

Научная статья

УДК 633.81:57.085.2+577.2

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75>



Особенности длительного сохранения мяты сортов Ажурная и Бергамотная в коллекции *in vitro*

Наталья Алексеевна Егорова, Маргарита Сергеевна Загорская,
Сулейман Февзиевич Абдурашитов

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
г. Симферополь, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Егорова Наталья Алексеевна, yegorova.na@mail.ru

Аннотация. Мята – ценное лекарственное и эфиромасличное растение, которое широко применяется в фармакологии, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности. Для поддержания коллекций сортов, ценных образцов и проведения селекции перспективно использование биотехнологии сохранения *in vitro* растительных объектов в условиях замедленного роста при низких положительных температурах. Цель работы – изучить морфометрические показатели и генетическую стабильность эксплантов двух сортов мяты при сохранении *in vitro* при 4–6 °С без освещения в течение года. Меристемы с двумя листовыми примордиями культивировали на питательной среде в культуральной комнате при 26 °С и освещенности 2–3 клк с 16-часовым фото-периодом. Развивающиеся из меристем микропобеги разделяли на сегменты стебля с одним узлом, которые использовали в качестве эксплантов для депонирования. Установлено, что после года депонирования при 4–6 °С без освещения у сортов Ажурная и Бергамотная количество жизнеспособных эксплантов составило 56,5 и 85,7% соответственно. У эксплантов отмечено развитие до 2,5 побегов длиной до 13,2 мм и ризогенез с частотой до 52,3%. После депонирования микропобеги черенковали и переносили в культуральную комнату для возобновления роста. Показано, что после двух субкультивирований полностью восстановились жизнеспособность (100%), морфометрические показатели микропобегов и коэффициент размножения (до 5,5–7,3). С помощью ISSR-анализа по четырем изученным ДНК-маркерам выявлено, что микропобеги этих сортов после хранения *in vitro* полностью идентичны исходным растениям. Проведенные исследования показали эффективность используемых условий для хранения *in vitro* эксплантов мяты и подтвердили их генетическую стабильность после года депонирования при 4–6 °С.

Ключевые слова: *Mentha* spp., эксплант, морфометрические параметры, депонирование *in vitro*, ISSR-анализ

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки РФ FNZW-2022-0008.

Для цитирования: Егорова Н. А., Загорская М. С., Абдурашитов С. Ф. Особенности длительного сохранения мяты сортов Ажурная и Бергамотная в коллекции *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 1. С. 64–75. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Features of long-term preservation of Azhurnaya and Bergamotnaya mint cultivars in an *in vitro* collection

Natalia A. Yegorova, Margarita S. Zagorskaya,
Suleiman F. Abdurashytov

Research Institute of Agriculture of Crimea,
Simferopol, Russian Federation

Corresponding author: Natalia A. Yegorova, yegorova.na@mail.ru

Abstract. Mint represents a valuable medicinal and essential oil plant widely used in pharmacology, perfumery, cosmetics, and food industry. In order to maintain collections of cultivars and valuable samples, as well as to carry out breeding, the application of biotechnology appears to be promising for *in vitro* preservation of

plant objects under the conditions of slow growth at low positive temperatures. The present study is focused on the morphometric parameters and genetic stability of the explants of two mint cultivars during their *in vitro* preservation at 4–6 °C for a year without illumination. Meristems with two leaf primordia were cultivated on a nutrient medium in a culture room at 26 °C and illumination of 2–3 klx with a 16-hour photoperiod. Microshoots developing from meristems were divided into single-node stem segments to be used as explants for deposition. After a year of deposition at 4–6 °C without illumination, the number of viable explants in the Azhurnaya and Bergamotnaya cultivars was established to be 56.5 and 85.7%, respectively. The explants under study were characterized by the development of up to 2.5 shoots up to 13.2 mm long and rhizogenesis with a frequency of up to 52.3%. Following the deposition, microshoots were cut and transferred to a culture room to resume growth. After two subcultivations, viability (100%), morphometric parameters of microshoots, and multiplication index (up to 5.5–7.3) were fully restored. The ISSR-analysis performed according to four studied DNA markers revealed the microshoots of these cultivars to be completely identical to the original plants after *in vitro* preservation. The conducted studies proved the effectiveness of the conditions used for *in vitro* preservation of mint explants and confirmed the explant genetic stability after a year of deposition at 4–6 °C.

Keywords: *Mentha* spp., explant, morphometric parameters, *in vitro* deposition, ISSR analysis

Funding. The work was performed within the state assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation FNZW-2022-0008.

For citation: Yegorova N. A., Zagorskaya M. S., Abdurashytov S. F. Features of long-term preservation of Azhurnaya and Bergamotnaya mint cultivars in an *in vitro* collection. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(1):64-75. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-64-75>.

ВВЕДЕНИЕ

Мята – широко известное многолетнее травянистое лекарственное, эфиромасличное и пряно-ароматическое растение семейства *Lamiaceae* (Martinov). Различные виды рода *Mentha* L. используются в фармакологии, косметической и пищевой промышленности, а также в медицине [1]. Для широкого применения мяты, в том числе в разнообразных селекционных программах, и сохранения генетического разнообразия необходимы эффективные методы поддержания сортов и коллекционных образцов. Мята относится к вегетативно размножаемым культурам, а наиболее используемым методом сохранения подобных видов является поддержание растительных образцов в полевых коллекциях, которые могут легко предоставить исходный материал для размножения ценных генотипов, проведения исследовательских работ и других целей [2, 3]. Однако у данного метода есть и серьезные недостатки: занимаемые обширные площади и высокие трудозатраты, повреждение образцов болезнями и вредителями, а также нежелательное смешивание образцов. Эти риски могут быть уменьшены с помощью другой стратегии сохранения – в медленно растущей коллекции *in vitro*. Благодаря развитию методов культивирования изолированных тканей и органов методики депонирования *in vitro*, и в частности создание медленнорастущих коллекций, активно используются в настоящее время в качестве эффективной альтернативы полевым коллекциям [3–5]. Поддержание медленного роста и удлинение периода между пересадками культур *in vitro* обеспечи-

ваются в таких технологиях путем снижения температуры культивирования до 2–10 °C, введения в состав питательной среды осмотически активных веществ или ингибиторов роста, снижения освещенности и некоторыми другими приемами [3, 4]. Такие биотехнологические методы особенно важны для вегетативно размножаемых видов растений. При разработке методик сохранения эксплантов в условиях низких положительных температур необходимо подобрать такие режимы, которые будут способствовать длительному сохранению эксплантов, а затем реализации их морфогенетического потенциала [4, 6]. Правильный выбор типа экспланта, состава питательной среды, условий депонирования и культивирования *in vitro* позволяет эффективно сохранять образцы и сводить к минимуму риск появления соматоклональных вариантов [5–8].

Известно, что культивирование тканей и органов на искусственных питательных средах может вызывать соматоклональную изменчивость, которая обусловлена кариологическими изменениями (вариабельность количества и морфологии хромосом), перестройками хромосом, транспозицией подвижных генетических элементов, соматическим кроссинговером, изменениями в метилировании последовательностей ДНК и другими причинами¹ [9]. Поэтому важным аспектом при использовании технологий *in vitro* для сохранения ценных генотипов является проверка генетической стабильности культивируемых растений. На сегодняшний день одними из наиболее точных и достоверных инструментов для выявления и изучения соматоклональной изменчи-

¹Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений: учебник и практикум для вузов. М.: Юрайт, 2020. 333 с.

ности являются молекулярно-генетические методы, основанные на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР) при амплификации специфических ДНК-маркеров. Наиболее подходящим методом изучения является ISSR-анализ (Inter Simple Sequence Repeats), основанный на полиморфизме межмикросателлитных локусов генома. Использование метода электрофореза межмикросателлитных участков геномной ДНК является хорошо воспроизводимым, удобным, чувствительным и полиморфным среди анонимных методов фрагментного анализа [10]. Поэтому этот метод широко используется для оценки молекулярно-генетического полиморфизма растений, регенерируемых в культуре тканей и органов, в том числе получаемых в процессе микроразмножения или депонирования *in vitro* [11–14]. В ряде исследований при использовании ПЦР-анализа выявлено появление при микроразмножении или депонировании генетически измененных растений [11, 13–15]. С другой стороны, у многих видов и сортов растений в процессе длительного микроразмножения или поддержания коллекций в изолированной культуре отмечали генетическое сходство с исходными донорными растениями, например, у тополя и осины [12], картофеля [15], рябчика [16] и растений других видов [11].

В Научно-исследовательском институте сельского хозяйства Крыма в течение многих лет ведется селекция мяты, в результате которой получены уникальные ценные генотипы (межвидовые гибриды, полиплоиды, анеуплоиды и др.) и высокопродуктивные эфиромасличные сорта различного направления [17, 18]. Для сохранения разнообразных образцов и сортов необходимо применение современных приемов поддержания коллекций.

В литературе представлено относительно много работ, касающихся разноплановых биотехнологических исследований видов мяты [19–23]. В частности, изучено влияние некоторых факторов на индукцию каллусогенеза, непрямого морфогенеза и получение растений-регенерантов [21, 24]. В ряде публикаций затронуты проблемы получения вторичных метаболитов (компонентов эфирного масла, розмариновой кислоты) в культуре изолированных клеток, каллусов или побегов у некоторых видов и сортов мяты [22, 25]. Большинство публикаций посвящено оптимизации питательных сред и условий культивирования для основных этапов клонального микроразмножения *Mentha piperita* L., *M. spicata* L., *M. viridis* L. и других видов или гибридов мяты [19, 20, 22, 25]. Имеются сведения о влиянии питательных сред на компонентный состав эфирного масла у размноженных в культуре органов растений [26]. Ранее нами изучены некоторые вопросы, связанные с микроразмножением сортов мяты, в частности, подобраны питательные среды для размножения в культуре меристем *in vitro* [27], показано влияние

количества субкультивирований на коэффициент размножения [28].

Публикаций, касающихся депонирования *in vitro* ароматических растений, в том числе и мяты, крайне мало. Так, Е. R. J. Keller с соавторами провели успешный опыт по сохранению двух тетраплоидов *M. villosa* Huds. и *M. piperita* L., а также октоплоида *M. piperita* L. при 2 и 10 °C на безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга в течение 6 месяцев [29]. Некоторые вопросы депонирования изучены на образцах *M. villosa* и *M. piperita*, которые депонировали 6 месяцев при 2 °C [30]. На примере нескольких сортов мяты (Удайчанка, Прилукская Карвонная, Украинская Перечная, Прилукская б) проанализировано развитие эксплантов в течение 24 месяцев с использованием разных типов экспланта и концентраций сахарозы в питательной среде [31]. Тем не менее в ряде публикаций приводятся достаточно противоречивые или неполные данные [29–31], а вопросы генетической гетерогенности растений мяты при культивировании *in vitro* освещены в единичных работах [2].

Цель настоящей работы – изучить морфометрические показатели и генетическую стабильность эксплантов двух сортов мяты при сохранении *in vitro* при 4–6 °C без освещения в течение года.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования использовали растения двух сортов мяты – Ажурная и Бергамотная. Сорт Ажурная – высокоментольный сорт (содержание ментола в эфирном масле составляет 67,1–68,5%), который получен путем свободного переопыления полиплоида *Mentha canadensis* L. с коллекционными образцами дикорастущих видов. Сорт Бергамотная – нементольный сорт (основные компоненты эфирного масла – линалоол (61,0%) и линалилацетат (18,0%)), созданный путем поэтапной гибридизации трех видов (*M. citrata* Ehrh. × *M. longifolia* L.) × *M. spicata* L. [18]. Исходные донорные растения выращивали в условиях закрытого грунта. Подготовку оборудования и материалов для работы в асептических условиях, питательных сред и анализ ростовых процессов проводили согласно общепринятым методам¹ [5].

В культуру *in vitro* вводили меристемы с двумя листовыми примордиями (0,5–0,7 мм), выделенные из пазушных почек донорных растений. Меристемы вычленили под стереоскопическим микроскопом МСП-1 (Россия) в условиях ламинарного бокса БАВип-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Экспланты культивировали на ранее оптимизированной для микроразмножения мяты [27] модификации питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [32] с добавлением 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) (Sigma, США).

При культивировании в условиях культураль-

ной комнаты (при 26 °С, влажности воздуха 70% и освещенности 2–3 клк с 16-часовым фотопериодом) из меристем развивались микропобеги. Далее проводили их черенкование, в качестве эксплантов для сохранения *in vitro* использовали сегменты стебля с одним узлом. В пробирки с 10 мл агаризованной питательной среды помещали по одному экспланту, закрывали их ватно-марлевыми пробками и депонировали в холодильной камере при 4–6 °С без освещения в течение одного года без пересадки. После года хранения подсчитывали количество жизнеспособных и развивающихся эксплантов (%), а также определяли морфометрические показатели: число (шт.) и длину (мм) побегов, число узлов на побеге (шт.), частоту ризогенеза (%), число (шт.) и длину (мм) корней. Далее в асептических условиях микропобеги черенковали, пересаживали на свежую питательную среду того же состава и помещали в условия культуральной комнаты (при 26 °С, влажности 70% и освещенности 2–3 клк с 16-часовым фотопериодом), где дважды проводили субкультивирование. После каждого субкультивирования определяли те же морфометрические показатели. Коэффициент размножения рассчитывали как количество микрочеренков, которое можно получить за одно субкультивирование, для этого среднее количество образовавшихся побегов умножали на среднее число узлов на побеге.

Геномную ДНК выделяли из молодых верхних листьев (0,2–0,3 г) растений мяты исходных сортов (выращенных в условиях закрытого грунта) и из побегов микрорастений после года депонирования *in vitro* и последующего отрастания в культуральной комнате. Для этого использовали ЦТАБ-буфер (цетилтриметиламмония бромид), а затем проводили очистку хлороформом [33]. Выделенную ДНК хранили при -20 °С. Для изучения влияния длительного хранения эксплантов при низкой положительной температуре на генетическую стабильность изучаемых сортов мяты провели ISSR-анализ генома растений мяты с праймерами M2, M3, M4, M8 [34] (табл. 1).

Таблица 1. ISSR праймеры, использованные для постановки ПЦР

Table 1. ISSR primers used for PCR

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'–3'	Температура отжига, °С
M2	(AC) ₈ (C/T)G	50,0
M3	(GA) ₈ (C/T)C	52,7
M4	(AG) ₈ YC	50,0
M8	(GTG) ₅	52,7

Для постановки ПЦР-реакции использовали компоненты, произведенные компанией «Евроген» (Россия). Общий объем реакционной смеси со-

ставлял 20 мкл: 1х TaqTurbo буфер с 2,5 mM Mg²⁺, 0,2 mM каждого dNTP (нуклеозидтрифосфат), 5 пкМ праймера, HSTaq ДНК-полимераза 2 единицы/порцию, в качестве матрицы применяли выделенную ДНК исследуемых растений в количестве 10–20 нг/реакцию. ПЦР проводили с использованием следующего режима амплификации: 1) начальная денатурация ДНК при 95 °С (3 мин); 2) далее 35 циклов 95 °С (30 с), 50,0 или 52,7 °С (30 с), 72 °С (1 мин); 3) окончательный синтез цепи ДНК при 72 °С (5 мин). Для работы использовали амплификатор T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Оценку ПЦР-продуктов проводили электрофоретическим разделением в 2,0%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия в TAE-буфере и последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. Полученные электрофореграммы обработаны с помощью программы TotalLab 2.01 (trial version) (Phoretix, Великобритания).

При культивировании *in vitro* (депонировании и микроразмножении) в каждом варианте опыта использовали 20 эксплантов в 2-кратной повторности. Данные обработаны статистически с использованием программы Statistica 10,0. Полученные результаты представлены в таблицах в виде средней арифметической величины со стандартной ошибкой. Для анализа достоверности различий применяли многодиапазонный тест Дункана при $p \leq 0,05$.

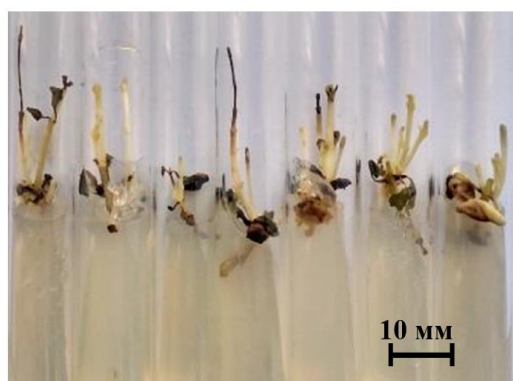
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Созданию медленно растущей коллекции *in vitro* предшествует целый комплекс процессов: введение в асептическую культуру меристем, выделенных из донорного растения; собственно микроразмножение; подбор условий для роста культуры при низкой положительной температуре с сохранением жизнеспособности после депонирования. При введении в культуру *in vitro* меристем мяты у изученных сортов наблюдали 100%-ю приживаемость эксплантов. Для культивирования меристем использовали питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением БАП (1,0 мг/л) и ИУК (0,5 мг/л), оптимизированную нами ранее [27]. После недели культивирования на этой среде отмечено начало развития меристем, а через 4 недели наблюдали 1–3 побега. В дальнейшем для второго этапа (собственно микроразмножения) или депонирования в качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом, которые получали при микрочеренковании основного и дополнительных побегов, сформировавшихся *in vitro*. Далее пробирки с эксплантами помещали в холодильную камеру на 1 год, где их культивировали при 4–6 °С без пересадки и освещения.

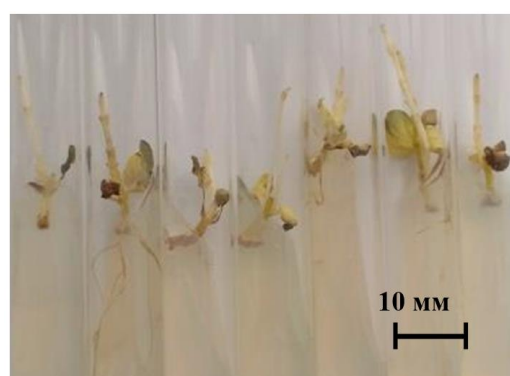
После одного года сохранения *in vitro* визуально оценивали количество жизнеспособных и развивающихся эксплантов (рис. 1, табл. 2).

Установлено, что все жизнеспособные экспланты после такого длительного хранения медленно развивались. Они формировали светлые этиолированные микропобеги с мелкими редуцированными листьями. Образования каллуса у основания побегов не отмечено ни у одного из сортов. Это очень важный аспект при депонировании, так как необходимо исключить индукцию соматональных вариантов из морфогенного каллуса, что может привести к потере генетической стабильности. На верхушках некоторых микропобегов у сорта Ажурная отмечены некро-

тические поражения (рис. 1, А). У этого сорта способность переносить холодный стресс оказалась достоверно ниже, так как количество жизнеспособных побегов составило 56,5%, а у сорта Бергамотная – 85,7% (см. табл. 2). Ранее для мяты сорта Удайчанка установлено, что число жизнеспособных эксплантов после года хранения при низкой положительной температуре *in vitro* составило 58,0% [31]. В работе Т. Islam с соавторами данные о жизнеспособности культур после депонирования 4-х образцов мяты, к сожалению, не представлены [30].



А



В



С



Д

Рис. 1. Микропобеги мяты сортов Ажурная (А) и Бергамотная (В) после одного года депонирования *in vitro* при 4–6 °С без освещения и микропобеги сортов Ажурная (С) и Бергамотная (Д) после второго субкультивирования при отрастании в условиях культуральной комнаты после года хранения *in vitro*

Fig. 1. Microshoots of Azhurnaya (A) and Bergamotnaya (B) mint cultivars after one year of *in vitro* deposition at 4–6 °C without illumination and microshoots of cultivars Azhurnaya (C) and Bergamotnaya (D) after the 2nd subculturing during regrowth in a culture room after a year of conservation *in vitro*

Таблица 2. Влияние хранения *in vitro* при 4–6 °С в течение 1-го года на морфометрические показатели эксплантов мяты сортов Ажурная и Бергамотная

Table 2. Influence of *in vitro* conservation at 4–6 °C for a year on the morphometric parameters of explants of mint cultivars Azhurnaya and Bergamotnaya

Морфометрические показатели	Сорт	
	Ажурная	Бергамотная
Число жизнеспособных эксплантов, %	56,5±5,8 ^b	85,7±7,1 ^a
Число развивающихся побегов, %	56,5±5,8 ^b	85,7±7,1 ^a
Число побегов, шт./эксплант	2,5±0,2 ^a	1,2±0,1 ^b
Длина побега, мм	13,2±0,9 ^a	11,8±1,2 ^a
Число узлов, шт./побег	1,4±0,1 ^a	1,6±0,1 ^a
Частота ризогенеза, %	8,6±1,5 ^b	52,3±8,1 ^a
Число корней, шт./побег	0,09±0,06 ^b	0,71±0,17 ^a
Длина корня, мм	40,5±4,4 ^a	39,2±5,2 ^a

Примечание. Значения, обозначенные одной и той же буквой в пределах строки, существенно не различаются (многодиапазонный тест Дункана при $p \leq 0,05$).

В работах многих исследователей показано, что низкая положительная температура при хранении в изолированной культуре выступает в качестве фактора, замедляющего рост растений [3–6, 35]. При анализе морфометрических показателей изучаемых нами сортов мяты также было установлено, что развитие микропобегов происходило с меньшей скоростью, чем в обычных культуральных условиях при микроразмножении *in vitro*. При этом у эксплантов сорта Ажурная наблюдали в 2 раза больше побегов, чем у сорта Бергамотная, однако длина побегов, число узлов и длина корней достоверно не различались. Частота ризогенеза у микропобегов 'Ажурной' была существенно ниже, чем у 'Бергамотной' (8,6 и 52,3% соответственно), как и число корней (см. табл. 2). При исследовании 4-х образцов мяты видов *M. villosa* Huds. и *M. piperita* L. также было выявлено наличие корней, при этом частота ризогенеза варьировалась от 16,0 до 86,0% [30].

После года депонирования при низкой положительной температуре жизнеспособные микропобеги черенковали, пересаживали на свежую питательную среду и помещали в условия культуральной комнаты (26 °С, освещенность – 2–3 клк) для оценки способности к восстановлению роста. Анализ морфометрических параметров проводили в течение двух субкультивирований (табл. 3). После первого субкультивирования число развивающихся побегов у 'Ажурной' и 'Бергамотной' составило 45,0 и 40,0% соответственно. Побеги были тонкими, с мелкими листьями. После второго субкультивирования количество развивающихся побегов достоверно возросло и достигло 100% у обоих сортов, что свидетельствует о полном восстановлении культур после длительного сохранения в условиях замедленного роста *in vitro*. Побеги имели насыщенный зеленый цвет, хорошо развитые листья и корни (см. рис. 1).

Таблица 3. Влияние количества субкультивирований при отрастании после хранения *in vitro* в течение 1-го года на морфометрические показатели эксплантов двух сортов мяты

Table 3. Influence of subcultures number during regrowth after conservation *in vitro* for a year on the morphometric parameters of two mint cultivars explants

Морфометрические показатели	Количество субкультивирований			
	1		2	
	Сорт		Сорт	
	Ажурная	Бергамотная	Ажурная	Бергамотная
Число развивающихся побегов, %	45,0±11,4 ^b	40,0±11,2 ^b	100±0,0 ^a	100±0,0 ^a
Число побегов, шт./эксплант	1,5±0,3 ^b	1,6±0,1 ^b	2,3±0,2 ^a	1,9±0,2 ^{ab}
Длина побега, мм	39,5±7,7 ^a	39,0±8,9 ^a	47,0±4,6 ^a	48,3±5,6 ^a
Число узлов, шт./побег	3,0±0,5 ^a	2,6±0,4 ^a	3,1±0,2 ^a	2,9±0,3 ^a
Частота ризогенеза, %	11,1±2,1 ^b	37,5±4,6 ^a	30,0±3,1 ^a	35,0±3,3 ^a
Число корней, шт./побег	0,2±0,1 ^c	1,0±0,0 ^b	1,5±0,2 ^a	1,3±0,1 ^{ab}
Длина корня, мм	21,6±4,4 ^a	15,6±7,2 ^a	17,8±5,1 ^a	22,2±3,1 ^a
Коэффициент размножения	4,6±1,5 ^b	4,3±0,5 ^b	7,3±0,8 ^a	5,5±0,3 ^{ab}

Примечание. Значения, обозначенные одной и той же буквой в пределах строки, существенно не различаются (многодиапазонный тест Дункана при $p \leq 0,05$).

Число побегов ко второму субкультивированию возросло у обоих сортов: с 1,5 до 2,3 шт./эксплант – у сорта Ажурная, с 1,6 до 1,9 шт./эксплант – у сорта Бергамотная. По длине побегов и числу узлов достоверных изменений не выявлено, однако наблюдалась тенденция к увеличению этих показателей. У сорта Ажурная ко второму субкультивированию достоверно увеличились частота ризогенеза (с 11,1 до 30,0%) и число корней (с 0,1 до 1,5 шт./побег). При этом отмечена тенденция уменьшения длины корней. У 'Бергамотной' достоверных различий влияния количества субкультивирований на данные параметры не наблюдали. Коэффициент размножения у обоих сортов достоверно вырос ко второму субкультивированию по сравнению с первым: у 'Ажурной' – с 4,6 до 7,3, у 'Бергамотной' – с 4,3 до 5,5. Такие коэффициенты размножения сопоставимы с этим параметром у изученных сортов мяты при клоновом микроразмножении *in vitro* [27, 28].

Для сортов Удайчанка, Прилукская Карвонная и Украинская Перечная ранее также было показано, что после депонирования (при низкой положительной температуре) при последующем отрастании в культуральной комнате количество жизнеспособных микропобегов и их морфометрические параметры ко второму субкультивированию почти полностью восстановились [31].

В одном из исследований после депонирования двух видов мяты (*M. villosa* Huds. и *M. piperita* L.) микропобеги для адаптации сразу высаживали в условия закрытого грунта и выращивали около месяца [30]. К сожалению, данные о количестве жизнеспособных побегов *ex vitro* авторы не привели. Высота развивающихся побегов в зависимости от генотипа достигала от 70,2 до 180,4 мм. При изучении образцов мяты тех же видов (*M. villosa* Huds. и *M. piperita* L.) Е. R. J. Keller с соавторами депонировали экспланты в общей сложности 3,5 года и каждые 6 месяцев переносили их

на свежую питательную среду [29]. При этом было показано постепенное увеличение количества узлов на побегах: через 6 месяцев – 9,0 шт./побег, через 3,5 года – до 20,0 шт./побег. Для адаптации микрорастения мяты после депонирования высаживали в тепличные условия, где приживаемость побегов достигала практически 100%. В работе С. Martin с соавторами показано успешное сохранение образцов *M. piperita* L. в течение 1,5–2 лет при температуре 2 и 10 °C с 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2–4 мкМ м⁻²с⁻¹ [2].

Важнейшей задачей при создании коллекций *in vitro* является сохранение генотипа исходных образцов и сортов. Для выявления генетической стабильности при депонировании *in vitro* провели сравнительный анализ ISSR-участков геномной ДНК исходных донорных растений мяты сортов Ажурная и Бергамотная и микрорастений этих сортов после года депонирования при низкой положительной температуре (рис. 2). В результате ISSR-анализа, выполненного с четырьмя праймерами, детектировано от 2 до 8 амплифицированных фрагментов размером от 189 до 1280 п.н. (табл. 4). Праймер М3 оказался наименее информативным, так как с его помощью получено наименьшее количество ампликонов. При анализе ДНК-матриц не выявлен полиморфизм амплифицированных ISSR-ПЦР-фрагментов. Таким образом, генетических различий между материнскими растениями и микрорастениями *in vitro* мяты сортов Ажурная и Бергамотная после депонирования в течение 12-ти месяцев не обнаружено.

Полученные результаты показали, что ISSR-профили ДНК микропобегов после года сохранения *in vitro* при низкой положительной температуре полностью идентичны по количеству и длине ампликонов растениям исходных сортов (выращенным в условиях закрытого грунта) по всем четырем использованным маркерам (см. табл. 4).

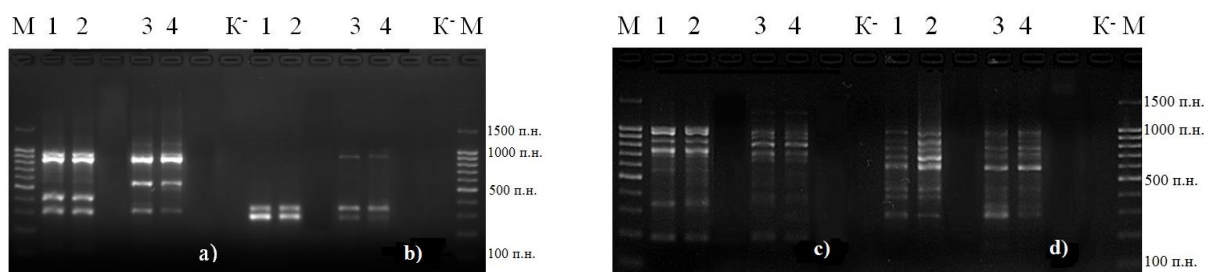


Рис. 2. Электрофореграммы результатов ISSR-ПЦР ДНК исходных растений сортов мяты Ажурная (1) и Бергамотная (3) и микропобегов этих сортов (соответственно – 2 и 4) после 1-го года сохранения *in vitro*, полученные с использованием ISSR-праймеров М2 (а), М3 (б), М4 (с), М8 (д). М – маркер молекулярных весов 100+ bp DNA Ladder; К– отрицательный контроль

Fig. 2. Electrophoregrams of the ISSR-PCR DNA results of initial plants mint cultivars Azhurnaya (1) and Bergamotnaya (3) and microshoots of these cultivars (2 and 4, respectively) after 1 year of *in vitro* conservation, obtained using ISSR primers M2 (a), M3 (b), M4 (c), M8 (d). M – molecular weight marker 100+ bp DNA Ladder; К– negative control

Таблица 4. Длина ампликонов (п.н.), полученных с использованием ISSR-праймеров, у растений исходных сортов мяты и микропобегов после 1-го года сохранения *in vitro* при 4–6 °C

Table 4. Length of amplicons (bp) obtained using ISSR primers at initial plants of mint cultivars and microshoots after 1 year of conservation *in vitro* at 4–6 °C

Праймер	Сорт Ажурная		Сорт Бергамотная	
	исходные растения	депонирование 1 год	исходные растения	депонирование 1 год
M2	900; 836; 413; 311	900; 836; 413; 311	1118; 913; 824; 513; 311	1118; 913; 824; 513; 311
M3	323; 269	323; 269	887; 330; 264	887; 330; 264
M4	1011; 939; 850; 735; 675; 553; 336; 189	1011; 939; 850; 735; 675; 553; 336; 189	1280; 939; 890; 810; 700; 636; 375; 192	1280; 939; 890; 810; 700; 636; 375; 192
M8	949; 840; 753; 659; 579; 424; 380; 276	949; 840; 753; 659; 579; 424; 380; 276	939; 850; 753; 675; 566; 419; 313; 276	939; 850; 753; 675; 566; 419; 313; 276

Литературные данные, касающиеся генетической гетерогенности растений, полученных в культуре изолированных органов и тканей, очень отличаются. Это объясняется тем, что авторы используют различные виды или сорта растения, различные биотехнологии и условия культивирования *in vitro* [11]. Л. Самарина с соавторами провели изучение растений чая после длительного микроразмножения в течение 7 лет с использованием пролиферации пазушных почек [14]. С помощью ПЦР-анализа на ISSR-маркерах они выявили небольшие генетические дистанции между размноженными проростками и исходным сортом Колхида. В некоторых других работах при проведении молекулярно-генетического анализа с использованием ISSR- и RAPD-маркеров также обнаружена генетическая нестабильность сортов и клонов чая после клонального микроразмножения *in vitro* [цит. по 14]. Н. Али с соавторами при микроразмножении *Orthosiphon stamineus* Benth. после трех субкультивирований *in vitro* выявили относительно низкий уровень полиморфизма (7,32%) среди полученных образцов [13]. Интересные данные получены при сравнительном анализе генетической стабильности 14-ти образцов картофеля, которые хранились *in vitro* от года до 26-ти лет, и их полевых аналогов [15]. Авторы установили, что 11 образцов картофеля в условиях *in vitro* были идентичны материнским растениям по изученным ДНК-маркерам. Однако у 3-х сортов обнаружены несоответствия между образцами *in vitro* и их исходными образцами *in vivo*.

В то же время во многих исследованиях показана генетическая стабильность растений в ходе клонального микроразмножения или длительного сохранения *in vitro*. Так, для гибридов тополя белого (*Populus alba* L.) и сереющего (*P. canescens* Sm.) установлено, что полученные с использованием меристемных культур клоны, находящиеся в коллекции длительного депонирования *in vitro* (21 год и 7 лет соответственно), не имели изменений в ДНК-спектрах по всем локусам в сравнении с материнскими деревьями [12]. Длительное хранение микроклонов *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst. в условиях замедленного роста *in vitro* при температуре 7 °C в те-

чение 12-ти месяцев также не вызвало генетической изменчивости у регенерантов, сформированных в ходе прямого органогенеза в первом пассаже, следующем за депонированием [16].

Что касается аналогичных исследований мяты, то имеются сведения о проведении молекулярно-генетической оценки 161 образца *M. piperita* L. при использовании разных методов хранения (криохранение, депонирование *in vitro* в течение 2–3-х лет, полевая коллекция) [2]. Установлено, что образцы, сохраненные с помощью биотехнологических методик, проявили генетическую стабильность, тогда как часть образцов из полевой коллекции отличалась от аналогичных образцов из двух других коллекций на 30–40%.

Представленная нами работа по изучению сохранения *in vitro* мяты на примере сортов Ажурная и Бергамотная показала, что длительное депонирование эксплантов при используемых условиях в течение года не привело к возникновению соматической изменчивости, что свидетельствует о перспективности применения данных методических приемов для создания коллекции ценных генотипов *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что растения мяты сортов Ажурная и Бергамотная можно успешно депонировать *in vitro* без освещения при низкой положительной температуре (4–6 °C) в течение 1-го года. Жизнеспособность эксплантов после 12-ти месяцев хранения составила 56,5–85,7%. После 2-х субкультивирований в условиях культуральной комнаты (при 26 °C и освещенности 2–3 клк) наблюдали полное восстановление всех морфометрических параметров микропобегов (высоты и числа побегов, количества узлов на побеге, частоты ризогенеза). После второго субкультивирования количество жизнеспособных развивающихся побегов достигло 100%, при этом коэффициент размножения составил: у 'Ажурной' – 7,3, у 'Бергамотной' – 5,5. С помощью ISSR-анализа по 4-м изученным ДНК-маркерам выявлено, что исследованные сорта сохранили генетическую стабильность после года хранения в условиях медленно растущей культуры *in vitro*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Eftekhari A., Khusro A., Ahmadian E., Dizaj S. M., Dinparast L., Bahadori M. B., et al. Phytochemical and nutra-pharmaceutical attributes of *Mentha* spp.: A comprehensive review // *Arabian Journal of Chemistry*. 2021. Vol. 14, no. 5. Article number 103106. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103106>.
2. Martin C., Senula A., González-González I., Acosta A., Keller E. R. J., Gonzalez-Benito M. E. Genetic identity of three mint accessions stored by different conservation procedures: field collection, *in vitro* and cryopreservation // *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2013. Vol. 60, no. 1. P. 243–249. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9830-x>.
3. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2011. N 47. P. 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>.
4. Cruz-Cruz C. A., Gonzalez-Arnao M. T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity // *Resources*. 2013. N 2. P. 73–95. <https://doi.org/10.3390/resources2020073>.
5. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: колл. монография; под общ. ред. И. В. Митрофановой. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 260 с. <https://doi.org/10.32514/978-5-907118-87-4>.
6. Chauhan R., Singh V., Quraishi A. *In vitro* conservation through slow-growth storage. In: M. Faisal, A. Alatar (ed.). *Synthetic seeds. Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*. Springer Nature Switzerland AG. 2019. P. 397–416. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_19.
7. Молканова О. И., Коновалова Л. Н., Стахеева Т. С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // *Бюллетень государственного Никитского ботанического сада*. 2016. N 120. С. 17–23.
8. Спиридович Е. В., Фоменко Т. И., Власова А. Б., Козлова О. Н., Вайновская И. Ф., Юхимук А. Н. [и др.]. Асептическая коллекция и банк ДНК Центрального ботанического сада НАН Беларуси как эффективные инструменты сохранения редких растений // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2017. N 3. С. 117–128.
9. Рябушкина Н. А. Клональная и микроклональная изменчивость растений // *Биотехнология. Теория и практика*. 2014. N 2. С. 17–27. <https://doi.org/10.11134/btp.2.2014.3>.
10. Wolfe A. D. ISSR techniques for evolutionary biology // *Methods in Enzymology*. 2005. Vol. 395. P. 134–144. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95009-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95009-X).
11. Teixeira Silva J. A., Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M. Molecular markers in micro-propagation, tissue culture and *in vitro* plant research // *Genes, Genomes and Genomics*. 2007. Vol. 1, no. 1. P. 66–72.
12. Машкина О. С., Федулова Т. П., Табацкая Т. М., Кондратьева А. М., Шабанова Е. А. Молекулярно-генетическая и цитогенетическая оценка перспективных гибридов и размноженных *in vitro* клонов тополя и осины // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2016. N 2. С. 60–69.
13. Ali H., Musa I. F., Bakar N. A. A., Karsani S. A., Yaacob J. S. *In vitro* regeneration and ISSR-based genetic fidelity analysis of *Orthosiphon stamineus* Benth. // *Agronomy*. 2019. Vol. 9, no. 12. P. 778. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120778>.
14. Samarina L., Gvasaliya M., Koninskaya N., Rakhmangulov R., Efremov A., Kiselyova N., et al. A comparison of genetic stability in tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] plantlets derived from callus with plantlets from long-term *in vitro* propagation // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2019. Vol. 138, no. 4. P. 467–474. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01642-2>.
15. Антонова О. Ю., Трускинов Э. В., Фролова Д. В., Гавриленко Т. А. Анализ генетической стабильности образцов картофеля, сохраняемых в условиях *in vitro* // *Аграрная Россия*. 2004. N 6. С. 25–30. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2004-6-25-29>.
16. Мурасева Д. С., Звягина Н. С., Новикова Т. И., Дорогина О. В. Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro* // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017. Т. 21. N 5. С. 554–560. <https://doi.org/10.18699/VJ17.272>.
17. Бугаенко Л. А., Шило Н. П. Полиплоидия и межвидовая гибридизация у мяты. Симферополь: Бизнес-Информ, 2012. 296 с.
18. Шульга Е. Б. Новые сорта мяты для Крыма и других регионов юга России // *Таврический вестник аграрной науки*. 2017. N 1 (9). С. 28–36.
19. Laslo V., Zăpârțan M., Vicas S., Agud E. Use of nodal explants in "*in vitro*" micro-propagation of *Mentha piperita* L. // *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Protectia Mediului*. 2011. Vol. 16. P. 247–251.
20. Bolouk S. G., Kazemitabar A. S. K., Sinaki J. M. *In vitro* culture of the peppermint plant (*Mentha piperita*) without the use of hormones // *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 2013. Vol. 6, no. 18. P. 1279–1283.
21. Islam A. T. M. R., Alam M. F. *In vitro* callus induction and indirect organogenesis of *Mentha piperita* (L.) – an aromatic medicinal plant // *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 4, no. 3. P. 49–60. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2018.4.3.0078>.
22. Wijaya B. K., Hardjo P. H., Emantoko S. Menthol from the stem and leaf *in vitro* *Mentha piperita* Linn. // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019. Vol. 293, no. 1. Article number 012009. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/293/1/012009>.
23. Vaidya B. N., Asanakunov B., Shahin L.,

Jernigan H. L., Joshee N., Dhekney S. A. Improving micropropagation of *Mentha × piperita* L. using a liquid culture system // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2019. Vol. 55, no. 1. P. 71–80. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-09952-4>.

24. Ghiorghe G. A journey into of the universe of *in vitro* cultures of plants. Callogenesis // *Environment and Natural Resources Research*. 2019. Vol. 9, no. 4. P. 45–60. <https://doi.org/10.5539/enrr.v9n4p45>.

25. Егорова Н. А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД «Автограф», 2021. 315 с. <https://doi.org/10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4>.

26. Benahmed A., Harfi B., Belkhiri A. Biological activity of essential oils of *Mentha pulegium* from field-grown and acclimated *in vitro* plants // *Current Science*. 2019. Vol. 116, no. 11. P. 1897–1911. <https://doi.org/10.18520/cs/v116/i11/1897-1904>.

27. Загорская М. С., Егорова Н. А. Оптимизация состава питательной среды для клонального микроразмножения *in vitro* сортов мяты Ажурная и Бергамотная // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия*. 2018. Т. 4 (70). N 2. С. 73–84.

28. Zagorskaya M., Yegorova N. Effect of prolonged cultivation on the micropropagation *in vitro* of mint cultivars and breeding samples // *BIO Web of Conferences*. 2018. Vol. 11. Article number 00049. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20181100049>.

29. Keller E. R. J., Senula A., Dreiling M. Gene-banking of vegetatively propagated medicinal plants – two cases: *Allium* and *Mentha* // *Acta Horticulturae*. 2005. N 676. P. 103–109. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.676.12>.

30. Islam T., Leunufna S., Dembele D. P., Keller E. R. J. *In vitro* conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions // *Plant Tissue Culture*. 2003. Vol. 13, no. 1. P. 37–46.

31. Егорова Н. А., Ставцева И. В., Якимова О. В., Каменек Л. И., Кривоухатко А. Г. Некоторые аспекты клонального микроразмножения и сохранения *in vitro* эфиромасличных растений // *Таврический вестник аграрной науки*. 2015. N 1 (3). С. 18–24.

32. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, no. 3. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

33. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemical Bulletin*. 1987. Vol. 19. P. 11–15.

34. Семёнова М. В., Енина О. Л., Шелепова О. В. Внутри- и межвидовая изменчивость *Mentha arvensis* L. и *M. canadensis* L. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019. Вып. 23. N 8. С. 1067–1075. <https://doi.org/10.18699/VJ19.582>.

35. Дорошенко Н. П. К вопросу создания коллекции генофонда винограда *in vitro* // *Русский виноград*. 2017. N 5. С. 68–86.

REFERENCES

1. Eftekhari A., Khusro A., Ahmadian E., Dizaj S. M., Dinparast L., Bahadori M. B., et al. Phytochemical and nutra-pharmaceutical attributes of *Mentha* spp.: A comprehensive review. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021;14(5). Article number 103106. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103106>.

2. Martin C., Senula A., González-González I., Acosta A., Keller E. R. J., Gonzalez-Benito M. E. Genetic identity of three mint accessions stored by different conservation procedures: field collection, *in vitro* and cryopreservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2013;60(1):243–249. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9830-x>.

3. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2011;47:5–16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>.

4. Cruz-Cruz C. A., Gonzalez-Arnao M. T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*. 2013;2:73–95. <https://doi.org/10.3390/resources2020073>.

5. Mitrofanova I. V. (ed.) *Fundamentals of in vitro genebank creation of species, cultivars and forms in ornamental, aromatic and fruit crops*. Simferopol: Arial; 2018. 260 p. (In Russian). <https://doi.org/10.32514/978-5-907118-87-4>.

6. Chauhan R., Singh V., Quraishi A. *In vitro* conservation through slow-growth storage. In: Faisal M.,

Alatar A. (eds.). *Synthetic seeds. Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*. Springer Nature Switzerland AG; 2019, p. 397–416. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_19.

7. Molkanova O. I., Konovalova L. N., Stakheyeva T. S. Propagation and conservation characteristics of valuable and rare species collection *in vitro*. *Byulleten' gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada = Bulletin of the State Nikitsky Botanical Garden*. 2016;120:17–23. (In Russian).

8. Spiridovich E. V., Fomenko T. I., Vlasava N. B., Kozlova O. N., Vaynovskaya I. F., Yukhimuk A. N., et al. Conservation of rare plants in the aseptic collection and DNA bank of the Central Botanical Garden of NAS of Belarus. *Izvestiya Natsional'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*. 2017;3:117–128. (In Russian).

9. Ryabushkina N. A. Clonality and somaclonal variations in plants. *Biotechnologiya. Teoriya i praktika = Biotechnology. Theory and practice*. 2014;2:17–27. (In Russian). <https://doi.org/10.11134/btp.2.2014.3>.

10. Wolfe A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods in Enzymology*. 2005;395:134–144. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95009-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95009-X).

11. Teixeira da Silva J. A., Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M. Molecular markers in micropropagation, tissue culture and *in vitro* plant research.

Genes, Genomes and Genomics. 2007;1(1):66-72.

12. Mashkina O. S., Fedulova T. P., Tabatskaya T. M., Kondratyeva A. M., Shabanova E. A. Molecular-genetic and cytogenetic assessment of promising hybrids and clones of poplar and aspen propagated *in vitro*. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2016;2:60-69. (In Russian).

13. Ali H., Musa I. F., Bakar N. A. A., Karsani S. A., Yaacob J. S. *In vitro* regeneration and ISSR-based genetic fidelity analysis of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Agronomy*. 2019;9(12):778. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120778>.

14. Samarina L., Gvasaliya M., Koninskaya N., Rakhmangulov R., Efremov A., Kiselyova N., et al. A comparison of genetic stability in tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] plantlets derived from callus with plantlets from long-term *in vitro* propagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2019;138(4):467-474. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01642-2>.

15. Antonova O. Yu., Truskinov E. V., Frolova D. V., Gavrilenko T. A. Analysis of the genetic stability of potato samples preserved under *in vitro* conditions. *Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia*. 2004;6:25-30. (In Russian). <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2004-6-25-29>.

16. Muraseva D. S., Zvyagina N. S., Novikova T. I., Dorogina O. V. Conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) in *in vitro* collection. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(5):554-560. (In Russian). <https://doi.org/10.18699/VJ17.272>.

17. Bugaenko L. A., Shilo N. P. *Polyploidy and interspecies hybridization in mint*. Simferopol: Business-Inform; 2012. 296 p. (In Russian).

18. Shulga E. B. New varieties of mint for Crimea and other southern regions of Russia. *Tavricheskii vestnik agrarnoi nauki = Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2017;1:28-36. (In Russian).

19. Laslo V., Zăpârțan M., Vicas S., Agud E. Use of nodal explants in "*in vitro*" micro-propagation of *Mentha piperita* L. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Protectia Mediului*. 2011;16:247-251.

20. Bolouk S. G., Kazemitabar A. S. K., Sinaki J. M. *In vitro* culture of the peppermint plant (*Mentha piperita*) without the use of hormones. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 2013;6(18):1279-1283.

21. Islam A. T. M. R., Alam M. F. *In vitro* callus induction and indirect organogenesis of *Mentha piperita* (L.) – an aromatic medicinal plant. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2018;4(3):49-60. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2018.4.3.0078>.

22. Wijaya B. K., Hardjo P. H., Emantoko S. Menthol from the stem and leaf *in vitro* *Mentha piperita* Linn. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019;293(1). Article number 012009. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/293/1/012009>.

23. Vaidya B. N., Asanakunov B., Shahin L.,

Jernigan H. L., Joshee N., Dhekney S. A. Improving micropropagation of *Mentha × piperita* L. using a liquid culture system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2019;55(1):71-80. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-09952-4>.

24. Ghiorghe G. A journey into of the universe of *in vitro* cultures of plants. Callogenesis. *Environment and Natural Resources Research*. 2019;9(4):45-60. <https://doi.org/10.5539/enrr.v9n4p45>.

25. Yegorova N. A. *Biotechnology of essential oil plants: creation of new forms and micropropagation in vitro*. Simferopol: Izdatel'skii dom "Aftograf"; 2021. 315 p. (In Russian). <https://doi.org/10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4>.

26. Benahmed A., Harfi B., Belkhir A. Biological activity of essential oils of *Mentha pulegium* from field-grown and acclimated *in vitro* plants. *Current Science*. 2019;116(11):1897-1911. <https://doi.org/10.18520/cs/v116/i11/1897-1904>.

27. Zagorskaya M. S., Yegorova N. A. Optimization of the nutrient medium composition for the clonal micropropagation *in vitro* mint cultivars Azhurnaya and Bergamotnaya. *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya = Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*. 2018;4(2):73-84. (In Russian).

28. Zagorskaya M., Yegorova N. Effect of prolonged cultivation on the micropropagation *in vitro* of mint cultivars and breeding samples. *BIO Web of Conferences*. 2018;11. Article number 00049. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20181100049>.

29. Keller E. R. J., Senula A., Dreiling M. Genebanking of vegetatively propagated medicinal plants – two cases: *Allium* and *Mentha*. *Acta Horticulturae*. 2005;676:103-109. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.676.12>.

30. Islam T., Leunufna S., Dembele D. P., Keller E. R. J. *In vitro* conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions. *Plant Tissue Culture*. 2003;13(1):37-46.

31. Yegorova N. A., Stavtzeva I. V., Yakimova O. V., Kamenyok L. I., Krivochatko A. G. Some aspects of clonal micropropagation and conservation *in vitro* of essential oil plants. *Tavricheskii vestnik agrarnoi nauki = Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2015;1:18-24. (In Russian).

32. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

33. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19:11-15.

34. Semenova M. V., Enina O. L., Shelepov O. V. Intra- and interspecific variability of *Mentha arvensis* L. and *M. canadensis* L. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(8):1067-1075. (In Russian). <https://doi.org/10.18699/VJ19.582>.

35. Doroshenko N. P. About creation of vine gene pool collection *in vitro*. *Russkii vinograd*. 2017;5:68-86. (In Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Н. А. Егорова,

д.б.н., доцент, заведующая лабораторией биотехнологии отдела эфиромасличных и лекарственных культур, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, 295043, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, Российская Федерация, yegorova.na@mail.ru <https://orcid.org/0000-0002-5455-3044>

М. С. Загорская,

младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, 295043, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, Российская Федерация, zagorskayamargo@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-0300-3031>

С. Ф. Абдурашитов,

к.б.н., заведующий лабораторией молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики в сельском хозяйстве, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, 295043, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, Российская Федерация, asuleyman83@rambler.ru <https://orcid.org/0000-0003-1631-4840>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 12.01.2022.
Одобрена после рецензирования 15.02.2022.
Принята к публикации 28.02.2022.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalia A. Yegorova,

Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory of Biotechnology, Department of Essential Oil and Medicinal Crops, Research Institute of Agriculture of Crimea, 150, Kievskaya St., Simferopol, 295043, Russian Federation, yegorova.na@mail.ru <https://orcid.org/0000-0002-5455-3044>

Margarita S. Zagorskaya,

Junior Researcher, Research Institute of Agriculture of Crimea, 150, Kievskaya St., Simferopol, 295043, Russian Federation, zagorskayamargo@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-0300-3031>

Suleiman F. Abdurashytov,

Cand. Sci. (Biology), Head of Laboratory of Molecular Genetics, Proteomics and Bioinformatics in Agriculture, Research Institute of Agriculture of Crimea, 150, Kievskaya St., Simferopol, 295043, Russian Federation, asuleyman83@rambler.ru <https://orcid.org/0000-0003-1631-4840>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 12.01.2022.
Approved after reviewing 15.02.2022.
Accepted for publication 28.02.2022.