л ИУК. Проведенные исследования являются основой для разработки методики клонального микроразмножения *in vitro M. officinalis L.*

Ключевые слова: *Melissa officinalis L.*, клональное микроразмножение, эксплант, *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis L.*) – травянистое лекарственное, эфиромасличное и пряно-ароматическое растение. Мелисса широко применяется в медицине, ее эфирное масло обладает успокаивающим действием. Это растение также используется как медонос, пряность в кулинарии, входит в состав ароматических чаев [1–3]. Эфирное масло мелиссы достаточно дорогое, а его содержание в сырье варьирует от 0,01 до 0,2 % (на абсолютно сухую массу) и лишь в некоторых случаях достигает 0,45 % [4; 5]. В связи с этим в ФГБУН «НИИСХ Крыма» проводится селекционная работа с целью получения высокомасличных и высокопродуктивных сортов *M. officinalis* [4].

Для осуществления селекции на современном уровне весьма эффективно привлечение биотехнологических методов, одним из которых является клональное микроразмножение. Методы размножения *in vitro* распространены и на лабораторном уровне отработаны для многих видов растений [6]. По сравнению с традиционными методами семенного и вегетативного размножения клональное микроразмножение имеет ряд преимуществ – более высокий коэффициент размножения, сокращение сроков селекции, возможность получения однородного оздоровленного посадочного материала [7]. В литературе встречаются отдельные данные о проведении исследований, касающихся культивирования изолированных тканей и органов

M. officinalis in vitro [8–13]. В частности, это работы, связанные с получением каллусных культур и клеточных суспензий, для выделения продуктов вторичного метаболизма [3]. Также изучались некоторые аспекты влияния состава питательной среды и условий культивирования на микроразмножение Melissa в культуре *in vitro* и адаптации микропобегов *in vivo* [10–13].

В связи с этим целью нашего исследования было изучение влияния ряда факторов (состава питательной среды, типа экспланта, генотипа, типа культурального сосуда) на развитие эксплантов на основных этапах клонального микроразмножения Melissa.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили ткани и органы растений Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.) сортов Цитронелла, Соборная и Крымчанка. В качестве эксплантов использовали меристемы с двумя листовыми примордиями и сегменты стебля с одним узлом, выделенные из растений, выращенных в условиях закрытого грунта. Работу в асептических условиях и приготовление питательных сред осуществляли согласно общепринятым методикам по культуре клеток, тканей и органов [14]. Стерилизацию растительного материала проводили путем последовательной обработки 70 % этанолом (1 мин) и 50 % раствором препарата «Брадофен» (6 мин) [15]. В разных вариантах опыта в качестве культуральных сосудов использовали пробирки или колбы (объемом 150 мл), закрывающиеся ватно-марлевыми пробками, и банки (объемом 200 мл), закрывающиеся фольгой. На питательную среду помещали экспланты из расчета 1 шт. на 10 мл питательной среды. Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением ИУК, НУК, БАП, тидиазурона (ТДЗ), кинетина (кин.), гибберелловой кислоты (ГК). Культивирование проводили в культуральной комнате при температуре 25 ± 2 °С, относительной влажности воздуха 70 % и освещенности 2–3 тысячи люкс с фотопериодом 16 часов. Анализ морфометрических показателей (количества и длины побегов, числа узлов на побеге, частоты множественного побегообразования, количества и длины корней) проводили на 30-е сутки культивирования. Расчет коэффициента размножения осуществляли путем умножения количества побегов на эксплант на количество узлов на побеге. В каждом варианте опыта анализировали не менее 20-ти эксплантов, повторность опыта 2–3-х кратная. Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам [16], с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что процесс клонального микроразмножения состоит из четырех этапов: введения в культуру *in vitro*, собственно микроразмножения, укоренения *in vitro* и адаптации полученных микропобегов к условиям *in vivo*. На первом этапе микроразмножения важным условием успешного культивирования является получение асептической культуры [6; 17]. При помещении эксплантов на

питательную среду развитие основного, а иногда и адвентивных побегов, отмечали на 7–10 сутки культивирования. В ходе проведенных ранее исследований установлено, что на этапе введения в культуру лучшее развитие сегментов стебля с одним узлом у сорта Цитронелла было при использовании в составе питательной среды БАП, а также при добавлении к БАП гибберелловой кислоты [18].

На развитие эксплантов на разных этапах микроразмножения *in vitro* оказывает влияние комплекс факторов [7]. В связи с этим изучали влияние состава питательной среды, генотипа и типа экспланта на морфогенез *M. officinalis* на этапе введения в культуру *in vitro*. При введении в культуру в качестве эксплантов использовали меристемы и сегменты стебля с одним узлом сортов Цитронелла и Соборная. Установлено, что при культивировании меристем сорта Цитронелла на безгормональной питательной среде морфометрические показатели микропобегов были минимальными. На других модификациях питательной среды МС проанализированные показатели у этого сорта достоверно не отличались (табл. 1). При этом длина побегов варьировала от 5,8 мм до 6,3 мм, а количество побегов на эксплант – от 1,1 шт. до 1,3 шт. Для сорта Соборная лучшие показатели развития микропобегов при культивировании меристем были получены на питательной среде МС18, содержащей 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК. При этом было отмечено максимальное число побегов на эксплант – 4,2 шт., а средняя длина побега составила 8,2 мм.

При культивировании сегментов стебля с узлом также отмечали различия между сортами. У сорта Соборная наибольшую длину побегов наблюдали на средах МС31 (32,1 мм) и МС18 (29,7 мм), а максимальное количество побегов на эксплант – на среде МС18 (3,3 шт.). У сорта Цитронелла наибольшая длина побегов была при использовании питательной среды МС18 (18,8 мм), лучшие показатели количества побегов – на средах МС17 и МС18 (5,6 шт. и 4,6 шт. соответственно). Следует отметить, что полученные из меристем микропобеги по всем морфометрическим показателям уступали побегам, развивающимся из сегментов стебля с узлом.

Анализ имеющихся литературных данных показал, что разные исследователи также изучали влияние типа экспланта на микроразмножение *M. officinalis* в культуре *in vitro*. При этом они использовали сегменты стебля с узлом, верхушки побегов, сегменты междоузлий, а также фрагменты листьев и корней [5; 9–1]. Некоторые авторы отмечали побегообразование не только из верхушек побегов, но и из каллусов, формирующихся у основания эксплантов [11]. Как известно, образование побегов из каллусной ткани нежелательно при микроразмножении, так как высока вероятность получения соматональных вариантов. В наших исследованиях не отмечено образования каллуса у основания побегов, в отличие от упомянутой работы.

Основной целью второго этапа микроразмножения является получение максимального коэффициента размножения. На этапе собственно микроразмножения в качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом трех сортов мелиссы, вычлененные из микропобегов, полученных при введении *in vitro*. Изучено влияние состава питательной среды и генотипа на микроразмножение мелиссы, при этом было испытано 6 вариантов питательной среды МС, дополненной БАП, кинетином и ТДЗ в различных концентрациях. Анализ

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ, ТИПА ЭКСПЛАНТА ...

морфометрических параметров показал, что у исследуемых сортов длина побегов варьировала от 35,1 мм до 70,3 мм, в зависимости от состава питательной среды.

Таблица 1

Влияние состава питательной среды, сорта и типа экспланта на развитие эксплантов *M. officinalis* на первом этапе клонального микроразмножения

Морфометрические параметры	Сорт	Тип экспланта	№ питательной среды МС и гормональные добавки в составе среды, мг/л				
			МС1 (6г)	МС17 (БАП – 0,5)	МС18 (БАП –1,0; ГК – 0,5)	МС31 (кин- 0,5)	МС20 (кин- 1,0; ГК -0,5)
Количество побегов, шт./эксплант	Цитронелла	меристемы	1,1±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1
		сегменты стебля с узлом	2,0±0,3	5,6±1,9	4,6±0,6	2,4±0,2	2,3±0,3
	Соборная	меристемы	1,2±0,2	2,6±0,5	4,2±0,2	1,4±0,2	1,1±0,1
		сегменты стебля с узлом	1,4±0,2	1,8±0,2	3,3±0,6	2,3±0,5	1,4±0,2
Количество узлов, шт./побег	Цитронелла	меристемы	1,0±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	1,0±0,1
		сегменты стебля с узлом	1,0±0,4	1,1±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1	1,6±0,2
	Соборная	меристемы	1,1±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	1,0±0,1	1,1±0,1
		сегменты стебля с узлом	1,1±0,1	1,5±0,1	2,3±0,2	2,0±0,3	1,1±0,1
Длина побега, мм	Цитронелла	меристемы	4,1±0,4	6,2±0,6	5,8±0,5	5,9±0,5	6,3±0,6
		сегменты стебля с узлом	16,7±3,3	11,9±1,3	18,8±2,1	11,4±1,3	13,7±1,9
	Соборная	меристемы	5,3±0,6	9,4±1,1	8,2±0,5	5,3±0,3	6,8±0,8
		сегменты стебля с узлом	5,5±0,7	13,5±1,4	29,7±2,4	32,1±4,5	7,8±0,4
Частота множественного побегообразования, %	Цитронелла	меристемы	11,1±0,1	25,0±1,1	17,6±4,5	23,5±2,6	6,3±0,3
		сегменты стебля с узлом	80,0±13,3	100	50,0±5,9	41,7±4,9	25,0±1,4
	Соборная	меристемы	22,2±4,7	68,8±4,6	41,2±3,3	23,5±2,6	12,5±0,5
		сегменты стебля с узлом	30,0±5,3	53,3±3,3	66,6±4,2	71,4±18,4	33,5±3,3

Следует отметить, что на испытанных вариантах питательной среды у изученных генотипов наблюдали множественное побегообразование с частотой от 20,0 до 91,7 %. Наибольшее число побегов на эксплант (4,3–6,3 шт.) для всех исследуемых генотипов отмечали на средах с добавлением 0,5 мг/л и 1,0 мг/л БАП. Максимальный коэффициент размножения у сортов Соборная и Крымчанка (19,9 и 17,6 соответственно) был на питательной среде с добавлением 0,5 мг/л БАП, а у сорта Цитронелла – с добавлением 1,0 мг/л кинетина (19,3), хотя среда с 1,0 мг/л БАП обеспечивала достоверно неотличающийся высокий коэффициент размножения (17,0) (рис. 1). У сортов Соборная и Крымчанка на некоторых вариантах питательной среды наблюдали индукцию корнеобразования у микропобегов, которая варьировала от 44,4 до 92,7 %, что в некоторых случаях позволяет исключить этап укоренения *in vitro*, сократив при этом сроки клонального микроразмножения.

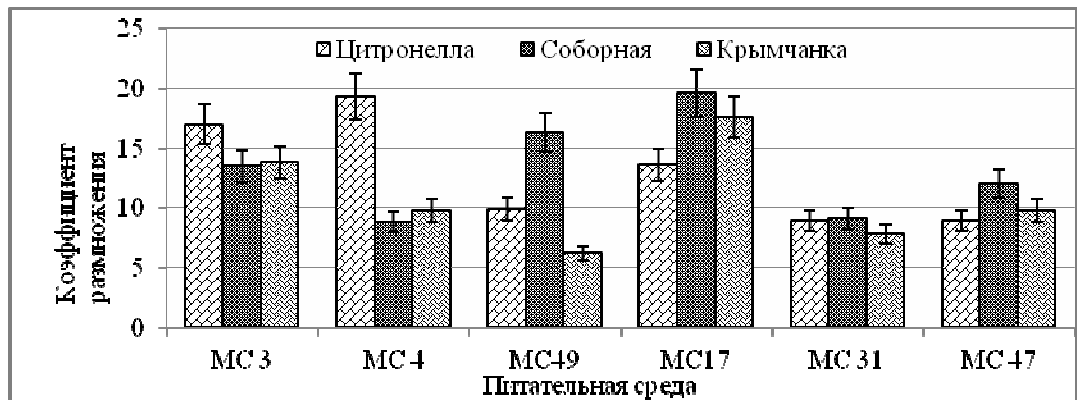


Рис. 1. Влияние состава питательной среды и сорта на коэффициент размножения Melissa на 2-м этапе микроразмножения. Гормональные добавки в составе питательной среды МС (мг/л): МС3 (БАП-1,0); МС4 (кин.-1,0); МС49 (ТДЗ-1,0); МС17 (БАП-0,5); МС31 (кин.-0,5); МС47 (ТДЗ-0,5).

Мефтахизейд с соавторами установили, что максимальное количество побегов на эксплант (3,2–4,1 шт.) у Melissa развивалось при культивировании на питательной среде с 3,0 мг/л БАП и 1,0 мг/л НУК [10, 11]. В наших исследованиях максимальное число побегов получено при более низких концентрациях БАП (0,5–1,0 мг/л) без добавления в состав среды НУК. Греческие исследователи наибольшую частоту множественного побегообразования и число побегов (до 4 шт.) наблюдали при культивировании микропобегов *M. officinalis* на питательной среде с добавлением 1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП [9]. Ученые из Ирана у большинства из изученных 17-ти генотипов Melissa отмечали хорошую регенерацию микропобегов при использовании в составе питательной среды 2,0 мг/л БАП или 1,0 мг/л БАП с 0,5 мг/л ИМК [12].

В процессе оптимизации условий культивирования Melissa изучено влияние типа культурального сосуда (колбы и банки) и сорта на развитие микрочеренков Melissa на

втором этапе микроразмножения *in vitro* (табл. 2). Показано, что у сортов Цитронелла и Крымчанка при культивировании в банках количество побегов на эксплант было в 1,5–2,0 раза выше, чем в колбах. У сорта Соборная тип культурального сосуда не оказал достоверного влияния на этот показатель. Длина побегов при культивировании в банках у большинства генотипов также была в 1,5–2,0 раза выше, чем при культивировании в колбах. Коэффициенты размножения у сортов Цитронелла и Крымчанка при культивировании в банках были достоверно выше (14,9 и 14,2 соответственно), чем в колбах (7,0 и 7,5 соответственно). В то же время у сорта Соборная тип культурального сосуда не влиял на коэффициент размножения. В результате проведенных исследований установлено, что на втором этапе микроразмножения мелиссы в качестве культурального сосуда целесообразно использование банок объемом 200 мл, закрывающихся фольгой.

Таблица 2

Влияние типа культурального сосуда и сорта на развитие побегов мелиссы на втором этапе клонального микроразмножения

Сорт	Тип культурального сосуда	Количество побегов, шт./эксплант	Количество узлов, шт.	Длина побега, мм	Коэффициент размножения
Цитронелла	колба	2,9±0,2	2,7±0,3	26,8±2,9	7,0±0,5
	банка	5,5±0,9	2,8±0,3	43,5±6,4	14,9±1,2
Соборная	колба	4,1±0,4	2,2±0,3	19,4±2,8	9,0±0,6
	банка	3,6±0,4	2,5±0,2	29,0±2,5	9,0±0,4
Крымчанка	колба	3,4±0,3	2,2±0,2	32,1±4,6	7,5±0,5
	банка	4,9±0,6	2,9±0,1	29,1±1,8	14,2±0,9

Так как у мелиссы на втором этапе микроразмножения не все сорта обладали высокой ризогенной способностью, то дальнейшей задачей стала оптимизация гормонального состава питательной среды для укоренения полученных *in vitro* побегов. При анализе влияния состава питательной среды и генотипа на третьем этапе микроразмножения мелиссы было испытано шесть модификаций питательной среды МС, дополненной ИМК, НУК и ИУК. У исследуемых сортов была отмечена высокая частота укоренения (до 77,8–93,8 %) на большинстве питательных сред (рис. 2). Однако максимальные показатели укоренения у сортов Цитронелла и Соборная были на среде, содержащей 0,5 мг/л НУК, на которой формировалось 10,1 шт. и 13,6 шт. корней на побег, имеющих длину 20,4 мм и 15,2 мм соответственно. У сорта Крымчанка лучшее корнеобразование отмечено на питательной среде, дополненной 1,0 мг/л ИУК (количество корней – 8,7 шт., длина корней – 32,9 мм). Следует отметить, что на этих питательных средах у исследуемых сортов, наряду с формированием основного корня, наблюдали хорошее развитие боковых корней, что важно при дальнейшей адаптации растений к условиям *in vivo*.

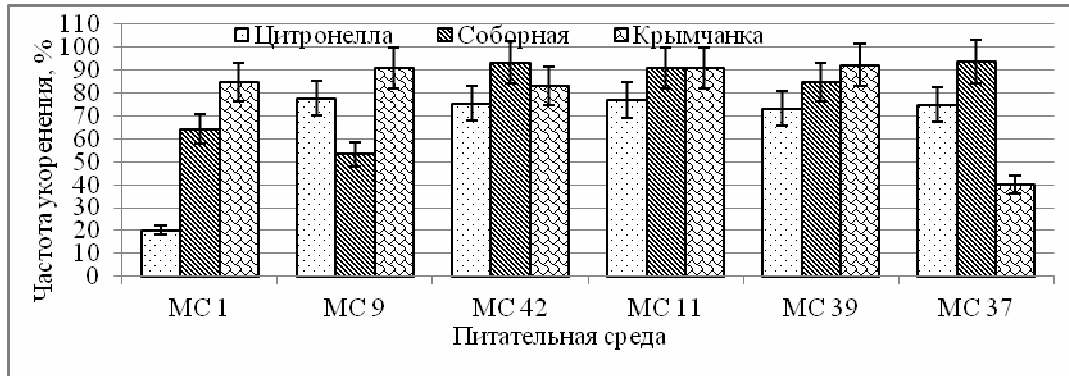


Рис. 2. Влияние состава питательной среды и сорта на частоту укоренения микропобегов мелиссы *in vitro*. Гормональные добавки в составе питательной среды МС (мг/л): МС 1 (без гормонов); МС 9 (НУК-1,0); МС 42 (НУК-0,5); МС 11 (ИУК-1,0); МС 39 (ИМК-1,0); МС 37 (ИМК-0,5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были выявлены особенности влияния состава питательной среды, типа экспланта, генотипа и типа культурального сосуда на развитие меристем и сегментов стебля с одним узлом трех сортов *M. officinalis* на 1–3 этапах клонального микроразмножения.

Установлено, что при введении в культуру *in vitro* максимальное количество побегов и их длина у сорта Соборная были на среде МС, дополненной 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК, а у сорта Цитронелла – на питательной среде МС, содержащей 0,5 мг/л кинетина, или 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК. Выявлено, что морфометрические показатели развития микропобегов из сегментов стебля с одним узлом были в 1,5–2 раза выше, чем из меристем.

На втором этапе микроразмножения мелиссы у сортов Соборная и Крымчанка оптимальной была питательная среда с добавлением 0,5 мг/л БАП (коэффициенты размножения составили 19,9 и 17,6 соответственно), а у сорта Цитронелла – среда с добавлением 1,0 мг/л кинетина (коэффициент размножения 19,3). В качестве культурального сосуда на втором этапе микроразмножения целесообразно использование банок объемом 200 мл, закрывающихся фольгой.

Максимальная частота укоренения для сортов Цитронелла и Соборная была отмечена на среде, дополненной 0,5 мг/л НУК, при этом количество корней составило 10,1 шт. и 13,6 шт. соответственно. Для сорта Крымчанка самые высокие показатели корнеобразования выявлены на питательной среде, дополненной 1,0 мг/л ИУК (количество корней – 8,7 шт.).

Данные исследования позволили оптимизировать условия культивирования для основных этапов размножения *in vitro*, что является основой для разработки методики клонального размножения *M. officinalis*.

Список литературы

1. Быков В. А. Атлас лекарственных растений России / В. А. Быков, В. А. Зайко, Н. Т. Конон [и др.]. – М.: Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений, 2006. – 345 с.
2. Назаренко Л. Г. Эфироны юга Украины / Л. Г. Назаренко, А. В. Афонин. – Симферополь : Таврия, 2008. – 144 с.
3. Silva S. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. Produced under the Influence of growth regulators / S. Silva, A. Sato, C. L. Salgueiro Lage [et al.] // J. Braz. Chem. – 2005. – No 16. – P. 1387–1390.
4. Невкрытая Н. В. Итоги работы по созданию нового сорта *Melissa officinalis* L. / Н. В. Невкрытая, Э. Д. Аметова, М. П. Марченко // Ученые записки ТНУ им. В. И. Вернадского, серия биология и химия. – 2014. – Т. 27 (66), № 5. – С. 110–118.
5. Moradkhani H. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review / H. Moradkhani, E. Sargsyan, H. Bibak [et al.] // J. of Medicinal Plants Research. – 2010. – Vol. 4, No 25. – P. 2753–2759.
6. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – Київ: Наукова думка, 2005. – 270 с.
7. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений: Учебное пособие / Е. А. Калашникова. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. – 318 с.
8. Galeş R. Aspects of floral structure and morphogenesis in *Melissa officinalis* / R. Galeş, A. Preotu, C. Toma // Biology vegetable. – 2010. – No 2. – P. 15–17.
9. Ghiorghita G. I. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species / G. I. Ghiorghita, D. E. St. Maftai, D. N. Nicuta // Anal.stiintifice ale Universitatii "AlexandruIoan Cuza", Geneticasi Biologie Moleculara. – 2005. – Vol. 5. – P. 119–126.
10. Meftahizade H. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes / H. Meftahizade, H. Moradkhani, B. Naseri [et al.] // J. of Medicinal Plants Research. – 2010. – Vol. 4, No 3. – P. 240–246.
11. Meftahizade H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. / H. Meftahizade, M. Lotfi, H. Moradkhani // African J. of Biotechnology. – 2010. – Vol. 9, No 28. – P. 4314–4321.
12. Mohebalipour N. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces / N. Mohebalipour, S. Aharizad, S. A. Mohammadi [et al.] // Journal of Food, Agriculture & Environment. – 2012. – V. 10 (1). – P. 280–286.
13. Tavares A. C. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots / A. C. Tavares, M. C. Pimenta, M. T. Gonsalves // Plant Cell Repts. – 1986. – Vol. 15, No 6. – P. 441–444.
14. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
15. Якимова О. В. Введение в культуру *in vitro* *Melissa officinalis* L. / О. В. Якимова, Н. А. Егорова // Перспективы интродукции декоративных растений в ботанических садах и дендропарках: материалы межд. научной конференции. – Симферополь: Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, 2014. – С. 196–198.
16. Лакин Г. Ф. Биометрия: уч. пособие [для биол. спец. вузов] – 4-е изд., перераб. и доп. / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
17. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин: підручник / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
18. Якимова О. В. Особенности морфогенеза эксплантов *Melissa officinalis* L. на первом этапе микроразмножения *in vitro* / О. В. Якимова, Н. А. Егорова // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – №3 (60). – С. 339–344.

INFLUENCE OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION, EXPLANT TYPE AND GENOTYPE ON CLONAL MICROPROPAGATION OF *MELISSA OFFICINALIS* L.

Yakimova O. V., Yegorova N. A.

*FSBSI "Research Institute of Agriculture of Crimea", Simferopol, Russian Federation
E-mail: olyyakimova@yandex.ru*

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) is a promising medicinal, essential oil and spicy aromatic plant. Currently, breeding work is carried out to obtain high-oil cultivars because the content of essential oil in the raw materials of lemon balm is rather low. To increase the efficiency of breeding with this valuable plant, it is expedient to apply biotechnological methods, one of which is clonal micropropagation.

The aim of study was to investigate the influence of some factors (explant type, nutrient medium composition, genotype and type of culture bottle) on lemon balm clonal micropropagation. The results of the studies led to the optimization of the conditions of *M. officinalis* explants cultivation at the first, second and third stages of clonal micropropagation. The studies revealed that maximum number of shoots and their length for cultivar Sobornaya was on MS nutrient medium supplemented with BAP (1.0 mg/l) and GA (0.5 mg/l) and for cultivar Citronella - on MS nutrient medium supplemented with kinetin (0.5 mg/l) or BAP (1.0 mg/l) and GA (0.5 mg/l). It was found that morphometric parameters of microshoots development from stem segments with one node were 1.5-2 higher than from meristems.

At the second stage of micropropagation the nutrient medium supplemented with 0.5 mg/l BAP was optimum for lemon balm cultivars Sobornaya and Krymchanka (multiplication index were 19.9 and 17.6, respectively), and for cultivar Citronella – nutrient medium supplemented with 1.0 mg/l kinetin (multiplication index 19.3). As a culture vessel for the second stage of lemon balm micropropagation it is preferable to use glass jar (200 ml) closed with aluminium foil.

Maximum frequency of rooting for Citronella and Sobornaya cultivars was noted on nutrient medium supplemented with 0.5 mg/l NAA, number of roots in this case reached 10.1 pcs. and 13.6 pcs., respectively. For Krymchanka cultivar, the highest rooting parameters were revealed on a nutrient medium supplemented with 1.0 mg/l of IBA (number of roots was 8.7 pcs.).

Results of the study allowed to optimize of cultivation conditions for the major stages of propagation *in vitro* and are the basis for developing methods of *M. officinalis* clonal micropropagation.

Keywords: *Melissa officinalis* L., clonal micropropagation, explant, *in vitro*.

References

1. Bykov V. A., Zayko V. A. and Konon N. T. *Atlas of medicinal plants of Russia*, 345 (M.:All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, 2006).
2. Nazarenko L. G. and Afonin A. V. *Volatile-oil-bearing plants on the south of Ukraine*, 144 (S.: Tauria, Simferopol, 2008).

3. Silva S., Sato A., Salgueiro Lage C. L., Silva San Gil R. A., Almeida Azevedo A. and Esquibel M. A. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. Produced under the Influence of growth regulators. *J. Braz. Chem.*, **16**, 1387 (2005).
4. Nevkrytaya N. V., Ametova E. D. and Marchenko M. P. The outcome of creating new variety of *Melissa officinalis* L. *Scientific Notes of Taurida National V. I. Vernadsky University, Biology and Chemistry series.*, **27 (66), 5**, 110 (2014).
5. Moradkhani H., Meftahizade H. and Naseri B. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *J. of Medicinal Plants Research*, **4, 25**, 2753 (2010).
6. Kushnir G. P. and Sarnatskaya V. V. *Microclonal propagation of plants. Theory and practice*, 270 (K.: Naukova dumka, Kiev, 2005).
7. Kalashnikova E. A. *Cell engineering of plants: Textbook*, 318 (M.: Publishing office: Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RGAU-MSHA), Moscow, 2012).
8. Galeş R., Preotu A. and Toma C. Aspects of floral structure and morphogenesis in *Melissa officinalis*. *Biology vegetable*. **2**, 15 (2010).
9. Ghiorghita G. I., Maftai D. E. St. and Nicuta D. N. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species. *Anal. stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza", Geneticasi Biologie Moleculara*, **5**, 119 (2005).
10. Meftahizade H., Moradkhani H., Naseri B., Lofti M. and Naseri A. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. *J. of Medicinal Plants Research*. **4, 3**, 240 (2010).
11. Meftahizade H., Lotfi M. and Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. *African J. of Biotechnology*. **9, 28**, 4314 (2010).
12. Mohebalipour N., Aharizad S., Mohammadi S. A., Motallebiazar A. R. and Arfi 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*, **10 (1)**, 280 (2012).
13. Tavares A. C., Pimenta M. C. and Gonsalves M. T. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots, *Plant Cell Repts.*, **15, 6**, 441 (1986).
14. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V. and Polischuk E. E. *Methods of tissue culture in the physiology and biochemistry of plants*, 488 (K: Naukova Dumka, Kyiv, 1980).
15. Yakimova O. V. and Yegorova N. A. Introduction to the culture *in vitro* *Melissa officinalis* L. *The perspectives of introduction of ornamental plants into botanical gardens and arboretums: materials of international conference*, 196 (V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, 2014).
16. Lakin G. F. *Biometrics: tutorial [for biol. universities] – 4th ed. Revised*, 352 (M.: Vysshaya shkola, Moscow, 1990).
17. Melnichuk M. D., Novak T. V. and Kunakh V. A. *Biotechnology of plants: textbook*, 520 (K.: Poligraf Consulting, Kiev, 2003).
18. Yakimova O. V. and Yegorova N. A. Peculiarities of *Melissa officinalis* L. explant morphogenesis at the first phase of micropropagation *in vitro*, *Proceedings of Kuban State Agrarian University*, **3 (60)**, 339 (2016).