

МОРФОГЕНЕЗ И КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ МЯТЫ В КУЛЬТУРЕ ЛИСТОВЫХ И СТЕБЛЕВЫХ ЭКСПЛАНТОВ *IN VITRO*

А. М. БУГАРА¹, доктор биологических наук;

И. А. БУГАРА², кандидат биологических наук

¹Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского,

²Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН

Мята – эфиромасличное и лекарственное растение с широким спектром практического использования. Сухой лист и эфирное масло мяты издавна используются для изготовления лекарственных средств, производства парфюмерно-косметических изделий, а также в качестве натуральных ароматизаторов. В последние годы в Украине созданы сорта мяты, характеризующиеся высоким сбором эфирного масла, повышенной урожайностью сухого листа, зимостойкостью и засухоустойчивостью, устойчивостью к ржавчине, с различным направлением биосинтеза эфирного масла: Симферопольская 200, Заграва, Украинска перечная, Двухукосная, Прилукская карвонная, Удайская, Удайчанка, Имла и другие [2].

В настоящее время для размножения мяты используются исключительно традиционные методы – корневищами и рассадой. Однако для ускоренного внедрения новых сортов в производство, а также для быстрого размножения уникальных селекционных генотипов уже недостаточно использования только традиционных методов. Необходима разработка эффективных технологий размножения и производства высококачественного посадочного материала на принципиально новой методической основе. Создание таких технологий базируется на использовании комплекса методов культуры изолированных тканей и органов, а также решении фундаментальных вопросов регуляции морфогенеза *in vitro* в зависимости от генотипа, типа экспланта, состава питательной среды и условий культивирования.

На сегодняшний день накоплен обширный экспериментальный материал, свидетельствующий о возможности клонального микроразмножения растений, как на основе культуры изолированных меристем, так и при использовании в качестве эксплантов других тканей и органов [4-6, 11, 18, 23]. Подавляющее большинство работ по клональному микроразмножению видов и сортов мяты базируется на использовании культуры изолированных меристем или вегетативных почек [1, 8, 22]. Особенности такого подхода для клонального микроразмножения ряда современных сортов мяты показаны нами ранее [3]. Однако возможность клонального микроразмножения мяты на основе культуры изолированных листовых и стеблевых эксплантов продемонстрирована пока для ограниченного числа видов рода *Mentha* [20]. Имеющиеся сорта мяты отечественной селекции не привлекались для подобных исследований. В этой связи целью настоящей работы являлось изучение некоторых особенностей морфогенеза в культуре листовых и стеблевых эксплантов мяты в связи с разработкой приемов клонального микроразмножения перспективных сортов, созданных на основе межвидовой гибридизации и экспериментальной полиплоидии.

Материалы и методы

Материалом для проведения исследований служили сорта мяты Симферопольская 200 (*M. canadensis* L. К 59 (4n) x *M. aquatica* L. К 6), Заграва (*M. canadensis* К 59 (4n) x *M. longifolia* L. N 6), Украинская перечная (*M. piperita* A₂ (4n) x *M. spicata* 2.8.14), Двухукосная (*M. canadensis* К 60 (4n) x *M. spicata* 2.8.14) селекции Института эфиромасличных и лекарственных растений УААН, а также сорт Прилукская 6 (получен методом отбора в семенном потомстве аллополиплоидной формы *M. piperita*).

Растения выращивали в условиях закрытого грунта, в качестве инициальных эксплантов использовали молодые листья и сегменты стебля (без узлов) длиной 0,7-1,0 см. Поверхностную стерилизацию растительного материала проводили 50% раствором препарата "Брадофен" с последующей промывкой в стерильной дистиллированной воде.

Молодые листья и стеблевые сегменты культивировали на жидкой и агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга [17], дополненной 10 мг/л БАП (6-бензиламинопурин) и 0,5 мг/л ИУК (индолилуксусная кислота). При использовании жидкой питательной среды экспланты помещали на мостики из фильтровальной бумаги. На агаризованной питательной среде экспланты культивировали поверхностно. В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 2 x 20 см с 10 мл питательной среды. Экспланты культивировали в условиях термостатированного помещения при температуре 23-25°C, относительной влажности воздуха 60-70%, освещенности 3-4 тыс. люкс с фотопериодом 16 часов. В процессе культивирования проводили визуальный анализ морфогенеза и регенерации растений, а также подсчитывали количество микрорастений, индуцированных с одного экспланта (коэффициент размножения). Для адаптации полученных растений-регенерантов к условиям *in vivo* их переносили в субстрат, состоящий из торфа и керамзита (1:1). В первые две недели адаптации растения содержали в условиях повышенной влажности, а затем переводили на обычный режим выращивания в закрытом грунте.

Для цитологических исследований растительный материал фиксировали по Карнуа, готовили временные препараты и окрашивали метиленовым синим по общепринятой методике [7]. Цитологический анализ и фотографирование препаратов проводили на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ с фотонасадкой МФНЭ-1.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили на персональном компьютере с использованием прикладного программного обеспечения Statistika 5.1 и Microsoft Office XP для Microsoft Windows. Результаты представляли в виде графиков с доверительными интервалами при 5%-ном уровне значимости.

Результаты и обсуждение

При эксплантации на питательную среду молодых листьев мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 первым видимым признаком проявления морфогенетических реакций являлась дифференциация вегетативных адвентивных почек непосредственно из клеток экспланта (рис. 1, а, б). В дальнейшем наблюдалась регенерация микропобегов, а затем корневой системы. Асинхронность процесса приводила к тому, что на одном листовом экспланте обнаруживалось одновременно как заложение адвентивных почек, так и развитие микропобегов и ризогенез. Цитологические исследования позволили установить, что при культивировании молодых листьев дифференциация вегетативных почек наблюдалась преимущественно из субэпидермальных клеток базальной части листа (рис. 1, в, г).

Морфогенез и регенерация растений в культуре стеблевых сегментов имели некоторые особенности. В отличие от культуры листовых эксплантов, в данном случае сначала наблюдалось каллусообразование, которое было приурочено к поверхности среза и происходило с обоих концов экспланта. После нарастания определенной небольшой массы каллуса в нем наблюдалась дифференциация вегетативных почек с последующей регенерацией растений (рис. 2, а, б). Заложение почек, развитие микропобегов и корневой системы также проходило асинхронно, в результате чего на одном каллусе можно было наблюдать как развившиеся укорененные микропобеги, так и заложившиеся вегетативные почки. Цитологический анализ препаратов первичного каллуса из стеблевых сегментов выявил присутствие в нем клеток меристематического и паренхимного типов. При этом дифференциация вегетативных почек наблюдалась преимущественно в локальных скоплениях клеток меристематического типа (рис. 2, в, г).

С точки зрения клонального микроразмножения особый интерес представляло исследование количественной динамики побего- и корнеобразования при культивировании листовых и стеблевых эксплантов. Исследования показали, что при эксплантации молодых листьев мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 на жидкую модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга,

дополненную 10 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК, первые видимые признаки индукции морфогенеза и образования вегетативных почек обнаруживались на 7-10 сутки культивирования (рис. 3). Этот процесс начинался раньше в культуре листовых эксплантов мяты сортов Симферопольская 200 и Украинская перечная, а спустя 2-3 суток - сортов Заграва, Двухукосная и Прилукская 6. В процессе дальнейшего культивирования из вегетативных почек наблюдалась регенерация микропобегов. Количество микропобегов, развивающихся с одного экспланта (коэффициент размножения), в значительной степени зависело от генотипа донорных растений. В результате за один цикл выращивания культуры (30 суток) количество микропобегов, образовавшихся на одном листовом экспланте изучаемых сортов мяты, было различным.

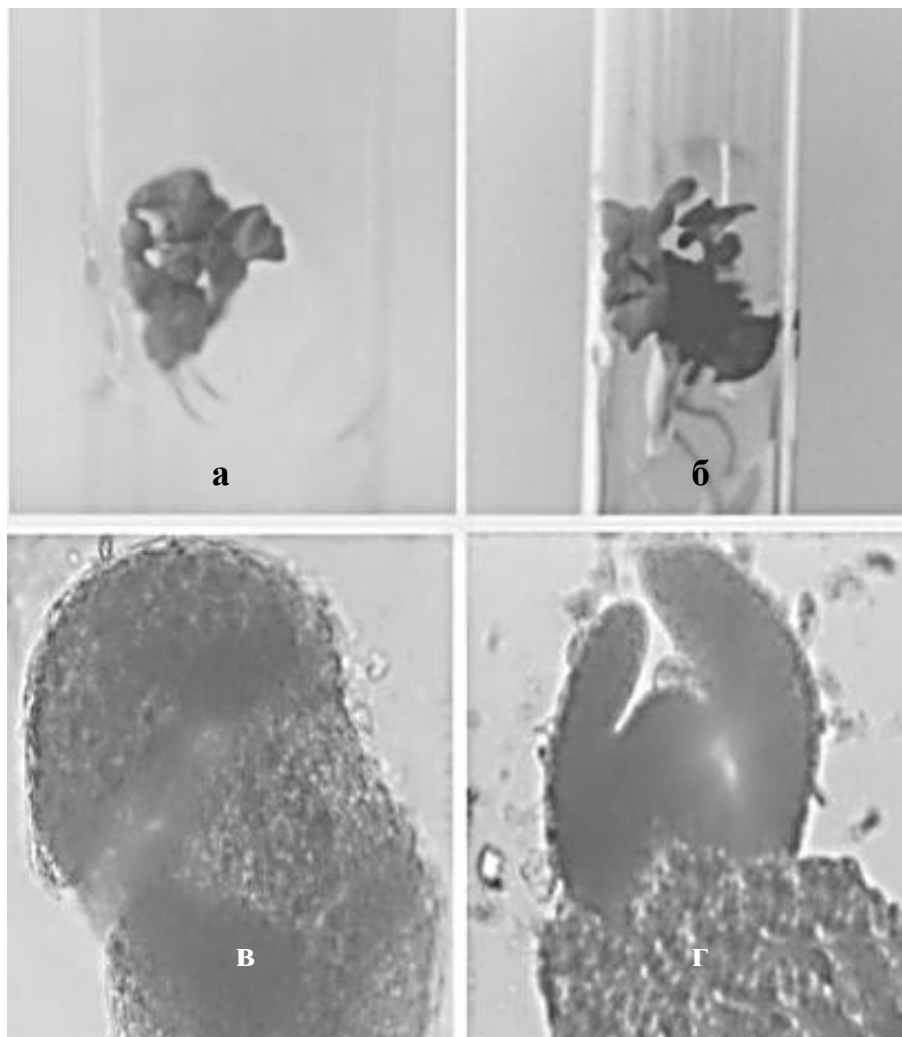


Рис. 1. Прямой органогенез в культуре листовых эксплантов мяты сорта Заграва *in vitro* на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга: а – регенерация микропобегов; б – множественное побегообразование и ризогенез; в, г – дифференциация вегетативных почек из тканей листа

Наибольшее количество адвентивных микропобегов развивалось при культивировании *in vitro* молодых листьев мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва (коэффициент размножения соответственно 1:31 и 1:26). Сорта Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 отличались пониженной способностью к адвентивному побегообразованию (коэффициент размножения 1:22 и 1:23). Образующиеся адвентивные микропобеги на 30 сутки имели нормальную морфологию и 4-5 пар хорошо развитых зеленых листьев без признаков дефектности окраски.

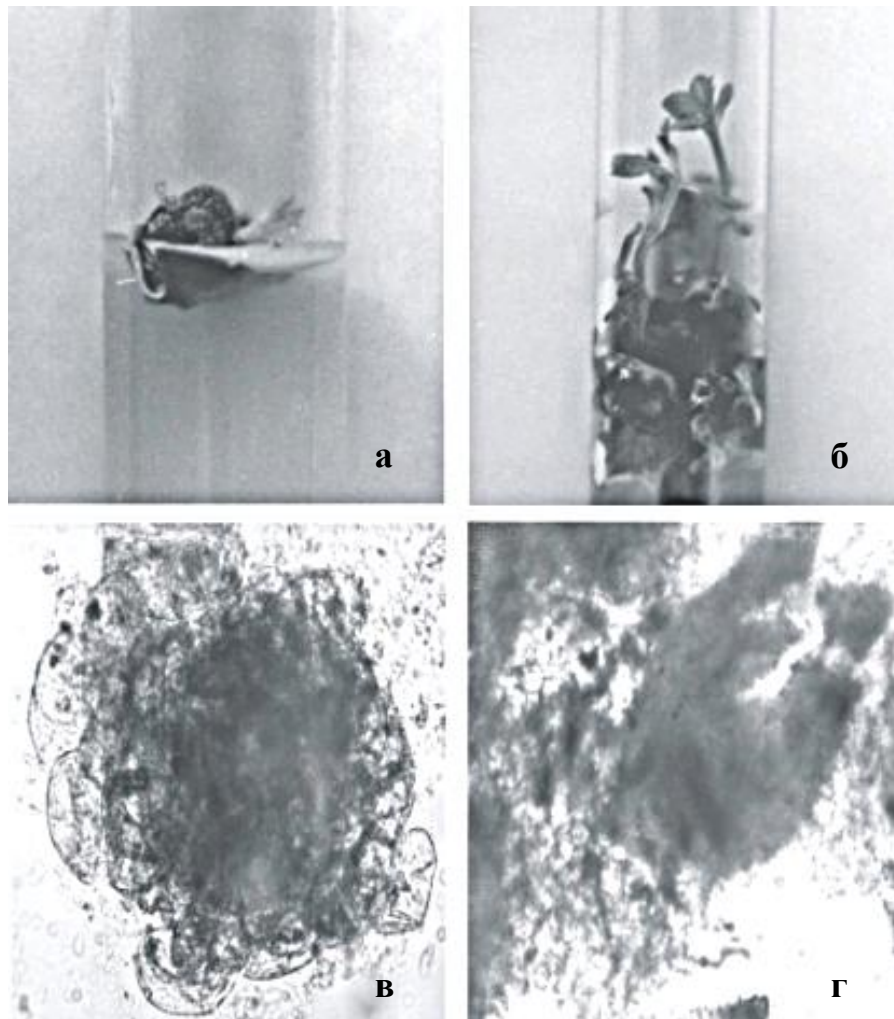


Рис. 2. Непрямой органогенез в культуре стеблевых эксплантов мяты сорта Заграва *in vitro* на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга: а – регенерация микропобегов из первичного каллуса; б – множественное побегообразование и ризогенез; в – локальное скопление клеток меристематического типа в первичном каллусе; г – дифференциация вегетативных почек из клеток меристематического типа

Развитие витрифицированных и аномальных микропобегов в наших экспериментах не было обнаружено. При культивировании свыше 30 суток не наблюдалось дальнейшего увеличения числа адвентивных микропобегов. В данном случае происходило их дальнейшее развитие, что проявлялось в увеличении длины и толщины стебля, а также размеров и числа листьев.

Динамика адвентивного корнеобразования при культивировании листовых эксплантов изучаемых сортов мяты на жидкой питательной среде была до некоторой степени сходна с динамикой адвентивного побегообразования (рис. 4). Первые признаки регенерации корней обнаруживались на 10-12 сутки культивирования, спустя 3-5 суток после заложения вегетативных почек. В процессе дальнейшего культивирования наблюдалось постепенное увеличение числа корней. Наибольшая частота корнеобразования была характерна для сортов Симферопольская 200 и Заграва. Для сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 эти показатели были несколько ниже. В результате одного цикла выращивания культуры из листового экспланта мяты сорта Симферопольская 200 развивалось около 36 адвентивных корней, сорта Заграва – 32, сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 – 22-27. Если процесс культивирования продолжался свыше 30

суток, то так же, как и в случае адвентивного побегообразования, это не приводило к увеличению количества корней. Однако визуально обнаруживались увеличение их размеров, интенсивный рост и активное развитие боковых корней.



Рис. 3. Динамика адвентивного побегообразования в культуре листовых эксплантов различных сортов мяты на жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

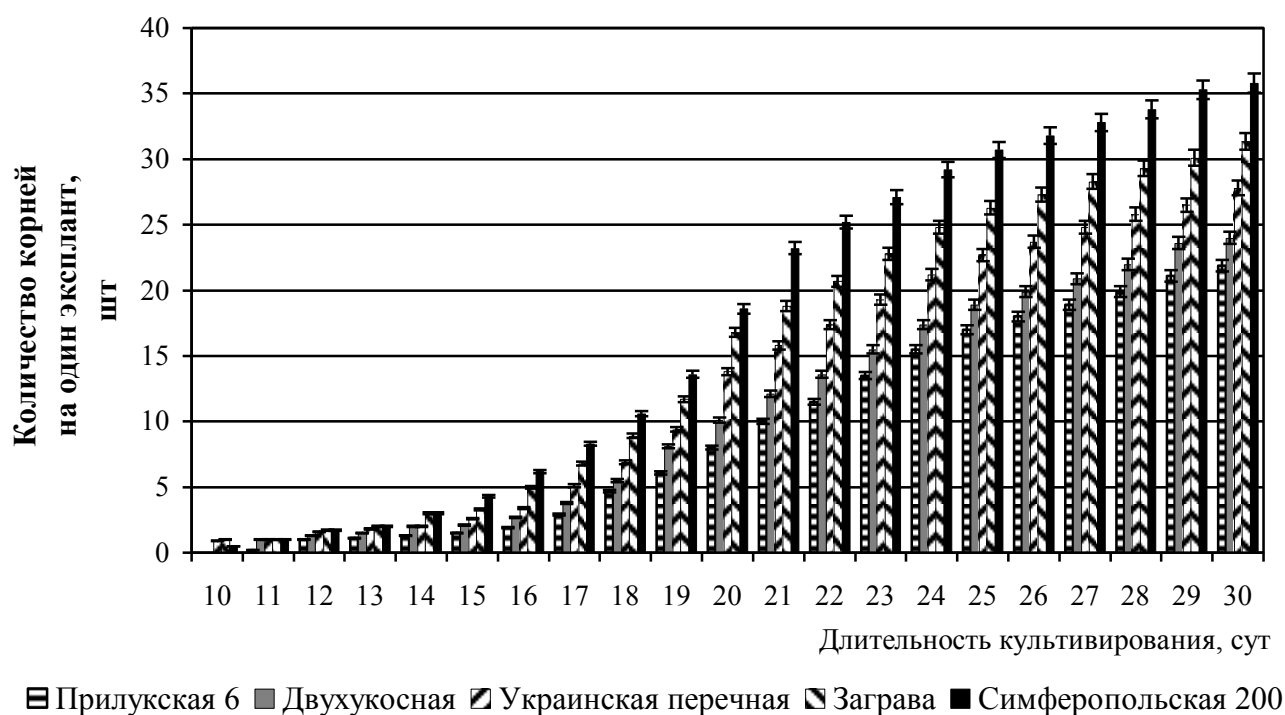


Рис. 4. Динамика адвентивного корнеобразования в культуре листовых эксплантов различных сортов мяты на жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

При сопоставлении результатов побего- и корнеобразования в культуре листовых эксплантов изучаемых сортов мяты можно сделать заключение, что развитие корневой системы являлось результатом корнеобразования у формирующихся микропобегов. Об этом могут свидетельствовать количественные показатели. Количество адвентивных микропобегов, развившихся в течение одного цикла выращивания, было приблизительно равно количеству корней. Отсутствие абсолютного равенства в данном случае связано с трудностью подсчета числа корней без травмирования растений, особенно после двух недель культивирования, в результате их интенсивного развития и сложного переплетения между собой.

При культивировании молодых листьев мяты на агаризованной питательной среде наблюдалось некоторое снижение частоты регенерации адвентивных микропобегов по сравнению с жидкой питательной средой (рис. 5). Первые видимые признаки индукции побегообразования обнаруживались у изучаемых сортов на 11-13 сутки, то есть на 3-4 суток позже, чем на жидкой питательной среде. В дальнейшем происходило увеличение количества адвентивных микропобегов. В итоге на 30 сутки культивирования из одного листового экспланта мяты сорта Симферопольская 200 развивалось до 26 адвентивных микропобегов, сорта Заграва – 24, а сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 – 16-20. Таким образом, культивирование молодых листьев на агаризованной питательной среде приводило к ингибированию процесса адвентивного побегообразования и снижению коэффициента размножения в течение одного цикла выращивания по сравнению с жидкой питательной средой.



Рис. 5. Динамика адвентивного побегообразования в культуре листовых эксплантов различных сортов мяты на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

Во многом сходная закономерность была выявлена при анализе процесса адвентивного корнеобразования в культуре листовых эксплантов изучаемых сортов мяты на агаризованной питательной среде (рис. 6).



Рис. 6. Динамика адвентивного корнеобразования в культуре листовых эксплантов различных сортов мяты на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

В данном случае первые признаки корнеобразования обнаруживались на 1-2 суток позже, чем при использовании жидкой питательной среды. В течение цикла выращивания наблюдалось постепенное увеличение числа адвентивных корней. На 30 сутки из одного листового экспланта мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва развивалось до 27 корней, сорта Украинская перечная – 22, а у сортов Двухукосная и Прилукская 6 – 16-17. При этом показатели частоты корнеобразования были сопоставимы с показателями частоты адвентивного побегообразования.

Таким образом, при культивировании *in vitro* эксплантов молодых листьев мяты наблюдалась множественная регенерация растений. При этом обнаруживалась зависимость количества микрорастений от консистенции питательной среды, в результате чего коэффициент размножения на жидкой питательной среде был выше, чем на агаризованной.

При эксплантации стеблевых сегментов мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 на жидкую, модифицированную нами питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 10 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК, первым видимым проявлением ответной реакции экспланта на условия культивирования являлась индукция каллусогенеза. Каллус возникал на 6-7 сутки культивирования с обоих концов стеблевого сегмента в местах среза, как ответная реакция на поранение. Образующийся каллус имел рыхлую консистенцию и отличался умеренной интенсивностью роста. На 9-10 сутки на поверхности каллуса наблюдалась дифференциация вегетативных почек. На 13-15 сутки, в зависимости от сорта, из образующихся почек развивались микропобеги (рис. 7). Несколько раньше этот процесс начинался в первичном каллусе мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва, а спустя 2 суток у других изучаемых сортов. В процессе культивирования количество микропобегов увеличивалось. На 30 сутки из одного экспланта стеблевого сегмента мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва развивалось до 14 микропобегов. Для мяты сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 этот показатель составил в среднем 12-13. Образующиеся микропобеги имели нормальную морфологию и 3-4 пары листьев без признаков дефектности окраски и витрификации.



Рис. 7. Динамика побегообразования в культуре стеблевых эксплантов различных сортов мяты на жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга

Видимые признаки корнеобразования обнаруживались в культуре стеблевых сегментов на 14-15 сутки (рис. 8). У сортов Симферопольская 200 и Заграва регенерация корней начиналась на 1 сутки раньше, чем у других сортов. В процессе культивирования наблюдалось увеличение частоты корнеобразования. На 30 сутки культивирования из одного экспланта стеблевого сегмента мяты сортов Симферопольская 200 и Заграва развивалось до 14 корней. У сортов Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 этот показатель составлял в среднем 10-12.

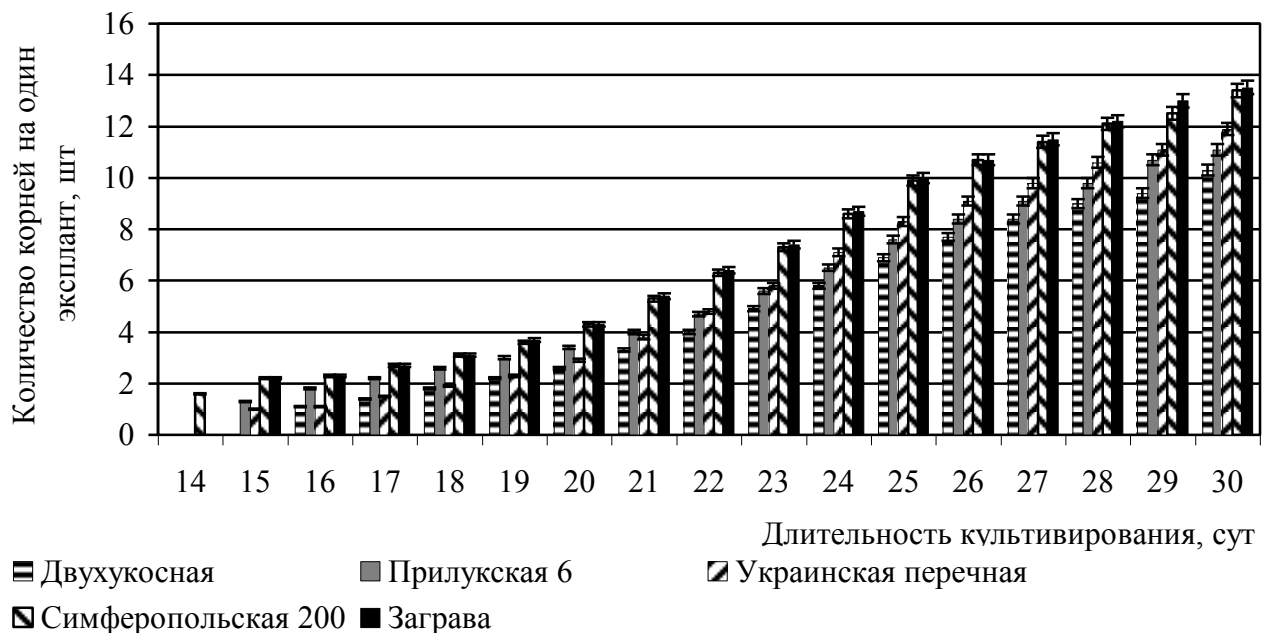


Рис. 8. Динамика корнеобразования в культуре стеблевых эксплантов различных сортов мяты на жидкой модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга:

Особенно следует отметить, что в данном случае, также как и при клональном микроразмножении в культуре листовых эксплантов, увеличение цикла выращивания не приводило к дополнительному побего- и корнеобразованию. Показатели коэффициента размножения не изменялись и оставались на постоянном уровне, составляя 1:12-1:14 в зависимости от сорта. Вместе с тем при культивировании свыше 30 суток наблюдалось дальнейшее развитие уже образовавшихся растений, увеличение размеров микропобегов и корней, а также количества листьев.

В отличие от листовых эксплантов, при культивировании сегментов стебля на агаризованной питательной среде не наблюдалось значительных различий как в интенсивности, так и в частоте побегообразования по сравнению с использованием жидкой питательной среды (рис. 9). На агаризованной питательной среде, так же как и на жидкой, индукция побегообразования визуально обнаруживалась на 13-15 сутки в зависимости от сорта. Количество микропобегов на один эксплант на 30 суток находилось приблизительно в тех же пределах, составляло у изучаемых сортов 1:11-1:14 и не изменялось при дальнейшем культивировании. При этом максимальный коэффициент размножения наблюдался у сорта Симферопольская 200. Культивирование стеблевых сегментов на агаризованной питательной среде не приводило к заметным изменениям частоты и интенсивности корнеобразования по сравнению с жидкой питательной средой (рис. 10).

Для адаптации растений-регенерантов, полученных в культуре молодых листьев и стеблевых сегментов к условиям *in vivo*, их переносили в субстрат, состоящий из смеси торфа и керамзита (1:1). При этом приживаемость растений составляла 91,7-100% в зависимости от сорта. По морфологическим признакам растения, полученные в культуре листовых и стеблевых эксплантов *in vitro*, не отличались от контрольных растений, размноженных рассадой. При выращивании в условиях закрытого грунта они нормально развивались, цвели и достигали фазы технической зрелости.

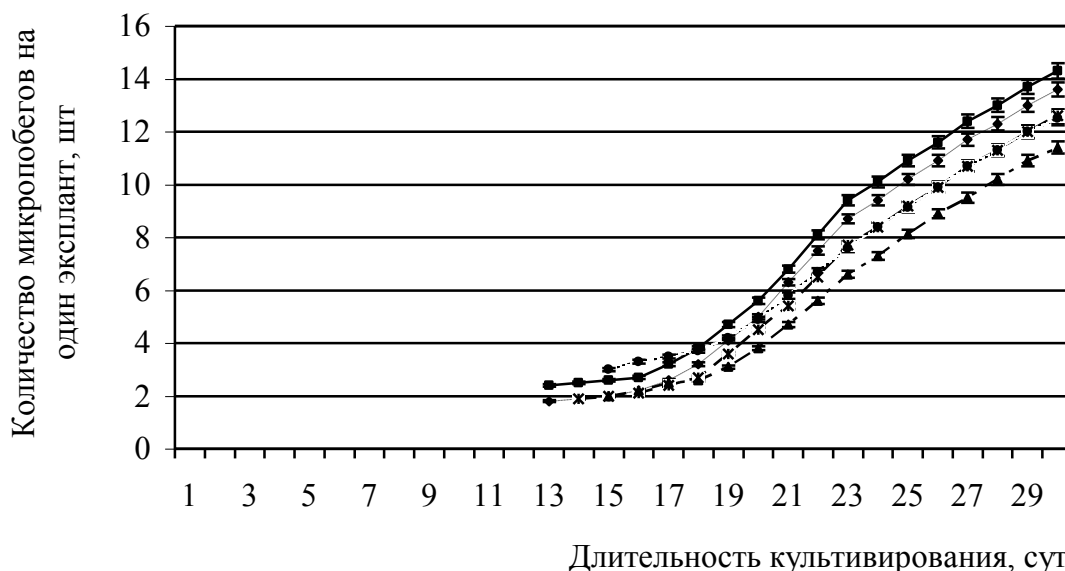


Рис. 9. Динамика побегообразования в культуре стеблевых эксплантов различных сортов мяты на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга:

- Симферопольская 200; - - - ◆ - - - Заграва;
- *— Украинская перечная; —▲— Двухукосная;
-◆..... Прилукская 6

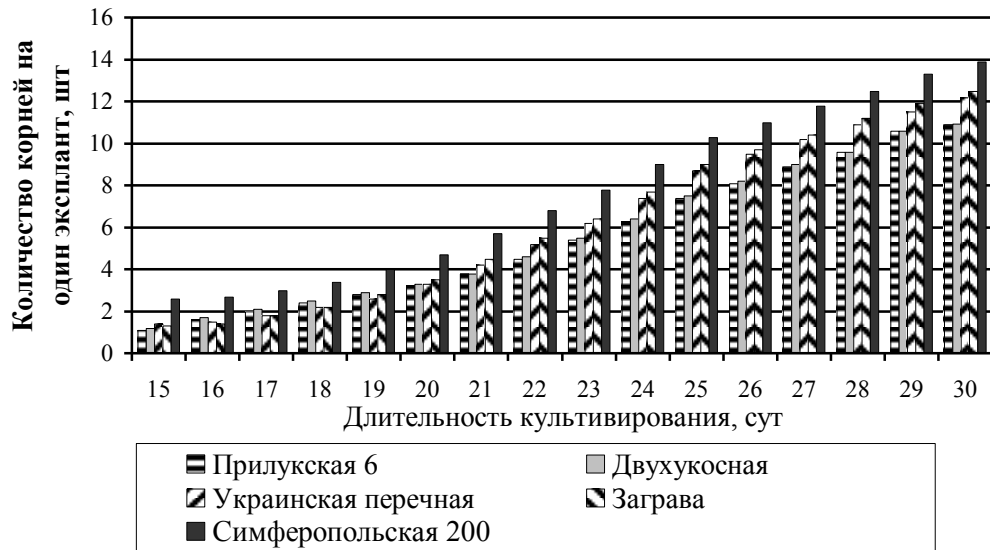


Рис. 10. Динамика корнеобразования в культуре стеблевых эксплантов различных сортов мяты на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга:

Таким образом, в результате проведенных исследований удалось выявить особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре изолированных молодых листьев и стеблевых сегментов изучаемых сортов мяты. При этом были установлены различия в типах регенерации в зависимости от экспланта. Известно, что регенерация растений в условиях *in vitro* может осуществляться как прямым путем, непосредственно из клеток экспланта, так и непрямым путем – через этап каллусообразования [6]. У всех изучаемых сортов мяты были выявлены оба указанных пути. Прямой путь наблюдался при культивировании эксплантов молодых листьев, непрямой – в культуре стеблевых сегментов. В обоих случаях происходила множественная регенерация растений, что позволяет рассматривать разработанную систему как один из подходов к клональному микроразмножению изучаемых сортов мяты. Поскольку культивирование листовых и стеблевых эксплантов различных генотипов мяты проводилось на питательной среде одного состава, можно сделать заключение, что тип регенерации в данном случае детерминирован природой экспланта.

Возможность использования культуры изолированных молодых листьев, а также листовых и стеблевых сегментов для клонального микроразмножения показана для довольно значительного числа видов растений [6, 9, 15, 16]. В ряде случаев была отмечена более высокая морфогенетическая активность эксплантов молодых листьев [9, 13]. Культура *in vitro* молодых листьев была использована для клонального микроразмножения *M. piperita*. Экспланты культивировали на питательной среде Линдсмайера и Скуга, дополненной 0,1 мг/л БАП и 0,1-1,0 мг/л кинетина. Множественное побегообразование начиналось спустя 2 месяца культивирования. Замена агаризованной питательной среды на «полужидкую» (0,4% агара) увеличивало почти в 2 раза количество микропобегов, развивающихся из одного экспланта. С целью индукции ризогенеза микропобеги переносили на питательную среду без фитогормонов [20].

Проведенные нами исследования выявили высокий морфогенетический потенциал молодых листьев различных сортов мяты при эксплантации их на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 10 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК. Особенностью данной питательной среды являлось значительное превышение концентрации цитокинина над концентрацией ауксина. Именно такой экспериментальный подход использовался и другими авторами для индукции органогенеза в культуре листовых эксплантов некоторых видов растений [10, 24].

Возможность клонального микроразмножения путем культивирования *in vitro* эксплантов стеблевых сегментов также показана для ряда видов растений [6, 12, 14]. В

имеющихся литературных данных о размножении в культуре стеблевых сегментов видов *M. arvensis* и *M. piperita* на первом этапе исследователи добивались прямой индукции вегетативных почек (микроробегов) или каллуса на первичной питательной среде. На втором этапе, образующиеся микроробегов переносили на среду для корнеобразования, а каллус на среду для регенерации [19, 21].

Наши исследования позволили разработать более простую систему для клонального микроразмножения мяты через прямой и непрямой пути морфогенеза, предусматривающую получение растений-регенерантов на первичной питательной среде в течение одного цикла выращивания культуры. При таком подходе исключается дополнительный этап, связанный с субкультивированием с целью индукции корнеобразования.

Известно, что при клональном микроразмножении растений путем культивирования *in vitro* различных эксплантов используются как жидкие, так и агаризованные питательные среды. Культивирование эксплантов на жидкой питательной среде иногда имеет преимущество по сравнению с поверхностным культивированием на агаризованной питательной среде. Считают, что жидкая питательная среда обеспечивает большую подвижность и доступность трофических факторов [4, 23]. Эффективность жидкой и агаризованной питательных сред для клонального микроразмножения в культуре листовых эксплантов проанализирована в небольшом количестве работ. При этом было показано, что регенерация растений из эксплантов листовых сегментов лучше проходила на жидкой питательной среде [9]. Однако, по-видимому, выбор консистенции питательной среды должен решаться индивидуально для каждого конкретного случая. Использование жидкой питательной среды может не давать заметного преимущества при клональном микроразмножении, а иногда ее эффективность даже хуже, чем при использовании агаризованной среды [12]. Результаты проведенных нами исследований показали целесообразность использования для клонального микроразмножения изучаемых сортов мяты жидкой питательной среды, обеспечивающей более высокий коэффициент размножения при культивировании *in vitro* молодых листьев. Однако данный факт следует рассматривать, вероятно, как частный случай, а не как общую закономерность. Это нашло подтверждение в результатах наших исследований, показавших, что при клональном микроразмножении в культуре стеблевых эксплантов не наблюдалось различий в коэффициенте размножения в зависимости от консистенции питательной среды (жидкая или агаризованная).

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана экспериментальная система для клонального микроразмножения мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Украинская перечная, Двухукосная и Прилукская 6 при использовании в качестве эксплантов молодых листьев и стеблевых сегментов. Разработанный подход позволяет проводить клональное микроразмножение сортов, имеющих различную генетическую основу, путем культивирования эксплантов на питательной среде одного состава. При этом в течение одного цикла выращивания культуры происходит формирование укорененных микроробегов, что исключает проведение дополнительного этапа культивирования с целью индукции корнеобразования и делает разработанную систему более технологичной с точки зрения практической реализации.

Выводы

Исследованы особенности морфогенеза в культуре изолированных молодых листьев и стеблевых сегментов мяты сортов Симферопольская 200, Заграва, Двухукосная, Украинская перечная и Прилукская 6 на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 10 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК. Установлено, что в культуре листовых эксплантов морфогенез и регенерация растений осуществлялись прямым путем непосредственно из клеток листа. В культуре стеблевых эксплантов регенерация растений происходила непрямой путем через этап каллусообразования. Разработана система множественной регенерации растений мяты *in vitro*, что позволяет использовать ее для

клонального микроразмножения изученных сортов в течение одного цикла выращивания культуры с коэффициентом размножения 1:14-1:31 в зависимости от генотипа и типа экспланта.

Список литературы

1. Бидюкова Г. Ф., Кириченко Е. Б. Репродуцирование *in vitro* растений мяты и их продукционная оценка // Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Евразия, 2001. – Т. 2. – С. 165-175.
2. Бугаенко Л. А., Шило Н. П., Шульга Е. Б., Мишнёв А. В. Использование межвидовой гибридизации и экспериментальной полиплоидии для создания сортов мяты с комплексом хозяйственно ценных признаков // Труды КГАУ. – 1999. – Вып. 62. – С. 244-253.
3. Бугара И.А., Бугара А.М. Некоторые особенности клонального микроразмножения мяты на основе культуры изолированных меристем *in vitro* // Бюл. Никит. бот. сада. – 2002. – Т.86. – С. 49-53.
4. Бутенко Р. Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
5. Виджешвар П., Митрофанова О.В., Лищук А.И. Клональное микроразмножение актинидии превосходной (*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson) // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 111-126.
6. Митрофанова И. В. Микроразмножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95.
7. Паушева Л. А. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
8. Родов В. С., Давыдова О. А. Размножение мяты методом культуры меристем // Труды ВНИИЭМК. – 1987. – Т. 18. – С. 78-83.
9. Bobak M., Blehova A., Krist J., Ovecha M., Samaj J. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1995. – Vol. 43, N 1. – P. 43-49.
10. Canhoto J. M., Cruz G. S. *In vitro* multiplication of *Actinida chinensis* Planch. by culture of yang leaves // Bol. da Soc. Broteriana. – 1987. – Vol. 2, N 60. – P. 239-252.
11. Chapman A., Blervacq A., Tissier J., Delbereil B., Vasseur J., Hilbert J. Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants. I. Scanning and transmission electron microscopy study on embryos originating from direct, indirect, and adventitious pathways // Can. J. Bot. – 2000. – Vol. 78, N 6. – P. 816-823.
12. Correia D., Natal G. A., Zavate C., Ribero M. C. Efeito domeio de cultura liquido e solido no crescimento e desenvolvimento de gamas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na multiplicação *in vitro* // PEF. – 1995. – N 48-49. – P. 107-116.
13. Jaksmanan P., Siew K., Joh C., Goh C. Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissue of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) // Plant and Cell Physiol. – 1997. – Vol. 38, N 1. – P. 59-64.
14. Le C. L. Culture *in vitro* du gene blanc (*Artemisia umbelliformis* Lam.) // Rev. suisse viticult., aboricuct. et horticult. – 1998. – Vol. 30, N 3. – P. 153-156.
15. Manickavasagam M., Ganapathi A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of sugarcane // India J. Exp. Biol. – 1998. – Vol. 36, N 8. – P. 832-835.
16. Mix-Wagner G., Eneva T. Plant regeneration from *Cichorium intybus* L. var. *sativum* leaf explants induced by ancymidos supplementer culture medium // Londbauforsch. Vvolkenrode. – 1998. – Vol. 48, N 2. – P. 53-55.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 13. – P. 473-497.
18. Pavingerova D., Briza J., Prenerova E. Obvozeni primarnich kultur z kvetnich pupenu rododendrromu // Rostl. vyroba. – 2000. – Vol. 46, N 6. – P. 281-286.

19. Phannipha C., Suttikan S., Phongsri S., Atchara T. Appropriated condition for shoot initiation of certain plant // *Indian J. Biotech.* – 2004. – Vol. 3, N 1. – P. 185.
20. Repcakova K., Rychlova M., Cellarova E., Houcariv R. Micropropagation of *Mentha piperita* L. through tissue cultures // *Herba hung.* – 1986. – Vol. 25, N 2. – P. 77-88.
21. Savithri B., Gupta S. K., Tuli R., Khanuja S. P. S., Sharma S., Bagchi G. D., Anil K., Sushil K. Micropropagation of mint // *Current Science.* – 2001. – Vol. 80, N 7. – P. 878.
22. Sunandakumari C., Martin K. P., Chithra M., Sini S., Madhusoodanan Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice *Mentha piperita* L. // *Indian J. Biotech.* – 2004. – Vol. 3, N 1. – P. 108- 112.
23. Suri S., Arora D., Ramawat K. A method for large-scale multiplication of *Curculigo orchioides* through bulbils formation from leaf explant in shake flask culture // *Indian J. Exp. Biol.* – 2000. – Vol. 38, N 2. – P. 145-148.
24. Tao R., Murayama H., Mariguchu K., Sugiura A. Plant regeneration from callus culture derived from primordial leaves of adult *Japanese persimmon* // *HortScience.* – 1988. – Vol. 23, N 6. – P. 1055-1056.

Morphogenesis and clonal micropropagation in leaves and stems explants of mint *in vitro*
A.M. Bugara, I.A. Bugara

The methods of clonal micropropagation of mint cultivars Simferopolskaya 200, Zagrava, Ukrainskaya perechnaya, Dvuhukosnaya and Prilukskaya on the basis of the culture of isolated leaf and stem explants have been elaborated. It was shown that the culture of leaf and stem explants ensures multiplication coefficient 1:14-1:31 depending from genotype and type explants.