

DOI

УДК 633.81:57.085.2

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO* *THYMUS SERPYLLUM L.* И *THYMUS CAUCASICUS WILLD.***А. Ш. Тевфик, Н. А. Егорова**

Реферат. Исследования проводили с целью оптимизации условий культивирования для второго этапа клонального микроразмножения *Thymus caucasicus Willd.* и *Thymus serpyllum L.* Сегменты стебля с одним узлом (8...10 мм), полученные при микрочеренковании побегов, культивировали на 10 различных питательных средах Мурагиге и Скуга (МС), содержащих 2% сахарозы и 0,8% агар-агара, с добавлением кинетина, тидиазурона, бензиламинопурина (БАП), индолилуксусной и гибберелловой кислот. При микроразмножении использовали различные культуральные сосуды (банки, колбы, пробирки). Продолжительность цикла выращивания варьировала от 40 до 70 сут. Самый высокий коэффициент размножения у *T. serpyllum* отмечали на среде МС с содержанием 1,0 мг/л БАП и составляет 6,7, *T. caucasicus* – на среде МС с 1,0 мг/л кинетина (16,1). Наибольшая эффективность культивирования обеих видов тимьяна достигалась в банках, при использовании которых коэффициент размножения был выше, чем при выращивании в пробирках или колбах, в 1,4...2,1 раза. Изучаемые виды тимьяна целесообразно культивировать при стандартном цикле 40 сут. Лучшие сочетания различных факторов размножения тимьяна способствовали максимальному проявлению морфогенетического потенциала в экспериментах *in vitro*. Наибольшее влияние на коэффициент размножения оказывали тип культурального сосуда, взаимодействие состава питательной среды и генотипа, а также состав питательной среды (доли влияния факторов составляли от 20,0% до 25,3%). Результаты исследований послужили основой разработки протокола, который можно использовать для ускоренного микроразмножения *T. caucasicus* и *T. serpyllum*.

Ключевые слова: тимьян ползучий (*Thymus serpyllum L.*), тимьян кавказский (*Thymus caucasicus Willd.*), клональное микроразмножение, *in vitro*, регуляторы роста.

Введение. В последние годы в медицине огромное значение уделяют фитопрепаратам. Внимание учёных сосредоточено на растениях рода *Thymus*, эфирное масло которых применяют в качестве мочегонных, антиоксидантных, успокаивающих, жаропонижающих, а также противосудорожных лекарственных средств. Имеются сведения об использовании препаратов из этого растения в виде мазей и компрессов при болях в суставах, ревматизме и при кожных заболеваниях [1, 2]. В эфирном масле ряда видов *Thymus* содержится ценное фенольное соединение – тимол, которое обладает бактерицидным, противовирусным, противогрибковым и противовоспалительным действием [3, 4, 5]. Существуют научные исследования, в которых описывается применение тимьяна при нарушениях работы пищеварительной системы, а также как вспомогательное средство для выведения желчи [6]. Издавна известно использование настоев и отваров из растительного сырья тимьяна, как лекарственных средств, обладающих отхаркивающим и антисептическим действием. Поэтому их включают в терапии заболеваний дыхательной системы (бронхита, ларингита, ангины и трахеита) [7, 8].

В последние десятилетия все больше видов сельскохозяйственных растений размножают с привлечением приемов культуры *in vitro*, которые позволяют повысить эффективность традиционного размножения и получить растения, оздоровленные от грибных, бактериальных, а при использовании хемо- или термотерапии, и вирусных инфекций. Методы микроразмножения также необходимы при разработке биотехнологий депонирования растений

в условиях *in vitro* [9, 10].

Для достижения эффективности процесса микроразмножения *in vitro* необходимо оптимизировать состав питательной среды для каждого этапа и подобрать оптимальные условия культивирования, такие как продолжительность цикла выращивания, тип культурального сосуда и другие факторы. При этом для каждого вида или даже сорта растения разрабатывают конкретную методику клонального размножения [11, 12].

При анализе литературных источников по микроразмножению видов рода *Thymus* не было выявлено данных о комплексном влиянии условий культивирования на морфогенетический потенциал эксплантов. Отсутствуют публикации о зависимости коэффициента размножения тимьяна *in vitro* от продолжительности цикла выращивания и типа культурального сосуда. Кроме того, описанные в научных работах результаты отечественных и зарубежных ученых, касающиеся состава регуляторов роста в питательной среде и других вопросов, довольно противоречивы [13, 14]. Экспланты *T. sibthorpii*, по данным авторов, необходимо культивировать на безгормональной питательной среде [15]. В большинстве публикаций отмечают, что наивысший коэффициент размножения достигается в вариантах, где питательная среда содержит цитокинины. Так, для *T. pallidus* необходимо добавление кинетина или аденина [16], для *T. serpyllum* – совместно БАП и кинетина [17], для *Thymus vulgaris* – изопентиладенина [18]. Применение существующих протоколов размножения тимьяна при работе с новыми видами или образцами затруднено из-за отсутствия унифицированных методических подходов.

Цель исследования – оценка влияния гормонального состава питательной среды и условий культивирования на морфогенез эксплантов двух видов рода *Thymus* для разработки методики микроразмножения *in vitro*.

Условия, материалы и методы. В ходе исследования в качестве исходных взяты растения тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна кавказского (*Thymus caucasicus* Willd.), которые были выращены в условиях закрытого грунта. Растения *T. serpyllum* получены из коллекции генофонда пряно-ароматических, эфиромасличных и лекарственных растений ФГБУН «НИИСХ Крыма» (УНУ № 507515), а *T. caucasicus* – из коллекции Южно-Уральского ботанического сада-института Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

В ходе работы применены общепринятые методы культуры органов и тканей растений [10, 11]. Для введения в культуру *in vitro* использовали ранее оптимизированные для этих видов растений питательные среды Мурасиге и Скуга (МС) [19].

На этапе собственно микроразмножения в условиях ламинарного бокса проводили микрочеренкование полученных при введении *in vitro* побегов. Выделенные сегменты стебля с одним узлом длиной 8...10 мм выращивали на модификациях питательной среды МС (фактор А), с добавлением кинетина (Кин.), тидиазурана (ТДЗ), бензиламинопурина (БАП), индолилуксусной кислоты (ИУК), гибберелловой кислоты (ГК₃) (Sigma, США), 2% сахарозы и 0,8 % агар-агара (Fujian Putian, Китай). Состав регуляторов роста в питательной среде был выбран на основании наших предварительных исследований микроразмножения тимьяна обыкновенного [20]. Для выращивания эксплантов использовали разные культуральные сосуды – пробирки (15×160 мм), стеклянные банки (200 мл) и колбы (200 мл), закрытые фольгой.

Культивирование осуществляли при +24...+26 °С, относительной влажности воздуха 70 % и освещенности 2...3 тыс. люкс с фотопериодом 16 часов. На 30-, 40-, 50-, 60- и 70-е сутки цикла выращивания анализировали различные параметры: длину и число микропобегов и корней, количество узлов на побеге, количество оводненных микропобегов и другие. Для расчета коэффициента размножения количество сформированных побегов умножали на число узлов на побеге.

Повторность эксперимента – 3-кратная, количество эксплантов в каждой повторности – 20. Изучение влияния факторов на различные параметры микроразмножения проведено с использованием 2-факторных лабораторных опытов. Для статистической обработки данных применяли методы вариационной статистики (пакет программ Microsoft Office, Excel 2010). В таблицах и на графиках представлены средние арифметические и их ошибки на 5%-ном уровне значимости. В отдельном заключительном эксперименте для определения

доли влияния отдельных факторов на коэффициент размножения проведен дисперсионный анализ (с использованием программы Statistica 10.0) влияния 4 факторов: генотипа (2 вида тимьяна), состава питательной среды (6 вариантов среды МС), типа культурального сосуда (пробирки, колбы, банки), продолжительности цикла выращивания (30, 40, 50, 60, 70 сут).

Результаты и обсуждение. На втором этапе размножения *in vitro* на микрорастениях формировались пазушные и адвентивные побеги. На эффективность этого этапа влиял генотип, состав питательной среды, а также условия культивирования – тип используемого для выращивания сосуда и продолжительность цикла выращивания.

Состав питательной среды. При сравнении числа побегов на 1 эксплант на питательных средах разного гормонального состава выявлен рост величины этого параметра у *T. serpyllum* при культивировании на среде МС, содержащей 1,0 мг/л БАП или 1,0 мг/л ТДЗ (рис. 1а), по сравнению со средой с добавлением кинетина. У *T. caucasicus* отмечено достоверное повышение числа побегов при использовании безгормональной среды МС или введении в состав питательной среды кинетина, по сравнению с добавлением БАП или ТДЗ.

Анализ зависимости длины побега (рис. 1б) от типа и содержания регуляторов роста в питательной среде МС выявил, что максимального значения этот показатель у обоих видов достигал при использовании 1,0 мг/л кинетина. Применение в качестве цитокинина БАП или ТДЗ способствовало снижению длины микропобегов в 2,4...4,8 и 2,4...2,7 раза, по сравнению с кинетином, соответственно.

Для *T. caucasicus* оптимальной оказалась среда МС с добавлением кинетина в количестве 1,0 мг/л. Так, на этой среде при оптимальных условиях культивирования коэффициент размножения достигал 16,1.

При использовании БАП или ТДЗ у *T. caucasicus* наблюдали образование витрифицированных микропобегов с частотой от 41,3 до 49,3% (табл. 1). Полученные результаты указывают на нерациональность применения указанных регуляторов роста для этого вида.

При выращивании эксплантов *T. serpyllum* отмечены значительные коэффициенты размножения (от 6,8 до 9,6) при использовании сред с тидиазураном. Однако применение этого цитокинина как и в случае с *T. caucasicus* вызывало аналогичные нежелательные проявления в асептической культуре (витрификацию побегов от 56,3 до 82,6 %). В связи с этим мы рекомендуем воздержаться от использования этих сред для *T. serpyllum*.

У тимьяна ползучего на среде МС с 1,0 мг/л БАП оводненные побеги не формировались и коэффициент размножения достигал максимального значения – 6,7. Поэтому мы считаем эту среду оптимальной для микроразмножения *T. serpyllum*.

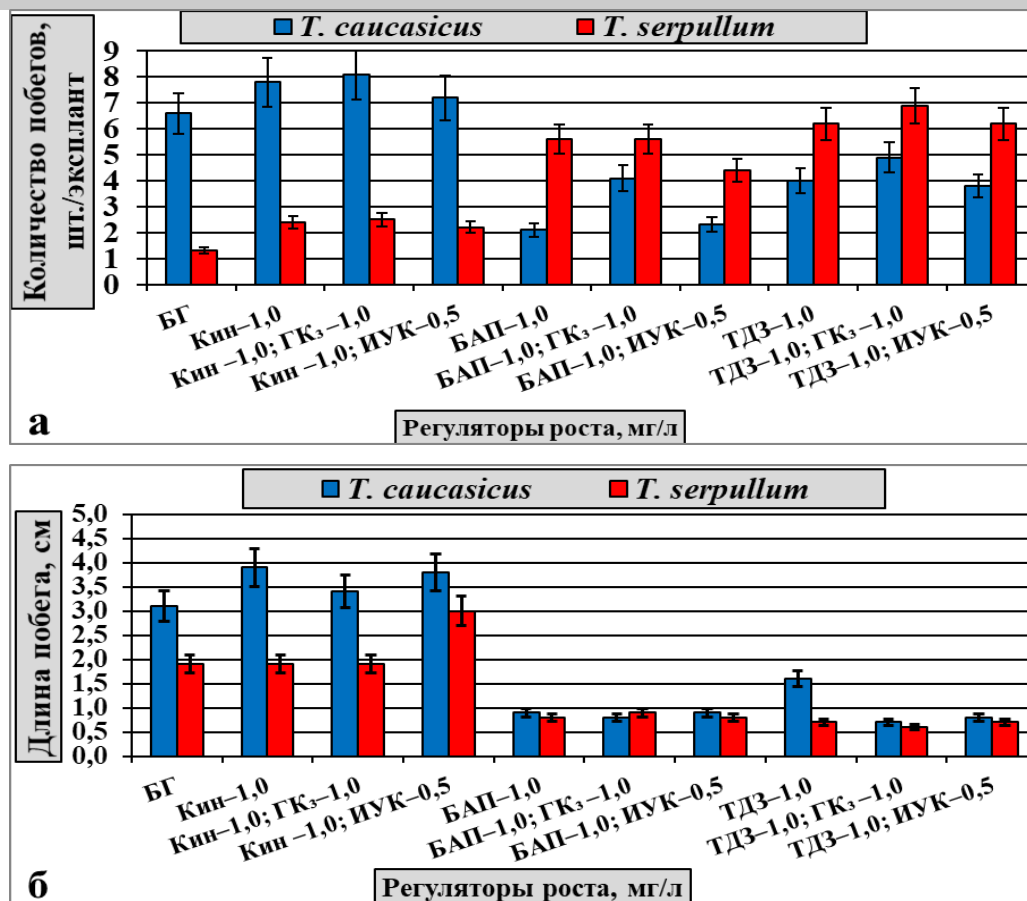


Рис. 1 – Количество (а) и длина побегов (б) при микроразмножении двух видов тимьяна на различных питательных средах

Культуральный сосуд. Для оценки влияния условий культивирования на этапе собственно микроразмножения экспланты культивировали в пробирках, колбах и банках. Анализ представленных на рис. 2 данных показал, что количество побегов на 1 эксплант в банках было в 2,0...3,7 раза выше, по сравнению с

культивированием в пробирках или колбах, на оптимальных для каждого вида тимьяна питательных средах. При добавлении в среду МС ТДЗ величина этого показателя была на одном уровне при использовании всех трех анализируемых типов культуральных сосудов.

Таблица 1 – Коэффициент размножения и частота витрификации побегов 2-х видов тимьяна в зависимости от состава питательной среды

Регуляторы роста в среде МС, мг/л	Коэффициент размножения		Частота витрификации, %	
	<i>T. caucasicus</i>	<i>T. serpyllum</i>	<i>T. caucasicus</i>	<i>T. serpyllum</i>
МС без гормонов	13,5±1,5	3,0±0,3	0	0
Кин. – 1,0	16,1±1,6	6,0±0,5	0	0
Кин. – 1,0; ГК ₃ – 1,0	14,4±2,0	6,0±0,4	11,2±1,3	0
Кин –1,0; ИУК–0,5	13,5±1,5	3,0±0,3	0	0
БАП –1,0	2,3±0,3	6,7±0,6	49,3±5,1	0
БАП–1,0; ГК ₃ –1,0	4,5±0,3	6,2±0,6	78,3±7,1	21,2±2,3
БАП–1,0; ИУК–0,5	2,5±0,3	4,8±0,6	67,7±6,1	8,2±0,9
ТДЗ – 1,0	4,6±0,3	6,8±0,5	41,3±4,8	56,3±6,2
ТДЗ–1,0; ГК ₃ –1,0	5,4±0,5	9,6±0,5	82,4±8,8	82,6±7,3
ТДЗ–1,0; ИУК–0,5	4,2±0,3	6,8±0,5	59,6±5,8	56,3±6,2

У *T. caucasicus* в банках наблюдали меньше узлов на питательных средах с кинетином или БАП, по сравнению с культивированием в пробирках или колбах

(рис. 3, 4). При этом у *T. serpyllum* отмечена тенденция повышения величины этого показателя при использовании банок.

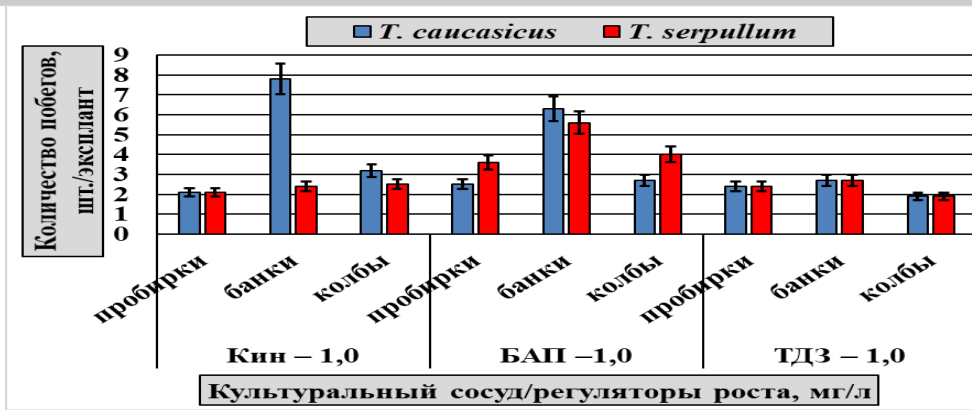


Рис. 2 – Количество побегов на 1 эксплант в зависимости от культурального сосуда и состава регуляторов роста в питательной среде при микроразмножении двух видов тимьяна

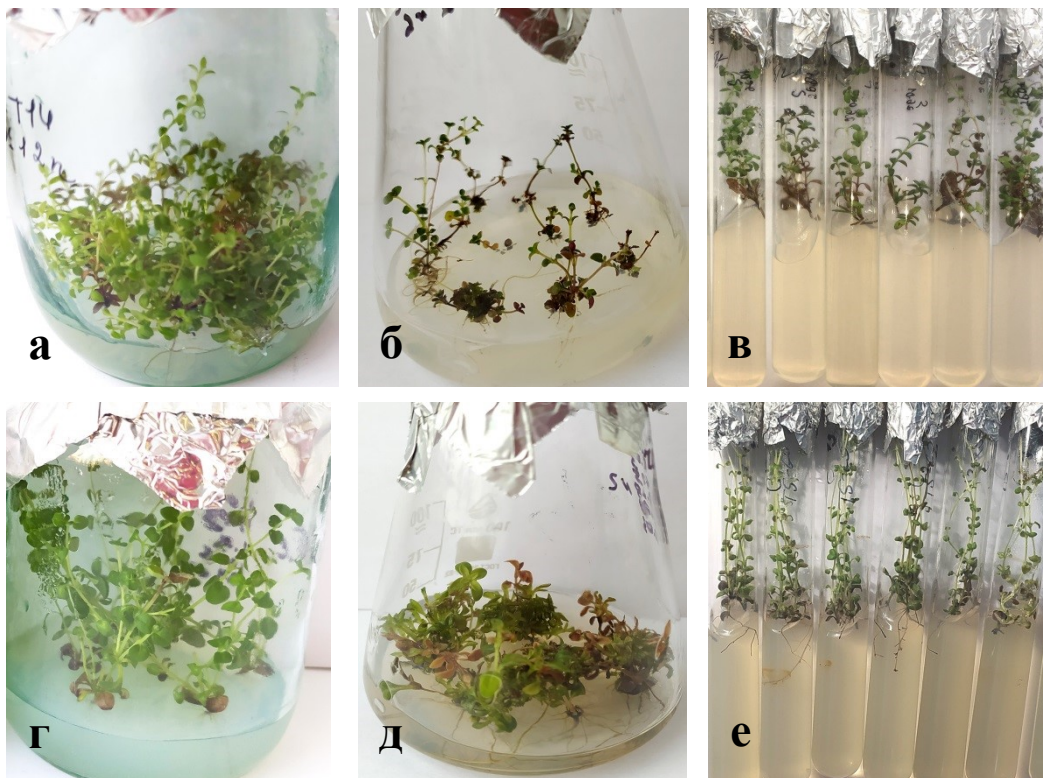


Рис. 3 – Культивирование *T. serpyllum* (а – банки; б – колбы; в – пробирки) и *T. caucasicus* (г – банки; д – колбы; е – пробирки)

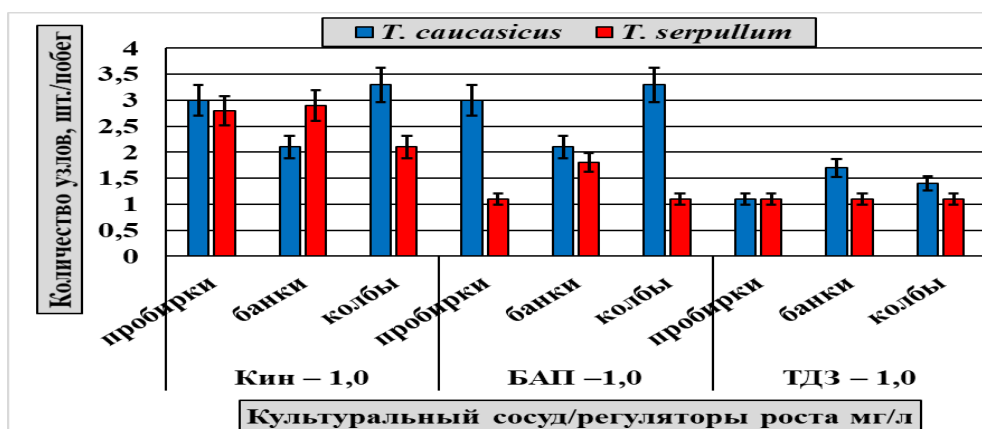


Рис. 4 – Количество узлов на побеге в зависимости от культурального сосуда и состава регуляторов роста в питательной среде при микроразмножении двух видов тимьяна

Анализ изменения коэффициента размножения в зависимости от типа культурального сосуда показал значительное его повышение при использовании банок (рис. 5). Так, при культивировании эксплантов на оптимальной питательной среде с кинетином в банках коэффициент размножения был выше у *T. caucasicus* в 1,4...1,9 раза, а у *T. serpullum* в 2,0...2,1 раза, по сравнению с пробирками или колбами.

Продолжительность цикла выращивания. В нашими предыдущих исследованиях с

T. vulgaris показано, что при увеличении длительности цикла выращивания до 70 сут. коэффициент размножения возрастал в 3,2 раза, по сравнению со стандартным циклом (40 сут.) [20]. У *T. caucasicus* и *T. serpullum* при культивировании эксплантов более двух месяцев также происходило повышение коэффициента размножения в 1,3 и 1,8 раза, однако достоверных различий при сравнении циклов выращивания разной длительности не установлено.

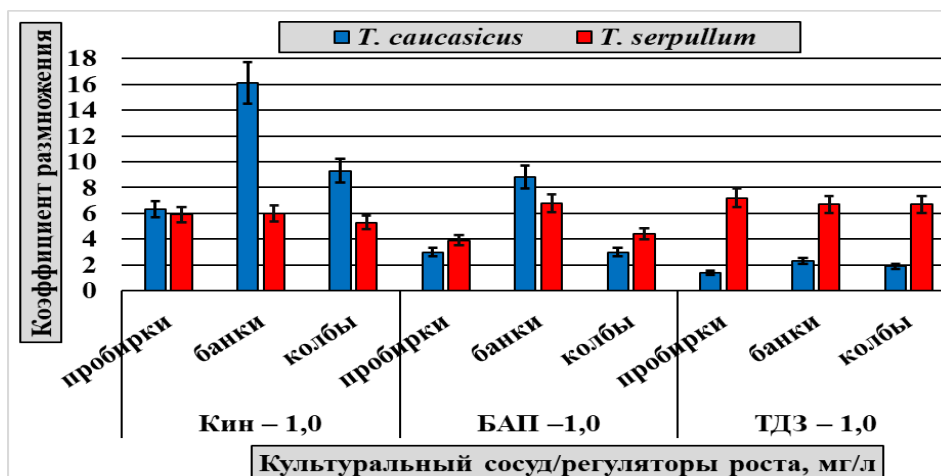


Рис. 5 – Коэффициент размножения двух видов тимьяна в зависимости от культурального сосуда и состава регуляторов роста в питательной среде

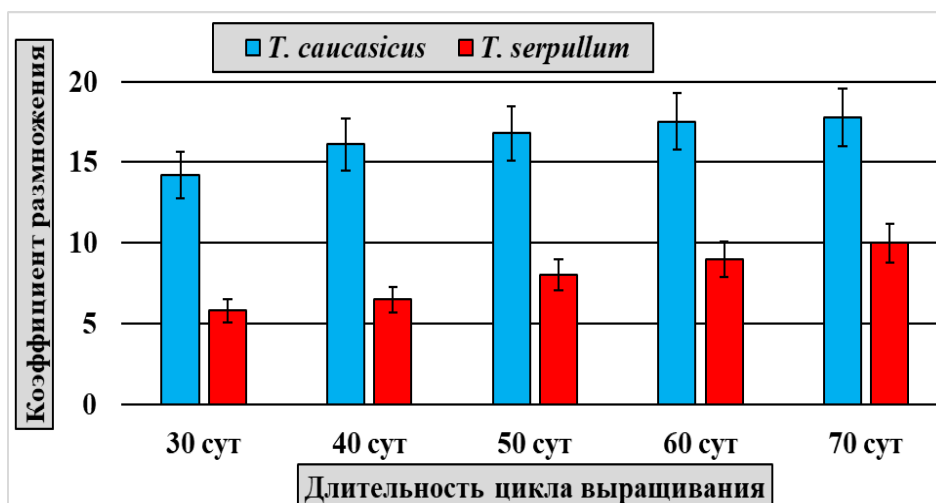
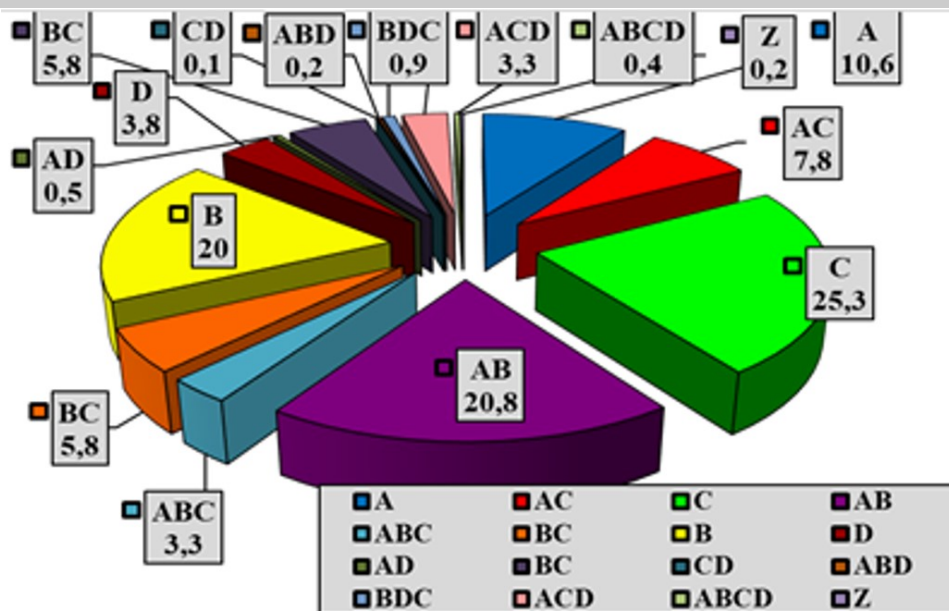


Рис. 6 – Коэффициент размножения двух видов тимьяна в зависимости от продолжительности цикла выращивания *in vitro*

Генотип. В ходе изучения клонального микроразмножения было выявлено, что влияние таких лимитирующих факторов, как состав питательной среды и условия культивирования, проявлялось по-разному у изученных видов тимьяна. Более высокий коэффициент размножения отметили у *T. caucasicus*. При сочетании оптимальных условий этот параметр достигал 16,1 (см. табл. 1). При культивировании *T. serpullum* коэффициент

размножения был в 2,4...2,5 раза ниже.

Согласно результатам дисперсионного анализа 4-факторного лабораторного эксперимента, на величину наиболее важного параметра «коэффициент размножения» наибольшее влияние оказывали тип культурального сосуда (доля влияния 25,3%), питательная среда (20,0%), а также взаимодействие факторов «генотип» и «питательная среда» (20,8%) (рис. 7).



А- генотип; В - питательная среда; С -тип культурального сосуда; D - продолжительность цикла выращивания; АВ - генотип/питательная среда; АС -генотип/тип культурального сосуда; AD - генотип/продолжительность цикла выращивания; ABC - генотип/питательная среда/тип культурального сосуда; ABD - генотип/питательная среда/продолжительность цикла выращивания; ACD - генотип/тип культурального сосуда/продолжительность цикла выращивания; ABCD - генотип/питательная среда/тип культурального сосуда/продолжительность цикла выращивания; BC - питательная среда/тип культурального сосуда; BD - питательная среда/продолжительность цикла выращивания; BCD - питательная среда/тип культурального сосуда/продолжительность цикла выращивания; CD - тип культурального сосуда/продолжительность цикла выращивания; Z- неучтенный фактор

Рис. 7 – Доля влияния генотипа, питательной среды, культурального сосуда и длительности цикла выращивания на коэффициент размножения тимьяна

Доля влияния генотипа на коэффициент размножения *T. caucasicus* и *T. serpyllum* составляла 10,6%, а продолжительности культивирования в цикле выращивания – всего лишь 3,8%, или была незначительной.

Выводы. Максимальный в экспериментах коэффициент размножения *T. caucasicus* (16,1) отмечен при добавлении в питательную среду 1,0 мг/л кинетина, *T. serpyllum* (6,7) – при добавлении 1,0 мг/л БАП. Наиболее эффективным было выращивание эксплантов тимьяна *in vitro* в стеклянных банках, которое

обеспечивало повышение коэффициента размножения в 1,4...2,1 раза, по сравнению с использованием пробирок или колб. При микро-размножении *T. caucasicus* и *T. serpyllum* целесообразно использовать стандартный цикл выращивания 40 суток. Коэффициент размножения тимьяна в наибольшей степени зависел от типа культурального сосуда (доля влияния 25,3%), состава питательной среды (20,0%) и взаимодействия генотипа и состава питательной среды (20,8%).

Литература

1. Брага П. К. Тимол: антибактериальная, противогрибковая и антиоксидантная активность // Гинекология. 2009. № 4 С. 61–66.
2. Aljabeili H. S., Barakat H., Abdel-Rahman H. A. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Thyme essential oil (*T. vulgaris*) // Food and Nutrition Sciences. 2018. Vol. 9. P. 433–446. doi: 10.4236/fns.2018.95034.
3. Содержание и антимикробная активность эфирных масел в траве тимьяна Маршалла и тимьяна ползучего / А. С. Шереметьева, А. В. Фролова, О. Г. Шаповал и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021. Т. 24. № 3. С. 27–32. doi: 10.29296/25877313-2021-03-04.
4. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of Thymus vulgaris essential oil against clinical isolates of opportunistic infections / M. V. Kryvtsova, I. Salamon, J. Koscova, et al. // Biosystems Diversity. 2019. Vol. 27. No. 3. P. 270–275. doi: 10.15421/011936.
5. Biological Properties of Essential Oils from Thymus algeriensis Boiss. / H. Ouakouak, A. Benarfa, M. Messaoudi, et al. // Plants. 2021. Vol. 10. No. 4. P. 786 URL: <https://doi.org/10.3390/plants10040786> (дата обращения: 25.06.2023). doi: 10.3390/plants10040786.
6. Винокурова О. А., Тринеева О. В., Сливкин А. И. Сравнительная характеристика различных видов тимьяна: состав, свойства, применение (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4 (17). С. 134–150.
7. Бубенчикова В. Н., Старчак Ю. А. Изучение отхаркивающей активности растений рода Тимьян // Медицинский вестник Башкортостана. 2013. Т. 8. № 5. С. 78–80.

8. Княжеская Н. П., Бобков Е. В. Фитопрепараты в терапии респираторных заболеваний // Медицинский совет. 2019. № 15. С. 70–76. doi: 10.21518/2079-701X-2019-15-70-76.
9. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт, 2020. 333 с.
10. Cardoso J. C., Gerald L. T. S., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the Twenty-First Century // Plant cell culture protocols (4th edition) / Eds.: V. M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. New York: Humana Press, 2018. P. 17–46. doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4_2.
11. Методология биотехнологических исследований цветочно-декоративных культур: коллективная монография / под общ. ред. И. В. Митрофановой. Симферополь: Ариал, 2018. 268 с. doi: 10.32514/978-5-907118-58-4.
12. 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.
13. Banna H. Y. Micropropagation of thyme plant (*Thymus vulgaris*) // Journal of Plant Production, Mansoura University. 2017. Vol. 8. No. 11. P. 1221–1227. doi: 10.21608/JPP.2017.41294.
14. Alcowani R., Solyman E., Qauod H. Introducing some of threatened *Thymus* species to *in vitro* tissue culturing as an approach for their conservation // Pakistan Journal of Botany. 2017. Vol. 49. No. 1. P. 259–264.
15. Micropropagation and molecular characterization of *Thymus sibthorpii* Benth. (Lamiaceae), an aromatic-medicinal thyme with ornamental value and conservation concern / G. Tsoktouridis, N. Krigas, V. Sarropoulou, et al. // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2019. Vol. 55. P. 647–658. doi: 10.1007/s11627-019-10000-y.
16. Conservation of *Thymus pallidus* Cosson ex Batt. by shoot tip and axillary bud *in vitro* culture / Z. N. Ansari, I. Boussaoudi, R. Benkaddour, et al. // Journal of Plant Biotechnology. 2020. Vol. 47. P. 53–65. doi: 10.5010/JPB.2020.47.1.053.
17. Khajuria A. K., Bisht N. S., Bhagat N. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Thymus serpyllum* L.: an important aromatic medicinal plant // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2020. Vol. 56, P. 652–661 doi: 10.1007/s11627-020-10094-9
18. Kulpa D., Wesolowska A., Jadcak P. Micropropagation and composition of essential oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2018. Vol. 46. No. 2. P. 525–532. doi: 10.15835/nbha46211020.
19. Тевфик А. Ш., Егорова Н. А., Коваленко М. С. Влияние лимитирующих факторов на развитие эксплантов *Thymus serpyllum* L. и *Thymus caucasicus* Willd. на первом этапе микроразмножения *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2023. № 1 (33). С.113–124. doi: 10.5281/zenodo.7898524.
20. Тевфик А. Ш., Егорова Н. А. Влияние условий культивирования и гормонального состава питательной среды на микроразмножение *in vitro* тимьяна обыкновенного // Таврический вестник аграрной науки. 2019. № 1 (17). С. 93–102. doi: 10.33952/2542-0720-2019-1-17-93-102

Сведения об авторах:

Тевфик Арзы Шевкиевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, e-mail: tevfik.arzy@yandex.ru

Егорова Наталья Алексеевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биотехнологии, e-mail: yegorova.na@mail.ru

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия.

OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION NUTRIENT AND CULTIVATION CONDITIONS FOR *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF *THYMUS SERPYLLUM* L. AND *THYMUS CAUCASICUS* L.

A. Sh. Tevfik, N. A. Egorova

Abstract. The study was conducted to optimize the cultivation conditions for the second stage of clonal micropropagation of *Thymus caucasicus* Willd. and *Thymus serpyllum* L. Stem segments with one node (8...10 mm), obtained by microcutting of shoots, were cultured on 10 different Murashige and Skoog (MS) nutrient media containing 2% sucrose and 0.8% agar-agar, with the addition of kinetin, thidiazuron, benzylaminopurine (BAP), indoleacetic and gibberellic acids. Various culture vessels (jars, flasks, test tubes) were used for micropropagation. The duration of the cultivation cycle varied from 40 to 70 days. The highest reproduction coefficient of *T. serpyllum* was noted on the MS medium containing 1.0 mg/l BAP and was 6.7, while that of *T. caucasicus* was on the MS medium containing 1.0 mg/l kinetin (16.1). The highest efficiency of culturing both thyme species was achieved in jars, with the use of which the reproduction coefficient was 1.4...2.1 times higher than when grown in test tubes or flasks. It is advisable to cultivate the studied thyme species with a standard cycle of 40 days. The best combinations of various thyme reproduction factors contributed to the maximum manifestation of the morphogenetic potential in *in vitro* experiments. The greatest influence on the multiplication coefficient was exerted by the type of culture vessel, the interaction of the composition of the culture medium and the genotype, as well as the composition of the culture medium (the shares of the influence of factors ranged from 20.0% to 25.3%). The results of the studies served as the basis for the development of a protocol that can be used for accelerated micropropagation of *T. caucasicus* and *T. serpyllum*.

Key words: creeping thyme (*Thymus serpyllum* L.), Caucasian thyme (*Thymus caucasicus* Willd.), clonal micropropagation, *in vitro*, growth regulators.

References

1. Braga PK. [Thymol: antibacterial, antifungal and antioxidant activity]. *Ginekologiya*. 2009; 4. 61–66 p.
2. Aljabeili HS, Barakat H, Abdel-Rahman HA. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of *Thyme essential oil* (*T. vulgaris*). *Food and Nutrition Sciences*. 2018; Vol.9. 433–446 p. doi: 10.4236/fns.2018.95034.
3. Sheremeteva AS, Frolova AV, Shapoval OG. [Content and antimicrobial activity of essential oils in the herb of Marshall's thyme and creeping thyme]. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2021; Vol.24. 3. 27–32 p. doi: 10.29296/25877313-2021-03-04.
4. Kryvtsova MV, Salamon I, Koscova J. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections. *Biosystems Diversity*. 2019; Vol.27. 3. 270–275 p. doi: 10.15421/011936.

5. Ouakouak H, Benarfa A, Messaoudi M. Biological properties of essential oils from *Thymus algeriensis* Boiss. Plants. 2021; Vol.10. 4. 786 p. [cited 2023, June 25]. Available from: <https://doi.org/10.3390/plants10040786>. doi: 10.3390/plants10040786.
6. Vinokurova OA, Trineeva OV, Slivkin AI. [Comparative characteristics of different types of thyme: composition, properties, application (review)]. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2016; 4 (17). 134-150 p.
7. Bubenchikova VN, Starchak YuA. [Study of expectorant activity of plants of the genus Thyme]. Meditsinskiy vestnik Bashkortostana. 2013; Vol.8. 5. 78-80 p.
8. Knyazhskaya NP, Bobkov EV. [Phytopreparations in the therapy of respiratory diseases]. Meditsinskiy sovet. 2019; 15. 70-76 p. doi: 10.21518/2079-701X-2019-15-70-76.
9. Kalashnikova EA. Kletochnaya inzheneriya rasteniy. [Cellular engineering of plants]. Moscow: Yurait. 2020; 333 p.
10. Cardoso JC, Gerald LTS, Teixeira da Silva JA. Micropropagation in the Twenty-First Century. Plant cell culture protocols (4th edition). Eds.: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. New York: Humana Press. 2018; 17-46 p. doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4_2.
11. Mitrofanova IV. Metodologiya biotekhnologicheskikh issledovaniy tsvetochno-dekorativnykh kultur: kollektivnaya monografiya. [Methodology of biotechnological studies of flower and ornamental crops: collective monograph]. Simferopol: Arial. 2018; 268 p. doi: 10.32514/978-5-907118-58-4.
12. Egorova NA. Biotekhnologiya efiromaslichnykh rasteniy: sozдание novykh form i mikrorazmnozhenie *in vitro*. [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.
13. Banna HY. Micropropagation of thyme plant (*Thymus vulgaris*). Journal of Plant Production, Mansoura University. 2017; Vol.8. 11. 1221-1227 p. doi: 10.21608/JPP.2017.41294.
14. Alcowni R, Solyman E, Qauod H. Introducing some of threatened *Thymus species* to *in vitro* tissue culturing as an approach for their conservation. Pakistan Journal of Botany. 2017; Vol.49. 1. 259-264 p.
15. Tsoktouridis G, Krigas N, Sarropoulou V. Micropropagation and molecular characterization of *Thymus sibthorpii* Benth. (Lamiaceae), an aromatic-medicinal thyme with ornamental value and conservation concern. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2019; Vol.55. 647-658 p. doi: 10.1007/s11627-019-10000-y.
16. Ansari ZN, Boussaoudi I, Benkaddour R. Conservation of *Thymus pallidus* Cosson ex Batt. by shoot tip and axillary bud *in vitro* culture. Journal of Plant Biotechnology. 2020; Vol.47. 53-65 p. doi: 10.5010/JPB.2020.47.1.053.
17. Khajuria AK, Bisht NS, Bhagat N. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Thymus serpyllum* L.: an important aromatic medicinal plant. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2020; Vol.56. 652-661 p. doi: 10.1007/s11627-020-10094-9
18. Kulpa D, Wesołowska A, Jadczyk P. Micropropagation and composition of essential oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2018; Vol.46. 2. 525-532 p. doi: 10.15835/nbha46211020.
19. Tevfik ASH, Egorova NA, Kovalenko MS. [Influence of limiting factors on the development of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus caucasicus* Willd. explants at the first stage of *in vitro* micropropagation]. Tavricheskiy vestnik agrarnoy nauki. 2023; 1 (33). 113-124 p. doi: 10.5281/zenodo.7898524.
20. Tevfik ASH, Egorova NA. [Influence of cultivation conditions and hormonal composition of the culture medium on *in vitro* micropropagation of common thyme]. Tavricheskiy vestnik agrarnoy nauki. 2019; 1 (17). 93-102 p. doi: 10.33952/2542-0720-2019-1-17-93-102

Authors:

Tevfik Arzy Shevkievna – Ph.D. of Biological Sciences, senior researcher of Biotechnology laboratory, e-mail: tevfik.arzy@yandex.ru

Egorova Natalya Alekseevna – Doctor of Biological Sciences, chief researcher, Head of Biotechnology laboratory, e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia.