

**УДК 633.81:57.085.2**

## **ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO* СОРТОВ МЯТЫ АЖУРНАЯ И БЕРГАМОТНАЯ**

**Загорская М. С., Егорова Н. А.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», Симферополь, Республика Крым, Россия  
E-mail: zagorskayamargo@gmail.com*

Целью исследования было изучение влияния состава питательной среды на морфометрические показатели эксплантов на 2-ом этапе клонального микроразмножения сортов Ажурная и Бергамотная. Испытано 14 модификаций питательной среды МС с различным содержанием регуляторов роста и сахарозы. Установлено, что на изученные показатели развития эксплантов влияли состав питательной среды и генотип. Наибольшее число побегов на эксплант у сорта Ажурная (3,4 шт.) было на среде МС с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК и 1 % сахарозы, тогда как у 'Бергамотной' (3,8 шт.) – на среде МС с 1,0 мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК<sub>3</sub> и 2 % сахарозы. Длина побегов и число узлов на них у 'Ажурной' были максимальными на безгормональной среде, а у 'Бергамотной' – на среде с 0,1 мг/л ТДЗ, 0,5 мг/л ИУК и 2 % сахарозы. Коэффициент размножения при этом достигал максимального значения у 'Ажурной' (12,6) на среде с 1,0 мг/л кинетина, 0,5 мг/л ИУК и 2 % сахарозы, а у 'Бергамотной' (9,8) – при добавлении 1,0 мг/л зеатина, 0,5 мг/л ИУК и 2 % сахарозы. На этих средах наблюдали ризогенез с частотой от 80 до 100 %, что позволяет исключить этап укоренения *in vitro* у изученных сортов мяты.

**Ключевые слова:** *Mentha spp.*, *in vitro*, клональное микроразмножение, питательная среда, регуляторы роста растений.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Род *Mentha* насчитывает более 600 видов, некоторые из них возделываются во многих странах мира, прежде всего как лекарственные и эфиромасличные растения. Популярность мяты в значительной степени связана с содержанием в эфирном масле ментола. Как его природный источник мята используется человеком довольно давно [1]. Спектр применения растительного сырья и эфирного масла мяты очень широк: это косметическая, пищевая промышленность, фармакология, а также медицина. Препараты из мяты оказывают антисептическое, седативное, умеренное спазмолитическое, желчегонное, антиэметическое действие.

За сравнительно короткий период времени формирования биотехнологии растений как самостоятельного направления науки достигнуты результаты, имеющие большое фундаментальное и прикладное значение. Наибольшее развитие получили технологии клонального микроразмножения и оздоровления растений. Возрастающий спрос на качественное эфирное масло мяты диктует необходимость разработки эффективных биотехнологических способов клонального

микроразмножения перспективных сортов. В НИИ сельского хозяйства Крыма в течение многих лет проводится работа по созданию сортов мяты с различным компонентным составом эфирного масла. Недавно получены и введены в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации высокоментольный сорт Ажурная и нементольный сорт Бергамотная [2]. Для них перспективна разработка приемов клонального микроразмножения *in vitro* с целью ускоренного размножения и получения качественного посадочного материала, а также депонирования *in vitro*.

К настоящему времени проведено достаточно много биотехнологических исследований разных видов мяты как отечественными, так и зарубежными учеными. Эти исследования касались вопросов индукции каллусо- и морфогенеза, клонального микроразмножения, депонирования *in vitro* и др. Так, были изучены особенности каллусообразования в культуре листовых эксплантов мяты перечной на питательных средах с различным содержанием селена [3]. Известно о разработке приемов холодого хранения при низких положительных температурах у четырех генотипов мяты из Южной Азии и получения медленно растущей культуры без полной остановки роста [4]. Проводятся также исследования по клональному микроразмножению. В качестве объектов для биотехнологических экспериментов использовались различные виды мяты: *Mentha piperita* [5–8], *M. viridis* [9], *M. canadensis* [10] и другие. В частности, проводились работы по изучению влияния типа экспланта и питательной среды на микроразмножение *in vitro* [7, 9, 11]. Имеются данные о разработке методики клонального размножения для некоторых эфиромасличных сортов мяты (Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6) [12]. Известно, что генотип оказывает большое влияние на эффективность морфогенетических процессов *in vitro*. Исследований по изучению различных аспектов микроразмножения для новых эфиромасличных сортов ранее не проводилось. Поэтому целью нашей работы была оптимизация состава питательной среды для 2-го этапа клонального микроразмножения *in vitro* для новых перспективных сортов мяты Ажурная и Бергамотная.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили ткани и органы мяты сортов Ажурная и Бергамотная. Сорт Ажурная – высокоментольный сорт (67,1–68,5 % ментола в эфирном масле), получен путем свободного переопыления полиплоида *Mentha canadensis* L. с коллекционными образцами дикорастущих видов. Нементольный сорт Бергамотная (основные компоненты эфирного масла – линалоол и линалил-ацетат) получен путем трехвидовой гибридизации (*M. citrata* Ehrh. × *M. longifolia* L.) × *M. spicata* L. [13]. Донорные растения выращивали в условиях закрытого грунта. Подготовку материалов и оборудования для работы в асептических условиях, питательных сред и анализ ростовых процессов проводили согласно изложенным в литературе рекомендациям [14, 15]. Экспланты культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [16] с добавлением БАП,

ИУК, зеатина, кинетина (кин), тидиазурона (ТДЗ), гибберелловой кислоты (ГК<sub>3</sub>) и 1–3 % сахарозы (сах.).

В культуру *in vitro* вводили меристемы с двумя листовыми примордиями (0,5–0,7 мм), выделенные из пазушных почек растений. На 2-ом этапе микроразмножения в качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом, вычлененные из побегов, развившихся из меристем. Микрочеренки культивировали в пробирках (с 10 мл питательной среды) в культуральной комнате при +26 °С, влажности 70 % и освещенности 2–3 клк с 16-часовым фотопериодом.

В процессе культивирования определяли различные морфобиологические показатели: число и длину побегов, количество листьев (узлов) на побеге, частоту ризогенеза, а также оценивали морфологию побегов. Коэффициент размножения (К. Р.) рассчитывали как количество микрочеренков, которое можно получить за одно субкультивирование, для этого среднее количество образовавшихся побегов умножали на среднее число узлов на побеге. Микрочеренкование побегов осуществляли каждые 40–45 дней. Все эксперименты воспроизведены не менее двух раз. Данные обработаны статистически, согласно общепринятым методам статистической обработки с использованием пакета программ Microsoft Office [Excel 2007].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс клонального микроразмножения состоит из нескольких этапов: введение в асептическую культуру, собственно микроразмножение, укоренение *in vitro*, адаптация к условиям *in vivo* [17]. При введении в культуру *in vitro* меристем мяты у изученных сортов наблюдали 100 % приживаемость эксплантов. Для культивирования использовали питательную среду МС482 с добавлением БАП (1,0 мг/л) и ИУК (0,5 мг/л), которую выделили на основании наших предварительных исследований [18]. После недели культивирования на этой среде отмечено развитие из меристем 1–3 побегов. В дальнейшем для 2 этапа (собственно микроразмножения) в качестве эксплантов использовали сегменты стебля с 1 узлом, которые получали при микрочеренковании основного и дополнительных побегов *in vitro*.

С целью совершенствования методики микроразмножения и оптимизации состава питательной среды было изучено влияние различных модификаций питательной среды Мурасиге и Скуга на развитие меристемных культур сортов мяты Ажурная и Бергамотная на 2-м этапе размножения *in vitro*. При этом были испытаны 14 модификаций сред МС с различным содержанием регуляторов роста (БАП, ИУК, ТДЗ, ГК<sub>3</sub>, кинетина, зеатина), сахарозы (1–3 %), макро- и микроэлементов, инозита.

Для второго этапа клонального микроразмножения сортов Ажурная и Бергамотная было характерно активное развитие основного и адвентивных побегов (1,5–3,8 шт. на эксплант) длиной от 28,9 до 81,3 мм. Также на некоторых средах развивались корни (рис. 1.). Изредка наблюдали образование небольшого каллуса у основания микропобега, снижение тургора и появление антоциановой окраски побегов.

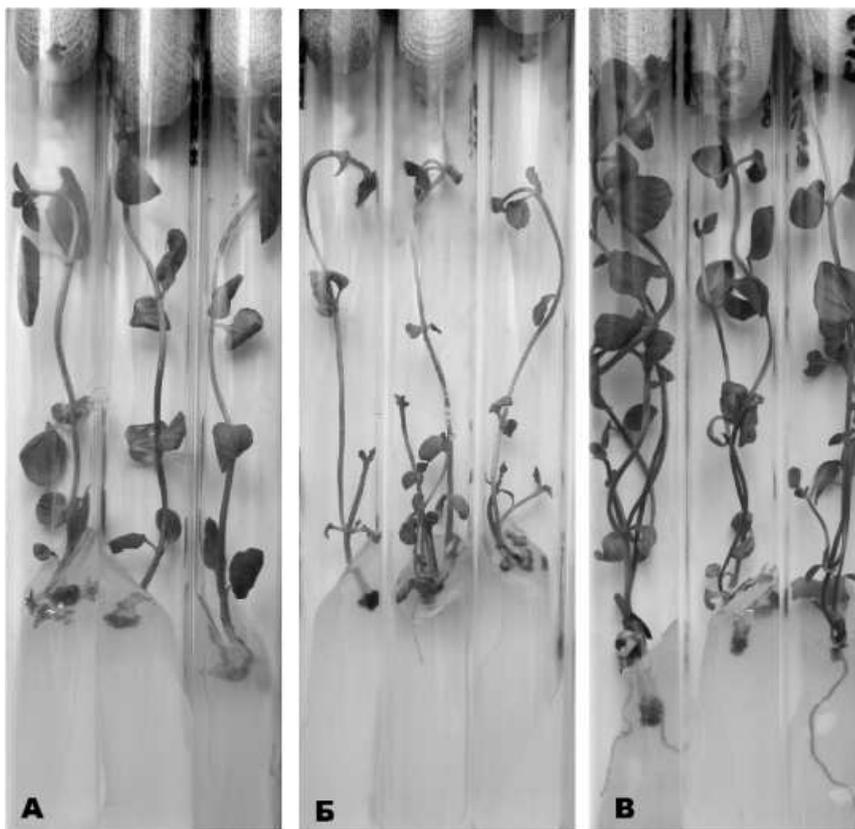


Рис. 1. Развитие меристемных культур мяты сорта Ажурная на 2-м этапе микроразмножения на различных модификациях питательной среды МС (А – МС482, Б – МСБ, В – МС542)

При помещении микрочеренков на модификации среды МС была установлена различная реакция изученных сортов. На безгормональной среде у 'Ажурной' отмечены самые длинные побеги (75,6 мм) и, соответственно, наибольшее количество узлов (табл. 1). Однако коэффициент размножения на этой среде (рис. 2) был не очень высоким, так как развивалось небольшое число побегов. У 'Бергамотной' на безгормональной среде количество побегов также было низким, но побеги были длинными (61,3 мм) с большим числом узлов. В связи с этим коэффициент размножения также был минимальным (5,2). Противоположные данные получили иранские ученые, которые предлагают использовать именно безгормональную среду для микроразмножения в связи с максимальными морфологическими показателями (длина побега 32 мм, число узлов 8 шт./побег) [7].

Мы также испытали рекомендованную для размножения некоторых эфиромасличных сортов мяты питательную среду с БАП (1,0 мг/л), ИУК (0,5 мг/л), кинетином (0,1 мг/л) и 3 % сахарозы (МСБ) [12]. Однако культивирование на этой среде не способствовало повышению коэффициента размножения для сорта

Ажурная, а, наоборот, привело к его достоверному снижению по сравнению с МСб/г. В то же время у сорта Бергамотная наблюдалось достоверное увеличение К.Р. и остальных морфометрических показателей (табл. 1,2, рис. 2).

**Таблица 1**  
**Влияние состава питательной среды на количество и длину микропобегов на 2-ом этапе микроразмножения сортов мяты**

№ питательной среды	Добавки в составе питательной среды МС (мг/л)	Кол-во побегов, шт./эксплант		Длина побега, мм	
		‘Ажурная’	‘Бергамотная’	‘Ажурная’	‘Бергамотная’
МСб/г	сах. 2 %	1,6±0,1	1,5±0,1	75,6±5,3	61,3±6,2
МСБ	БАП (1,0) + ИУК (0,5) + кин (0,1), сах. 3 %	2,4±0,2	2,3±0,2	45,7±4,7	63,4±5,9
МС482	БАП (1,0) + ИУК (0,5), сах. 2 %	1,9±0,1	2,0±0,1	49,6±3,1	57,8±3,5
МС482а	БАП (1,0) + ИУК (0,5), сах. 1 %	3,4±0,4	2,6±0,3	28,9±2,6	42,1±4,3
МС482б	БАП (1,0) + ИУК (0,5), сах. 2 %, инозит (50,0)	2,6±0,5	2,2±0,2	49±5,2	63,9±5,2
МС487	БАП (1,0) + ГК <sub>3</sub> (0,5), сах. 2 %	2,0±0,1	3,8±0,3	52,4±5,0	39,6±2,8
МС540	кин (1,0) + ИУК (0,5), сах. 2 %	3,3±0,5	1,8±0,1	55,0±4,9	67,1±6,7
МС541	ТДЗ (1,0) + ИУК (0,5), сах. 2 %	3,2±0,4	2,2±0,1	46,5±3,2	64,6±4,4
МС542	зеатин (1,0) + ИУК (0,5), сах. 2 %	3,2±0,5	2,5±0,2	54,5±4,8	66,3±5,5
МС543	ТДЗ (0,1) + ИУК (0,5), сах. 2 %	2,7±0,2	1,6±0,0	59,0±3,8	81,3±4,5
МС3	ТДЗ (0,5) + ИУК (0,5), сах. 2 %	2,3±0,2	1,5±0,1	51,5±5,1	71,8±7,0
МС4	ТДЗ (0,5), сах. 2 %	2,4±0,2	2,3±0,2	44,5±5,0	50,5±5,7
МС5	½ МС + ТДЗ (0,5) + ИУК (0,5), сах. 2 %	2,5±0,3	1,7±0,2	34,9±4,5	62,6±7,6
МС6	ТДЗ (0,5) + ГК <sub>3</sub> (0,5), сах. 2 %	2,8±0,2	2,1±0,2	57,0±4,3	71,6±5,1
МС7	ТДЗ (0,5) + ИУК (0,5), сах. 1 %	2,9±0,2	1,8±0,1	43,8±4,1	55,9±6,0

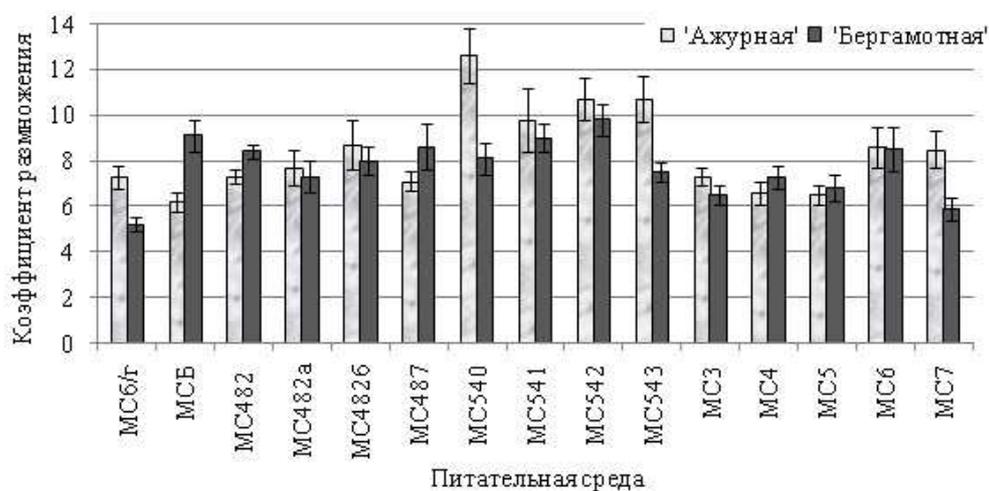


Рис. 2. Влияние состава питательной среды на коэффициент размножения двух сортов мяты на 2-ом этапе клонального микроразмножения *in vitro*. Состав питательных сред см. в табл. 1.

На среде MC482 (ранее использованной нами для микроразмножения некоторых сортов мяты) у сорта Ажурная наблюдали рост количества побегов (до 1,9 шт./эксплант), однако снижение их длины и числа узлов. Это не повлияло на коэффициент размножения по сравнению с безгормональной средой. У 'Бергамотной' длина побегов и количество узлов оказались высокими, и К. Р. был достоверно выше (8,4), чем на среде MC6/г (5,2). Добавление в среду гибберелловой кислоты (MC487) вместо ИУК вызвало рост числа побегов: у 'Бергамотной' этот показатель достиг максимального значения (3,8). Это способствовало достоверному увеличению К. Р. у данного сорта по сравнению с MC6/г, однако К. Р. был примерно на одном уровне со средами, используемыми для других эфиромасличных сортов мяты (МСБ, MC482). При этом у 'Ажурной' выявлена тенденция к снижению К. Р. и остальных параметров по сравнению с этими средами. Показано, что у обоих сортов на данной среде отсутствовала способность к ризогенезу (табл. 2).

Добавление в питательную среду кинетина вместо БАП (MC540–MC482) способствовало увеличению количества побегов у сорта Ажурная, что обеспечило максимальный К. Р. – 12,6. У сорта Бергамотная такое изменение состава среды достоверно не повлияло на изученные показатели. Также на среде MC540 выявлена высокая частота ризогенеза у обоих сортов, которая достигла 93,3 % (см. табл. 2).

Добавление в питательную среду зеатина (1,0 мг/л) вместо БАП (MC542–MC482) способствовало значительному увеличению количества побегов и достоверному повышению К. Р. у обоих сортов. При этом у 'Бергамотной' на среде MC542 был максимальный К. Р. (9,8). Частота корнеобразования на этой среде составила от 80 до 100 %. (табл. 2.). С целью упрощения состава среды была проанализирована возможность снижения содержания углеводов в питательной

среде МС482. Установлено, что уменьшение концентрации сахарозы до 1 % (МС482а – МС482) способствовало увеличению количества побегов, однако снижению их длины и числа узлов. Поэтому К. Р. достоверно не изменился. При этом у обоих сортов наблюдали увядание и снижение тургора многих побегов. Уменьшение вдвое концентрации инозита в питательной среде (МС482б – МС482) привело к повышению количества побегов у обоих сортов. Длина побегов и количество узлов на них достоверно не изменились. Коэффициент размножения также достоверно не изменился, хотя у сорта Ажурная наблюдалась тенденция к его увеличению.

Таблица 2

**Влияние состава питательной среды на число узлов на побеге и частоту корнеобразования на втором этапе микроразмножения двух сортов мяты**

№ питательной среды*	Количество узлов, шт./побег		Частота корнеобразования, %	
	‘Ажурная’	‘Бергамотная’	‘Ажурная’	‘Бергамотная’
МСб/Г	4,4±0,3	3,3±0,3	100,0	100,0
МСБ	2,6±0,2	4,0±0,4	35,0±3,1	10,0±0,9
МС482	3,6±0,2	4,0±0,2	37,9±3,3	42,1±3,8
МС482а	2,3±0,2	2,9±0,3	15,8±1,8	15,0±1,2
МС482б	3,4±0,3	3,7±0,4	16,7±1,4	31,6±2,9
МС487	3,6±0,3	2,3±0,1	0,0	0,0
МС540	3,8±0,3	4,5±0,4	93,3±8,8	93,3±9,1
МС541	3,0±0,1	4,0±0,2	20,5±2,2	28,5±2,0
МС542	3,3±0,3	3,8±0,3	80,0±7,7	100,0
МС543	3,9±0,2	4,6±0,2	79,4±6,5	91,6±9,1
МС3	3,0±0,2	4,1±0,3	36,8±3,4	80,0±7,5
МС4	2,6±0,2	3,1±0,2	31,5±2,9	45,0±4,3
МС5	2,5±0,2	3,9±0,4	70,0±6,9	73,6±7,2
МС6	3,0±0,1	3,9±0,2	5,5±0,9	0,0
МС7	2,8±0,1	3,3±0,2	20,0±1,5	40,0±3,6

\* состав питательных сред см. табл.1.

В последнее время при оптимизации питательных сред для индукции процесса морфогенеза у многих видов растений используют высокоактивный цитокинин – тидиазурон [19]. Мы также испытали его влияние на развитие эксплантов мяты. Сравнение действия разных цитокининов (введенных в питательные среды совместно с ИУК) при их одинаковой концентрации (среды МС482, МС540, МС541, МС542) не выявило существенного преимущества ТДЗ. Так, количество побегов у сорта Ажурная на всех средах с ТДЗ (МС541, МС543, МС3, МС4, МС5, МС6, МС7) было выше, чем на МС482, однако число узлов достоверно не отличалось. У ‘Бергамотной’ ТДЗ также достоверно не повлиял на количество побегов. Коэффициент размножения по сравнению со средой МС482 у ‘Бергамотной’ увеличился только на среде МС541 (1,0 мг/л ТДЗ), однако побеги были с пониженным тургором. Снижение концентрации тидиазурана до 0,1 мг/л (МС543–МС482) привело у ‘Ажурной’ к достоверному росту К. Р. до 10,7. Также были установлены высокая частота ризогенеза 79,4–91,6 % и хорошее развитие корневой системы у обоих сортов. Добавление в среду только ТДЗ (МС 4 – МС482) привело к снижению К. Р. у сортов. В работе индийских ученых на аналогичной среде выявили отсутствие развития побегов [5]. Снижение концентрации макро- и микроэлементов при введении в среду 0,5 мг/л ТДЗ (МС5–МС482) не только достоверно снизило К. Р., но и привело к появлению у ‘Ажурной’ единичных случаев витрификации, каллусообразования и слабого развития побегов. У Бергамотной такой реакции не наблюдали. Использование гибберелловой кислоты вместе с ТДЗ (МС6–МС482) вызвало увеличение К. Р. у сортов, но и индукцию каллуса у ‘Ажурной’ (11,1 %), а также появление слабых побегов и отсутствие ризогенеза у ‘Бергамотной’.

При снижении концентрации сахарозы до 1 % и замене БАП на тидиазурон в концентрации 0,5 мг/л (МС7 – МС482) коэффициент размножения у ‘Ажурной’ достоверно увеличился до 8,5, а у сорта Бергамотная был достоверно ниже контроля (5,9). Также было отмечено угнетение развития листьев у обоих сортов.

Таким образом, в ходе исследования при испытании 14 модификаций питательной среды МС было выявлено различное влияние одной и той же среды на коэффициент размножения у изученных сортов. Так, для сорта Ажурная на 2-ом этапе размножения среда МС540 была оптимальной, так как обеспечивала максимальный коэффициент размножения (12,6). Но для сорта Бергамотная лучшей средой оказалась МС542 (К.Р. 9,8). Однако при больших объемах работы удобно использовать универсальную питательную среду для размножения нескольких сортов. Такой средой, по-видимому, является МС542, содержащая зеатин и ИУК. У ‘Бергамотной’, как было указано выше, на этой среде был максимальный К. Р., а у ‘Ажурной’ отмечено недостоверное снижение этого показателя по сравнению с МС540. Установлено, что на среде МС540 у обоих сортов наблюдалось активное корнеобразование. Такой показатель, как частота ризогенеза, не является основным на 2-ом этапе микроразмножения. Однако определение питательной среды, которая обеспечивает одновременно максимальный К. Р. и высокую частоту формирования корней, позволит исключить этап укоренения *in vitro* и сразу переносить укорененные растения на адаптацию. С этой точки зрения питательная среда МС542

с добавлением 1,0 мг/л зеатина и 0,5 мг/л ИУК является наиболее подходящей для изученных сортов, так как ее использование не только обеспечивает высокий К. Р., но и может ускорить и удешевить процесс микроразмножения за счет одновременной стимуляции развития побегов и корней.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние состава питательной среды на морфометрические показатели эксплантов на 2-ом этапе микроразмножения сортов мяты Ажурная и Бергамотная. При испытании 14 вариантов питательной среды МС выявлены различные морфогенетические реакции у изученных сортов. Наибольшее число побегов на эксплант у сорта Ажурная (3,4 шт.) было на среде МС с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК и 1 % сахарозы, тогда как у 'Бергамотной' (3,8 шт.) – на среде МС с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК<sub>3</sub> и 2 % сахарозы. Длина побегов и число узлов на них у 'Ажурной' были максимальными на безгормональной среде, а у 'Бергамотной' – на среде с 0,1 мг/л ТДЗ, 0,5 мг/л ИУК и 2 % сахарозы. Коэффициент размножения при этом достигал максимального значения у 'Ажурной' (12,6) на среде с 1,0 мг/л кинетина, 0,5 мг/л ИУК и 2 % сахарозы, а у 'Бергамотной' (9,8) – при добавлении в питательную среду 1,0 мг/л зеатина, 0,5 мг/л ИУК и 2 % сахарозы. На этой среде наблюдали ризогенез с частотой от 80 до 100 %, что позволяет исключить этап укоренения *in vitro* у изученных сортов. Питательная среда с добавлением 1,0 мг/л зеатина и 0,5 мг/л ИУК, по-видимому, является наиболее универсальной для изученных сортов, так как обеспечивает высокий коэффициент размножения и одновременно стимулирует развитие корней.

#### Список литературы

1. Паштецкий В. С. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра / В. С. Паштецкий, Н. В. Невкрытая, А. В. Мишнев, Л. Г. Назаренко. – Симферополь: АРИАЛ, 2017. – 243 с.
2. Шульга Е. Б. Новые сорта мяты для Крыма и других регионов юга России / Е. Б. Шульга // Таврический вестник аграрной науки. – 2017. – № 1 (9). – С. 28–36.
3. Бугара И. А. Получение каллусных культур *Mentha piperita* L. и их цитологическая характеристика при выращивании на питательных средах с различной концентрацией селена / И. А. Бугара, О. А. Мальцева // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Сер. Биология, химия. – 2011. – Т. 24 (63), № 4. – С. 17–23.
4. Islam T. In vitro conservation of four Mint (*Mentha* spp.) accession / T. Islam, S. Leunufna, D. P. Dembele [et al.] // Plant Tissue Cult. – 2003. – Vol. 13 (1). – P. 37–46.
5. Thul S. T. An efficient protocol for high-frequency direct multiple shoot regeneration from internodes of peppermint (*Mentha x piperita*) / S. T. Thul, A. K. Kukreja // Natural Product Communications. – 2010. – Vol. 5, No.12. – P. 1945–1946.
6. Laslo V. Use of nodal explants in «in vitro» micropropagation of *Mentha piperita* L. / V. Laslo, M. Zapartan, S. Vicas, E. Agud // Analele universitatii din Oradea, Fascicula protectia mediului. – 2011. – Vol. 16. – P. 247–251.
7. Bolouk S. G. In vitro culture of the peppermint plant (*Mentha piperita*) without the use of hormones / S. G. Bolouk, S. K. Kazemitabar, J. M. Sinaki // International journal of agriculture and crop sciences. – 2013. – Vol. 6 (18). – P. 1279–1283.
8. Mehta J. An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L. (Peppermint) / J. Mehta, R. Naruka, M. Sain [et al.] // Asian journal of plant science and research. – 2012. – Vol. 2 (4). – P. 518–523.

9. Raja H. D. In vitro propagation of *Mentha viridis* L. from nodal and shoot tip explants / H. D. Raja, D. I. Arockiasamy // *Plant tissue cult. & Biotech.* – 2008. – Vol. 18 (1). – P. 1–6.
10. Gomes H. T. Assessment of mint (*Mentha* spp) species for large-scale production of plantlets by micropropagation / H. T. Gomes, P. M. Bartos, A. E. Marins [et al.] // *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* – 2015. – Vol. 37, № 4. – P. 405–410.
11. Егорова Н. А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: микрклональное размножение, синтез продуктов вторичного метаболизма *in vitro* / Н. А. Егорова // *Физиология растений и генетика.* – 2014. – Т. 46, № 3. – С. 187–201.
12. Бугара И. А. Индуцированный морфогенез и клональное микроразмножение перспективных сортов мяты: автореф. дис... канд. биол. наук: спец. 03.00.20 «Биотехнология» / И. А. Бугара – Ялта, 2006. – 21 с.
13. Шульга Е. Б. Новый высокопродуктивный сорт мяты Ажурная / Е. Б. Шульга // *Таврійський вісник аграрної науки.* – 2013. – № 1. – С. 56–60.
14. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Саранцкая, В. Е. Полищук. – Киев: Наук. думка, 1980. – 488 с.
15. Бугаенко Л. А. Размножение растений *in vitro* и получение безвирусного посадочного материала (Методические указания) / Л. А. Бугаенко, Н. А. Егорова. – Симферополь: ЮФ «КАТУ» НАУ, 2005. – 28 с.
16. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
17. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие / Р. Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
18. Загорская М. С. Влияние сорта и длительности культивирования на клональное микроразмножение мяты *in vitro* / М. С. Загорская, Н. А. Егорова // *Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.* – 2017. – С. 205–208.
19. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур / И. В. Митрофанова. – Киев: Аграрна наука, 2011. – 344 с.

## **OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION FOR THE CLONAL MICROPROPAGATION *IN VITRO* MINT CULTIVARS AZHURNAYA AND BERGAMOTNAYA**

***Zagorskaya M. S., Yegorova N. A.***

***Federal State Budget Scientific Institution «Research Institute of Agriculture of Crimea»,  
Simferopol, Russia  
E-mail: zagorskayamargo@gmail.com***

*Mentha* (also known as mint) is medicinal, essential oil and spicy aromatic plant in the family Lamiaceae widely distributed worldwide. To increase the efficiency of breeding process and seed production of this valuable crop, it is necessary to develop biotechnological methods of reproduction and sanitation. During a relatively short period of time when plant biotechnology was formed as an independent branch of science, results having great fundamental and applied importance were achieved. Clonal micropropagation and plant health improvement are best developed technologies nowadays. The increasing demand for high quality mint essential oil makes it necessary to develop effective biotechnological methods for clonal micropropagation of promising

varieties. Scientific work on creation mint cultivars with various component compositions of essential oil has been carried out in Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Agriculture of Crimea" for many years. Highly menthol mint cultivar Azhurnaya and non-menthol cultivar Bergamotnaya are recently received and introduced into the State Register of Breeding Achievements of the Russian Federation. For these cultivars, it is promising to develop clonal micropropagation techniques *in vitro* for the purpose of accelerated reproduction and production of quality planting material, as well as *in vitro* preservation.

The aim of our research was to study the influence of nutrient medium composition on the morphometric parameters of explants at the 2<sup>nd</sup> stage of clonal micropropagation of cultivars Azhurnaya and Bergamotnaya. Fourteen modifications of MS medium with different content of growth regulators (BAP, IAA, GA<sub>3</sub>, kinetin, TDZ, zeatin) and sucrose (1–3 %) were tested. The studies revealed that composition of nutrient medium and genotype had influence on the studied parameters of explants development (segments of the stem with one node). The greatest number of shoots per explant for Azhurnaya variety (3.4 pcs.) was on MS medium supplemented with BAP (1.0 mg/l), IAA (0.5 mg/l) and 1 % sucrose, while for Bergamotnaya (3.8 pcs.) – on MS medium supplemented with BAP (1.0 mg/l), GA<sub>3</sub> (0.5 mg/l) and 2 % sucrose. Length of shoots and number of nodes on them for Azhurnaya were maximum using hormone-free medium, while for Bergamotnaya – using medium with TDZ (0.1 mg/l), IAA (0.5 mg/l) and 2 % sucrose. Micropropagation by cutting main and adventitious shoots was used for multiplication *in vitro* at the 2<sup>nd</sup> stage. The multiplication index in this case reached the maximum value for Azhurnaya (12.6) on medium with 1.0 mg/l of kinetin, 0.5 mg/l of IAA and 2 % sucrose, and for Bergamotnaya (9.8) – by adding 1.0 mg/l of zeatin, 0.5 mg/l of IAA, and 2 % sucrose to culture medium. Rhizogenesis with a frequency of 80 to 100 % was observed on these media. This fact allows to exclude the phase of rooting *in vitro* in studied mint cultivars.

**Keywords:** *Mentha* spp., *in vitro*, clonal micropropagation, nutrient medium, plant growth regulators.

### References

1. Pashetskyy V. S., Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V. and Nazarenko L. G. *Essential oil industry in the Crimea. Yesterday, today, tomorrow*, 243 p. (Simferopol: Publ. house "ARIAL", 2017).
2. Shulga E. B. New varieties of mint for the Crimea and other southern regions of Russia, *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*, **1** (9), 28 (2017).
3. Bugara I. A. and Maltseva O. A. Receive of *Mentha piperita* L. callus culture and their cytological characteristics when grown in nutrient medium with different concentrations of selenium, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Series: Biology, chemistry*, **24** (63), **4**, 17 (2011).
4. Islam T., Leunufna S., Dembele D. P. and Keller J. E. R. *In vitro* conservation of four Mint (*Mentha* spp.) accession, *Plant Tissue Cult.*, **13** (1), 37 (2003).
5. Thul S. T. and Kukreja A. K. An efficient protocol for high-frequency direct multiple shoot regeneration from internodes of peppermint (*Mentha x piperita*), *Natural Product Communications*, **5**, **12**, 1945 (2010).
6. Laslo V., Zapartan M., Vicas S. and Agud E. Use of nodal explants in «*in vitro*» micropropagation of *Mentha piperita* L., *Analele universitatii din Oradea, Fascicula protectia mediului*, **16**, 247 (2011).
7. Bolouk S. G., Kazemitabar S. K. and Sinaki J. M. *In vitro* culture of the peppermint plant (*Mentha piperita*) without the use of hormones, *International journal of agriculture and crop sciences*, **6** (18), 1279 (2013)

8. Mehta J., Naruka R., Sain M., Dwivedi A., Sharma D. and Mirza J. An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L. (Pippermint), *Asian journal of plant science and research*, **2** (4), 518 (2012).
9. Raja H. D. and Arockiasamy D. I. *In vitro* propagation of *Mentha viridis* L. from nodal and shoot tip explants, *Plant tissue cult. & Biotech*, **18** (1), 1 (2008).
10. Gomes H. T., Bartos P. M., Marins A. E., De Olivera S. O. and Scherwinski-Pereira J. E. Assessment of mint (*Mentha* spp) species for large-scale production of plantlets by micropropagation, *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **37**, 4, 405 (2015).
11. Yegorova N. A. Some aspects of essential oil plants biotechnology: microclonal propagation, synthesis of secondary metabolites *in vitro*, *Fiziologiya rastenij i genetika Physiology of Plants and Genetics*, **46**, 3, 187 (2014).
12. Bugara I. A. Induced morphogenesis and clonal micropropagation of promising mint varieties, abstract of diss. cand. biol. sci., 21 (Yalta, 2006).
13. Shulga E. B. The new high-productive mint variety Ajhurna, *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*, **1**, 55 (2013).
14. Kalinin F. L., Sarantskaya V. V. and Polischuk V. E. *Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry*, 488 p. (Kiev: Nauk. dumka, 1980).
15. Bugaenko L. A and Yegorova N. A. *Reproduction of plants in vitro and obtaining of a virus-free planting material (Methodical instructions)*, 28 p. (Simferopol: South Branch "Crimean Agrotechnological University" of the National Agrarian University, 2005).
16. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, **15**, 3, 473 (1962).
17. Butenko R. G. *Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology on their basis: a textbook*, 160 p. (M: FBK-PRESS, 1999).
18. Zagorskaya M. S. and Yegorova N. A. Influence of cultivar and duration of cultivation on mint clonal micropropagation *in vitro*, *Proceedings of the International conference dedicated to 85<sup>th</sup> anniversary of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus*, 205 (2017).
19. Mitrofanova I. V. *Somatic embryogenesis and organogenesis as a base of biotechnology of perennial horticultural plants obtaining and conservation*, 344 p. (Kiev: Agrarna nauka Publ., 2011).