

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 582.949.27:58.085+57.085.2+633.81

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* *Satureja montana* L.

Наталья Алексеевна Егорова, Мария Сергеевна Коваленко

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

E-mail: yegorova.na@mail.ru

Чабер горный (*Satureja montana* L.) – ценное эфиромасличное и лекарственное растение, продукты переработки которого применяются в медицине в качестве противомикробного, противогрибкового, спазмолитического, противовирусного средства, в основном благодаря высокому содержанию карвакрола в эфирном масле. Для внедрения новых высокопродуктивных сортов в производство актуально использование биотехнологических приемов размножения. Цель работы – изучение особенностей развития эксплантов на основных четырех этапах размножения и разработка протокола клонального микроразмножения на примере трех сортов *S. montana*. Подобраны питательные среды для введения в культуру *in vitro* эксплантов (сегментов стебля с 1 узлом) для сортов Аргентум и Электрум – среда Мурасиге и Скуга (MS) с 0,5 мг/л кинетина; и сорта Мельхиор – MS с 0,5 мг/л кинетина и гибберелловой кислоты (GA₃). Установлено, что на 2-м этапе микроразмножения максимальные коэффициенты размножения (4,2–5,6 за одно субкультивирование) у сортов Электрум и Аргентум обеспечивала среда MS с кинетином (0,5 мг/л) и GA₃ (0,5 мг/л), а у сорта Мельхиор – безгормональная среда MS. При культивировании на этих средах, в отличие от сред с 6-бензиламинопурином и тидиазурином, не наблюдали нежелательной витрификации побегов и каллусообразования. Выявлены генотипические различия – из трех изученных сортов более высокие морфометрические параметры и коэффициент размножения наблюдали у ‘Электрума’. Для укоренения *in vitro* рекомендована питательная среда ½ MS с 0,5 мг/л индолил-3-масляной кислоты, на которой частота укоренения достигала 93,8 %. При адаптации *ex vitro* показана наибольшая эффективность использования в качестве субстрата перлита, который обеспечивал максимальную частоту приживаемости (до 88,2%) и массу растений. В результате исследований впервые разработан протокол клонального микроразмножения *S. montana*, который предназначен для ускоренного размножения ценных образцов в селекции и получения качественного посадочного материала для сельскохозяйственного производства.

Ключевые слова: чабер горный; размножение *in vitro*; сорт; эксплант; питательная среда; укоренение *in vitro*; адаптация *ex vitro*

Введение

Одно из ценных эфиромасличных и лекарственных растений чабер горный (в некоторых источниках – зимний) (*Satureja montana* L.) представляет собой невысокий многолетний полукустарник из семейства Яснотковые (Lamiaceae). Ареал его распространения довольно широк, включает многие страны Средиземноморского региона, Ближнего Востока и Северной Америки, где он растет как в диком виде, так и возделывается на производственных плантациях (Vladic et al., 2017). Виды рода *Satureja* среди лекарственных растений вызывают большой интерес, поскольку содержат многие биоактивные соединения – эфирные масла, фенольные соединения, флавоноиды, танины, стероиды, каротиноиды, дубильные вещества и др. (Тере, Cilkiz, 2015). Содержание эфирного масла у чабера горного не очень высоко, в среднем 0,6% на сырую массу. В его состав входят фенолы (карвакрол, тимол), терпеновые углеводороды (камфен, сабинен, α-терпинен и др.), оксиды (1,8-цинеол, цис-линалооксид), спирты (линалоол, борнеол), сложные эфиры (линалилацетат, геранилацетат), кетон (камфора). Основная ценность эфирного масла заключается,

прежде всего, в высоком содержании карвакрола – у сортов селекции НИИСХ Крыма оно достигает 72,6–78,4 % (Pashtetskiy et al., 2021).

Благодаря присутствию в растительном сырье биологически активных компонентов, чабер горный, так же как и ряд других видов рода *Satureja*, часто используется в народной и традиционной медицине. Во многих работах показано, что эфирное масло *S. montana*, в основном благодаря наличию карвакрола, обладает противомикробными, противогрибковыми, антиоксидантными, спазмолитическими, противовирусными и противодиарейными свойствами (Jafari et al., 2016; Hudz et al., 2020). Так, в исследовании О.Н. Постниковой с соавт. (2022) установлено, что эфирное масло *S. montana* проявляло высокую антимикробную активность в отношении некоторых штаммов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Его использование позволяет эффективно защищать организм от окислительного стресса, повреждения свободными радикалами, воспалений и микробных инфекций. Продукты переработки чабера применяют при лечении заболеваний кожи, опорно-двигательного аппарата, верхних дыхательных путей, стоматита, цистита и др. Есть данные, что виды чабера могут обеспечить естественную профилактику или лечение диабета, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, болезни Альцгеймера (Rafie Hamidpour et al., 2019).

Сырье и эфирное масло *S. montana* также применяется как ароматизатор и натуральный консервант в перерабатывающей промышленности, в кулинарии при приготовлении мясных изделий, сухофруктов и других продуктов, их добавляют в парфюмерные композиции пряно-бальзамического направления (Alirezalu et al., 2020).

Имеются сведения о разработке подходов для использования эфирного масла *S. montana* для производства биопестицидов, активных против насекомых-вредителей *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Leptinotarsa decemlineata* и нематоды *Meloydogine javanica* (Navarro-Rocha et al., 2020).

Высокая перспективность применения растительного сырья для получения фармацевтических, пищевых и косметических продуктов способствует научному и практическому интересу к *S. montana* и другим видам этого рода. Активно проводятся исследования, посвященные биохимическим особенностям растений чабера, агротехнологиям выращивания, селекции (Hudz et al., 2020, Ushakova et al., 2019, Abdelshafeek et al., 2023). В последние годы в ФГБУН «НИИСХ Крыма» были выведены 3 новых высокопродуктивных сорта чабера горного (Platonova, 2015). Однако для быстрого внедрения этих сортов в производство, а также для ускоренного размножения перспективных образцов из естественных популяций или коллекций необходимы эффективные методы размножения. Имеющиеся данные по традиционному размножению семенами или черенкованием чабера горного свидетельствуют, что первый метод, к сожалению, не позволяет сохранить генетическую однородность получаемых сеянцев, а при размножении зелеными черенками выявлена низкая укореняемость и ряд других недостатков (Zheleznyak, Vorniku, 2019).

Известно, что многие проблемы традиционных приемов размножения можно преодолеть, используя клональное микроразмножение *in vitro* (Cardoso et al., 2018, Yegorova, 2021). В литературных источниках есть данные об исследованиях, посвященных оптимизации состава питательных сред и условий культивирования для некоторых этапов микроразмножения ряда видов *Satureja*, – *S. hortensis* (Khlebnikova, Cherednichenko, 2018), *S. punctata* (Teshome et al., 2016), *S. khuzistanica* (Mirjani et al., 2018), *S. avromanica* (Mozafari et al., 2015), *S. thymbra* (Sarropoulou, Maloupa 2019), *S. abyssinica* (Teshome et al., 2017). При введении *in vitro* эти авторы чаще всего культивировали апексы побегов или узловыe сегменты. В ряде работ нередко

использовали проростки из семян *in vitro* (Navroski et al., 2014, Teshome et al., 2016), что, на наш взгляд, не способствует получению посадочного материала, генетически идентичного исходным растениям. Во многих публикациях для получения максимального числа побегов у этих видов чабера рекомендуют введение в среду БАП (Mozafari et al., 2015; Sarropoulou, Maloupa 2019), а также этого цитокинина совместно с НУК (Teshome et al., 2016) или ИМК и N6-(2-изопентенил) аденина (Mirjani et al., 2018). Судя по имеющимся сведениям, регуляторы роста для укоренения побегов *in vitro* также весьма видоспецифичны – так, для индукции ризогенеза у *S. avromanica* использовали ИМК (Mozafari et al., 2015), у *S. hortensis* НУК (Navroski et al., 2014), а у *S. khuzistanica* оба этих ауксина (Mirjani et al., 2018).

Интересные данные представили болгарские ученые, которые при анализе биохимического состава полученных *in vitro* (из семян) растений *S. montana* выявили значительные количества общих фенолов и флавоноидов, сопоставимые с таковыми у исходных растений *in vivo*. Данные факты позволили им констатировать, что растения данного вида чабера *in vitro* являются потенциальной биотехнологической матрицей для производства ценных биологически активных веществ (Vrancheva et al., 2022). Для развития такого перспективного биотехнологического направления, как получение вторичных метаболитов из различных культивируемых объектов (в том числе культуры пролиферирующих побегов) необходимы методики быстрого микроклонирования в асептических условиях, что может быть экологически обоснованной альтернативой получению этих соединений из дикорастущих популяций.

Перечисленные факты свидетельствуют о перспективности создания методики размножения *in vitro* для чабера горного, необходимой, прежде всего, для ускоренной мультипликации ценных образцов и сортов, а также для формирования альтернативных биотехнологических приемов получения БАВ. Однако в доступной литературе сведений о таких исследованиях мы не выявили. В связи с этим целью данной работы было изучение особенностей развития эксплантов на основных четырех этапах размножения и разработка протокола клонального микро размножения *S. montana*.

Объекты и методы исследования

Растительными объектами для исследования служили 3 сорта чабера горного (*Satureja montana* L.) селекции ФГБУН «НИИСХ Крыма» – Аргентум, Электрум и Мельхиор. Исходные донорные растения, полученные из коллекции генофонда пряно-ароматических, эфиромасличных и лекарственных растений ФГБУН «НИИСХ Крыма» (УНУ № 507515 <http://www.ckp-rf.ru>), выращивали в условиях закрытого грунта.

Экспланты культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), дополненной регуляторами роста растений – кинетин (Kin), тидиазурон (TDZ), гибберелловая кислота (GA₃) (CDH, Индия), бензиламинопурин (BAP) (NeoFroxx, Германия), β-индолил-3-масляная кислота (IBA), β-индолил-3-уксусная кислота (IAA); α-нафтилуксусная кислота (NAA) (Merck, Германия).

В некоторых опытах использовали среду MS без добавления регуляторов роста (MS h/f). В качестве гелеобразователя в среды добавляли агар-агар для микроклонирования (Fujian Putian, Китай). Питательные среды разливали в закрытые ватно-марлевыми пробками пробирки (16 × 150 мм) и стерилизовали при 121 °C 20 минут в горизонтальном автоклаве СПГА-100-1-НН (АО «ТЗМОИ», Россия).

В качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом. Для стерилизации растительного материала применяли этанол («Росспиртпром», Россия), препарат ДезТаб («Ахлор Донге ЛТД», Китай), содержащий 43 % C₃O₃N₃Cl₃, 20 % NaC₃O₃N₃Cl₂ (активный хлор – 48–53 %). Все процедуры при введении *in vitro* и

микрочеренковании побегов проводили в условиях ламинарного бокса БАВнп-01 «Ламинар-С»-1,2 (Lamsystems, Россия).

Культивирование осуществляли в культуральной комнате при температуре 24–26°C, относительной влажности воздуха 70 % и освещенности 2–3 клк с фотопериодом 16 часов.

При адаптации *ex vitro* использовали прозрачные пластиковые стаканы объемом 180 мл, наполненные субстратом (торф, перлит, дерновая земля в различных соотношениях). Растения выращивали в адаптационной комнате при 22–24°C, освещении светодиодными лампами дневного света с продолжительностью светового периода 16 ч (освещенность 2,5–3,0 клк), влажности воздуха 70–80 %. Для поддержания высокой влажности первые 2 недели растения накрывали прозрачными пластиковыми стаканами на 100 мл. Каждые 2–3 дня растения поливали раствором питательной смеси Кнопа.

При анализе культивируемых *in vitro* объектов определяли: количество стерильных/развивающихся эксплантов (% от анализируемых), количество оводненных побегов (% от анализируемых), количество (шт.) и длину (см) побегов, количество узлов на побег (шт.), коэффициент размножения (произведение количества побегов/на эксплант на число узлов/на побег), частоту укоренения (% от анализируемых), количество (шт.) и длину (см) корней. В процессе адаптации *ex vitro* анализировали: приживаемость (% от числа анализируемых), количество побегов (шт./растение), длину побегов (см), массу надземной части растений и корней (г). В каждом варианте опыта анализировали не менее 20 эксплантов, повторность опыта 2–3-кратная.

Статистическую обработку данных проводили согласно стандартным методам, с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010). Достоверность различий между вариантами рассчитывали по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. В таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки, а на графике средние значения и доверительные интервалы.

Результаты и их обсуждение

Введение в культуру in vitro

Для клонального микроразмножения чабера применяли метод активации существующих меристем (из пазушных почек побега). Определены оптимальные условия стерилизации – обработка сегментов побегов мыльном раствором (40 мин), а затем 70% этанолом (40 сек) и 0,3% раствором препарата ДезТаб (25 мин). Затем растительный материал 3 раза промывали по 10 мин стерильной дистиллированной водой. Такая обработка позволила получить максимальное количество (до 95,0–97,0%) стерильных жизнеспособных эксплантов чабера.

В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* использовали сегменты стебля с узлом, для чего после стерилизации побеги в чашке Петри разрезали на сегменты 8–10 мм с одним узлом и парой пазушных почек (рис. 1а) и микрочеренки помещали на питательные среды. Через 10–12 суток культивирования эксплантов начиналось развитие 1–2 пазушных побегов разной длины, которое зависело от состава питательной среды.

В таблице 1 представлены экспериментальные данные о морфометрических параметрах эксплантов трех сортов чабера при их культивировании на нескольких вариантах питательной среды MS. Установлено, что при введении микрочеренков в асептическую культуру количество развивающихся эксплантов у сортов Электрум и Мельхиор, как правило, было в пределах 90–100%. У ‘Аргентума’ на многих средах число жизнеспособных эксплантов составило всего 60–77%, остальные экспланты через неделю культивирования становились бурыми. На 1-м этапе размножения, при

введении эксплантов *in vitro* происходило развитие побегов из пазушных почек (рис. 1б). Формирование адвентивных побегов отмечали довольно редко. Частота этих процессов зависела от сорта и гормонального состава питательной среды. При сравнении действия трех цитокининов (BAP, Kin, TDZ) в концентрации 0,5 мг/л у всех сортов не выявлено достоверных различий по числу и длине побегов. При этом максимальное число побегов (1,9–2,1 шт./эксплант) у ‘Электрума’ и ‘Мельхиора’ выявлено на средах, содержащих TDZ и BAP, а у ‘Аргентума’ – на среде ½ MS с Kin и GA₃. Однако, необходимо обратить внимание, что на средах с BAP и TDZ часто развивались витрифицированные побеги, непригодные для дальнейшего размножения (рис. 1в). Так, у ‘Мельхиора’ на среде с BAP формировалось 15,3 % оводненных побегов, а на среде с TDZ помимо витрификации выявлен нежелательный при микроразмножении каллусогенез с частотой 22,4 %.



Рис. 1 Микроразмножение чабера горного *in vitro*: выделение эксплантов (а); развитие эксплантов при введении в культуру (б); формирование витрифицированных побегов (в); развитие побегов на 2-м этапе микроразмножения (г); укоренение побегов *in vitro* (д); адаптация микрорастений *ex vitro*, 30 сут (е). Масштаб – 10 мм.

Fig. 1 Micropropagation of mountain savory *in vitro*: isolation of explants (а); development of explants upon introduction into culture (б); formation of vitrified shoots (в); development of shoots at the 2nd stage of micropropagation (г); rooting of shoots *in vitro* (д); adaptation of microplants *ex vitro*, 30 days (е). Scale bar 1 mm

Сопоставление анализируемых параметров при культивировании эксплантов трех сортов чабера на разных средах показало, что для сортов Аргентум и Электрум оптимальной является среда МС с 0,5 мг/л Кин, а для сорта Мельхиор – MS с 0,5 мг/л Kin и GA₃. На этих средах при введении *in vitro* основной интегральный параметр –

коэффициент размножения был наиболее высоким (хотя часто достоверно и не отличался) по сравнению с другими средами (табл. 1), но важно, что при этом отсутствовало нежелательное развитие тератологических витрифицированных побегов.

Таблица 1

Влияние состава питательной среды и сорта на развитие эксплантов при введении в культуру *in vitro* чабера горного (40 сут культивирования)

Table 1

The influence of the culture medium composition and the cultivar on the development of explants when introduced into *in vitro* culture of mountain savory (40 days of cultivation)

Сорт/ Cultivar	Регуляторы роста в среде МС, мг/л / Growth regulators in MS medium, mg/l	Коли- чество развива- ющихся эксплан- тов, % /Amount of developing explants, %	Коли- чество побегов шт./ эксплант /Amount of shoots pcs./explan t	Длина побега, мм /Shoot length, mm	Коли- чество узлов, шт./ побег /Amount of nodes, pcs./shoo t	Кoeffи- циент размно- жения /Multiplica tion index
Аргентум/ Argentum	MS h/f	60,0±5,8	1,4±0,1	27,5±3,0	3,2±0,3	4,5±0,5
	BAP 0,5	74,5±7,3	1,7±0,2	34,9±3,5*	3,9±0,4	6,4±0,6
	Kin 0,5	81,3±7,9	1,6±0,1	36,9±2,8	4,3±0,3	6,8±0,7
	Kin 1,0	79,7±6,9	1,6±0,1	38,8±4,3	4,2±0,4	6,2±0,6
	TDZ 0,5	63,3±6,2	1,5±0,1	33,2±3,7*	3,6±0,3	5,4±0,5
	Kin 0,5+ GA ₃ 0,5	89,7±8,6	1,6±0,1	40,4±3,8	3,9±0,3	6,5±0,6
	½ MS Kin 0,5 + GA ₃ 0,5	92,7±8,5	2,0±0,1	26,9±1,6*	2,8±0,2	5,7±0,4
	Kin 0,5+ BAP 0,2	68,2±6,1	1,3±0,1	26,7±3,2*	3,1±0,3	4,2±0,5
	Kin 2,0	76,7±7,1	1,7±0,1	35,2±2,8	3,7±0,3	6,2±0,6
Электрум/ Electrum	MS h/f	90,0±8,8	1,6±0,1	46,6±4,7*	4,4±0,4	6,9±0,7
	BAP 0,5	100	1,9±0,2	47,5±4,2*	4,8±0,4	8,8±0,9
	Kin 0,5	93,6±9,4	1,6±0,1	35,7±5,3	3,9±0,6	6,8±0,7
	TDZ 0,5	93,6±9,0	1,9±0,1	47,6±4,8*	4,2±0,5	8,0±0,9
	Kin 0,5+ GA ₃ 0,5	95,0±8,9	1,7±0,1	37,1±3,3	3,2±0,3	5,3±0,5
Мельхиор/ Melchior	MS h/f	92,3±9,4	1,8±0,1	31,3±2,7	2,7±0,2	4,7±0,4
	BAP 0,5	93,3±8,8	1,9±0,1	19,8±1,3*	2,0±0,1	3,8±0,3
	Kin 0,5	100	1,9±0,1	26,0±1,7	2,7±0,2	4,9±0,4
	TDZ 0,5	100	2,1±0,1	23,4±1,3*	2,2±0,1	4,8±0,4
	Kin 0,5+ GA ₃ 0,5	100	1,9±0,1	33,9±1,6	2,8±0,1	5,5±0,4

Примечание – *Витрификация до 10–25 % побегов.

Note – *Vitrification of up to 10-25% of shoots.

При сравнении морфогенеза эксплантов разных сортов чабера горного выявлены генотипические различия. Для сорта Аргентум характерно более низкое число развивающихся эксплантов при введении в культуру, а для сорта Мельхиор – меньшая длина побегов на большинстве представленных питательных сред (табл. 1). Сорт Электрум в целом характеризовался лучшей способностью к размножению – у него были достигнуты более высокие коэффициенты размножения (5,3–8,8), благодаря развитию на многих средах более длинных побегов с большим числом узлов.

Поскольку у чабера из эксплантов развивалось несколько побегов, имеющих в среднем до 4,8 узлов, можно использовать для размножения этого вида несколько методов – индукцию пазушного и адвентивного побегообразования и микрочеренкование побегов, что позволяет получить больше эксплантов при дальнейшем субкультивировании и в целом повысить коэффициент размножения. Что касается продолжительности первого этапа размножения, то рекомендуется культивировать экспланты в течение 35–40 сут, в течение которых можно достигнуть максимальных параметров. При более продолжительном культивировании начинается пожелтение и подсыхание верхушек побегов и нижних листьев.

2 этап клонального микроразмножения

На этапе собственно микроразмножения в качестве эксплантов использовали сегменты стебля с 1 узлом (8–10 мм). Для этого в асептических условиях проводили микрочеренкование развившихся при введении *in vitro* побегов, затем микрочеренки помещали на свежие питательные среды. При культивировании эксплантов, также как и на предыдущем этапе, наблюдали развитие пазушных и, очень редко, адвентивных побегов длиной до 50–70 мм (рис. 1г). Анализ развития эксплантов трех сортов на семи модификациях среды MS показал, что длина побегов и количество узлов были выше при введении в среду кинетина. На питательных средах с BAP или TDZ из эксплантов развивалось больше побегов (до 2,4 шт. у ‘Электрума’), однако при этом формировались оводненные микропобеги с частотой до 23,2 % (рис. 2). Витрификация особенно сильно проявилась на среде с TDZ, на которой также часто развивался каллус, нежелательный при размножении из-за вероятности появления соматоклональных вариантов. Совместное введение в среду Kin и GA₃ способствовало удлинению побегов и увеличению числа узлов. Использование разных концентраций кинетина (0,5 и 1,0 мг/л) существенных различий при развитии эксплантов не вызвало.

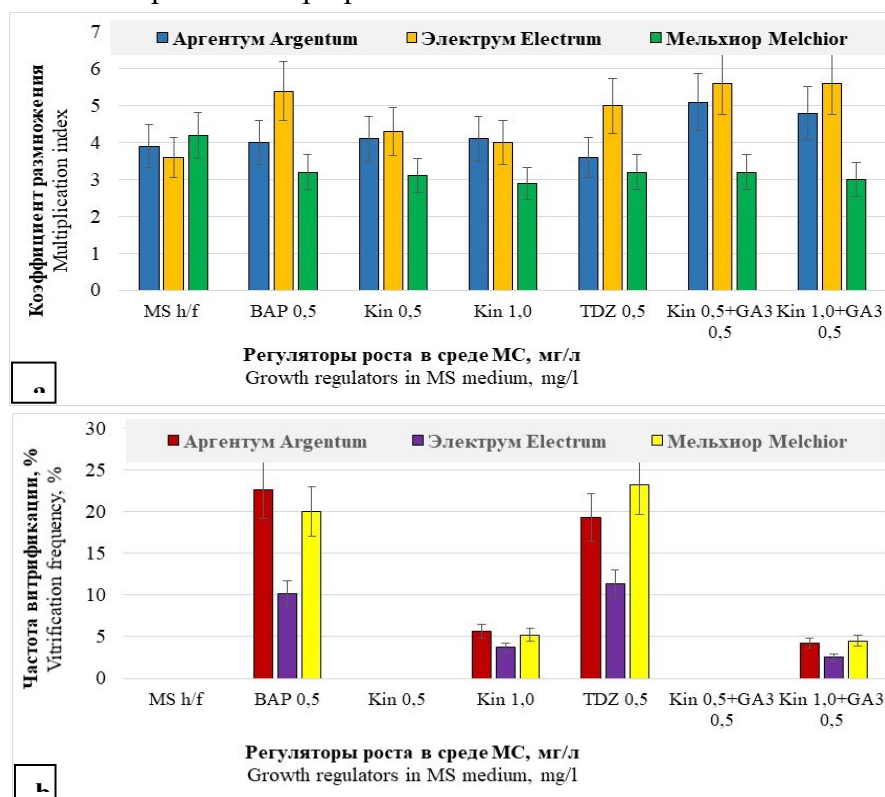


Рис. 2 Влияние состава питательной среды и сорта на коэффициент размножения (а) и частоту витрифицированных побегов (б) на 2-м этапе микроразмножения чабера горного *in vitro*

Fig. 2 The influence of the culture medium composition and the cultivar on the multiplication index (a) and the frequency of vitrified shoots (b) at the 2nd stage of mountain savory micropropagation *in vitro*

Основной параметр на 2-м этапе, коэффициент размножения, варьировал у сортов на испытанных средах от 2,9 до 5,6 (рис. 2). Хотя многие обсуждаемые различия параметров при использовании разных регуляторов роста и недостоверны, тем не менее, видны тенденции повышения основных показателей, что позволяет выделить более подходящие для размножения питательные среды. С учетом всех изученных параметров оптимальной средой для второго этапа микроразмножения у сортов Электрум и Аргентум является MS с Kin (0,5 мг/л) и GA₃ (0,5 мг/л). Для сорта Мельхиор лучше использовать безгормональную среду. Эти питательные среды у данных сортов обеспечивали максимальные коэффициенты размножения (соответственно, 5,6, 5,1 и 4,2 за одно субкультивирование) при практическом отсутствии витрификации и каллусообразования.

На втором этапе размножения, также как и на первом, из трех изученных сортов лучшие морфометрические показатели (наибольшее число и длину побегов) в целом наблюдали у Электрума. Коэффициент размножения у этого сорта был до 30% выше, чем других. Более того, для достижения максимального эффекта у сортов для микроразмножения на этом этапе рекомендуется использовать среды разного состава. Так же, как и при введении *in vitro*, целесообразно сочетать индукцию пазушного и адвентивного побегообразования и микрочеренкование побегов, что способствует получению большего числа эксплантов для последующего культивирования. Следует отметить, что процесс микроразмножения, при необходимости получения большего числа растений, можно повторять в течение нескольких субкультивирований. Для этого побеги черенкуют в ламинарном боксе и переносят на свежую питательную среду, рекомендованную для 2 этапа. При использовании оптимальных для каждого сорта питательных сред в течение трех наблюдаемых последовательных пассажей отмечали хорошее развитие микропобегов, при этом коэффициенты размножения были в пределах 3,9–6,0 (в зависимости от сорта). Необходимо указать, что индукция корнеобразования на этих средах наблюдалась крайне редко, поэтому для чабера необходим отдельный этап укоренения.

Укоренение *in vitro*

Полученные на 2-м этапе микропобеги разделяли на микрочеренки с 1 узлом (10 мм), которые помещали на питательные среды для укоренения и переносили в культуральную комнату. Через неделю у основания эксплантов наблюдали индукцию корнеобразования, а после 35–40 сут культивирования формировались нормально развитые побеги длиной в среднем до 48,9 мм с 5–8 корнями (рис. 1д). Признаков витрификации побегов не наблюдали.

Изучение влияния питательной среды на укоренение *in vitro* (на примере сорта Мельхиор) показало, что на безгормональной среде частота укоренения была минимальной (31,8 %), однако число корней достигло максимального значения (5,7 шт./эксплант) (табл. 2). Снижение содержания макро- и микросолей в безгормональной среде ½MS способствовало увеличению числа укоренившихся эксплантов до 97,0% при уменьшении количества корней. Сравнение влияния трех ауксинов показало, что добавление IAA способствовало формированию наиболее длинных корней, однако при этом формировался каллус (с частотой до 25%), что является нежелательным эффектом на данном этапе. На среде с 1,0 мг/л NAA выявлены минимальные показатели развития побегов и укоренения. Введение в среду IBA в концентрации 1,0 мг/л показало средние значения измеряемых величин, увеличение концентрации этого ауксина до 2,0 мг/л способствовало росту числа побегов и их длины, а также повысило укореняемость эксплантов до 82,3%.

Таблица 2

Влияние состава питательной среды на развитие эксплантов на 3-м этапе микроразмножения чабера горного сорта Мельхиор (40 сут культивирования)

Table 2

The influence of the culture medium composition on the explants development at the 3rd stage of micropropagation of the mountain savory cultivar Melchior (40 days of cultivation)

Регуляторы роста в среде МС, мг/л /Growth regulators in MS medium, mg/l	Частота укоренения, % /Rooting rate, %	Количество корней, шт./побег /Amount of roots, pcs./shoot	Длина корня, мм /Root length, mm	Длина побега, мм /Shoot length, mm
MS h/f	31,8±2,8	5,7±0,8	16,9±1,8	20,7±1,6
½ MS h/f	97,0±8,9	3,9±0,3	13,7±0,7	39,8±3,5
IBA 0,1	88,2±8,2	4,2±0,4	17,8±1,5	42,2±3,9
IBA 0,5	90,1±9,2	3,8±0,3	14,1±0,7	48,5±3,9
IBA 1,0	66,7±6,5	2,8±0,3	15,4±1,2	24,4±2,1
IBA 2,0	82,3±7,9	3,9±0,4	8,3±0,6	48,9±3,6
NAA 1,0	63,9±6,0	4,2±0,4	13,1±0,9	23,9±2,5
IAA 1,0	70,0±6,9	3,3±0,2	19,3±0,9	26,5±2,2
½ MS IBA 0,5	93,8±9,0	4,5±0,3	18,5±0,9	45,6±4,2

Наиболее благоприятное влияние на ризогенез оказало введение в состав среды ½MS ауксина IBA в концентрации 0,5 мг/л: частота укоренения достигла 93,8 % и число корней было максимальным (в среднем 4,5 на побег). При этом длина самих побегов оставалась достаточно высокой (45,6 мм). Поэтому на данном этапе микроразмножения мы рекомендуем данную среду, при культивировании на которой у двух других сортов чабера частота формирования корней была не ниже 85%.

Адаптация ex vitro

Для адаптации использовали укорененные *in vitro* микрорастения с 4–5 корнями и хорошо развитым побегом длиной не менее 40–50 мм. В течение 1,5–2 месяцев происходило развитие основного побега до 10–12 см и нескольких боковых побегов 1 порядка (рис. 1е), а также формирование развитой корневой системы. Поскольку при адаптации *ex vitro* основным лимитирующим фактором часто является состав субстрата, было проанализировано развитие микрорастений чабера с использованием 4 видов субстрата: торф, перлит, торф+перлит, торф+перлит+дерновая земля (табл. 3).

Установлено, что самый низкий показатель приживаемости растений (41,2%) был при использовании смеси торфа, перлита и земли. Лучший результат по данному показателю получен при выращивании растений сорта Мельхиор с применением перлита (88,2%). Максимальное число побегов на растение зафиксировано при использовании в качестве субстрата торфа, а минимальное – при применении смеси торф+перлит+земля. При анализе массы микрорастений на субстратах торф и торф+перлит общая масса достоверно не отличалась (2,1 г), масса корней также была одинакова. При использовании в качестве субстрата перлита общая масса растений была максимальной. При этом следует отметить наибольшую массу корней, что, по-видимому, и способствовало высокой приживаемости микрорастений за счет хорошо развивающейся корневой системы. Учитывая высокие показатели приживаемости, длины побегов и массы растений оптимальным субстратом для адаптации чабера следует считать перлит. Апробация рекомендуемых режимов адаптации *ex vitro* у сортов Аргентум и Электрум показала их эффективность – частота приживаемости после 2 мес составила 75,0 и 82,4%, соответственно.

Таблица 3

Влияние типа субстрата на развитие микрорастений чабера горного сорта Мельхиор при адаптации *ex vitro* (60 сут культивирования)

Table 3

The influence of substrate type on the development of mountain savory cultivar Melchior microplants during *ex vitro* adaptation (60 days of cultivation)

Субстрат для адаптации/ Adaptation substrate	Прижи- ваемость, % /Survival rate, %	Количество побегов, шт./ растение /Amount of shoots, pcs./plant	Длина побега, см /Shoot length, cm	Масса, г /Weight, g	
				надземной части /aboveground part	корней /roots
Торф / Peat	64,7±6,0	16,8±2,2	14,6±0,3	1,9±0,3	0,2±0,04
Перлит / Perlite	88,2±7,8	10,9±1,8	10,8±0,8	2,4±0,3	0,6±0,07
Торф + перлит (1:1) /Peat+ Perlite (1:1)	64,7±6,3	13,0±1,8	6,9±0,6	1,8±0,2	0,2±0,02
Торф+перлит+дерновая земля (1:1:1) / Peat + perlite + turf soil (1:1:1)	41,2±4,5	8,3±1,5	12,6±0,8	2,8±0,4	0,1±0,02

Выводы

В результате исследований впервые разработан протокол клонального микроразмножения *Satureja montana* L., включающий четыре основных этапа, для которых экспериментально подобраны эффективные питательные среды и условия культивирования. Методика размножения *in vitro* апробирована на трех сортах – Мельхиор, Электрум, Аргентум. Подобран режим стерилизации, позволяющий получить до 97,0% асептических эксплантов. При сравнительном анализе влияния на микроразмножение чабера трех цитокининов выявлено, что на средах с BAP и TDZ развивались непригодные для дальнейшего размножения оводненные микропобеги с частотой до 23,2 %, тогда как кинетин не оказывал такого негативного влияния на морфогенез эксплантов. Показано, что при введении эксплантов (сегментов стебля с 1 узлом) в культуру *in vitro* для сортов Аргентум и Электрум оптимальной является среда MS с 0,5 мг/л кинетина, а для сорта Мельхиор – MS с 0,5 мг/л кинетина и GA₃.

Установлено, что у чабера можно использовать для размножения несколько методов – индукцию пазушного и адвентивного побегообразования и микрочеренкование побегов, что позволяет повысить эффективность размножения. На 2-м этапе микроразмножения наибольшие коэффициенты размножения (4,2–5,6 за одно субкультивирование) при практическом отсутствии витрификации и каллусообразования у сортов Электрум и Аргентум обеспечивала питательная среда MS с Kin (0,5 мг/л) и GA₃ (0,5 мг/л), а у сорта Мельхиор – безгормональная среда MS.

На этапах размножения из трех изученных сортов более высокие морфометрические параметры (число и длина побегов) и коэффициент размножения наблюдали у 'Электрума'. Оптимизирована питательная среда для укоренения *in vitro* (½ MS с 0,5 мг/л IBA), на которой частота укоренения достигала 93,8%, а число корней 4,5 на побег. При адаптации микрорастений в условиях *ex vitro* сравнение 4 видов субстрата показало наибольшую эффективность использования перлита, который обеспечивал максимальную частоту приживаемости (до 88,2%) и массу надземной части и корней. Представленный протокол микроразмножения *in vitro* предназначен для ускоренной мультипликации образцов в коллекциях или селекционных программах, а также для массового получения качественного посадочного материала сортов для сельскохозяйственного производства.

Благодарности/Acknowledgements

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ FNZW-2022-0008. В исследованиях использовались сорта чабера горного из коллекции генофонда пряно-ароматических, эфиромасличных и лекарственных растений ФГБУН «НИИСХ Крыма» (УНУ № 507515 <http://www.ckp-rf.ru>).

Литература / References

Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: Автограф, 2021. 315 с. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4).

[Yegorova N.A. Biotechnology of essential oil plants: creation of new forms and micropropagation *in vitro*. Simferopol: "Avtograf", 2021. 315 p. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.]

Железняк Т., Ворнику З. Семенное и вегетативное размножение чабера горного. В кн.: Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective, 21-22 iunie 2019, Bălți. Balti, Republic of Moldova: Tipogr. „Indigou Color”, 2019. Ediția 3. P. 164–168. [Jelezniak T., Vorniku Z. Seed and vegetative propagation of mountain savory (*Satureja montana* L.) In: Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective, 21-22 iunie 2019, Bălți. Balti. Republic of Moldova: Tipogr. „Indigou Color”, 2019. Ediția 3. 164–168 (In Russian)]

Паштецкий В.С., Тимашева Л.А., Пехова О.А., Данилова И.Л., Серебрякова О.А. Эфирные масла и их качество. Симферополь: «АРИАЛ», 2021. 212 с.

[Pashetskiy V.S., Timasheva L.A., Pekhova O.A., Danilova I.L., Serebryakova O.A. Efirnyye masla i ikh kachestvo [Essential oils and their quality]. Simferopol: "ARIAL", 2021. 212 p. (In Russian)]

Платонова Т.В. Оценка перспективных клонов чабера горного (*Satureja montana* L.) в Предгорном Крыму // Инновации в науке. 2015. № 44. С. 57–61.

[Platonova T.V. Evaluation of promising clones of winter savory (*Satureja montana* L.) in the premountain Crimea // Innovatsii v nauke. 2015. 44:57–61. (In Russian)]

Постникова О.Н., Шевкопляс Л.А., Кувейда Т.А., Сатаева Т.П., Кирсанова М.А., Логадырь Т.А. Влияние эфирного масла *Satureja montana* L. на рост культур условно-патогенных микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. 99. 6. С. 701–707. DOI: 10.36233/0372-9311-262.

[Postnikova O.N., Shevkoplyas L.A., Kuevda T.A., Sataeva T.P., Kirsanova M.A., Logadyr T.A. Effect of the essential oil of *Satureja montana* L. on the growth of cultures of conditionally pathogenic microorganisms // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. 2022. 99:P. 701–707. DOI: 10.36233/0372-9311-262 (In Russian)]

Ушакова И.Т., Беспалько Л.В., Харченко В.А., Молчанова А.В., Левко Г.Д. Изменчивость основных хозяйственно ценных признаков у чабера горного (*Satureja montana* L.) сорта Бобрик // Овощи России. 2019. № 3. С. 25–29. DOI:10.18619/2072-9146-2019-3-25-29.

[Ushakova I.T., Bepalko O.V., Kharchenko V.A., Molchanova A.V., Levko G.D. Variability of the main agronomic valuable traits in mountain savory (*Satureja montana* L.) in 'Bobrik' varieties // Ovoshchi Rossii. 2019. 3:25–29. DOI:10.18619/2072-9146-2019-3-25-29 (In Russian)]

Хлебникова Д.А., Чередниченко М.Ю. Влияние минерального состава питательной среды на рост *Satureja hortensis* L. в культуре *in vitro* // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2018. 3 (72). С. 360–362.

[Khlebnikova D.A., Cherednichenko M.Yu. The influence of mineral composition of the nutrient medium on the growth of *Satureja hortensis* L. in vitro culture // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2018. 3(78):360–362 (In Russian)]

Abdelshafeek K.A., Osman A.F., Mouneir S.M., Elhenawy A.A., Abdallah W.E. Phytochemical profile, comparative evaluation of *Satureja montana* alcoholic extract for antioxidants, anti-inflammatory and molecular docking studies // BMC Complement Med Ther. 2023. Vol. 23. P. 108. DOI: 10.1186/s12906-023-03913-0.

Alirezalu K., Pateiro M., Yaghoubi M., Alirezalu A., Peighambardoust S.H., Lorenzo J.M. Phytochemical constituents, advanced extraction technologies and technofunctional properties of selected Mediterranean plants for use in meat products. A comprehensive review // Trends in Food Science & Technology. 2020. Vol. 100. P. 292–306. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.04.010.

Cardoso J.C., Gerald L.T.S., Teixeira da Silva J.A. [Eds.: V. M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo]. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Plant cell culture protocols (4th edition). New York: Humana Press, 2018. P. 17–46.

Hudz N., Makowicz E., Shanaida M., Białon M., Jasicka-Misiak I., Yezerska O., Svydenko L., Wieczorek P.P. Phytochemical evaluation of tinctures and essential oil obtained from *Satureja montana* herb // Molecules. 2020. 25. No 4763.

Jafari F., Ghavidel F., Zarshenas M.M. A critical overview on the pharmacological and clinical aspects of popular *Satureja* species // J. Acupunct. Meridian Stud. 2016. Vol. 9. P. 118–127. DOI: 10.1016/j.jams.2016.04.003

Mirjani L., Salimi A., Matinizadeh M., Razavi K., Shahbazi M. Effective factors on micropropagation of medicinal plant of *Satureja khuzistanica* // Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 2018. 26. No.1. DOI: 10.22092/ijrfpbgr.2018.109250.1235.

Mozafari A.A., Vafaei Y., Karami E. In vitro propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi – an indigenous threatened medicinal plant of Iran // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2015. 21(3). P. 433–439.

Murashige T., Skoog F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962.15 (3). P. 473–497.

Navarro-Rocha J., Andrés M.F., Díaz C.E., Burillo J., González-Coloma A. Composition and biocidal properties of essential oil from pre-domesticated Spanish *Satureja montana* // Industrial Crops and Products. 2020. 145. No.111958. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111958

Navroski M.C.I., Waldow D.A.G., Reiniger L.R.S., Golle D.P., Curti A.R., Pereira M.O. Multiplicação in vitro de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.) // Rev. Bras. Pl. Med. Campinas. 2014. 16 (1). P. 117–121.

Rafie Hamidpour, Soheila Hamidpour, Parvin Doostmohamadi. Chemistry, Pharmacology and Medicinal Property of Savory (*Satureja* L.) to Prevent and Cure Illnesses such as Diabetes, Cardiovascular Disease, Alzheimer's Disease, and Cancer // Cancer Sci Res. 2019. 2 (1). P. 1–5.

Sarropoulou V., Maloupa E. In vitro propagation of *Satureja thymbra* L. (Lamiaceae): A valuable aromatic medicinal native plant of the Mediterranean region // GSC Biological and Pharmaceutical sciences. 2019. 9 (2). P. 009–020.

Tepe B., Cilkiz M.A. A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja* // Pharmaceutical Biology. 2015. 54 (3). P. 375–412. DOI:10.3109/13880209.2015.1043560.

Teshome I., Teshome S., Soromessa T., Feyissa T. Development of an efficient in vitro propagation protocol for *Satureja punctata* – A rare aromatic and medicinal plant // Taiwan. 2016. 61 (1). P. 41–48. DOI:10.6165/tai.2016.61.41.

Teshome S., Soromessa T., Feyissa T. *In vitro* propagation of a threatened medicinal plant *Satureja abyssinica* through nodal explants – antimicrobial and antifungal herb // IJBST. 2017. 10 (3). P. 20–25.

Vladic J., Vidović S., Acimovic M., Gavarić A., Jokić S. *Satureja montana*: Cultivation, Production and Uses. Medicinal Plants: Production, Cultivation and Uses. Matthias, Aubert; Laisné, Nicolas (ur.). New York (NY): Nova Science Publishers, 2017. P. 27–58.

Vrancheva R., Dincheva I., Aneva I., Georgiev V., Pavlov A. GC-MS-based metabolite profiling of wild and *in vitro* growing plants of *Satureja montana* L. // Доклади на Българската академия на науките. 2022. 75 (1). P. 150–158. DOI:10.7546/CRABS.2022.01.18

Статья поступила в редакцию 24.11.2025 г.

Yegorova N.A., Kovalenko M.S. Clonal micropropagation of *Satureja montana* L. *in vitro* // Plant Biology and Horticulture: theory, innovation. 2026. № 1 (178). P. 96-108

Mountain savory (*Satureja montana* L.) is a valuable essential oil and medicinal plant, the processed products of which are used in medicine as an antimicrobial, antifungal, antispasmodic, antiviral agent, mainly due to the high carvacrol content in the essential oil. For introduction of new highly productive cultivars into production, the use of biotechnological reproduction methods is relevant. The aim of the work is to study the features of explant development at the four main propagation stages and to develop clonal micropropagation protocol using three *S. montana* cultivars as an example. Culture media were selected for introducing explants (stem segments with 1 node) into *in vitro* culture for the Argentum and Electrum cultivars (MS medium with 0.5 mg/l kinetin) and the Melchior cultivar (MS with 0.5 mg/l kinetin and GA₃). It was established that at the 2nd stage of micropropagation, the maximum multiplication index (4.2–5.6 per subcultivation) for the Electrum and Argentum cultivars were provided by the MS medium with kinetin (0.5 mg/l) and GA₃ (0.5 mg/l), and for the Melchior cultivar – by the hormone-free MS medium. When culturing on these media, unlike media with BAP and TDZ, no undesirable vitrification of shoots or callus formation was observed. Genotypic differences were revealed: of the three studied cultivars, higher morphometric parameters and multiplication index were observed in ‘Electrum’. For *in vitro* rooting, a culture medium of ½ MS with 0.5 mg/l IBA is recommended, on which the rooting frequency reached 93.8%. During *ex vitro* adaptation, the greatest efficiency was demonstrated when using perlite as a substrate, which ensured the maximum survival rate (up to 88.2%) and plant weight. As a result of the research, a protocol for *S. montana* clonal micropropagation was developed for the first time, which is intended for the accelerated propagation of valuable samples in breeding and obtaining high-quality planting material for agricultural production.

Key words: mountain savory; propagation *in vitro*; cultivar; explant; culture medium; rooting *in vitro*; adaptation *ex vitro*