ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

УДК 633.81:57.085.2 UDC 633.81:57.085.2

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЛИМИТИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ *MELISSA OFFICINALIS* L. ПРИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ *IN VITRO* И АДАПТАЦИИ *EX VITRO*

Якимова О.В.*, Коваленко М.С.

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия
*E-mail: olyyakimova@yandex.ru

Melissa officinalis L. – многолетнее травянистое эфиромасличное растение, широко применяемое в медицине, а также в парфюмерной, косметической, ликеро-водочной и пищевой промышленности. Низкое содержание эфирного масла в сырье мелиссы обусловливает проведение селекционной работы, направленной на создание высокомасличных сортов. Использование биотехнологических методов *in vitro* позволяет повысить эффективность такой работы и быстро размножить перспективные селекционные образцы. Цель данной работы – изучить влияние сорта на развитие растений *M. officinalis* при клональном микроразмножении *in vitro* и адаптации *ex vitro*. Установлено, что на этапе собственно микроразмножения у таких сортов, как Соборная и Крымчанка оптимальна питательная среда с добавлением 0,5 мг/л БАП (коэффициенты размножения 19,9 и 17,6 соответственно), а у сорта Цитронелла – среда с добавлением 1,0 мг/л кинетина (коэффициент размножения 19,3). На этапе укоренения *in vitro* наибольшая частота ризогенеза у сортов Цитронелла и Соборная (75,5% и 93,3% соответственно) выявлена на среде с добавлением 0,5 мг/л НУК, у сорта Крымчанка (90,9%) – на среде с 1,0 мг/л ИУК. На этих средах у изучаемых сортов хорошо развивались основные и придаточные корни. Максимальную частоту приживаемости микрорастений изученных сортов при адаптации *ex vitro* (до 93,3%) обеспечивал субстрат, состоящий из смеси торфа, песка и перлита (2:1:2). Результаты проведенных исследований использовали для разработки протокола клонального микроразмножения *M. officinalis*.

Ключевые слова: Melissa officinalis L. ◆ эксплант ◆ микропобег ◆ клональное микроразмножение ◆ укоренение *in vitro* ◆ адаптация *ex vitro* ◆ эфиромасличные растения

INFLUENCE OF SOME LIMITING FACTORS ON THE DEVELOPMENT OF *MELISSA OFFICINALIS* L. PLANTS DURING *IN VITRO* MICROPROPAGATION AND *EX VITRO* ADAPTATION

Yakimova O.V.*, Kovalenko M.S.

Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia
*E-mail: olyyakimova@yandex.ru

Melissa officinalis L. is a perennial herbaceous essential oil, medicinal and spicy-aromatic plant, widely used in medicine, as well as in the perfume and cosmetics, liquor and food industries. The low content of essential oil in lemon balm raw materials determines the need for breeding work aimed at creating high-oil cultivars. The use of *in vitro* biotechnological methods will increase the efficiency of this process and quickly multiply promising breeding samples. The aim of this work was to study the effect of cultivar on the development of *M. officinalis* plants during *in vitro* clonal micropropagation and *ex vitro* adaptation. It was found that at the stage of actual micropropagation, the optimal culture medium for the Sobornaya and Krymchanka cultivars was the one with the addition of 0,5 mg/l BAP (the multiplication indexes were 19,9 and 17,6, respectively), and for the Citronella variety, the optimal medium was the one with the addition of 1,0 mg/l kinetin (the multiplication index was 19,3). At the stage of *in vitro* rooting, the highest frequency of rhizogenesis for the Citronella and Sobornaya cultivars (75,5% and 93,3%, respectively) was on the culture medium with the addition of 0,5 mg/l NAA, and for the Krymchanka cultivar (90,9%), on the medium with 1,0 mg/l IAA. On these media, the studied cultivars demonstrated good development of the main and adventitious roots. The maximum survival rate of micro plants of three lemon balm cultivars during *ex vitro* adaptation (up to 93,3%) was provided by a substrate consisting of a mixture of peat, sand and perlite (2:1:2). The conducted studies were used to develop a protocol for clonal micropropagation of *M. officinalis.*

Keywords: Melissa officinalis L. ◆ explant ◆ microshoot ◆ clonal micropropagation ◆ *in vitro* rooting ◆ *ex vitro* adaptation ◆ essential oil plants

Поступила в редакцию: 17.02.2025 *Принято в печать: 04.03.2025*

Цитировать | Cite as

DOI: 10.31163/2618-964X/2025-5 EDN: NSJTBL

ВВЕДЕНИЕ

Уникальные природно-климатические условия юга России позволяют выращивать многие эфиромасличные культуры, продукты переработки которых используют в медицине, ликеро-водочной, пищевой, парфюмерной, косметической и других отраслях промышленности. Наряду с использованием традиционных ароматических растений (*Coriandrum sativum, Lavandula angustifolia, Rosa damascena, Salvia sclarea*), актуальным остается внедрение в производство новых перспективных видов, в частности мелиссы лекарственной *Melissa officinalis* L. [Паштецкий и др., 2018].

M. officinalis – многолетнее травянистое эфиромасличное растение, возделываемое во многих странах мира – в США, Италии, Болгарии, Сирии, Иране, а также на юге России [Dixit, 2015; Атлас лекарственных растений России, 2021]. Помимо использования в медицине в качестве антидепрессанта, седативного, спазмолитического и иммуномодулирующего средства, мелисса лекарственная служит медоносом и кулинарной приправой. Сырьё и эфирное масло этого растения широко применяют в лекарственных препаратах и ароматизированных чаях [Moradkhani et al., 2010; Kittler et al., 2018; Аникина и др., 2021]. Однако низкое содержание в сырье мелиссы эфирного масла (0,02-0,30% в пересчете на сухую массу) стимулирует к проведению селекции по выведению новых сортов с повышенным его содержанием [Невкрытая и др., 2014; Kittler et al., 2018; Nevkrytaya et al., 2020]. Такая селекционная работа, направленная на создание высокомасличных сортов *M. officinalis,* проводится в ФГБУН «НИИСХ Крыма» [Невкрытая и др., 2014]. Для повышения эффективности селекции необходимы ускоренные методы размножения ценных генотипов (гибридов, селекционных линий и полученных *in vitro* регенерантов), в частности клональное микроразмножение *in vitro*.

По сравнению с традиционным семенным и вегетативным размножением микроразмножение *in vitro* не зависит от сезона, не требует больших площадей, приводит к получению генетически стабильного оздоровленного посадочного материала, характеризуется более высоким коэффициентом размножения, а также позволяет создавать коллекции генетической плазмы *in vitro* [Cardoso et al., 2018; Soaresa et al., 2023; Калашникова, Киракосян, 2023].

Биотехнологические приемы ускоренного размножения *in vitro* активно используются для решения многих прикладных задач как селекции, так и семеноводства важнейших сельскохозяйственных, плодово-ягодных, цветочно-декоративных растений [Основы создания генобанка.., 2018; Иванова-Ханина, 2019; Митрофанова и др., 2021; Калашникова и др., 2023]. В то же время число исследований, посвященных разработке биотехнологических методов эфиромасличных культур, сравнительно невелико [Thui, Kukreja, 2010; Khosh-Khui, 2014; Егорова, 2021]. В литературе встречаются единичные работы по культивированию *M. officinalis in vitro*. Так, изучены некоторые вопросы, связанные с индукцией каллусо- и морфогенеза при культивировании разных органов и тканей этого растения [Meftahizade, 2010a,b]. Большая же часть публикаций касается разработки приемов клонального микроразмножения *M. officinalis* [Mohebalipour et al., 2012; Sevik, Guney, 2013; Yegorova et al., 2019]. Имеются сведения об особенностях морфогенеза при культивировании различных типов эксплантов, таких как верхушки побегов, междоузлия, сегменты стебля с узлом, фрагменты листьев и корней [Mohebalipour et al., 2012]. Изучено действие гамма-излучения на микроразмножение мелиссы *in vitro* [Radomir et al., 2023]. Встречаются данные о влиянии генотипа на этот процесс [Meftahizade, 2010a,b]. Многие работы посвящены оптимизированию

состава культуральной среды на этапах введения эксплантов в культуру *in vitro* и собственно микроразмножения [Ghiorghita et al., 2005; Meftahizade, 2010a,b; Mohebalipour et al., 2012; Shakeri et al., 2013]. Так, H. Meftahizade, с соавторами отмечали максимальное количество побегов (3,2-4,1 шт./эксплант) при культивировании побегов на среде с введением 3,0 мг/л БАП и 1,0 мг/л НУК [Meftahizade, 2010a]. В другой работе лучшие показатели морфогенеза эксплантов наблюдали при содержании в среде 2,0 мг/л ИУК (длина побега – 15,98 см; число узлов – 9,6 шт./побег) [Mohebalipour et al., 2012]. Имеются сведения о том, что добавление в среду Мурасиге и Скуга 1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л НУК способствовало образованию множественных побегов (до 4 шт./эксплант) [Ghiorghita et al., 2005]. Показано, что при микроразмножении мелиссы добавление к ризогенным средам активированного угля ингибировало процесс укоренения [Meftahizade, 2010a]. G.I. Ghiorghita с соавторами при культивировании микропобегов мелиссы на среде с добавлением кинетина и НУК отметили высокую частоту укоренения, что позволило исключить 3-й этап клонального микроразмножения [Ghiorghita et al., 2005]. S.M. Shakeri с соавторами предлагали использовать безгормональную питательную среду для клонального микроразмножения мелиссы [Shakeri et al., 2013].

В целом, в проанализированных публикациях представлены зачастую противоречивые данные. Кроме того, недостаточно изучены такие вопросы, как укоренение *in vitro* и адаптация *ex vitro* микрорастений *M. officinalis.* Тем не менее это важные этапы размножения *in vitro*, так как от успеха их реализации зависит эффективность методики клонального микроразмножения. В связи с этим цель данной работы состояла в изучении влияния сорта на развитие растений *M. officinalis* при клональном микроразмножении *in vitro* и адаптации *ex vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили ткани и органы растений трех сортов *Melissa officinalis* L. – Цитронелла, Соборная, Крымчанка. Донорные растения выращивали в условиях закрытого грунта. Для соблюдения условий асептики все работы по введению в культуру и микрочеренкованию побегов *in vitro* выполняли в условиях ламинар-бокса БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Эксперименты проводили согласно общепринятым протоколам биотехнологии растений *in vitro* [Cardoso et al., 2018; Калашникова, Киракосян, 2023]. Для освобождения эксплантов от экзогенной инфекции проводили двухэтапную процедуру стерилизации. На первом этапе растительный материал замачивали в слабощелочном мыльном растворе в течение 40 мин. На втором этапе стерилизацию эксплантов проводили в условиях ламинар-бокса с использованием 70% этанола (экспозиция 1 мин) и препарата «ДезТаб» – 43 % $C_3O_3N_3Cl_3$, 20 % $NaC_3O_3N_3Cl_2$ («Ахлор Донге ЛТД», КНР) (экспозиция 6 мин).

В культуру *in vitro* вводили пазушные почки (размером 0,8-1,0 мм), которые вычленяли под стереоскопическим микроскопом МСП-1 (Россия) в асептических условиях ламинарного бокса, помещали в пробирки (150×16 мм) на ранее оптимизированную агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [Murashige, Skoog, 1962], дополненную 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) или 1,0 мг/л БАП с 0,5 мг/л гиббереллoвой кислоты ($ГК_3$) [Yegorova, Yakimova, 2019]. На втором и третьем этапах клонального микроразмножения (собственно микроразмножения и укоренения, рис. 1 А, Б) в качестве эксплантов использовали микрочеренки с одним или двумя узлами (7-10 мм), полученные на предыдущем

этапе микроразмножения *in vitro*. Микрочеренки выращивали в закрытых фольгой стеклянных банках объемом 200 мл с 35-40 мл среды (рис. 1 А). При этом использовали различные модификации питательной среды МС, дополненной БАП, кинетином (кин.), тидиазуроном (ТДЗ), $ГК_3$, индолил-3-уксусной кислотой (ИУК), индолил-3-масляной кислотой (ИМК) и 1-нафтилуксусной кислотой (НУК) в различных сочетаниях и концентрациях.

Изолированные почки, побеги *in vitro* и растения *ex vitro* культивировали/выращивали при 26±2°С, влажности воздуха 70%, 16-часовом фотопериоде и освещенности 2-3 клк. Для адаптации *ex vitro* отбирали микропобеги длиной 40-60 мм с хорошо развитой корневой системой (рис. 1 Б), высаживали в пластиковые стаканы (объемом 200 мл) со стерильным субстратом разного состава (торф, перлит, песок, керамзит в различных сочетаниях) (рис. 1 В). Полив осуществляли по мере подсыхания, поддерживая влажность воздуха 90% в первые 14 суток, а затем – не ниже 75-85%. Адаптацию растений проводили в течение 35-45 суток, после чего пересаживали в условия открытого грунта.

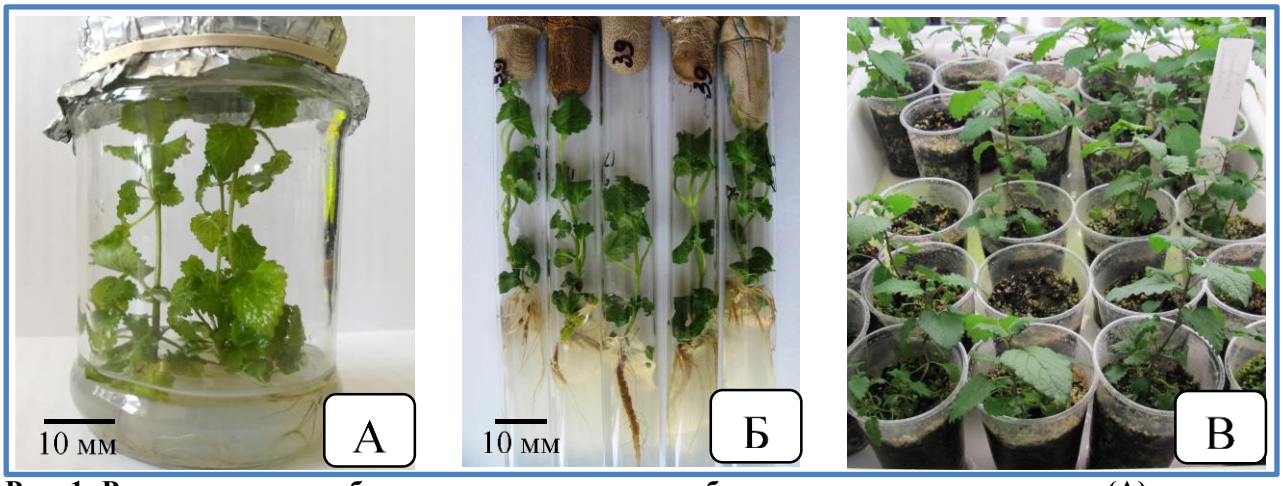

Рис. 1. Развитие микропобегов мелиссы на этапе собственно микроразмножения (А), на этапе укоренения *in vitro* (Б) и на этапе адаптации *ex vitro* (В). (30 сутки выращивания, сорт Цитронелла)

На этапе собственно микроразмножения анализ проводили в конце цикла выращивания (на 30-35-е сутки культивирования) и оценивали следующие морфометрические показатели: частота множественного побегообразования, количество побегов, количество узлов, длина побегов. Коэффициент размножения (К.Р.) рассчитывали как произведение количества побегов на количество узлов. На этапе укоренения *in vitro* и адаптации *ex vitro* определяли частоту ризогенеза (%), длину побега (мм), количество (шт./эксплант) и длину (мм) корней, а также количество адаптированных микропобегов (%). Частоту ризогенеза (%) рассчитывали как отношение числа микропобегов с корнями к общему числу анализируемых побегов, умноженное на 100. В каждом варианте анализировали по 20 эксплантов или микрорастений в трехкратной повторности.

Математическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel 2010). В таблицах и на рисунках показаны средние значения и их стандартные ошибки. Нормальность распределения данных оценивали с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Так как все данные характеризовались нормальным распределением ($p \leq 0,5$), для оценки достоверности различий между вариантами применяли доверительный интервал ($\bar{x} \pm t_{05} \times SE$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее для сортов *M. officinalis* были подобраны условия для эффективного развития меристем с двумя листовыми примордиями или сегментов стебля с одним узлом на первом этапе микроразмножения *in vitro*. При этом максимальное развитие эксплантов (частота множественного побегообразования до 66,6%, количество побегов до 5,6 шт./побег и длина побега до 29,7 мм) отмечали на питательной среде, дополненной 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л $ГК_3$ или 0,5 мг/л БАП [Якимова, Егорова, 2018].

Основной целью второго этапа микроразмножения является получение максимального количества микропобегов, способных к дальнейшему укоренению и адаптации. В данном эксперименте проанализировано 6 модификаций питательной среды МС. Показано, что рост основного побега на испытанных вариантах среды начинался на 5-7-е сутки, а развитие адвентивных побегов (на некоторых питательных средах) отмечали на 15-20-е сутки культивирования. На 30-е сутки культивирования на разных модификациях среды у растений изучаемых сортов длина побегов варьировала от 35,1 мм до 70,3 мм, а частота множественного побегообразования составляла 20,0-91,7% (рис. 2, табл. 1).

При добавлении в состав среды кинетина или ТДЗ у сортов Соборная и Крымчанка отмечали низкие значения морфометрических показателей, коэффициент размножения при этом не превышал 16,3 (табл. 1). В то же время у сорта Цитронелла при использовании в составе питательной среды 1,0 мг/л кинетина наблюдали максимальное развитие эксплантов, коэффициент размножения при этом составил 19,3. Для сортов Соборная и Крымчанка использование в качестве фитогормона БАП в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л позволило получить наибольшее число побегов на эксплант (4,3-6,3 шт.). На среде МС, дополненной 0,5 мг/л БАП, количество узлов на побеге у этих сортов было в 1,4 раза больше, чем на среде с 1,0 мг/л БАП, а коэффициент размножения – в 1,6 и 1,3 раза больше, соответственно.

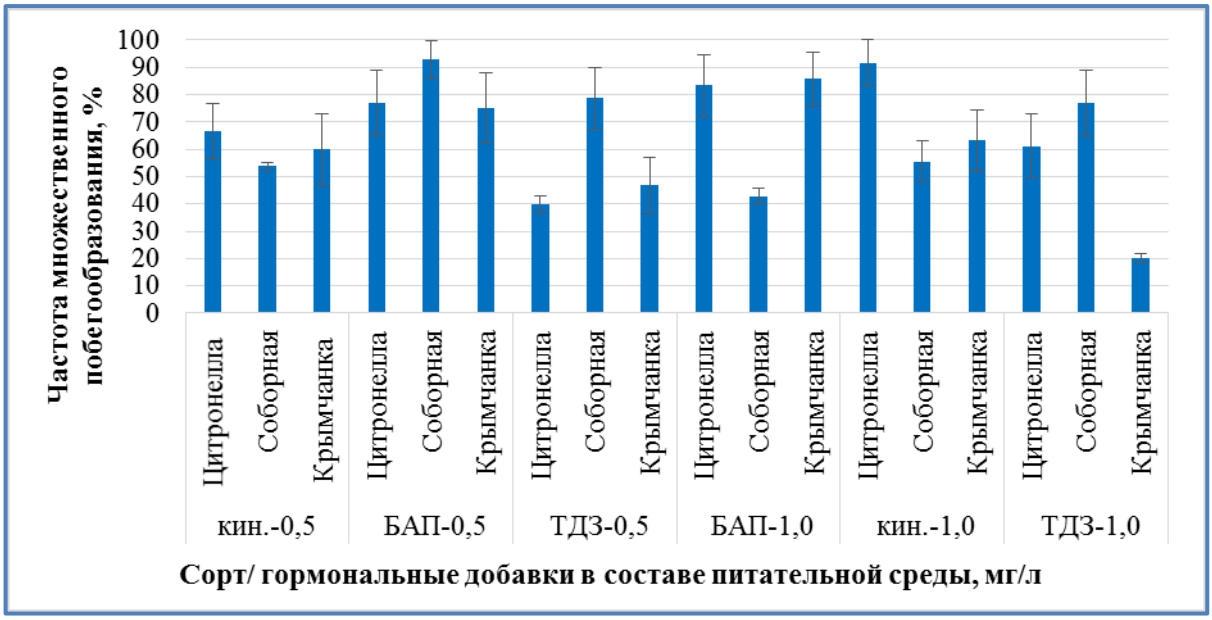

Рис. 2. Влияние сорта и состава питательной среды на частоту множественного побегообразования при микроразмножении *M. officinalis* (n=20).

Таблица 1. Влияние состава питательной среды и сорта на развитие микропобегов мелиссы на втором этапе микроразмножения (4 субкультивирование)

Гормональные добавки в составе среды МС, мг/л	Сорт, (n – количество наблюдений)	Количество побегов, шт./эксплант*	Количество узлов, шт./побег	Длина побега, мм	К.Р.
Кинетин-0,5	Цитронелла (n=56)	2,8±0,3	3,2±0,2	52,6±3,2	9,0
	Соборная (n=48)	2,4±0,3	3,8±0,3	65,7±3,5	9,1
	Крымчанка (n=46)	2,3±0,3	3,4±0,2	59,3±3,7	7,8
БАП-0,5	Цитронелла (n=94)	4,7±0,1	2,9±0,2	39,9±2,6	13,6
	Соборная (n=106)	5,3±0,6	3,7±0,1	52,4±2,1	9,6
	Крымчанка (n=86)	4,3±0,3	4,1±0,2	73,3±2,6	17,6
ТДЗ-0,5	Цитронелла (n=46)	2,3±0,3	3,9±0,3	62,4±4,8	8,9
	Соборная (n=60)	3,0±0,3	4,0±0,2	56,4±3,4	12,0
	Крымчанка (n=48)	2,4±0,3	4,1±0,3	65,9±3,4	9,8
БАП-1,0	Цитронелла (n=126)	6,3±0,4	2,7±0,1	40,8±1,8	17,0
	Соборная (n=100)	5,0±0,6	2,7±0,2	35,1±3,3	13,5
	Крымчанка (n=92)	4,6±0,6	3,0±0,1	45,3±1,9	13,8
Кинетин-1,0	Цитронелла (n=92)	4,6±0,5	4,2±0,2	66,2±2,6	19,3
	Соборная (n=52)	2,6±0,3	3,4±0,3	67,7±3,3	8,8
	Крымчанка (n=56)	2,8±0,3	3,5±0,2	60,4±2,8	9,8
ТДЗ-1,0	Цитронелла (n=68)	3,4±0,4	2,9±0,1	43,1±3,0	9,9
	Соборная (n=102)	5,1±0,6	3,2±0,1	47,3±2,3	16,3
	Крымчанка (n=44)	2,2±0,3	2,8±0,2	48,0±2,7	6,1

** – для показателя «количество побегов» для всех сортов n=20.*

В литературе имеются данные о том, что максимальное количество побегов на эксплант (3,2-4,1 шт.) у мелиссы развивалось при культивировании на питательной среде с добавлением 3,0 мг/л БАП и 1,0 мг/л НУК [Meftahizade, 2010a,b]. Греческие исследователи наибольшую частоту множественного побегообразования и число побегов (до 4 шт.), как и мы, наблюдали при культивировании микропобегов *M. officinalis* на питательной среде с добавлением 1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП [Ghiorghita et al., 2005]. Ученые из Ирана у большинства из оцененных 17-ти генотипов мелиссы отмечали хорошую регенерацию микропобегов при введении в состав среды 2,0 мг/л БАП или 1,0 мг/л БАП с 0,5 мг/л ИМК [Mohebalipour et al., 2012].

Установлено, что на третьем этапе микроразмножения *in vitro* у исследуемых сортов в большинстве вариантов питательных сред наблюдалась высокая частота укоренения (до 77,8-93,8%) (табл. 2).

Таблица 2. Влияние состава питательной среды и сорта на укоренение микропобегов мелиссы *in vitro* (n=20)

99	Сорт	Частота укоренения, %	Число корней, шт./побег	Длина корня, мм
без гормонов	Цитронелла	20,0±1,3	5,0±0,8	24,0±4,8
	Соборная	64,3±4,2	6,0±0,4	31,6±4,1
	Крымчанка	84,6±8,5	4,0±0,6	35,7±3,6
9НУК-1,0	Цитронелла	77,8±10,4	11,1±3,0	8,9±1,5
	Соборная	53,3±3,4	15,0±2,7	13,3±1,9
	Крымчанка	90,9±9,1	10,3±1,4	19,0±2,6
НУК-0,5	Цитронелла	75,0±8,1	10,1±1,4	20,4±3,6
	Соборная	93,3±6,7	13,6±2,2	15,2±2,1
	Крымчанка	83,3±11,1	5,0±0,7	15,1±1,4
ИУК-1,0	Цитронелла	76,9±6,5	5,9±0,7	27,9±3,8
	Соборная	90,9±9,0	6,7±0,9	7,1±0,5
	Крымчанка	90,9±9,0	8,7±0,9	32,9±5,2
ИМК-1,0	Цитронелла	73,3±8,1	8,3±0,5	29,7±3,6
	Соборная	84,6±7,2	6,5±0,8	15,5±2,2
	Крымчанка	92,3±7,6	5,2±0,6	18,7±2,6
ИМК-0,5	Цитронелла	75,0±6,3	3,9±0,7	18,8±3,2
	Соборная	93,1±6,3	4,7±0,4	41,6±3,6
	Крымчанка	40,0±1,6	3,8±0,3	30,6±4,4

Формирование корневой системы начиналось в конце второй недели культивирования. Корни образовывались преимущественно из нижнего узла побега. На этапе укоренения отмечали хорошее развитие побегов, длина которых варьировала от 19,2 мм до 69,3 мм, в зависимости от сорта.

На безгормональной питательной среде у сортов Соборная и Крымчанка отмечали достаточно высокую частоту образования корней, которая составила 64,3 и 84,6% соответственно, а у сорта Соборная величина этого показателя была минимальной – 20,0%. При введении в состав среды 1,0 мг/л ИУК у всех генотипов наблюдали увеличение количества корней по сравнению с безгормональной средой. Однако у сорта Соборная использование этого регулятора роста привело к существенному снижению длины корней (до 7,1 мм). Применение другого ауксина – ИМК (0,5-1,0 мг/л) не дало статистически достоверного повышения частоты корнеобразования, а у сорта Крымчанка, наоборот, привело к снижению этого показателя до 40,0%.

Максимальную частоту укоренения у сортов Цитронелла и Соборная (75,5% и 93,3% соответственно) наблюдали на среде МС, содержащей 0,5 мг/л НУК. На этой среде формировалось 10,1 и 13,6 % корней, длиной 20,4 мм и 15,2 мм соответственно. Однако у сорта Крымчанка лучшее корнеобразование отмечали на среде МС, дополненной 1,0 мг/л ИУК (количество корней – 8,7 шт., длина корня – 32,9 мм). На этих средах у исследуемых сортов, наряду с формированием основного корня, наблюдали хорошее развитие придаточных корней, что важно для дальнейшей адаптации микрорастений *ex vitro*.

В литературе встречаются работы, в которых освещены некоторые аспекты укоренения микропобегов *M. officinalis in vitro*. H. Meftahizade с соавторами максимальную частоту укоренения (до 96%) побегов мелиссы наблюдали при использовании среды МС с добавлением 1,0 мг/л НУК [Meftahizade et al., 2010a]. Однако в этом исследовании при размножении и укоренении микропобегов *in vitro* отмечали индукцию морфогенного каллуса у основания эксплантов [Meftahizade et al., 2010a]. Известно, что при развитии побегов из каллусной ткани значительно увеличена возможность получения сомаклональных вариантов, что нежелательно при клональном микроразмножении. В отличие от упомянутой работы, в наших исследованиях образования каллуса не отмечено. M,S, Shakeri с соавторами выявили укоренение микропобегов на безгормональной среде МС [Shakeri et al., 2013]. В других исследованиях максимальное количество корней было получено при добавлении в среду 2,0 мг/л ИУК [Silva et al., 2005; Mohebalipour et al., 2012].

Заключительный этап клонального микроразмножения состоит в переносе растений в нестерильные условия выращивания и их адаптация *ex vitro*. Эффективность этого процесса в значительной степени зависит от состава субстрата для выращивания микрорастений. Установлено, что у всех трех сортов минимальные показатели адаптации растений *ex vitro* были при использовании смеси торфа, песка и керамзита в соотношении 1:1:1 (табл. 3).

Таблица 3. Влияние типа субстрата и сорта на частоту приживаемости растений мелиссы в процессе адаптации *ex vitro* (n=20)

Сорт	Тип субстрата			
	торф/перлит, 1:1	торф/песок/перлит 2:1:2	торф/песок 2:1	торф/перлит/керамзит 1:1:1
Цитронелла	71,4±7,3	85,7±9,7	80,0±6,4	53,3±3,3
Соборная	86,7±9,0	86,7±9,0	100	73,3±8,1
Крымчанка	80,0±10,6	93,3±6,7	66,7±7,5	40,0±3,4

У сорта Соборная максимальная частота жизнеспособных побегов (100%) была при выращивании в субстрате, содержащем торф:песок (1:1). Данный показатель для микрорастений сорта Цитронелла на этом субстрате также имел высокое значение (80,0%), а для сорта Крымчанка составил всего 66,7%. Для всех трех сортов высокие, достоверно не отличающиеся значения приживаемости побегов (85,7-93,3%) отмечали при использовании смеси торфа, песка и перлита в соотношении 2:1:2.

Анализ литературы показал, что для адаптации регенерантов или проростков из семян *in vitro* у мелиссы использовали различные субстраты. Приживаемость растений на разных видах субстрата может быть обусловлена генотипическими различиями, а также разными условиями культивирования *ex vitro*. H. Meftahizade с соавторами акклиматизацию растений-регенерантов мелиссы проводили в течение 30 дней в теплице при температуре 25ºС и относительной влажности воздуха 80% с использованием смеси почвы, торфа и перлита (1:1:1) [Meftahizade et al., 2010a]. В другой работе в качестве субстрата для выращивания растений мелиссы использовали почву, что позволило получить 90-100% адаптированных регенерантов [Mohebalipour et al., 2012]. В исследованиях S.Silva с соавторами акклиматизацию растений этого вида также проводили с использованием почвы [Silva et al., 2005].

Ранее полученные нами результаты и данные настоящего исследования явились основой для разработки протокола клонального микроразмножения *M. officinalis,* который схематично представлен на рис. 3.

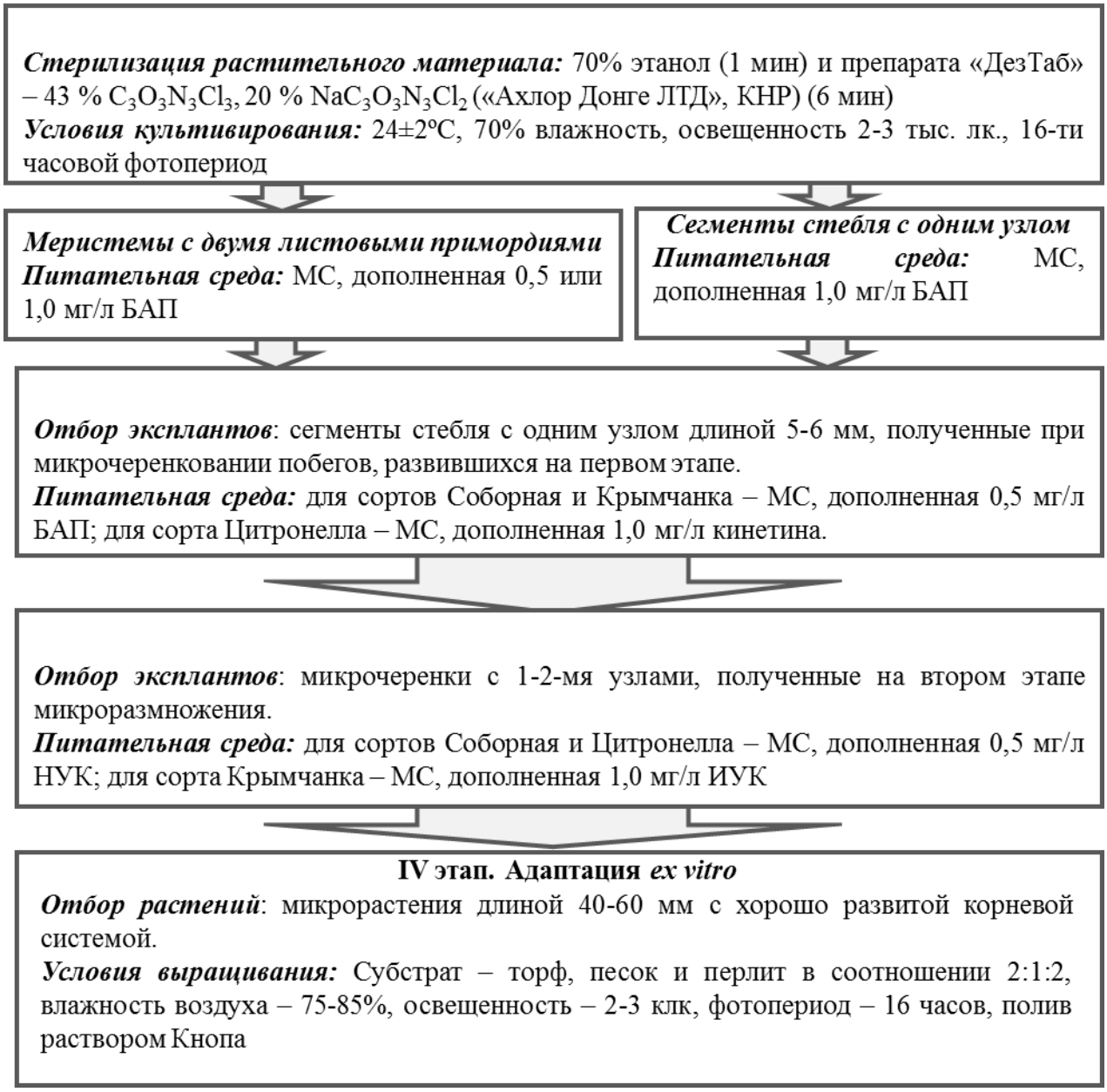

Рис. 3. Схема клонального микроразмножения мелиссы лекарственной *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены особенности влияния состава питательной среды и генотипа на развитие микропобегов при микроразмножении мелиссы на этапах собственно микроразмножения и укоренения *in vitro* и адаптации *ex vitro*. Показано, что на втором этапе микроразмножения для сортов Соборная и Крымчанка оптимально использование питательной среды с добавлением 0,5 мг/л БАП (коэффициенты размножения составили 19,9 и 17,6 соответственно), а для сорта Цитронелла – среды с добавлением 1,0 мг/л кинетина (коэффициент размножения 19,3). Установлено, что у побегов сортов Цитронелла и Соборная наибольшая частота ризогенеза (75,5% и 93,3%, соответственно) была на питательной среде с добавлением 0,5 мг/л НУК, а для сорта Крымчанка (90,9%) – на среде с 1,0 мг/л ИУК. На этих средах у всех сортов отмечено

хорошее развитие корней (количество корней – 8,7-13,6 шт./побег; длина корня – 15,2-32,9 мм). Максимальную частоту приживаемости микрорастений при адаптации *ex vitro* (до 93,3%) обеспечивал субстрат, состоящий из смеси торфа, песка и перлита (2:1:2).

Проведенные исследования использовали для разработки методики клонального микроразмножения *M. officinalis*, которую можно применять для ускоренного размножения ценных генотипов этого эфиромасличного растения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аникина А.Ю., Басалаева И.В., Бушковская Л.М. и др. Лекарственные и эфиромасличные культуры: особенности возделывания на территории Российской Федерации. М.: ВИЛАР, 2021. 256 с.
2. Атлас лекарственных растений России / под общ. ред. Н.И. Сидельникова. М.: «Наука», 2021. 646 с.
3. Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД «Автограф», 2021. 315 с.
4. Иванова-Ханина Л.В. Адаптация растений-регенерантов ежевики к условиям *ex vitro* // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2019. Т. 5(71). С. 30–39.
5. Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Культура тканей и клеток растений. Москва: ООО Издательство «КноРус», 2023. 184 с.
6. Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н., Зайнуллин В.Г., Юдин А.А. Размножение *in vitro* перспективных сортов картофеля для возделывания в условиях Республики Коми // Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 2023. № 7 (65). С. 36–41.
7. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Смыкова Н.В. Оздоровление и размножение *in vitro* перспективных сортов и гибридных форм хризантемы садовой селекции Никитского ботанического сада // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2021. № 138. С. 92–100. DOI: 10.36305/0513-1634-2021-138-92-100
8. Невкрытая Н.В. Аметова Э.Д., Марченко М.П. Итоги работы по созданию нового сорта *Melissa officinalis* L. // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия биология и химия. 2014. Т. 27 (66). № 5. С. 110–118.
9. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур / по ред. И.В. Митрофановой. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. 260 с.
10. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. 320 с.
11. Якимова О.В., Егорова Н.А. Влияние состава питательной среды, типа эксплантa и генотипа на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2018. Т. 4 (70). № 1. С. 158–167.
12. Cardoso J.C., Gerald L.T.S., Teixeira da Silva J.A. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Plant cell culture protocols (4th edition) / Eds.: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. New York, NY: Humana Press, 2018. P. 17–46.

13. Dixit A.K. Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) an herbal medicinal plant with broad therapeutic uses and cultivation practices: a review // International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research. 2015. Vol. 02 (11). P. 0928–0933.
14. Ghiorghita G.I., Maftei D.E.St., Nicuta D.N. Investigations on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. species // Anal. stiintifice ale Universitatii "AlexandruIoan Cuza", Geneticasi Biologie Moleculara. 2005. Vol. 5. P. 119–126.
15. Khosh-Khui M. Biotechnology of scented Roses: a review // International Journal of Horticultural Science and Technology. 2014. Vol. 1 (1). P. 1–20.
16. Kittler J., Krüger H., Ulrich D., et al. Content and composition of essential oil and content of rosmarinic acid in lemon balm and balm genotypes (*Melissa officinalis*) // Genetic Resources of Crop Evolution. 2018. No. 65. P. 1517–1527. DOI: 10.1007/s10722-018-0635-4
17. Meftahizade H., Lotfi M., Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. // African Journal of Biotechnology. 2010a. Vol. 9 (28). P. 4314–4321.
18. Meftahizade H., Moradkhani H., Naseri B., et al. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes // Journal of Medicinal Plants Research. 2010b. Vol. 4 (3). P. 240–246.
19. Mohebalipour N., Aharizad S., Mohammadi S.A., et al. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces // Journal of Food, Agriculture & Environment. 2012. Vol. 10 (1). P. 280–286.
20. Moradkhani H., Sargsyan E., Bibak H., et al. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: a review // Journal of Medicinal Plants Research. 2010. Vol. 4 (25). P. 2753–2759.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bi-oassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15 (3). P. 473–497.
22. Nevkrytaya N.V., Pashtetsky V.S., Novikov I.A., et al. Analysis of the selective value of promising *Melissa officinalis* L. subsp. *altissima* (Smith.) Arcang variety // Agronomy Research. 2020. Vol. 18 (1). P. 216–227.
23. Radomir A.M., Stan R., Guță I.C. Effect of gamma irradiation on *Salvia officinalis* L. and *Melissa officinalis* L. *in vitro* plants // AgroLife Scientific Journal. 2023. Vol. 12 (1). P. 158–165. DOI: 10.17930/AGL2023118
24. Sevik H., Guney K. Effects of IAA, IBA, NAA, and GA_3 on rooting and morphological features of *Melissa officinalis* L. stem cuttings // The Scientific World Journal. 2013. Vol. 2013. P. 1–5. DOI: 10.1155/2013/909507
25. Silva S., Sato A., Salgueiro Lage C.L., et al. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. Produced under the Influence of growth regulators // Journal of Brazilian Chemical Society. 2005. No. 16. P. 1387–1390.
26. Shakeri S.M., Kazemitabar S.K., Sinaki J.M. *In vitro* culture of *Melissa offcinalis* without the use of hormones // International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 2013. Vol. 6 (20). P. 1382–1387.
27. Soaresa J.S., Ramosa J.C.M., Sorgatoa J.C., et al. *Brassavola tuberculata* Hook.: *in vitro* growth and *ex vitro* establishment as a function of the micropropagation system and sucrose // Brazilian Journal of Biology. 2023. Vol. 83. Art. number: e270892. DOI: 10.1590/1519-6984.270892
28. Thui S.T., Kukreja A.K. An efficient protocol for high-frequency direct multiple shoot regeneration from internodes of peppermint (*Mentha×piperita*) // Natural Product Communications. 2010. Vol. 5 (12). P. 1945–1946.

29. Yegorova N.A., Yakimova O.V. The effect of long-term subcultivation on clonal micropropagation of *Melissa officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. // Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya =Tomsk State University Journal of Biology. 2019. Vol. 47. P. 22–39. DOI: 10.17223/19988591/47/2
30. Yegorova N.A., Yakimova O.V., Belova I.V. Long-term passage and characteristics of *Melissa officinalis* L. callus cell cultures // Russian Journal of Plant Physiology. 2024. Vol. 71 (3). P. 1–9. DOI: 10.1134/S1021443724606037

Цитировать как
Якимова О.В., Коваленко М.С. Влияние лимитирующих факторов на развитие растений *Melissa officinalis* L. при микроразмножении *in vitro* и адаптации *ex vitro* // Экобиотех. 2024. Т. 8. № 1. С. 50-61. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-5 EDN: NSJTBL

Cited as
Yakimova O.V., Kovalenko M.S. Influence of limiting factors on the development of *Melissa officinalis* L. plants during *in vitro* micropropagation and *ex vitro* adaptation. *Ecobiotech.* 2024. V. 8 (1). P. 50-61. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-5 EDN: NSJTBL (In Rus.)

Сведения об авторах

Ольга Валерьевна Якимова, к.б.н., Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия. E-mail: olyyakimova@yandex.ru, AuthorID: 835923, ORCID: 0000-0003-1586-498X

Мария Сергеевна Коваленко, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия. E-mail: mary-exo-l@yandex.ru, AuthorID: 1053216, ORCID: 0000-0002-7894-340X

Information About the Authors

Olga V. Yakimova, PhD in Biological Sciences, Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russian Federation. E-mail: olyyakimova@yandex.ru, AuthorID: 835923, ORCID: 0000-0003-1586-498X

Maria S. Kovalenko, Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russian Federation. E-mail: mary-exo-l@yandex.ru, AuthorID: 1053216, ORCID: 0000-0002-7894-340X