

УДК 633.81:57.085.2

СРАВНЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ДВУХ ВИДОВ *Mentha* L., РАЗМНОЖЕННЫХ *in vitro* И *in vivo*

© 2023 г. О. В. Шелепова^{1, 2, *}, Л. Н. Коновалова^{1, 2}, Е. Н. Баранова^{1, 2}, Т. А. Диловарова²

¹Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, (ГБС РАН), Москва, 127276 Россия

²ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии”, Москва, 127550 Россия

*e-mail: shov_gbsad@mail.ru

**e-mail: greenpro2007@rambler.ru

Поступила в редакцию 26.08.2022 г.

После доработки 15.11.2022 г.

Принята к публикации 25.11.2022 г.

Проанализирована способность двух видов растений рода *Mentha*, полученных методом клонально-го микроразмножения продуцировать эфирные масла (ЭМ). С помощью ГХ-МС исследовали химический состав ЭМ, выделенных гидродистилляцией из высушенных листьев и цветущих побегов из растений первого и второго года вегетации, размноженных *in vitro*, и контрольных, размноженных черенкованием. Выход, а также количественный и качественный состав масел, полученных из растений *M. × piperita* (мяты перечной), размноженных *in vitro* и контрольных растений различались. Основным компонентом ЭМ контрольных растений был ментол, у растений, размноженных *in vitro*, в первый год вегетации в профиле масла преобладали ментол, ментон и *iso*-ментон. На второй год вегетации у растений перечной мяты, размноженных *in vitro*, содержание основных компонентов ЭМ соответствовало уровню контрольных растений. У растений *M. spicata* (мяты кудрявой), размноженных *in vitro*, качественный состав ЭМ уже в первый год вегетации был аналогичен контрольным растениям, при этом основным компонентом масла был карвон. Клональное микроразмножение мяты кудрявой (*M. spicata*) и мяты перечной (*M. × piperita*) является надежным методом быстрого размножения, позволяющим производить растения с составом эфирного масла аналогичным контрольным растениям. Вместе с тем необходим строгий контроль состава ЭМ этих растений на начальном этапе выращивания.

Ключевые слова: *Mentha × piperita* L., *Mentha spicata* L., *in vitro*, адаптация, эфирное масло

DOI: 10.56304/S023427582301009X

Среди всего разнообразия растений рода *Mentha* (семейство Lamiaceae) мята перечная (*Mentha × piperita* L.) и мята кудрявая (*Mentha spicata* L.) наиболее широко используемые во всем мире растения, которые давно и безопасно применяют в медицинских целях, благодаря фармакологически полезным свойствам, таким как противоаллергическое, спазмолитическое, противовирусное и антибактериальное действия, предотвращающее развитие различных инфекций [1–4]. В пищевой промышленности сушеные листья мяты используют в виде чаев или смесей для настоев [5, 6]. В мяте содержится ряд флавоноидов, которые являются высокоэффективными антиоксидантами, но наиболее важными биологически активными соединениями у мяты кудрявой и перечной являются эфирные масла (ЭМ).

Растения содержат до 250 различных летучих компонентов, основными из которых у мяты кудрявой являются карвол и лимонен, у мяты перечной — ментол [7–9]. ЭМ мяты используют для придания вкуса и аромата различным пищевым продуктам [6, 10]. В связи с большим спросом на ЭМ двух видов мяты, селекцией данных культур занимаются на протяжении 19 и 20 веков, в настоящее время зарегистрировано много культиваров с уникальным компонентным составом эфирного масла. В коммерческих целях выращивают различные хемотипы мяты, которые характеризуются повышенным содержанием отдельных компонентов ЭМ, таких как лимонен, 1,8-цинеол (эвкалиптол), карвон, линалоол и т.п., особо значимых в косметической и фармацевтической промышленности за их освежающий аромат и биоактивные свойства [11]. Происхождение обоих видов мя-

ты сложное межвидовое гибридное – мята перечная (*M. × piperita*) является гибридом между *M. aquatica* и *M. spicata*, а мята кудрявая (*M. spicata*) – гибридом между *M. longifolia* и *M. rotundifolia*. Оба вида редко размножаются семенами и, как следствие, преимущественно вегетативным путем – делением корневищ и укоренением побегов, что часто затрудняет разведение растений. Для крупномасштабного размножения данных видов мяты использование черенков не является идеальным из-за длительного времени (два года), необходимого для получения развитого растения, возможного загрязнения фитопатогенами черенков после срезания, а также отсутствием в достаточном количестве высококачественного сырья [12]. Учитывая умеренный процент вегетативного размножения *M. × piperita* и *M. spicata*, в качестве альтернативного варианта массового производства для удовлетворения коммерческого спроса, либо для целей сохранения хозяйственно ценных генотипов предложен метод клонального микроразмножения [13–15]. Применение этого метода *in vitro* позволяет получать необходимое количество экспериментального растительного материала мяты для практического использования. Вместе с тем обоснованность использования этого метода во многом зависит от способности растений, полученных методом клонального микроразмножения, обеспечивать высокие урожаи биомассы растений, состав эфирного масла, которого соответствует требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации. XIII издание [16].

На протяжении последних лет многие экспериментальные работы с растениями мяты были посвящены влиянию условий клонального микроразмножения, в частности использованию регуляторов роста, на химический состав ЭМ растений мяты, размноженных *in vitro*. Полученные результаты указывают на различия в способности к регенерации в зависимости от генотипа растений и условий культивирования. Так, выращивание эксплантов мяты *M. × piperita* и *M. spicata* на среде Мурасиге-Скуга с добавлением регулятора роста БАП (6-бензиламинопурина) в дозах от 0.5 до 2.5 мг/л позволяет достичь регенерации побегов мяты в течение 5–6 недель, стимулирует больший выход новых побегов и листьев из эмбрионного каллуса на стадии морфогенеза, а полная регенерация побегов мяты наблюдалась в течение 5–6 недель и продолжалась более 60 дней [17, 18]. Но при этом в составе ЭМ, продуцируемого растениями *in vitro*, может изменяться количество содержащихся отдельных компонентов. Так, в работе [19] продемонстрировано, что специфические ароматические профили микрклонов *in vitro* генотипа “Mitcham” *M. × piperita*, характеризуются отсут-

ствием пулегона и ментофурана. Практически отсутствуют исследования, посвященные изучению изменения состава ЭМ растений, размноженных *in vitro*, в длительном периоде интродукции и сравнению этого состава с ЭМ контрольных образцов.

Целью данного исследования была оценка химического состава ЭМ растений первого и второго года вегетации, размноженных *in vitro*, и сравнение полученных значений с таковыми у контрольных растений (размноженных черенкованием) двух видов мяты, выращенных в полевых условиях, а также оптимизация клонального микроразмножения мяты перечной *M. × piperita* и мяты кудрявой *M. spicata* коллекции лаборатории физиологии и иммунитета растений ГБС РАН.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал. Объектом исследования служили растения мяты перечной *M. × piperita* и мяты кудрявой *M. spicata*, полученные из коллекции лаборатории физиологии и иммунитета растений ГБС РАН и выращенные на экспериментальном участке этой лаборатории (55°864' с. ш., 37°597' в.д.). Почва участка дерново-подзолистая, окультуренная: рН 5.8–6.0; содержание гумуса 6.4%; содержание песка 18.0%; нитратных форм азота – 4.1; обменных форм фосфора 53.8 и калия 29.3 мг/100г почвы. В конце мая 2020 г на данном экспериментальном участке были высажены растения мяты кудрявой и перечной размноженные *in vitro* и контрольные, полученные методом зеленого черенкования из маточных образцов данных видов мяты [20]. Растения высаживали в борозды на расстоянии 10–15 см друг от друга с междурядьями 50 см. В 2020 г (первый год вегетации) и в 2021 г (второй год вегетации) в фазу бутонизации проводили учет выхода и определение состава ЭМ контрольных и адаптированных растений.

Мята перечная *M. × piperita* – высокопродуктивный и высокомасличный вид, высота растения 62–68 см. Куст компактный, полусферической формы. Стебель с антоциановой окраской, листья темно-зеленые, эллиптической формы, не опушены. Опушение оценивали визуально под бинокулярным микроскопом Bresser-Advance ICD 10x-160x (Bresser, Германия). Цветки лиловые. Урожай зеленой массы – 15.0–16.5 т/га, сухого листа до 2.5 т/га. Содержание ЭМ в пересчете на абсолютно сухое сырье – до 4.0%, ментола в масле – 50–70%, ментона – 10–22%. Сорты на основе данного вида отвечают требованиям производственной технологии возделывания, высокоустойчивы к септориозу и ржавчине [21].

Мята кудрявая *M. spicata* – высокопродуктивный вид, высота растения до 85 см. Стебель сла-

боопушенный, листья светло-зеленые, яйцевидной формы на длинном черешке, не опушены. Цветки светло-лиловые, собранные в колосовидные соцветия. Вид способен формировать урожай зеленой массы до 11.5 т/га, сухого листа – 2.0 т/га. Содержание ЭМ в пересчете на абсолютно сухое сырье – 3.0%. В ЭМ данного вида содержится до 75% карвона и 10% лимонена. Данный вид устойчив к болезням и вредителям [21].

Культивирование *in vitro*. Основным методом, который мы использовали – активация развития пазушных меристем. В качестве эксплантов брали апикальные и латеральные почки побегов текущего года с небольшим участком стебля (с серединой части стебля) с одним узлом (10–15 мм). В каждом варианте опыта было не менее 20 эксплантов. Их предварительно обрабатывали 70%-ным этанолом (экспозиция 30с), а затем стерилизовали 4%-ным раствором гипохлорита натрия (АО “ВТЕ Юго-Восток”, Россия) (экспозиция 5 мин) с добавлением 2 капель Tween 20 (Sigma-Aldrich, США).

Стерильные экспланты высаживали на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) [22], содержащую 0.8% агара, 3% сахарозы и регулятор роста БАП (Phyto Tech. Lab, США). В варианте 1 (В-1) добавляли 0.5 мг/л БАП, в варианте 2 (В-2) 1.0 мг/л, в контроле использовали среду МС без фитогормонов (В-К).

Значения pH всех сред были зафиксированы на уровне 5.6–5.8. Среды стерилизовали паром в автоклаве (2540ЕКА, Tuttnauer, Израиль) при 121°C в течение 20 мин. Культивирование проводили в специально оборудованном помещении при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$ с фотопериодом 16 ч свет (2500–3000 лк)/8 ч (темнота) и уровнем влажности 70%. Эксперимент проводили в трехкратной повторяемости.

После четырех недель культивирования определяли морфометрические показатели: число и длину побегов (см), количество узлов на побеге (шт), длину корня (см). Коэффициент размножения рассчитывали как среднее количество микропобегов, которое можно получить за одно субкультивирование с одного экспланта. Для этого среднее количество образовавшихся микропобегов умножали на среднее число узлов на микропобеге [23]. Всего учитывали по 30 растений в каждом варианте среды. Четырехнедельные микроклоны из эксплантов использовали для адаптации растений. Растения извлекали из культуральных флаконов, корни промывали водопроводной водой для удаления следов агара. Адаптацию растений к условиям *in vivo* проводили на мхе сфагнум [24]. Мох может храниться неограниченно долго, впи-

тывает и удерживает большое количество жидкости, пропускает воздух, обладает асептическими свойствами, что препятствует развитию бактериальных и грибных возбудителей [25, 26]. Растения адаптировали при $23^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ с фотопериодом 16 ч света/8 ч темноты при интенсивности света 160 мкМ фотонов $\text{m}^{-2} \text{c}^{-1}$ и уровне влажности 70% в течение 4 недель, после чего высадили их в открытый грунт на экспериментальном участке лаборатории ГБС РАН.

Определение содержания и состава эфирного масла растений мяты. Навеску (до 20 г) воздушно-сухих надземных частей измельчали и затем подвергали гидродистилляции в течение 2 ч в соответствии со стандартной процедурой, описанной в Государственной Фармакопее XIII ОФС.1.5.3.0010. Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [27]. Эфирные масла хранили в темноте до анализа.

Качественный состав масла определяли газохроматографически в ЦКП ФИЦ “Биотехнология” РАН (RFMEFI62114X0002) на газовом хроматографе Shimadzu GC-MS QP 2010 Ultra EI (Shimadzu, Япония) с массдетектором GCMS-QP 2010; колонка неполярная SPB-1 (Shimadzu) (твердосвязанный метилсиликон) длина 30 м, диаметр 0,25 мм. Образцы растворяли в бензоле в соотношении 1 : 150 и хроматографировали в режиме программирования температуры при следующих рабочих параметрах: температура инжектора 180°C, интерфейса 205°C, детектора 200°C. Газ-носитель – гелий. Поток через колонку 1 $\text{cm}^3/\text{мин}$, деление потока 1 : 10. Параметры масс-детектора: режим регистрации – ТИС, диапазон масс 30–400 m/z . Температурный режим для веществ с индексом удерживания до 1300 – термостат 60°C 3 мин, далее 2°C/мин до 230°C и изотерма 2 мин. Температурный режим для веществ с индексом удерживания более 1300 – термостат 60°C 1 мин, далее 4°C/мин до 230°C и изотерма 2 мин. Для определения линейных индексов удерживания хроматографировали смесь линейных парафинов: нонан, декан, тридекан, пентадекан, гептадекан.

Статистическая обработка данных. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность различий между составами эфирных масел образцов контрольных растений и растений, размноженных *in vitro*, первого и второго года вегетации тестировали, используя Windows SPSS, версию 20.0 – ANOVA, тест Тьюки.

Таблица 1. Средние значения морфометрических показателей микропобегов мяты перечной и мяты кудрявой на этапе пролиферации через четыре недели культивирования *in vitro*
Table 1. Average values of morphometric parameters of peppermint and spearmint microshoots at the proliferation stage after four weeks of *in vitro* cultivation

Вид	Количество латеральных побегов (шт)			Длина микропобегов (см)			Количество новых узловых сегментов (шт)			Длина корня (см)		
	В-К	В-1	В-2	В-К	В-1	В-2	В-К	В-1	В-2	В-К	В-1	В-2
<i>M. × piperita</i>	1.4 ± 0.1 _c	3.0 ± 0.4 _b	3.8 ± 0.3 _a	6.3 ± 0.3 _a	5.7 ± 0.3 _b	5.2 ± 0.3 _c	5.1 ± 0.1 _{ab}	5.8 ± 0.3 _a	4.4 ± 0.4 _b	4.5 ± 0.2 _b	6.3 ± 0.2 _a	4.4 ± 0.3 _b
<i>M. spicata</i>	1.3 ± 0.2 _b	2.9 ± 0.3 _{ab}	3.2 ± 0.3 _a	5.1 ± 0.2 _a	4.8 ± 0.1 _{ab}	4.5 ± 0.3 _b	4.2 ± 0.2 _a	4.1 ± 0.3 _a	3.7 ± 0.2 _b	3.6 ± 0.2 _a	3.1 ± 0.2 _{ab}	2.8 ± 0.3 _b

Примечание. Значения, за которыми следует одна и та же буква в индексе, существенно не отличаются ($p > 0.05$, тест Тьюки).
Note. Values followed by the same letter in subscript are not significantly different ($p > 0.05$, Tukey's test).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование *in vitro*. Качественные характеристики первичных эксплантов часто являются определяющими для успешного прохождения этапа стерилизации и переноса их в стерильные условия. Растения должны быть свободны от фитопатогенной микрофлоры и грибных спор, присущих септическим условиям *in vivo*. Одним из факторов, осложняющих эту стадию, является опушение поверхности стеблей и листьев контрольных растений, увеличенная площадь таких эксплантов и сложность строения их поверхности. При введении в асептическую культуру *in vitro* эксплантов растений мяты перечной (*M. × piperita*), стебли которой были без заметного опушения, применение отработанной нами ступенчатой стерилизации, позволило получить 96.8% жизнеспособных эксплантов. В тех же условиях стерилизации жизнеспособность эксплантов растений мяты кудрявой (*M. spicata*), стебли которой слабо опушены, составила 90.2%.

На первом этапе микроразмножения происходило развитие основного побега, а также активное адвентивное побегообразование (табл. 1).

Так, у мяты кудрявой формировалось от 1.4 до 3.8 побега/эксплант, а у мяты перечной — от 1.3 до 3.2. При этом максимальное количество побегов на эксплант формировалось в варианте В-2 при добавлении в среду 1.0 мг/л БАП и развивались достаточно длинные побеги, в среднем до 5.2 см у мяты кудрявой и 4.5 см у мяты перечной. В варианте В-1 (0.5 мг/л БАП) у обоих видов мяты длина побегов была выше на 6–9% по сравнению с вариантом В-2, и самые длинные побеги обоих видов мяты были получены в контроле (безгормональной среде). Добавление в состав среды БАП

привело к повышению некоторых морфометрических параметров, за исключением длины побегов. Это связано с тем, что цитокинины участвуют в росте и дифференциации клеток и влияют на апикальное доминирование и рост пазушных зачатков. Использование цитокининов позволяет ускорить процессы морфогенеза при культивировании растений [28, 29].

Количество новых узловых сегментов у мяты перечной на среде В-1 было выше на 14% по сравнению с контролем, при этом у мяты кудрявой этот показатель в данном варианте опыта был на уровне контроля. В варианте В-2 у обоих видов количество новых узловых сегментов был статистически значимо ниже на 12–14% по сравнению с контрольной средой.

У изученных видов мяты коэффициент размножения был самым низким на контрольной среде В-К (5.5–8.1). На гормональных средах вариантов В-1 и В-2 результаты, полученные для этого показателя, статистически значимо не различались и были в 1.6–1.9 раза выше показателей контрольного варианта. (рис. 1).

Максимальный коэффициент размножения отмечен у мяты перечной и минимальный — у мяты кудрявой. Высокий коэффициент размножения (15.1 и 9.1) у обоих видов мяты наблюдали при добавлении к среде МС 0.5 мг/л БАП. При использовании данной модификации среды получена максимальная частота приживаемости эксплантов (95%).

Следует отметить, что у обоих видов мяты, уже на первом этапе микроразмножения частота корнеобразования составляла 86–91%. Наибольшее количество корней образовалось у мяты перечной, при этом и длина корней у нее была больше

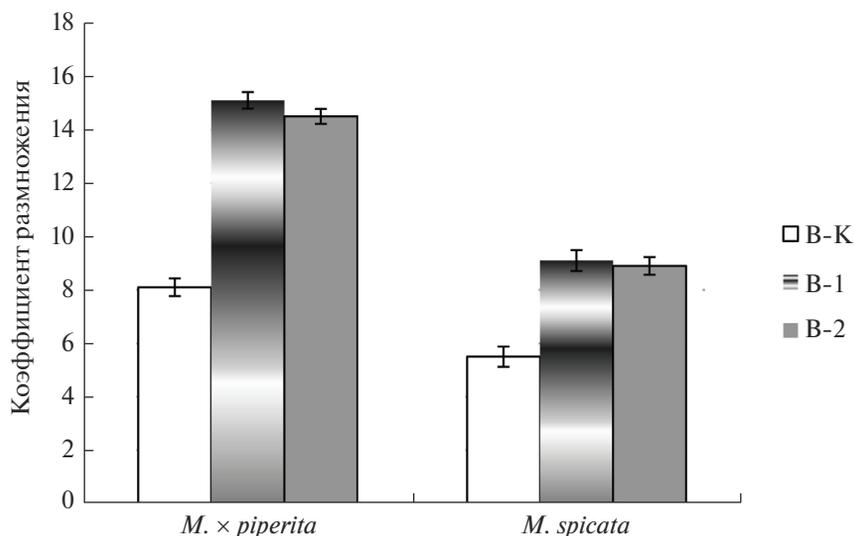


Рис. 1. Влияние среды на коэффициент размножения микропобегов мяты перечной и мяты кудрявой. В-К – контроль, В-1 – вариант 1 (0.5 мг/л БАП), В-2 – вариант 2 (1.0 мг/л БАП).

Fig. 1. Influence of the medium on the multiplication factor of peppermint and spearmint microshoots. V-K – control variant, V-1 – variant 1 (0.5 mg/l BAP), V-2 – variant 2 (1.0 mg/l BAP).

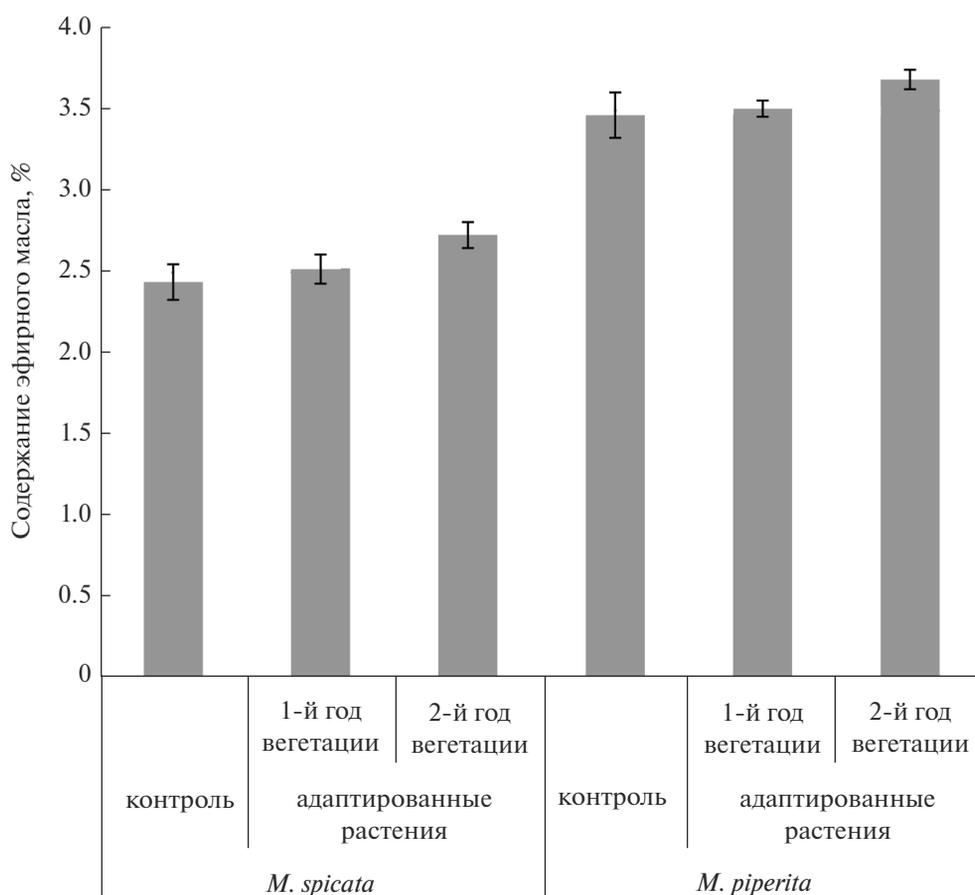


Рис. 2. Содержание эфирного масла в надземной части адаптированных и контрольных растений мяты перечной и мяты кудрявой.

Fig. 2. The content of essential oil in the aerial parts of adapted plants and control plants of peppermint and spearmint.

Таблица 2. Состав эфирного масла мяты перечной и мяты кудрявой в зависимости от способа размножения, %
Table 2. The composition of the essential oil of peppermint and spearmint, depending on the method of reproduction, %

Соединения	<i>M. spicata</i>			<i>M. × piperita</i>		
	контроль	адаптированные растения		контроль	адаптированные растения	
		1-й год вегетации	2-й год вегетации		1-й год вегетации	2-й год вегетации
α-пинен	0.82 _a	0.62 _c	0.67 _c	0.40 _a	0.32 _{ba}	0.38 _a
сабинен	0.20 _a	0.20 _a	0.14 _b	0.30 _a	0.20 _b	0.23 _{ba}
β-пинен	1.50 _a	0.94 _b	1.11 _{ab}	0.33 _a	0.30 _a	0.26 _{ba}
мирцен	1.74 _a	0.85 _c	0.56 _d	0.40 _a	0.27 _b	0.38 _a
3-октанол	0.17 _{ab}	0.21 _a	0.23 _a	1.60 _a	1.09 _b	0.95 _{bc}
d-лимонен	10.61 _a	9.21 _{ab}	9.23 _{ab}	4.00 _a	1.69 _{cd}	1.95 _c
1,8-цинеол	0.49 _a	0.38 _{ab}	0.27 _b	1.20 _{bc}	1.80 _b	2.30 _a
линалуол	t	t	t	0.19 _a	0.10 _c	0.21 _a
ментон	0.14 _a	0.14 _a	0.13 _a	11.21 _b	17.14 _c	11.21 _b
ментофуран	t	t	t	0.63 _{bc}	1.00 _a	0.75 _b
iso-ментон	0.17 _a	0.14 _{ab}	0.15 _{ab}	14.95 _{cd}	19.25 _a	16.32 _c
ментол	1.12 _a	1.07 _a	1.06 _a	54.27 _a	39.40 _d	52.38 _{ab}
iso-ментол	t	t	t	1.16 _a	1.02 _{ab}	0.26 _d
метил ацетат	t	t	t	1.10 _{cd}	6.70 _a	2.25 _c
пулегон	t	t	t	0.70 _c	2.67 _a	1.82 _b
карвон	72.78 _a	68.65 _{ab}	68.16 _{ab}	0.02 _c	0.31 _a	0.03 _c
дигидрокарвон	1.84 _d	7.53 _{ab}	8.38 _a	t	t	t
дигидрокарвил	1.53 _c	3.35 _a	3.91 _a	t	t	t
p-ментанлактон	t	t	t	0.07 _c	0.17 _a	0.15 _a
β-бурбонен	0.61 _a	0.53 _{ab}	0.58 _a	0.06 _b	0.11 _a	0.11 _a
α-терпинеол	t	t	t	0.10 _c	0.20 _a	0.20 _a
пиперитон	t	t	t	0.10 _d	1.00 _a	1.10 _a
β-кариофилен	0.12 _b	0.15 _{ba}	0.20 _a	0.20 _c	0.40 _a	0.40 _a
гермакрен D	0.61 _a	0.55 _a	0.51 _{ab}	0.80 _a	t	0.70 _{ba}

Примечание. t – содержание соединения менее 0.05%. Значения, за которыми следует одна и та же буква в строке, существенно не отличаются ($p > 0,05$, тест Тьюки).

Note. t – compound content less than 0.05%. Values followed by the same letter within a row are not significantly different ($p > 0,05$, Tukey's test)).

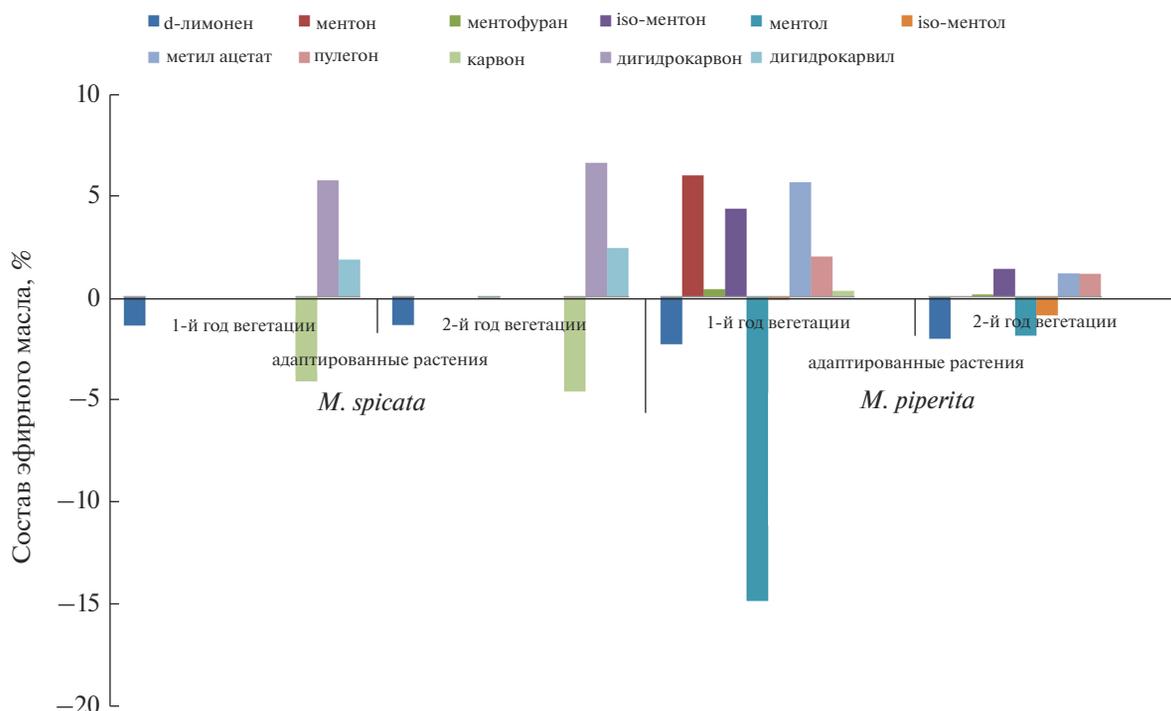


Рис. 3. Различия в содержании отдельных компонентов эфирного масла адаптированных растений мяты перечной и мяты кудрявой 1 и 2 года вегетации по сравнению с контрольными растениями.

Fig. 3. Differences in the content of individual components of the essential oil of adapted peppermint and spearmint plants of the 1st and 2nd year of vegetation compared with control.

(табл. 1). В целом аналогичную картину (корнеобразование уже на первом этапе микроразмножения) у сортов мяты перечной фиксируют многие исследователи [23, 30, 31]. Но для регенерации корней других видов мяты *in vitro* оптимальной является среда МС с 1.0 мг/л индолил-3-масляной кислотой (ИМК) [13, 17, 32].

Для оптимизации условий адаптации укорененных побегов мяты к условиям *in vivo* был использован мох сфагнум, обладающий с высокой водоудерживающей способностью и асептическими свойствами [25, 26]. После адаптации размноженные растения переносили в полевые условия на экспериментальный участок лаборатории физиологии и иммунитета растений ГБС РАН, где выращивали в течение двух лет (2020 и 2021 гг.). В фазу бутонизации проводили учет выхода ЭМ и определяли его состав в контрольных и адаптированных растениях.

Анализ выхода и состава эфирного масла мяты перечной и мяты кудрявой. Выход ЭМ зависит от многих факторов, таких как условия выращивания *in vivo* и *in vitro*, дата сбора урожая и условия его хранения после сбора [33, 34]. Так, максимальное содержание ЭМ у контрольных растений за годы

опыта (2020–2021 гг.) было зафиксировано у мяты перечной, в среднем оно составило $3.47 \pm 0.14\%$, у контрольных растений мяты кудрявой – $2.44 \pm 0.11\%$, (рис. 2).

У растений обоих видов мяты, размноженных *in vitro*, содержание ЭМ было больше как в первый, так и во второй год вегетации, однако данное увеличение было статистически не значимы по сравнению с контролем. Следует подчеркнуть, что в ранее проведенных исследованиях уже указывалось, что использование регуляторов роста (в частности БАП) увеличивает производство биомассы и выход ЭМ у мяты [28]. В то же время при использовании БАП, наряду с увеличением общего выхода ЭМ, зачастую меняется состав вторичных метаболитов, в частности терпеновых соединений [14, 17].

Анализ масел с помощью ГХ-МС контрольных растений и растений первого и второго года вегетации, размноженных *in vitro*, выявил в общей сложности 24 соединения. Их содержание составило от 93.7 до 95.3% от общего количества масла (табл. 2), в основном с преобладанием оксигенированных монотерпенов (до 80%), таких как ментол (до 54.3%) и ментон (до 17.1%) у мяты переч-

ной и карвон (до 72.3%) и d-лимонен (до 10.6%) у мяты кудрявой.

Исходя из состава эфирного масла мяты перечной и по стандартам Российской Фармакопеи XIII [16] растительное сырье из данного вида может быть использовано в фармацевтической промышленности. Присутствие в эфирном масле мяты кудрявой антибактериальных компонентов, в частности карвона, позволяет применять данное масло в качестве противомикробного препарата против *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Acinetobacter* spp. и *Klebsiella pneumoniae* [4, 9].

По качественному составу ЭМ каких-либо существенных различий между контрольными и растениями, размноженными *in vitro*, не обнаружено; однако у растений, размноженных *in vitro*, наблюдалось изменение процентного содержания конкретных соединений в составе ЭМ (табл. 2, рис. 3).

В полевых условиях в первый год вегетации в растениях мяты кудрявой, размноженных *in vitro*, в составе ЭМ возросло содержание дигидрокарвона (в 4.1 раза) и дигидрокарвила (в 2.2 раза), а содержание карвона статистически значимо не отличалось от контрольных родительских форм. Первые два соединения являются предшественниками синтеза карвона, и, следовательно, повышенное содержание этих компонентов свидетельствует о потенциальной возможности увеличения содержания карвона в ЭМ растений мяты кудрявой, размноженных *in vitro* [6].

У растений мяты перечной, размноженных *in vitro*, в первый год вегетации в составе ЭМ в 1.4 раза снизилось содержание основного компонента – ментола по сравнению с аналогичным показателем контрольных родительских форм. При этом в хроматографическом профиле ЭМ данных растений мяты перечной возросла доля ментона, изоментона, метил ацетата и пулегона. Известно, что метил ацетат и пулегон являются предшественниками ментона и *iso*-ментона в биосинтезе монотерпенов рода *Mentha*, а ментон и изоментон – предшественниками ментола и изоментона, соответственно [19, 35]. Поэтому накопление этих соединений в качестве основного компонента ЭМ указывает на неоптимальную работу восстановительных ферментов, катализирующих превращение метил ацетата и пулегона в ментон и в дальнейшем в ментол. Полученные нами данные согласуются с другими исследованиями, в которых микробиологи накапливают пулегон в качестве основного компонента вместо ментона и ментола [31]. Также следует отметить увеличение процентного содержания в составе

ЭМ растений мяты перечной, размноженных *in vitro*, такого компонента как ментофуран. В первый год вегетации его содержание возросло в 1.6 раза, во второй оно снизилось, но все же превышало в 1.2 раза уровень этого соединения в составе ЭМ контрольных растений.

Сравнительная оценка ЭМ контрольных и растений, размноженных *in vitro*, второго года вегетации обоих видов мяты выявила существенные колебания только в содержании минорных компонентов ЭМ (табл. 2). Для мажорных компонентов ЭМ варибельность была ниже и связана в основном с ментоном и *iso*-ментоном у мяты перечной и дигидрокарвилем и d-лимоненом у мяты кудрявой. В составе ЭМ растений мяты кудрявой второго года вегетации, размноженных *in vitro*, мажорные компоненты оставались на уровне аналогичных показателей растений первого года. В то время как, в составе ЭМ растений мяты перечной второго года вегетации, размноженных *in vitro*, возросло содержание ментола (52.38%), и снизилось *iso*-ментона (16.32%) и ментона (11.2%). Содержание метил ацетата и пулегона хотя и снизилось, но не достигло уровней характерных профилю ЭМ контрольных растений.

Согласно литературным данным состав ЭМ регенератов *in vitro* должен восстановиться до родительских форм через 120 дней после перевода растений в полевые условия [36]. Полученные нами результаты подтвердили восстановление профиля ЭМ растений мяты кудрявой к первому году вегетации, а мяты перечной только ко второму году вегетации. Следует отметить, что одной из причин снижения ментола и увеличения содержания ментона в составе ЭМ растений мяты перечной, размноженных *in vitro*, по сравнению с контрольными растениями могут быть и климатические условия 2020 г. Известно, что особенно для ментольных хемотипов мяты, температура воздуха является одним из основных регулирующих факторов в период интенсивного образования ЭМ. Для получения наиболее качественного ЭМ необходима сумма эффективных температур вегетационного периода 3200–3400°C, в Московском регионе данный показатель несколько ниже (порядка 2400–2600°C) [37]. И хотя, наблюдающиеся в последние годы погодные аномалии, привели к существенному потеплению климата и увеличению суммы эффективных температур в Средней полосе России, возможно именно низкая сумма эффективной температуры вегетационного периода 2020 г (2123°C) привела к снижению выхода ментола в составе ЭМ растений мяты перечной первого года вегетации, размноженных *in vitro*. По-видимому, эти растений оказались более чувствительны к пониженным температурам

по сравнению с контрольными растениями. Напротив, жаркое лето 2021 г (сумма эффективных температур вегетационного периода 2021 г составила 2854°C) способствовало высокому содержанию ментола в составе ЭМ растений мяты перечной второго года вегетации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что добавление к среде 0.5 мг/л регулятора роста БАП является оптимальным для микроразмножения изученных видов — обеспечивает одновременно высокий коэффициент размножения и максимальную частоту формирования корней, что позволяет уменьшить время, необходимое для размножения растений. В полевых условиях у растений мяты кудрявой и перечной, размноженных *in vitro*, содержание ЭМ было выше как в первый, так и во второй год вегетации по сравнению с контрольными растениями, размноженных зелеными черенками, — у мяты кудрявой на 3.3–11.2%, у мяты перечной на 1.1–6.3%, соответственно.

У контрольных растений мяты перечной в составе ЭМ доминировали ментол (54.3%) и ментон (11.2%), у мяты кудрявой — карвон (72.8%). У растений мяты перечной, размноженных *in vitro*, в первый год вегетации в составе ЭМ на 27.4% снизилось содержание ментола по сравнению с контрольными растениями, в профиле ЭМ преобладали *iso*-ментон, ментон и метил ацетат. На второй год вегетации в составе ЭМ растений этого вида мяты возросло содержание ментола (на 32.9%) и снизилось содержание остальных мажорных компонентов до уровня профиля ЭМ контрольных растений. У растений мяты кудрявой, размноженных *in vitro*, уже в первый год вегетации содержание основного мажорного компонента карвона статистически значимо не отличалось от контрольных растений, а содержание дигидрокарвона и дигидрокарвила возросло в 4.1 и в 2.2 раза соответственно.

Таким образом, клональное микроразмножение мяты кудрявой (*M. spicata*) и мяты перечной (*M. × piperita*) является надежным методом быстрого размножения, позволяющим производить растения с составом эфирного масла аналогичным контрольным растениям.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках Госзаданий 122042700002-6 (ГБС РАН) и 0431-2022-0003 (ФГНБУ ВНИИСБ) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trevisan S.C.C., Menezes A.P.P., Barbalho S.M., Guiguer É.L. Properties of *Mentha piperita*: a brief review. *World J. Pharm. Med.*, 2017, 3(1), 309–313.
2. Wińska K., Mączka W., Łyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules*, 2019, 24, 2130. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>
3. Silva H. A descriptive overview of the medical uses given to *Mentha* aromatic herbs throughout history. *Biology*, 2020, 9(12), 484. <https://doi.org/10.3390/biology9120484>
4. Mahendran G. Verma S.K. Rahman L.-Ur. The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (*Mentha spicata* L.): A review. *J. Ethnopharmacol.*, 2021, 278, 114266. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114266>
5. Salehi B., Stojanovic-Radic Z., Matejic J., Sharopov F., Antolak H., Kregiel D., Sen S., Sharifi-Rad M., Acharya K., Sharifi-Rad R., Martorell M., Sureda A., Martins N., Sharifi-Rad J. Plants of genus *Mentha*: from farm to food factory. *Plants*, 2018, 7, 70. <https://doi.org/10.3390/plants7030070>
6. Mahboubi M. *Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *J. Tradit. Complement. Med.*, 2021, 11(2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.011>
7. Amato A., Liotta R., Mule F. Effects of menthol on circular smooth muscle of human colon: analysis of the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.*, 2014, 740, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.018>
8. Balakrishnan A. Therapeutic Uses of Peppermint — A Review. *J. Pharm. Sci. Res.*, 2015, 7(7), 474–476.
9. Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Abu-Zaitoun S.Y., Khasati A.I., Kalbouneh S.R. Biological properties and bioactive components of *Mentha spicata* L. essential oil: focus on potential benefits in the treatment of obesity, Alzheimer's disease, dermatophytosis, and drug-resistant infections. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2019, 3834265. <https://doi.org/10.1155/2019/3834265>
10. Nair B. Final report on the safety assessment of *Mentha piperita* (Peppermint) oil. *Mentha piperita* (Peppermint) leaf extract. *Mentha piperita* (Peppermint) leaf. and *Mentha piperita* (Peppermint) leaf water. *Int. J. Toxicol.*, 2001, 20(3), 61–73.
11. Ludwiczuk A., Kiełtyka-Dadasiewicz A., Sawicki R, Golus J., Ginalska G. Essential oils of some *Mentha* species and cultivars. their chemistry and bacteriostatic activity. *Nat. Prod. Commun.*, 2016, 11, 1018. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100736>
12. Kalembe D., Synowiec A. Agrobiological Interactions of Essential Oils of Two Menthol Mints: *Mentha piperita* and *Mentha arvensis*. *Molecules*, 2020, 25, 59. <https://doi.org/10.3390/molecules25010059>

13. Mehta J., Naruka R.; Sain M., Dwivedi, A., Sharma, D., Mirza, J. An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L. (Peppermint). *Asian J. Plant Sci. Res.*, 2012, 2, 518–523.
14. Talankova-Sereda T.E., Kolomiets J.V., Holubenko A.V., Nuzhyna N.V. The influence of clonal micropropagation on productivity and differentiation of *Mentha piperita* plant tissues. *Regul. Mech. Biosyst.*, 2019, 10, 337–344.
15. Shkopinska T.E., Kolomiiec Yu.V., Grugoryuk I. P., Kutsenko N.I. Economic valuable traits of promising breeding samples and “Chornolysta” variety of *Mentha piperita* L. after in vitro sanitation and micropropagation. *Plant Var. Stud. Prot.*, 2019, 15(4), 424–433. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.15.4.2019.188722>
16. ФС 2.5.0029.15 Мята перечной листья. МЗ Р.Ф. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, Москва, 2015. 1008 с.
17. Łyczko J., Piotrowski K., Kolasa K., Galek R., Szumny A. *Mentha piperita* L. micropropagation and the potential influence of plant growth regulators on volatile organic compound composition. *Molecules*, 2020, 25, 2652. <https://doi.org/10.3390/molecules25112652>
18. Khan S., Shende S., M., Bonde D.R. In vitro micropropagation of mint (*Mentha*). *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2021, 10(2), 1688–1692. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/2RD3K>
19. Bertoli A., Leosnardi M., Krzyzanowska J., Oleszek W., Pistelli L. In vitro production of *M × piperita* not containing pulegone and menthofuran. *Acta Biochim. Pol.*, 2012, 59, 417–423. https://doi.org/10.18388/abp.2012_2132
20. Бугаенко Л.А. Особенности размножения мяты. *Актуальная биотехнология*, 2015, 1, 18–24.
21. Бочкарёв Н.И., Зеленцов С.В., Шуваева Т.П., Бородкина А.П. Таксономия, морфология и селекция ментольных мят (обзор). *Масличные культуры*, 2015, 2(162), 106–124.
22. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, 15, 473–497.
23. 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, 4(2), 73–84.
24. Niemi M., Vestberg M. Inoculation of commercially grown strawberry with VA mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 1992, 144, 133–142.
25. Чекурова Г.В., Евтухова Л. А., Слюсаренко А.Г. Размножение клюквы в культуре *in vitro*. *Бюллетень Главного ботанического сада*, 1990, 157, 90–95.
26. Heck M.A., Lüth V.M., van Gessel N., Krebs M., Kohl M., Prager A., Joosten H., Decker E.L., Reski R. Axenic in vitro cultivation of 19 peat moss (*Sphagnum* L.) species as a resource for basic biology, biotechnology and paludiculture. *New Phytol.*, 2021, 229, 861–876. <https://doi.org/10.1111/nph.16922>
27. ОФС.1.5.3.0010. Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. МЗ Р.Ф. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т. 1 Москва, 2015. 1004 с.
28. Santoro M.V., Nieves F., Zygadlo J., Giordano W.F., Banchio E. Effects of growth regulators on biomass and the production of secondary metabolites in peppermint (*Mentha piperita*) micropropagated *in vitro*. *Am. J. Plant Sci.*, 2013, 4, 49–55. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.45A008>
29. Islam A.T.M.R., Islam Md.M., Alam M.F. Rapid *in vitro* clonal propagation of herbal spice. *Mentha piperita* L. Using shoot tip and nodal explants. *Res. Plant Sci.*, 2017, 5, 43–50. <https://doi.org/10.12691/plant-5-1-5>
30. Benahmed A., Harfi B., Belkhiri A. Biological activity of essential oils of *Mentha pulegium* from field-grown and acclimated *in vitro* plants. *Curr. Sci.*, 2019, 116(11), 1897–1904.
31. Akter K.T., Hoque M.A., Yeasmin T. Effect of IBA concentration on *in vitro* root regeneration of different Mint explants. *Ann. Bangladesh Agric.*, 2016, 20, 49–59.
32. Егорова Н.А., Загорская М.С., Абдурашитов С.Ф. Клональное микроразмножение эфиромасличных растений семейства Lamiaceae. *Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология*, 2022, 12(1), 64–75.
33. Baser K., Husnu C., Gerhard B. Handbook of essential oils. Science. technology. and applications. 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton. New York, 2016, 1128.
34. Шелепова О.В., Кондратьева В.В., Олехнович Л.С., Зайчик Б.Ц., Ружицкий А.О. Различия в составе эфирного масла и накоплении салициловой кислоты у *Mentha arvensis* var. *piperascens* (Lamiaceae) при интродукции в Подмоскowie. *Растительные ресурсы*, 2016, 3, 94–104.
35. Fejér J., Grušová D., De Feos V., Ůrgeová E., Obert B., Preťová A. *Mentha × piperita* L. nodal segments cultures and their essential oil production. *Ind. Crop. Prod.*, 2018, 112, 550–555. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.055>
36. Chaput M.-H., San H., De Hys L., Grenier E., David H., David A. How plant regeneration from *Mentha × piperita* L. and *Mentha × citrata* Ehrh. leaf protoplasts affects their monoterpene composition in field conditions. *J. Plant Physiol.*, 1996, 149, 481–488.
37. Shelepova O.V., Olekhnovich L.S., Konovalova L.N., Khusnetdinova T.I., Gulevich A.A., Baranova E.N. Assessment of essential oil yield in three mint species in the climatic conditions of Central Russia. *Agron. Res.*, 2021, 19(3), 1551–1562. <https://doi.org/10.15159/AR.21.113>

Comparison of the Chemical Composition of Essential Oils of Two Species of *Mentha* L. Propagated *in vitro* and *in vivo*

O. V. Shelepova^{a, b, #, ##}, L. N. Konovalova^{a, b}, E. N. Baranova^{a, b}, and T. A. Dilovarova^b

^a*N.V. Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences (MBG), Moscow, 127276 Russia*

^b*All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology (ASRIAB), Moscow, 127550 Russia*

[#]*e-mail: shov_gbsad@mail.ru*

^{##}*e-mail: greenpro2007@rambler.ru*

Abstract—The ability of two plant species of the *Mentha* genus (*M. spicata* and *M. × piperita*), obtained by clonal micropropagation to produce essential oils (EOs) has been analyzed. Using GC-MS, we studied the chemical composition of EOs isolated by hydrodistillation from dried leaves and flowering shoots of the plants of the first and second years of vegetation, propagated *in vitro*, and control plants propagated by cuttings. The yield, as well as the quantitative and qualitative composition of oils obtained from *in vitro* propagated *M. × piperita* plants and control plants were different. The main component of the EO fraction in the control plants was menthol. In adapted plants of the first year of vegetation, menthol prevailed in the oil profile, but along with menthone and isomenthone. In the second year of vegetation, the content of the main EO components in adapted *M. × piperita* plants was at the level of control plants. In adapted mint regenerants of the *M. spicata* species, the qualitative composition of EO in the first year of vegetation was identical with close to that of control plants, and carvone was the main component of EOs. Spearmint (*M. spicata*) and peppermint (*M. × piperita*) clonal micropropagation is a reliable rapid propagation method to produce plants with similar essential oil composition to control plants. At the same time, strict control over the EO composition of these plants at the initial stage of cultivation it is necessary.

Keywords: *Mentha × piperita* L., *Mentha spicata* L., *in vitro*, adaptation, essential oil