

УДК 581.14
DOI 10.26897/0021-342X-2017-5-17-28

ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ ВИТРИФИКАЦИИ
МНОГОКОЛОСНИКА ФЕНХЕЛЬНОГО
AGASTACHE FOENICULUM (PURSH) KUNTZE (LAMIACEAE)
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

О.Б. ПОЛИВАНОВА, М.Ю. ЧЕРЕДНИЧЕНКО

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

При культивировании растений *in vitro* зачастую возникает ряд морфологических нарушений, наиболее распространенным из которых является витрификация. Данное состояние характеризуется изменениями в строении органов растений, нарушениями метаболизма лигнина и хлорофилла и приводит к расстройству основных физиологических процессов, происходящих в листьях, – фотосинтеза и газообмена. Витрификация может ограничивать использование растений в культуре *in vitro*, снижать эффективность клонального микро-размножения.

Применение одного или нескольких методов для профилактики витрификации не всегда является эффективным, что связано с недостаточной изученностью механизма витрификации и видоспецифичностью реакции на применяемые методы. Поэтому изучение витрификации носит индивидуальный характер.

Растения рода *Agastache* являются перспективными для использования в пищевой и фармацевтической промышленности, поскольку обладают ярко выраженными антимикробными, противовирусными, антиоксидантными свойствами. Для *Agastache foeniculum in vitro* характерны такие признаки витрификации, как утолщение стебля, прозрачность и ломкость листьев, дефицит хлорофилла, нарушение нормального функционирования первичных меристем.

Для устранения витрификации или снижения ее уровня у *Agastache foeniculum in vitro* были использованы такие подходы, как изменение минерального состава питательной среды, увеличение концентрации агара, добавление в питательную среду силикагеля в качестве влагопоглотителя, применение системы аэрации сосуда для культивирования.

Было установлено, что наиболее эффективным способом устранения витрификации для *Agastache foeniculum in vitro* является аэрация сосуда для культивирования и увеличение концентрации агара в питательной среде.

Ключевые слова: *Agastache foeniculum*, культура *in vitro*, витрификация, аэрация, *Lamiaceae*.

Введение

Род *Agastache* J. Clayton ex Gronov. насчитывает около 22 видов многолетних травянистых ароматических растений, встречающихся почти исключительно на

территории Северной Америки [9]. Перспективными видами для крупномасштабного культивирования на территории Европы являются *A. rugosa* и *A. foeniculum*. Данные виды также являются объектом биотехнологических исследований, поскольку содержат широкий спектр вторичных метаболитов, прежде всего оксикоричных кислот, накопление которых в культуре *in vitro* проходит значительно эффективнее, чем *in vivo* [5, 16, 24]. Розмариновая кислота обладает ярко выраженной антиоксидантной активностью, способна стабилизировать мембраны, препятствует образованию β -амилоидных агрегатов и увеличивает когнитивную функцию, что является одной из основных стратегий в лечении болезни Альцгеймера [5]. Культивирование растений *in vitro* предполагает возможность контроля развития побегов путем варьирования факторов внешней среды [2]. Однако зачастую в условиях высокой влажности, избытка сахаров и минеральных компонентов проявляются различные анатомические, морфологические и физиологические нарушения, наиболее распространенным из которых является витрификация. Витрификация характеризуется такими симптомами, как гипоплигнизация, дефицит хлорофилла, нарушения ферментативной активности и синтеза белков [25]. Внешние проявления витрификации – стекловидные, ломкие побеги с прозрачными мелкими листьями и отсутствием верхушечного роста [10]. В настоящее время признаки витрификации в культуре *in vitro* описаны более чем у 200 видов растений. Нарушения в развитии побегов, связанные с витрификацией, снижают эффективность клонального микроразмножения и ограничивают использование растений в культуре *in vitro* в целом.

В ходе более чем 30-летнего изучения витрификации однозначный механизм этого явления так и не был до конца установлен. Вероятно, это связано с множеством факторов, вовлеченных в данный процесс. В работе [12] описан каскад биохимических событий, приводящих к витрификации. Витрификация расценивается как адаптивная реакция на совокупность таких стрессовых воздействий, как высокая влажность, избыток минерального питания, осмотический шок, травмы вследствие поражения эксплантов, накопление эргастических газов в ограниченном пространстве сосуда для культивирования [12]. Все описанные в литературе случаи витрификации были связаны с культивированием на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS), которая отличается высоким содержанием аммонийного азота. Таким образом, минеральный состав питательной среды, в частности, содержание в ней азота, рассматривается как один из основных факторов, приводящих к витрификации. Исследования показали, что витрификация, уровень нитратного азота и общее содержание азота линейно увеличиваются вместе с увеличением содержания аммонийного азота в питательной среде для культивирования *Amelanchier arborea* [4]. Отмечено, что уменьшение содержания NH_4NO_3 в среде MS в 2 и, соответственно, в 3 раза снижает уровень витрификации у *Satix babylonica* [3] и *Prunus avium* [20]. Использование питательной среды $\text{MS}-\frac{1}{2}\text{NO}_3$ для клонального микроразмножения каштанов позволяло получить побеги нормальной морфологии. Культивирование на питательных средах со сниженным содержанием азота, таких как среда Хеллера и Кнопа, также позволяло получить побеги без признаков витрификации [7]. Помимо азота, на степень витрификации оказывают влияние другие ионы: для некоторых культур эффективным являлось увеличение содержания кальция в питательной среде [14, 23]. Но существуют и противоположные данные, согласно которым повышенное содержание кальция может вызывать гипоплигнизацию и проявление признаков витрификации [13].

Во многих исследованиях отмечена связь между использованием фитогормонов и регуляторов роста и нарушением в развитии растений в культуре *in vitro*. Это может



Рис. 1. Витрифицированные растения *Agastache foeniculum in vitro*

быть связано с общим гормональным дисбалансом. Снижение уровня цитокининов в питательной среде для некоторых видов уменьшало витрификацию [18].

В работе [17] предположено, что уровень витрификации определяется концентрацией агара в питательной среде. Ее увеличение во многих случаях позволяло устранить симптомы витрификации. Есть мнение, что влияние концентрации агара на степень витрификации у растений зависит от вида растения и марки агара [23].

Еще одним немаловажным фактором является газовый состав питательной среды сосудов для культивирования. В пространстве невентилируемых сосудов происходит накопление таких веществ, как этилен, CO_2 , ацетальдегид и этанол. Из них наиболее существенное влияние на культуру клеток и тканей оказывают этилен и CO_2 , ингибирующие морфогенез побегов [21, 26]. Применение вентиляции сосудов для культивирования позволило снизить уровень витрификации у многих видов [11, 15, 22].

Введение экзогенных добавок и влагопоглотителей в состав питательной среды – распространенный прием в устранении витрификации. К снижению уровня витрификации приводит добавление салициловой кислоты, ионов серебра, кокосового молока, флороглюцинола, гидролизата казеина, ланолина, аскорбиновой кислоты [6].

При культивировании *A. foeniculum* на питательной среде MS *in vitro* были отмечены симптомы витрификации, среди которых встречались утолщения стебля, прозрачные, ломкие и скрученные листья, короткие междоузлия, чрезмерный базальный рост, образование множества узлов на стеблях и следы апикального некроза (рис. 1).

Микроскопическое исследование выявило изменения в строении замыкающих клеток устьиц – сами устьица имели округлую форму, их клетки изменились (рис. 2).

Целью данной работы было выявление факторов внешней среды, способствующих снижению уровня витрификации при культивировании *Agastache foeniculum in vitro*.

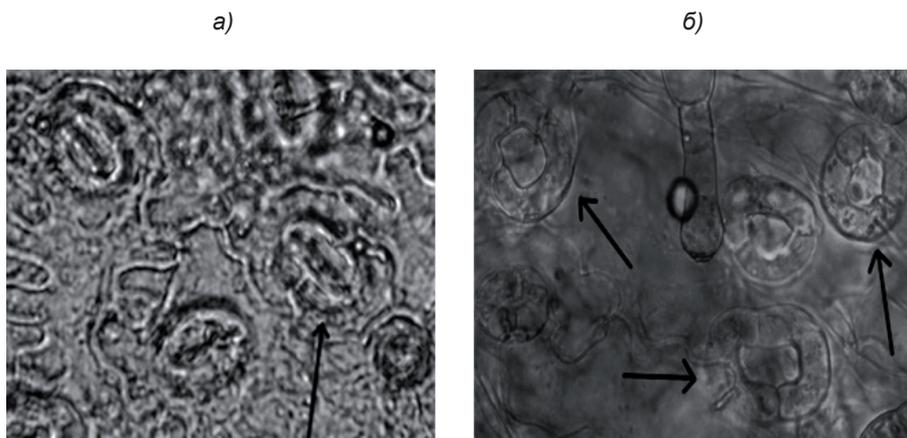


Рис. 2. Устьица нормального (а) и витрифицированного (б) растения *Agastache foeniculum*

Методика исследований

Экспланты от ранее полученных асептических микропобегов нормальной морфологии в возрасте 2 мес пересаживали на модифицированные среды MS с различным соотношением минеральных компонентов и добавлением силикагеля в качестве влагопоглотителя в концентрациях 0,05, 0,10 и 0,20%. Использовались среды MS со сниженным в 2 раза содержанием минеральных солей ($MS+\frac{1}{2}$ мин. с.), а также минеральных солей и сахара ($\frac{1}{2}MS$), сниженным в 3 раза содержанием нитратов ($MS+\frac{1}{3}NO^3$), с увеличенным содержанием кальция (550, 660, 770, 880 мг/л Ca^{2+}) и агара (0,85, 0,90 и 1,00%). В качестве эксплантов использовали нодальные сегменты длиной около 10 мм. Также часть эксплантов была пересажена на питательную среду MS в сосуды для культивирования с системой аэрации. Наиболее простой способ осуществления аэрации при культивировании растений *in vitro* – перфорация крышки сосуда для культивирования и покрытие культурального сосуда материалом, обеспечивающим лучшую вентиляцию [11, 15]. В качестве покрытия использовали фольгу с перфорацией, пленку с перфорацией и крафтовую бумагу. Наблюдение за побегами осуществляли в течение 1 мес. Оценивали такие показатели, как длина побега и количество побегов, приходящееся на 1 эксплант. Также измеряли содержание пигментов, относительную влажность растений [8] и содержание лигнина [1]. Для каждого из вариантов эксперимента был определен уровень витрификации как отношение количества витрифицированных побегов к общему числу побегов, выраженное в процентах [19].

Результаты и обсуждение

В опыте по относительному определению влажности между вариантами не было выявлено существенных различий (табл. 1), что соответствует ранее полученным данным на других объектах, согласно которым разница в относительной влажности между нормальными и витрифицированными растениями обычно не превышает 1–6% [8].

Влияние факторов культивирования на различные показатели *A. Foeniculum*

Варианты эксперимента	Длина побега, мм	Число побегов на 1 экплант, шт.	Относительная влажность, %	Уровень витрификации, %
MS	19,90±0,78	30,00±5,64	59,29±5,78	94,74
MS+½ мин. с.	25,80±1,23	8,70±1,44	62,08±6,90	57,18
MS+½NO ₃	17,76±1,25	31,13±6,33	72,37±3,64	95,00
½MS	27,93±1,76	16,18±0,76	45,78±1,67	60,52
MS+550 мг/л Ca ²⁺	15,58±0,91	15,33±0,57	60,00±3,05	69,11
MS+660 мг/л Ca ²⁺	14,99±0,45	17,00±0,89	73,00±1,82	75,67
MS+770 мг/л Ca ²⁺	16,30±0,85	15,05±1,02	57,82±0,61	79,45
MS+880 мг/л Ca ²⁺	15,92±0,34	16,06±1,46	74,46±9,52	64,24
MS+0,85% агара	31,8±2,98	6,33±1,26	74,73±6,47	54,87
MS+0,90% агара	33,09±2,78	5,73±1,59	70,85±6,46	33,33
MS+1,00% агара	36,69±2,25	3,32±0,69	62,02±6,21	10,00
MS+0,05% силикагеля	23,33±1,00	20,19±2,20	68,08±17,23	96,11
MS+0,10% силикагеля	20,49±1,00	27,56±1,36	71,62±8,90	95,23
MS+0,20% силикагеля	19,37±1,14	29,77±1,26	77,50±9,30	95,07
MS (покрытие – крафтовая бумага)	30,33±3,65	4,20±1,10	50,10±1,70	00,00
MS (покрытие – перфорированная фольга)	44,80±6,99	4,47±1,06	51,59±10,40	20,00
MS (покрытие – перфорированная пленка)	43,44±4,38	6,23±1,69	51,48±4,01	33,33

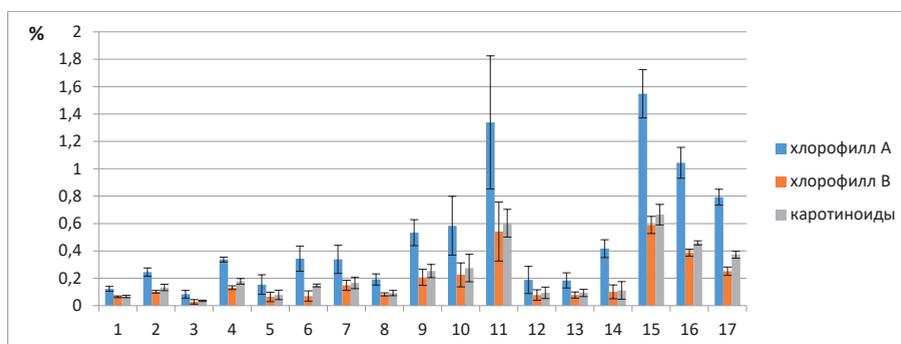


Рис. 3. Содержание пигментов у растений *Agastache foeniculum* при различных условиях культивирования *in vitro*: 1 – MS; 2 – MS+½ мин. с.; 3 – MS+½NO₃; 4 – ½MS; 5 – MS+550 мг/л Ca²⁺; 6 – MS+660 мг/л Ca²⁺; 7 – MS+770 мг/л Ca²⁺; 8 – MS+550 мг/л Ca²⁺; 9 – MS+0,85% агара; 10 – MS+0,90% агара; 11 – MS+0,10% агара; 12 – MS+0,05 % силикагеля; 13 – MS+0,10% силикагеля; 14 – MS+0,20% силикагеля; 15 – MS, покрытие – крафтовая бумага; 16 – MS, покрытие – перфорированная фольга; 17 – MS, покрытие – перфорированная пленка

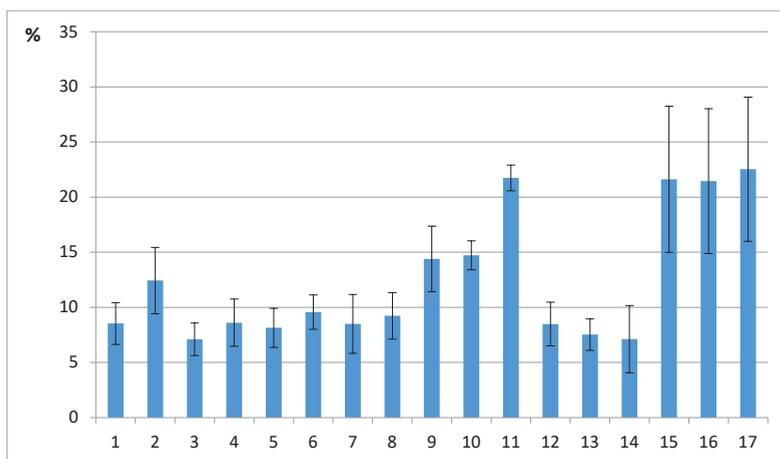


Рис. 4. Содержание лигнина у растений *Agastache foeniculum* при различных условиях культивирования *in vitro*: 1 – MS; 2 – MS+½ мин. с.; 3 – MS+¼NO₃; 4 – ½MS; 5 – MS+550 мг/л Ca²⁺; 6 – MS+660 мг/л Ca²⁺; 7 – MS+770 мг/л Ca²⁺; 8 – MS+550 мг/л Ca²⁺; 9 – MS+0,85 % агара; 10 – MS+0,90% агара; 11 – MS+0,10% агара; 12 – MS+0,05% силикагеля; 13 – MS+0,10% силикагеля; 14 – MS+0,20% силикагеля; 15 – MS, покрытие – крафтовая бумага; 16 – MS, покрытие – перфорированная фольга; 17 – MS, покрытие – перфорированная пленка



Рис. 5. Растения *Agastache foeniculum in vitro*, полученные при культивировании в условиях аэрации (покрытие сосуда для культивирования – крафтовая бумага) и на питательной среде с увеличенной концентрацией агара

Наиболее витрифицированные побеги имели меньшую длину и большее число побегов на эксплант по сравнению с растениями с низким уровнем витрификации (табл. 1).

Результаты количественного определения пигментов представлены на рис. 3. Как видно из диаграммы, содержание пигментов зависит от уровня витрификации. Наибольшее содержание пигментов характерно для вариантов питательных сред с увеличенной концентрацией агара и для вариантов с системой аэрации сосудов для культивирования, а наименьшее – для среды MS с обычной концентрацией агара (0,7%), а также в случае добавления силикагеля как влагопоглотителя. Аналогичная зависимость была получена при определении содержания лигнина (рис. 4).

Уменьшение общего содержания в питательной среде минеральных солей, а также минеральных солей и сахара позволяет снизить количество витрифицированных растений *Agastache foeniculum in vitro* (табл. 1). Снижение концентрации нитратного азота в питательной среде усиливало признаки витрификации. Не было выявлено зависимости уровня витрификации от концентрации ионов кальция в питательной среде.

Было установлено, что с увеличением концентрации агара в питательной среде проявления витрификации по всем показателям значительно снижаются (табл. 1, рис. 3, 4). Лучший результат был отмечен на питательной среде с концентрацией агара 1,00% (табл. 1, рис. 3–5).

Наличие в составе питательной среды силикагеля в качестве влагопоглотителя не способствовало снижению проявления симптомов витрификации. Для всех вариантов питательных сред с силикагелем отмечено большее количество побегов, приходящихся на один эксплант, при меньшей длине побега, чем в лучших вариантах (табл. 1).

Использование системы аэрации сосуда для культивирования приводило к снижению проявления симптомов витрификации. Применение крафтовой бумаги в качестве покрытия сосуда для культивирования способствовало полному исчезновению признаков витрификации и позволяло получить растения нормальной морфологии (табл. 1, рис. 3–5).

Выводы

1. У растений *Agastache foeniculum*, культивируемых на питательной среде MS, отмечается высокий уровень витрификации. Витрификация характеризуется уменьшением длины побега, увеличением числа побегов на эксплант, снижением содержания пигментов и лигнина.

2. Снижение содержания азота, а также добавление силикагеля в качестве влагопоглотителя в питательную среду MS усиливает проявление признаков витрификации. Увеличение содержания кальция в питательной среде не оказывает заметного влияния на уровень витрификации у *Agastache foeniculum*.

3. Наиболее эффективным способом устранения витрификации в культуре *in vitro* *Agastache foeniculum* является использование системы аэрации, а также увеличение концентрации агара в питательной среде.

Библиографический список

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. 2-е изд., перераб. и доп. Л.: Колос, 1972. 455 с.

2. Чердиченко М.Ю., Поливанова О.Б. Перспективы биотехнологических методов размножения представителей рода *Agastache* Clayton ex Gronov. для получения вторичных метаболитов // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2015. № 4 (55). С. 282.

3. Beauchesne G. Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique // C. R. Acad. Agric. Paris. 1981. Vol. 67. P. 1389–1397.

4. Brand M.H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1993. Vol. 35 (3). P. 203–209.

5. Bulgacov V.P., Inyushkina Y.V., Fedoreyev S.A. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications // Critical Reviews in Biotechnology. 2012. Vol. 32 (3). P. 203–217.

6. Chandrika R., Shivakameshwari M.N., Thara Saraswathi K.J. Reduction of vitrification in *in vitro* shoot cultures of *Eryngium foetidum* L. – a potential aromatic and medicinal herb // Indian Journal of Plant Sciences. 2015. Vol. 4 (2). P. 52–58.

7. Daguin F., Letouzé R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues // Physiologia Plantarum. 1986. Vol. 66 (1). P. 94–98.

8. Diaz-Pérez J.C., Shackel K.A., Sutter E.G. Relative water content and water potential of tissue cultured apple shoots under water deficits // Journal of Experimental Botany. 1995. Vol. 46 (1). P. 111–118.

9. Fuentes-Granados R., Widrlechner M.P., Wilson L.A. An overview of *Agastache* research // Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 1998. Vol. 6 (1). P. 69–97.

10. Gaspar T., Kevers C., Franck T. et al. Paradoxical results in the analysis of hyperhydric tissues considered as being under stress: questions for a debate // Bulgarian Journal of Plant Physiology. 1995. Vol. 21 (2–3). P. 80–97.

11. Jo M.H., Ham I.K., Lee A.M. et al. Effect of sealing materials and photosynthetic photon flux of culture vessel on growth and vitrification in carnation plantlets *in vitro* // Journal of Korean Society of Horticultural Science. 2002. Vol. 43 (2). P. 133–136.

12. Kevers C., Coumans M., Coumans-Gillès M.F., Caspar Th. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro* // Physiologia Plantarum. 1984. Vol. 61 (1). P. 69–74.

13. Kevers C., Gaspar T. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro* // Journal of Plant Physiology. 1985. Vol. 118 (1). P. 41–48.

14. Kreutmeier C., Gebhardt K., Paul L., Feucht W. The effect of MgSO₄ and CaCl₂ on regeneration of shoot tip cultures of *Prunus cerasus* *in vitro* // Gartenbauwissenschaft. 1984. Vol. 49. P. 204–212.

15. Lai C.-C., Lin H.-M., Nalawade S.M. et al. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels // Journal of Plant Physiology. 2005. Vol. 162 (3). P. 355–361.

16. Lee S.Y., Xu H., Kim Y.K., Park S.U. Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008. Vol. 24. P. 969–972.

17. Leshem B. Growth of carnation meristems *in vitro*: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation // Annals of Botany. 1983. Vol. 52 (3). P. 413–415.

18. Leshem B., Werker E., Shalev D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation // *Annals of Botany*. 1988. Vol. 62 (3). P. 271–276.
19. Liu M., Jiang F., Kong X. et al. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. // *Scientia Horticulturae*. 2017. Vol. 217. P. 285–296.
20. Riffaud J.L., Cornu D., Capelli P. Utilisation de la culture *in vitro* pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt // *Agronomie*. 1981. Vol. 1 (8). P. 633–640.
21. Righetti B., Magnanini E., Infante R., Predieri S. Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures // *Physiology Plantarum*. 1990. Vol. 78 (4). P. 507–510.
22. Sharma U., Mohan J.S.S. Reduction of vitrification *in vitro* raised shoots of *Chlorophytum borivillianum* Sant. & Fernand., a rare potent medical herb // *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006. Vol. 44. P. 499–506.
23. Singha S., Townsend E.C., Oberly G.E. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1990. Vol. 23 (2). P. 135–142.
24. Xu H., Kim Y.K., Jin X. et al. Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze // *Journal of Medicinal Plants Research*. 2008. Vol. 2 (9). P. 237–241.
25. Ziv M. Quality of micropropagated plants – vitrification // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 1991. Vol. 27 (2). P. 64–69.
26. Zobayed S.M.A., Armstrong J., Armstrong W. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation // *Plant Science*. 2001. Vol. 161 (3). P. 537–548.

WAYS OF VITRIFICATION OVERCOMING OF *AGASTACHE FOENICULUM* (PURSH) KUNTZE (LAMIACEAE) IN *IN VITRO* CULTURE

O.B. POLIVANOVA, M.Yu. CHEREDNICHENKO

(Russian Timiryazev State Agrarian University)

Different morphological disturbances often occur when plants are in vitro cultivated. The most common of them is vitrification. This condition is characterized by changes in the plant organs structure, disturbances in the lignin and chlorophyll metabolism, and leads to disorders of basic physiological processes in leaves – photosynthesis and gas exchange. Vitrification can limit the use of in vitro plants and reduce the effectiveness of clonal micropropagation.

During the study of vitrification, techniques have been developed that could reduce or eliminate the symptoms of vitrification. However, the use of one or more methods for vitrification prevention is not always effective, due to the lack of understanding of the vitrification mechanism and species-dependent reactions to the methods applied. Thus the study of vitrification is individual and specific.

Agastache plants are promising for use in food and pharmaceutical industries, because they have pronounced antimicrobial, antiviral, antioxidant properties. The vitrification symptoms *in vitro* for *Agastache foeniculum* such as stem thickening, leaf transparency and fragility, chlorophyll deficiency, and the disruption of normal functioning of primary meristems are characterized.

Changes in medium's mineral composition, an increase in agar concentration, silicagel addition as dehumidifier and cultural vessel aeration system have been used to eliminate or reduce *Agastache foeniculum* vitrification level *in vitro*.

It has been found that the most effective way to eliminate vitrification for *Agastache foeniculum* in *in vitro* culture is to aerate the culture vessel and increase agar concentration in the nutrient medium.

Key words: *Agastache foeniculum*, *in vitro* culture, vitrification, aeration, Lamiaceae.

References

1. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P. Metody biokhimicheskogo issledovaniya rasteniy [Methods of biochemical research of plants]. 2nd ed., rev. and ext. L.: Kolos, 1972. 455 p.
2. Cherednichenko, M.Yu, Polivanova O.B. Perspektivy biotekhnologicheskikh metodov razmnozheniya predstaviteley roda *Agastache* Clayton ex Gronov. dlya polucheniya vtorichnykh metabolitov [Prospects of biotechnological methods of reproducing representatives of the genus *Agastache* Clayton ex Gronov. for obtaining secondary metabolites] // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2015. No. 4 (55). P. 282.
3. *Beauchesne G.* Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique // C. R. Acad. Agric. Paris. 1981. Vol. 67. P. 1389–1397.
4. Brand M.H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1993. Vol. 35 (3). P. 203–209.
5. Bulgacov V.P., Inyushkina Y.V., Fedoreyev S.A. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications // Critical Reviews in Biotechnology. 2012. Vol. 32 (3). P. 203–217.
6. Chandrika R., Shivakameshwari M.N., Thara Saraswathi K.J. Reduction of vitrification in *in vitro* shoot cultures of *Eryngium foetidum* L. – a potential aromatic and medicinal herb // Indian Journal of Plant Sciences. 2015. Vol. 4 (2). P. 52–58.
7. Daguin F., Letouzé R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues // Physiologia Plantarum. 1986. Vol. 66 (1). P. 94–98.
8. Diaz-Pérez J.C., Shackel K.A., Sutter E.G. Relative water content and water potential of tissue cultured apple shoots under water deficits // Journal of Experimental Botany. 1995. Vol. 46(1). P. 111–118.
9. Fuentes-Granados R., Widrlechner M.P., Wilson L.A. An overview of *Agastache* research // Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 1998. Vol. 6 (1). P. 69–97.
10. Gaspar T., Kevers C., Franck T. et al. Paradoxical results in the analysis of hyperhydric tissues considered as being under stress: questions for a debate // Bulgarian Journal of Plant Physiology. 1995. Vol. 21 (2–3). P. 80–97.
11. Jo M.H., Ham I.K., Lee A.M. et al. Effect of sealing materials and photo-synthetic photon flux of culture vessel on growth and vitrification in carnation plant-

lets *in vitro* // Journal of Korean Society of Horticultural Science. 2002. Vol. 43 (2). P. 133–136.

12. Kevers C., Coumans M., Coumans-Gillès M.F., Caspar Th. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro* // Physiologia Plantarum. 1984. Vol. 61 (1). P. 69–74.

13. Kevers C., Gaspar T. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro* // Journal of Plant Physiology. 1985. Vol. 118 (1). P. 41–48.

14. Kreutmeier C., Gebhardt K., Paul L., Feucht W. The effect of MgSO₄ and CaCl₂ on regeneration of shoot tip cultures of *Prunus cerasus in vitro* // Gartenbauwissenschaft. 1984. Vol. 49. P. 204–212.

15. Lai C.-C., Lin H.-M., Nalawade S.M. et al. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels // Journal of Plant Physiology. 2005. Vol. 162 (3). P. 355–361.

16. Lee S.Y., Xu H., Kim Y.K., Park S.U. Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008. Vol. 24. P. 969–972.

17. Leshem B. Growth of carnation meristems *in vitro*: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation // Annals of Botany. 1983. Vol. 52 (3). P. 413–415.

18. Leshem B., Werker E., Shalev D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation // Annals of Botany. 1988. Vol. 62 (3). P. 271–276.

19. Liu M., Jiang F., Kong X. et al. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. // Scientia Horticulturae. 2017. Vol. 217. P. 285–296.

20. Riffaud J.L., Cornu D., Capelli P. Utilisation de la culture *in vitro* pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt // Agronomie. 1981. Vol. 1 (8). P. 633–640.

21. Righetti B., Magnanini E., Infante R., Predieri S. Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures // Physiology Plantarum. 1990. Vol. 78 (4). P. 507–510.

22. Sharma U., Mohan J.S.S. Reduction of vitrification *in vitro* raised shoots of *Chlorophytum borivilianum* Sant. & Fernand., a rare potent medical herb // Indian Journal of Experimental Biology. 2006. Vol. 44. P. 499–506.

23. Singha S., Townsend E.C., Oberly G.E. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1990. Vol. 23 (2). P. 135–142.

24. Xu H., Kim Y.K., Jin X. et al. Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze // Journal of Medicinal Plants Research. 2008. Vol. 2 (9). P. 237–241.

25. Ziv M. Quality of micropropagated plants – vitrification // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 1991. Vol. 27 (2). P. 64–69.

26. Zobayed S.M.A., Armstrong J., Armstrong W. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation // Plant Science. 2001. Vol. 161 (3). P. 537–548.

Поливанова Оксана Борисовна – асп. РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: polivanovaoks@gmail.com).

Чередниченко Михаил Юрьевич – к. б. н., доц. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства, РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: michael.tsch@gmail.com).

Oksana B. Polivanova – Postgraduate Student, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; e-mail: polivanovaoks@gmail.com).

Mikhail Yu. Cherednichenko – PhD (Ag), Associate Professor of Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding and Seed Science Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; e-mail: michael.tsch@gmail.com).