НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО	**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**
Декан факультету захисту рослин, біотехнологій та екології	**Завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття**
_____Юлія КОЛОМІЄЦЬ	**_____Олена КВАСКО**
“____” _____ 20__ р.	**“____” _____ 20__ р.**

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему “Особливості непрямого морфогенезу *Salvia officinalis L* . в умовах *in vitro* ”

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма “Екологічна біотехнологія та біоенергетика”

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

д.с.-г.н., професор _____ **Микола ЛІСОВИЙ**
(підпис)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

д.с.-г.н., професор _____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**
(підпис)

Виконав _____ **Надія МАЙДАНОВИЧ**
(підпис)

КИЇВ – 2025

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
екобіотехнології
та біорізноманіття
к.б.н., доцент_____ Олена КВАСКО
«____» _____ 2025р.

З А В Д А Н Н Я
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ ЗДОБУВАЧУ

Майданович Надії Романівні

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма "Екологічна біотехнологія та біоенергетика"

Орієнтація освітньої програми Освітньо професійна_____

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи: «Особливості непрямого морфогенезу *Salvia officinalis L* . в умовах *in vitro*»

затверджена наказом від "07" листопада 2024 р. № 2005 "С".

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 листопада 2025 року.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: список літературних джерел по темі кваліфікаційної роботи; перелік методик для введення в культуру *in vitro Salvia officinalis*; перелік поживних середовищ для культивування *Salvia officinalis*.

Перелік питань, які потрібно розробити:

−провести огляд літературних джерел щодо біологічних і морфологічних особливостей шавлії лікарської;

−проаналізувати сучасний стан досліджень морфогенезу рослин роду *Salvia* в умовах *in vitro;*

−дослідити вплив біотичних та абіотичних факторів на процеси прямого і непрямого морфогенезу;

−визначити об'єкти та методи дослідження, оптимальні для культивування тканин шавлії лікарської в умовах *in vitro;*

−розробити та описати схему проведення експериментальних досліджень;

−дослідити умови одержання первинного калюсу шавлії лікарської та оцінити вплив різних регуляторів росту і складу живильних середовищ на інтенсивність калюсоутворення;

−сформулювати рекомендації щодо оптимізації умов непрямого морфогенезу шавлії лікарської в культурі тканин.

Дата видачі завдання 11 листопада 2024 року

Керівник магістерської
кваліфікаційної роботи _____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**
(підпис)

Завдання прийняв до виконання _____ **Надія МАЙДАНОВИЧ**
(підпис)

РЕФЕРАТ

Магістерська кваліфікаційна робота на тему «Особливості непрямого морфогенезу шавлії лікарської в умовах *in vitro*» виконана на 61 сторінці друкованого тексту. Включає в себе себе 20 рисунків, 4 таблиці та список використаної літератури.

Дослідження проводились в навчально-науковій лабораторії «Біотехнології та клітинної інженерії» НУБіП України.

Мета роботи: дослідження процесів непрямого морфогенезу *Salvia officinalis* L. (шавлії лікарської) в умовах *in vitro* та визначення факторів, що впливають на формування калюсної тканини і регенерацію рослин.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані такі **завдання:**

– провести огляд літературних джерел щодо біологічних і морфологічних особливостей шавлії лікарської;

– проаналізувати сучасний стан досліджень морфогенезу рослин роду *Salvia* в умовах *in vitro;*

– дослідити вплив біотичних та абіотичних факторів на процеси прямого і непрямого морфогенезу;

– визначити об’єкти та методи дослідження, оптимальні для культивування тканин шавлії лікарської в умовах *in vitro;*

– розробити та описати схему проведення експериментальних досліджень;

– дослідити умови одержання первинного калюсу шавлії лікарської та оцінити вплив різних регуляторів росту і складу живильних середовищ на інтенсивність калюсоутворення;

– сформулювати рекомендації щодо оптимізації умов непрямого морфогенезу шавлії лікарської в культурі тканин.

Об’єкт дослідження: *Salvia officinalis* L. (шавлія лікарська).

Предмет дослідження: особливості непрямого морфогенезу шавлії лікарської в умовах *in vitro*.

ЗМІСТ

ВСТУП 6

РОЗДІЛ 1.ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 8

1.1. Біологічна характеристика шавлії лікарської 8

1.2. Морфогенез рослин роду *Salvia* в умовах *in vitro* 15

1.3. Особливості непрямого морфогенезу та фактори, що на нього впливають 20

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 28

2.1. Об’єкти і методи дослідження 28

2.2. Загальна схема проведення досліджень 29

2.3. Приготування живильних середовищ 31

2.4. Стерилізація насіння 34

2.5. Одержання первинного калюсу 36

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ 40

ВИСНОВКИ 57

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 59

ДОДАТКИ 63

ВСТУП

Шавлія лікарська (*Salvia officinalis* L.) – багаторічна рослина з родини глухокропивових, відома як ефіроолійна, лікарська та декоративна культура. Її традиційно вирощують у країнах Середземномор'я, а нині – у багатьох регіонах світу завдяки широкій адаптивності. Листки та верхівки пагонів містять ефірну олію, у складі якої поєднуються туйон, камфора, цинеол та інші терпенові сполуки, а також фенольні компоненти (розмаринова кислота, флавоноїди, дубильні речовини) [1].

Завдяки такому хімічному профілю шавлія має багатостороннє використання: у фармакопеї як протизапальний та антисептичний засіб, у харчовій промисловості як пряність, у парфумерії та косметології як джерело ароматичних речовин [2]. Поєднання лікарської й господарської цінності робить цей вид привабливим об'єктом для сучасних біотехнологічних підходів, зокрема для клонального розмноження в умовах *in vitro*.

У культурі тканин можливі два основні шляхи морфогенезу [3]. Прямий органогенез передбачає відновлення пагонів із наявних меристем і забезпечує високу стабільність морфологічних та хімічних ознак клонів [4]. Проте він не завжди ефективний у випадках, коли експланти виявляють низьку регенераційну здатність. Непрямий морфогенез, навпаки, проходить через стадію калюсної тканини, з якої формуються пагони або соматичні ембріоїди [3].

Непрямий морфогенез дозволяє отримати значно більшу кількість регенерантів та створює умови для пошуку нових варіантів, але водночас супроводжується низкою проблем: ризиком сомаклональної мінливості, потемнінням середовища внаслідок окиснення фенолів, гіпергідричністю та зниженням життєздатності рослин на етапі акліматизації [5].

Актуальність вивчення непрямого морфогенезу шавлії лікарської визначається його суперечливим характером [6]. З одного боку, цей шлях проблемний через ризик втрати стабільності хемопрофілю та складність контролю процесів. З іншого – саме він відкриває можливості для масштабного

розмноження рослин у випадках, коли прямий органогенез малоефективний, а також для добору нових форм із перспективним біохімічним профілем. Розуміння особливостей цього процесу необхідне для ефективного використання шавлії як лікарської та ароматичної культури.

Метою роботи є дослідження процесів непрямого морфогенезу *Salvia officinalis* L. (шавлії лікарської) в умовах *in vitro* та визначення факторів, що впливають на формування калюсної тканини і регенерацію рослин.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані такі **завдання:**

– провести огляд літературних джерел щодо біологічних і морфологічних особливостей шавлії лікарської;

– проаналізувати сучасний стан досліджень морфогенезу рослин роду *Salvia* в умовах *in vitro;*

– дослідити вплив біотичних та абіотичних факторів на процеси прямого і непрямого морфогенезу;

– визначити об’єкти та методи дослідження, оптимальні для культивування тканин шавлії лікарської в умовах *in vitro;*

– розробити та описати схему проведення експериментальних досліджень;

– дослідити умови одержання первинного калюсу шавлії лікарської та оцінити вплив різних регуляторів росту і складу живильних середовищ на інтенсивність калюсоутворення;

– сформулювати рекомендації щодо оптимізації умов непрямого морфогенезу шавлії лікарської в культурі тканин.

Предмет дослідження: особливості непрямого морфогенезу шавлії лікарської в умовах *in vitro*.

Об’єкт дослідження: *Salvia officinalis* L. (шавлія лікарська).

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічна характеристика шавлії лікарської

Шавлія лікарська (*Salvia officinalis* L.) належить до царства Рослини (Plantae), відділу Покритонасінні (Magnoliophyta), класу Евдикоти (Magnoliopsida), порядку Губоцвіті (Lamiales), родини Глухокропивові (Lamiaceae), роду Шавлія (*Salvia*) [2].

Шавлія лікарська (*Salvia officinalis* L.) – багаторічна – напівкущова рослина, яка здавна використовується людиною завдяки поєднанню декоративних, ароматичних властивостей, та значного фармакологічного потенціалу. Природний ареал виду охоплює узбережжя та схили Середземномор'я з переважанням вапнякових ґрунтів, високою інсоляцією та низьким рівнем вологості. Завдяки екологічній пластичності та здатності адаптуватися до помірного клімату шавлія була інтродуковаана за межі свого природного поширення і нині культивується у багатьох країнах Європи, на Кавказі, у Малій Азії та Північній Америці. Для господарського використання важливими є її стійкість до посух та стабільність ароматичного профілю в різних ґрунтово-кліматичних умовах, хоча кількісне співвідношення летких компонентів істотно варіює залежно від погодних чинників, фенологічної стадії розвитку та застосованої агротехніки [7, 8].

Життєва форма шавлії – напівкущ із густим розташуванням листків, із дерев'янистою основою пагонів і трав'янистими щорічними приростами. Кущ зазвичай заввишки 40–80 см, проте в старих насадженнях або в особливо сприятливих умовах може сягати більшої висоти. Листки супротивні, овальні чи ланцетні, з виразним сірувато-зеленим відтінком (рис. 1.1). На поверхні листкових пластинок і молодих пагонів розташовані залозисті трихоми, у яких накопичується ефірна олія – основний об'єкт використання у фармакопейній та харчовій промисловості [1, 9].

Рис. 1.1 – Зовнішній вигляд Шавлії лікарської [10]

Листкова пластинка зморшкувата, з чітко вираженим сітчастим жилкуванням. Стебла чотиригранні, що є типовою ознакою родини, часто галузяться, біля основи дерев'яніють і зберігаються кілька років – це зумовлює необхідність періодичного обрізування старих пагонів для підтримання життєздатності кущів (рис. 1.2).

Квітки шавлії лікарської зібрані у переривчасті колосоподібні суцвіття, що складаються з кільчастих напівзавитків у верхній частині пагонів. Віночок двогубий, найчастіше фіолетово-синього забарвлення; у культурних форм може бути ліловим або білим. Верхня губа добре розвинена, нижня має три частки й виконує функцію опори для комах-запилювачів. Характерною ознакою роду *Salvia* є наявність спеціалізованого механізму запилення: тичинки укорочені й

видозмінені таким чином, що дотик комахи до нижньої частини нитки спричиняє опускання пиляків і відкладання пилку на спинній поверхні запилювача [2].

Рис. 1.2 – Шавлія лікарська (*Salvia officinalis* L.)

Плід – складний, розпадається на чотири дрібні горішки; насіння дрібне, з твердою оболонкою (рис. 1.3).

Шавлія розмножується як генеративним, так і вегетативним шляхом. Розмноження за допомогою насіння застосовують переважно для створення нових популяцій або у селекційній роботі, проте воно супроводжується генетичною мінливістю, яке впливає на вміст та склад ефірної олії. Для

промислового вирощування, де необхідна стабільність хімічного профілю та фармакопейних показників, основним методом є вегетативне розмноження – живцювання [2, 11, 12].

Рис. 1.3 – Насіння Шавлії лікарської [13]

Живці добре укорінюються за умов оптимальної температури, помірної вологості повітря та субстрату з достатньою аерацією; застосування стимуляторів коренеутворення може прискорювати цей процес, хоча правильний підбір мікроклімату часто забезпечує не менший ефект. У промислових насадженнях використовують також обрізування старих пагонів для підтримання компактності кущів та стимулювання утворення молодих вегетативних приростів.

Фітохімічний профіль шавлії обумовлюється насамперед наявністю ефірної олії та фенольних сполук. Ефірна олія утворюється в залозистих трихомах і відносно легко виділяється шляхом парової дистиляції або екстракції органічними розчинниками [9]. Її основними леткими компонентами, у різних кількісних співвідношеннях, є α- і β-туйон, камфора, 1,8-цинеол (евкаліптол),

борнеол, камфен, β-пінен та інші моно- і сесквітерпени [7, 10, 14]. Вміст і пропорції цих речовин змінюються залежно від генотипу та умов вирощування, формуючи різні хемотипи; тому для фармакопейної сировини має значення не лише загальний вихід олії, а й контроль її якісного складу. Туйон, як біологічно активна сполука з нейротропною дією, надає характерного гіркувато-камфорного відтінку аромату й водночас обмежує використання шавлії у харчових продуктах відповідно до нормативних вимог [2, 15].

До фенольних сполук шавлії належать розмаринова кислота, карнозол, карнозова кислота, численні флавоноїди (лютеолін, апігенін, похідні кверцетину), а також дубильні речовини. Особливе значення має розмаринова кислота, яка проявляє виражену антиоксидантну активність і пов’язана з протизапальними та антимікробними властивостями водних і спиртових екстрактів [7, 16]. У традиційній практиці листки та верхівки пагонів застосовували як пряно-ароматичну і лікувальну сировину при запальних процесах у ротовій порожнині та горлі, для полоскань, а також як засіб, що стимулює травлення.

Шавлія лікарська належить до світлолюбних і теплолюбних видів із помірною потребою у волозі та вимогами до добре дренованих ґрунтів. Оптимальними є легкі та середньосуглинкові субстрати, бажано карбонатні або нейтральні, з достатнім вмістом кальцію [17]. Надмірне зволоження й важкі, ущільнені ґрунти спричиняють розвиток кореневих гнилей і зниження виходу ефірної олії. У помірному кліматі рослини здатні витримувати зиму за наявності снігового покриву або при застосуванні мульчування; натомість сильні морози без снігу пошкоджують верхівкові бруньки та багаторічну основу пагонів.

У технології вирощування важливе значення має система внесення добрив, зокрема азоту [17]. Надлишок азотних добрив стимулює надмірний вегетативний ріст і знижує концентрацію ароматичних метаболітів, тоді як калій та мікроелементи сприяють підвищенню вмісту ефірної олії та стійкості до посухи.

Серед найпоширеніших хвороб відзначають борошнисту росу, сіру гниль, кореневі гнилі та плямистості листя [2]. Основними шкідниками є попелиці,

трипси та листогризучі гусениці. Ефективна профілактика включає забезпечення належної провітрюваності насаджень, уникання загущення, раціональний полив без перезволоження, а також чергування ділянок у сівозміні. За сучасних умов, коли застосування хімічних засобів захисту обмежується, зростає значення біологічних методів контролю та використання стійких ліній або відносно стійких хемотипів.

З огляду на високу господарську цінність культури та варіабельність її хімічного складу, селекційна робота спрямована на формування генотипів із підвищеним і стабільним вмістом ефірної олії, оптимальним співвідношенням ключових компонентів, високою врожайністю та зимостійкістю в умовах культивування [2, 8]. Традиційні методи ґрунтуються на відборі клонів із природних популяцій з подальшим вегетативним розмноженням.

У декоративному напрямі відбирають форми з варієгатним листям, сріблястим відтінком та компактною будовою куща. Для фармакопейної сировини першочергового значення набуває контроль якості, який включає підтвердження ботанічної ідентичності виду, визначення чистоти та вмісту летких сполук, а також перевірку на відсутність сторонніх домішок і мікробіологічного забруднення.

Рослина добре піддається технологіям ex-situ збереження та інтенсивного розмноження [18, 19]. У випадках, коли необхідне швидке одержання значної кількості генетично однорідного матеріалу, збереження цінних клонів або елімінація латентних інфекцій, рослину переводять у культуру *in vitro*. Тотіпотентність клітин забезпечує можливість регенерації з апікальних і пазушних меристем, бруньок або навіть фрагментів листкової тканини. Для фармакогностичних завдань перевагу зазвичай віддають шляхам, що знижують ризик сомаклональних варіацій і, відповідно, втрати стабільного хемічного профілю. Практичний досвід свідчить, що регенерація з меристем і бруньок забезпечує краще збереження вихідних властивостей, тоді як калюсні стадії характеризуються ширшим діапазоном відхилень. У промисловій практиці культура *in vitro* здебільшого використовується як допоміжний інструмент,

проте у випадках, коли потрібна особлива сортова чистота або складно забезпечити належний рівень фітосанітарного контролю, вона є незамінною.

Збір і первинна обробка сировини впливають на якість не менше, ніж генотип і агротехніка. Сушіння проводять швидко, за помірної температури і з доброю вентиляцією, щоб зберегти леткі фракції й запобігти потемнінню листя через окиснення фенолів [9, 11]. Дроблення до зберігання небажане, бо воно руйнує залозисті трихоми і сприяє втраті ефірної олії; подрібнення здійснюють безпосередньо перед екстракцією чи фасуванням. Зберігають суху сировину в герметичних ємностях, захищених від світла й тепла.

З практичного погляду шавлія – культура багатофункціональна [9, 11, 14]. У харчовій промисловості вона належить до традиційних середземноморських прянощів, особливо придатних для страв із високим вмістом жиру завдяки терпко-гіркуватому смолисто-камфорному відтінку, що забезпечує смаковий баланс. В ароматерапевтичних і косметичних засобах використовують ефірну олію та екстракти, які формують характерні свіжі, трав’яні ноти. У фармакопейній практиці листки та верхівки пагонів застосовують у складі настоїв при запальних процесах слизової оболонки ротової порожнини та глотки, для полоскань, а також як допоміжний засіб при підвищеному потовиділенні. Наукові публікації останніх десятиліть описують антиоксидантні, протимікробні, спазмолітичні та жовчогінні властивості екстрактів шавлії лікарської.

Шавлія має також важливе екологічне та ландшафтне значення [2]. Шавлія – це посухостійкий вид, що належить до цінних нектаро- та пилконосів і сприяє підтриманню біорізноманіття шляхом залучення запилювачів у сади та агроландшафти. Компактні кущі з характерним сріблясто-зеленим забарвленням листя утворюють виразні декоративні бордюри й гармонійно поєднуються з іншими ксерофітами. Завдяки різноманіттю сортів можливо підтримувати декоративний ефект від ранньої весни до пізньої осені, особливо за умови регулярного видалення відцвілих суцвіть та обрізування пагонів.

Підсумовуючи, шавлія лікарська (*Salvia officinalis*) є багаторічною культурою з високою господарською й науковою цінністю [9, 11, 15, 19]. Поєднання декоративних властивостей, стабільного вмісту ефірної олії та здатності адаптуватися до різних кліматичних умов робить її важливим об'єктом харчової, фармацевтичної й косметичної промисловості. Завдяки екологічній пластичності, різноманітності хемотипів і перспективам клонального розмноження шавлія посідає помітне місце як у практиці вирощування, так і в дослідженнях вторинного метаболізму та селекції.

1.2. Морфогенез рослин роду *Salvia* в умовах *in vitro*

Морфогенез представників роду *Salvia* в умовах *in vitro* ґрунтується на керованому відновленні пагонів і коренів із соматичних тканин під впливом поживного середовища та регуляторів росту. Реалізуються два шляхи:

– прямий, коли активуються вже наявні меристеми або індукуються адвентивні бруньки без утворення калюсу;

– непрямий, коли перед органоутворенням відбувається недовга фаза дедиференціації з формуванням калюсної тканини.

У виробничому розмноженні перевагу надають прямому шляху, оскільки він забезпечує збереження хемотипу та морфологічну сталість клонів [4, 20]. Непрямий підхід використовують як допоміжний інструмент – для подолання рефрактерності окремих експлантів або для масштабування у випадках, коли прямий метод дає низький вихід рослин.

Надійними джерелами регенерації для прямого шляху є верхівкові та пазушні бруньки, а також відрізки стебла з одним вузлом і активною брунькою [4, 12]. Рідше застосовують фрагменти листкових пластинок, якщо під епідермісом зберігаються клітини з меристематичним потенціалом. Для вирівнювання результатів донорні рослини попередньо омолоджують обрізуванням і стимулюванням нових приростів за 3–5 тижнів до відбору експлантів. Це знижує фенольний стрес, полегшує асептизацію та вирівнює

відповідь у культурі, що особливо важливо для шавлій із залозистими трихомами, багатими на ефірну олію та фенольні сполуки.

Поверхневу стерилізацію проводять обережно: коротке занурення у спирт, далі обробка гіпохлоритом натрію з додаванням поверхнево-активної речовини та ретельне промивання стерильною водою. Важливо зменшувати площу свіжих зрізів і швидко переносити матеріал на живильне середовище [19]. Короткочасне занурення зрізів у слабкий розчин аскорбінової чи лимонної кислоти зменшує потемніння, але не може компенсувати необхідність коректної техніки роботи з експлантами. На початковому етапі доцільно працювати з невеликими фрагментами тканини, щоб знизити площу рани та обмежити вивільнення поліфенолів у середовище.

Поживну основу для *Salvia* зазвичай формують на солях Мурасіге-Скуга із сахарозою та агаром чи гелановою камеддю [21]. У фазі індукції пагонів добре працює стандартна концентрація макро- і мікроелементів; під час укорінення доречно знижувати саме макроелементи приблизно удвічі, щоб полегшити формування коренів і зменшити осмотичне навантаження [19]. Регуляція розвитку при прямому шляху спирається на помірні концентрації цитокінінів для розкриття пазушних бруньок і на м’які ауксини для коренеутворення. 6-бензиламінопурин і кінетин у невисоких дозах забезпечують розгалуження без дрібнолистості й укорочених міжвузлів; тідіазурон можна використовувати лише як короткий поштовх і одразу прибирати після появи активних бруньок, інакше зростає ризик ламких, «ущільнених» тканин [22-24].

Для укорінення найстабільніші результати дає індол-3-масляна кислота; індолілоцтова нестійка у культурі, а нафтилоцтова інколи провокує надлишкове потовщення тканин біля майбутньої кореневої шийки [25]. Дієва логіка – двоетапність: короткий ауксиновий імпульс для індукції кореневих примордіїв і дорощування на середовищі без регуляторів, що сприяє видовженню коренів із чіткою кореневою шапочкою.

Світловий режим, температура та газообмін істотно впливають на результати культивування поряд із рецептурою середовища [4, 5]. Для пагонових

культур *Salvia* ефективним є помірне освітлення з фотоперіодом 14-16 годин: надмірне світло на початкових етапах посилює фотоокиснення фенолів і спричиняє некроз країв листків, тоді як дефіцит світла призводить до витягування міжвузлів і ламкості тканин. Оптимальна температура в межах 22-25 °C забезпечує баланс між темпом поділів і якістю морфогенезу; тривалі відхилення знижують частку життєздатних пагонів.

Ємності для культивування повинні пропускати повітря: використання кришок із повітропроникними вставками або контрольоване провітрювання зменшує ризик гіпергідричності [19, 26]. Додаткова щільність гелю, рідше розміщення експлантів і точне поділення матеріалу на відрізки стебла з вузлом покращують формування листків і знижують частоту склоподібності, до якої *Salvia* особливо схильна через опушений епідерміс.

Економіка процесу тримається на серійній мультиплікації вузлових сегментів [19]. Після встановлення асептичних мікрокущиків їх переводять на середовище з помірним цитокініном і дають три-чотири тижні на формування бічних пагонів; далі проводять чисту дисекцію на сегменти з однією активною брунькою, розсаджують без загущення і запускають новий пасаж. Надто щільне розміщення погіршує газообмін і якість світла, тож вихід придатних до укорінення пагонів падає, навіть якщо сумарна біомаса зростає. Сильні пагони варто рано переводити на середовище без регуляторів, щоб відновити нормальне співвідношення стебла і листка; ослаблені короткий час утримують у слабкому цитокініновому фоні, але без затягування, яке погіршує листкову якість.

Підтримання асептичності культур *Salvia* має низку особливостей [3]. Латентні ендофіти старших пагонів можуть проявлятися вже після отримання видимої стерильності, тому маточні рослини періодично оновлюють із меристемних ділянок, ведуть паралельні лінії та уникають змішування матеріалу різного віку. Антимікробні добавки до середовища застосовують лише у виняткових випадках, оскільки вони часто пригнічують меристеми та порушують морфогенез. Надійніші результати забезпечує дотримання чистоти інструментів, швидке проведення дисекції, використання невеликих інокулюмів

і делікатне поводження з тканинами, щоб уникати ушкодження залозистих трихом.

Укорінення та подальша акліматизація є одним із найскладніших етапів. Пагони, отримані на цитокініновому фоні, мають добре розвинене листя, але ще не пристосовані до сухішого повітря поза культурою, тому різкий перехід призводить до в’янення навіть за наявності коренів. Виживаність підвищує поступова акліматизація під прозорими укриттями або в умовах дрібнодисперсного зволоження, використання субстратів із високою повітропроникністю (торф із перлітом чи кокосовим волокном), розсіяне освітлення протягом перших 10-14 днів і обмежений полив. Додавання кальцію на етапі вкорінення та легкі підживлення після висадки знижують ламкість верхівок і частоту некрозів, які зазвичай пов’язані з дефіцитом кальцію та бору за умов високої вологості [17, 27]. Волога повинна надходити регулярно, але без застою, оскільки коренева система шавлії потребує достатньої аерації.

Хімічна стабільність є головною причиною, чому прямий органогенез для ароматичних видів *Salvia* розглядають як оптимальний підхід [4, 20]. Пагони, відновлені без калюсної стадії, зазвичай зберігають профіль ефірної олії та співвідношення основних терпенових і фенольних компонентів, що має вирішальне значення для фармакопейної та харчової сировини. Оцінювання стабільності не обмежується морфологічними ознаками: після стабілізації рослин проводять аналіз вмісту й спектра летких сполук у листі з порівнянням до еталонного клонового матеріалу. У разі виявлення небажаних відхилень серію відновлюють із меристем і скорочують кількість пасажів, щоб уникнути накопичення фізіологічної втоми.

Непрямий морфогенез розглядають як допоміжний підхід у випадках, коли пряма регенерація дає низький вихід або потрібне швидке масштабування [3]. Практична схема зводиться до кількох базових принципів. Початкова стадія повинна бути короткою: ауксиновий сигнал має бути достатнім для запуску поділів, але тривале утримання на сильних комбінаціях затягує повторну диференціацію. Вирішальним чинником є якість калюсної тканини: світлі,

щільні ділянки з ознаками меристемного потенціалу переходять у бруньки значно охочіше, ніж водянисті маси. Умови освітлення, температури та газообміну добирають аналогічні тим, що застосовують на фазі утворення пагонів при прямому морфогенезі: помірне світло, температура 22-25 °С, відведення етилену.

Оскільки саме калюсні цикли найчастіше призводять до сомаклональної мінливості, цей шлях не застосовують для клонування ліній із критичною потребою у стабільності хемопрофілю. Його основне призначення – розблокувати регенерацію в експлантах із низькою відповіддю або забезпечити вихідний матеріал для подальшого відбору й переведення у стабільну пагонову культуру.

Для масового розгону пагонів інколи застосовують тимчасово-занурювальні системи як прискорювач росту без переходу до калюсних етапів. Короткі іммерсії рідким середовищем із довшими фазами аерації підвищують трофіку й зменшують гіпергідричність порівняно з постійною рідиною. Для шавлій такі режими слід налаштовувати делікатно: короткі занурення, суворий контроль густоти біомаси та освітлення, обов’язкове повернення на гель перед укоріненням. Такі режими використовують, як інструмент прискорення, а не заміна базового меристемно-вузлового підходу [3, 4, 12, 17, 28].

Видові особливості коригують техніку, але не змінюють логіки [12, 20]. Шавлія лікарська зазвичай добре реагує на помірні дози бензиламінопурину, швидко відкриває пазушні бруньки і формує корені під дією індол-3-масляної кислоти; основна проблема – гіпергідричність у разі загущення і слабкого газообміну. Шавлія мускатна чутливіша до надлишку цитокінінів: навіть помірні дози за тривалого впливу дають короткі, «товсті» пагони зі схильністю до склоподібності, тому їй краще підходять короткі цитокінінові імпульси з раннім переведенням на середовища без регуляторів. Шавлія китайська добре укорінюється, але на старті потребує особливо делікатної обробки експлантів через активні фенольні реакції; за правильно організованої дисекції її вузлові культури дають рівномірний потік матеріалу без агресивних гормональних схем.

Для конкретних клонів корисно робити короткий попередній скринінг концентрацій цитокінінів і режимів освітлення, адже різниця в опушенні, товщині листка і інтенсивності вторинного метаболізму помітно впливає на поведінку у культурі.

Якість кінцевих рослин визначається повнотою органогенезу, а не лише швидкістю мультиплікації [5, 25]. Надто молоді пагони не варто одразу переводити на укорінення; водночас сильні пагони не слід довго утримувати на цитокініновому фоні, щоб не погіршувати формування провідних тканин. Короткі «паузи» на середовищі без регуляторів відновлюють нормальну полярність росту і сприяють анатомічній повноцінності пагонів. Після висадки у субстрат працює проста рутина: відсутність стоячої води у піддонах, поступове нарощування освітлення, стримані підживлення – і перший тиждень не перетворюється на зону невиправданих втрат.

Підтримання стабільних параметрів мікроклімату, дотримання фіксованого графіка пасажів, чіткий облік походження партій і уникнення змішування серій різного віку забезпечують відтворюваність результатів [19]. За таких умов прямий морфогенез формує стабільний матеріал із заданим ароматичним профілем, а непрямий може використовуватися як допоміжний інструмент для вирішення окремих завдань або швидкого нарощування біомаси, після чого культуру доцільно знову переводити у стабільний пагоновий режим.

1.3. Особливості непрямого морфогенезу та фактори, що на нього впливають

Непрямий морфогенез у культурі рослин – це відновлення пагонів, коренів або цілої рослини через стадію калюсної тканини, коли первинна організація експланта руйнується, клітини повертаються до поділу, а далі з маси недиференційованих клітин виринають нові органи або соматичні ембріоїди [3]. Ключова перевага цього шляху – надзвичайна пластичність: калюс легко масштабувати, розподіляти, піддавати відбору, змінювати умови середовища і

спрямовувати розвиток у потрібний бік. Водночас саме тут закладено головні ризики – від варіабельності потомства до втрат регенераційної здатності та небажаних змін у метаболізмі. Стадія калюсу не є «порожньою» паузою між експлантом і новою рослиною; це активний етап переналаштування програм росту, де сукупність ранових сигналів, гормонального фону, окисно-відновного балансу, осмотичного тиску і трофіки визначає, чи отримаємо життєздатні пагони, корені або ембріоїди, чи натомість старіючу масу бурого калюсу без шансів на регенерацію.

Початок непрямого морфогенезу пов’язаний із рановою відповіддю. Механічне ушкодження експланта знімає апікальне домінування, підвищує локальний рівень реактивних форм кисню і фітогормонів, активує фенілпропаноїдний шлях, що захищає тканини, але водночас веде до накопичення фенолів і потемніння [21, 26]. Якщо ці процеси не врівноважити, тканина швидко входить у стан оксидативного стресу і гине. Тому успішна індукція калюсу завжди поєднує два кроки: коротку, але достатню за силою стимуляцію поділів ауксином та швидке зняття надлишкової токсичності за рахунок антиоксидантів, сорбентів фенолів і своєчасного перенесення на свіже середовище. Синтетичні ауксини типу 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти запускають масові поділи і дають однорідні маси калюсу, але тривале перебування на них фіксує «проліферативну пам’ять» клітин і гальмує наступну редиференціацію. Природні або більш м’які ауксини, наприклад, нафтилоцтова й індол-3-масляна кислота, індукують калюс повільніше, але легше піддаються «вимиканню» і менше провокують химерні анатомічні відхилення. Баланс із цитокінінами визначає вектор розвитку: перевага ауксину підтримує проліферацію й коренеутворення, тоді як переведення на середовище з домінуванням цитокініну або повністю без регуляторів відкриває шлях до брунькування чи ембріогенезу.

Тип експланта та його фізіологічний вік істотно визначають стартовий потенціал культури [3]. Молоді листкові пластинки та черешки, як правило, формують світлий, активно зростаючий калюс із високою морфогенною

компетентністю, тоді як старі міжвузлові відрізки схильні до потемніння й швидкої дегенерації. Важливе значення має не лише наявність рани, а й її площа: великі зрізи посилюють ранову відповідь і вивільнення фенольних сполук, що без антиоксидантного захисту швидко перетворює середовище на токсичне. У практичній роботі обирають мінімально достатні фрагменти тканини, працюють оперативно, одразу після дисекції переносять матеріал на поживне середовище та в перші дні утримують його у темряві або за умов дуже слабкого освітлення для зменшення фотоокиснювальних процесів. Для родів із високим вмістом фенольних сполук, зокрема *Salvia*, доцільним є використання полівінілпіролідону, аскорбінової чи лимонної кислоти, активованого вугілля, а також часті пересадження невеликих порцій калюсу на свіжі середовища [21, 26]. Такі прийоми забезпечують головне завдання початкової фази – збереження життєздатної, світлої калюсної маси, здатної до подальшого органогенезу або соматичної ембріогенезу.

Структура калюсу є прогностичним маркером результату [2, 20]. Компактний, злегка гранульований, світлий калюс із меристемоподібними «острівцями» і прозорими включеннями має високий шанс дати бруньки або ембріоїди. Надто пухкий, водянистий, склоподібний калюс свідчить про дисбаланс водного режиму, надлишок цитокінінів або слабку аерацію посудини; такий матеріал охочіше утворює нестабільні структури, погано формує провідні тканини і масово випадає під час акліматизації. Темно-коричневий або майже чорний калюс є ознакою хронічного фенольного стресу, імовірність регенерації з нього мінімальна. Керування консистенцією здійснюють через концентрацію гелеутворювача, тип джерела вуглецю, щільність посадки і газообмін. Твердіший гель, негусте розміщення фрагментів і доступ повітря через фільтровані кришки різко знижують гіпергідричність і стимулюють появу щільних меристемних вузлів. Додавання кальцію і бору в адекватних кількостях підтримує цілісність клітинної стінки, правильне відкладення пектинів і роботу верхівкових домінант, тоді як дефіцит цих елементів проявляється ламкістю тканин і некрозом верхівок відновлених пагонів.

Освітлення, температура та осмотичний режим керують темпом переходів між фазами [5, 29, 30]. Більшість калюсних культур індукують у темряві, щоб не загострювати фенольне окиснення на старті, і переводять на світло під час регенерації. Надмірне освітлення в перші тижні викликає некроз країв і прискорює старіння калюсу; недостатнє – затягує поділи і провокує водянистість. Помірний фотоперіод і розсіяне світло достатні для формування справжніх листочків на адвентивних пагонах. Температурний оптимум близький до 22-25 °C; вищі температури пришвидшують поділ, але підсилюють дихальні втрати і оксидативний стрес, тоді як нижчі сповільнюють перебіг, інколи покращуючи якість структур ціною часу. Осмотичний тиск регулюють концентрацією сахарози та додаткових речовин. Для ембріогенезу корисними бувають маніт або поліетиленгліколь, що імітують помірний водний дефіцит і стимулюють дозрівання ембріоїдів; для органогенезу надлишкова осмотика небажана, бо гальмує видовження меристем і провідних елементів.

Азотне живлення відіграє важливу роль у регуляції морфогенезу *Salvia* в культурі *in vitro* і потребує точного балансування [5, 31]. Підвищена частка амонійної форми азоту стимулює швидке наростання калюсної біомаси, проте зумовлює закислення локального мікросередовища та підвищує чутливість тканин до фенольного стресу. Нітратна форма забезпечує більш рівномірний ріст і краще корелює з індукцією брунькування. Оптимальним підходом вважається зниження загальної концентрації макроелементів на стадії вкорінення та корекція співвідношення амонію й нітрату під час повторної диференціації. На перебіг морфогенезу суттєво впливає джерело вуглецю. Сахароза використовується як універсальний варіант для більшості експериментів. Глюкоза іноді знижує інтенсивність потемніння тканин, проте зумовлює їх надмірну водянистість. Мальтоза сприяє рівномірнішому розвитку соматичних ембріоїдів і зменшує частоту некрозів на поверхні експлантів.

Гормональні режими при непрямому морфогенезі передбачають початкову фазу індукції та наступну фазу стабілізації [3, 23]. На старті експланти короткочасно культивують на середовищі з підвищеним вмістом ауксину до

формування рівномірного калюсу. Після появи меристемних зачатків або ембріоїдних структур концентрацію ауксину знижують до мінімуму, замінюють на комбінацію з перевагою цитокініну або повністю вилучають регулятори. У багатьох системах саме зниження вмісту фітогормонів, а не їх накопичення, забезпечує ефективне брунькування: за відсутності регуляторів меристеми формують нормальні осі росту, а не численні недорозвинені пагони. Для соматичного ембріогенезу характерною є додаткова стадія дозрівання – перехід від проліферативного до диференціювального режиму стимулюють абсцизова кислота, осмотичний стрес і культивування в темряві з подальшим відновленням освітлення. Ігнорування цього етапу призводить до утворення маси дрібних ембріоїдів, які одночасно проростають у слабкі рослини без повноцінного дозрівання, що знижує їхню життєздатність під час акліматизації.

У ємносях для культивування часто накопичується етилен: у невеликих кількостях він стимулює ранні реакції, у надлишку пригнічує диференціацію та підвищує частоту гіпергідричності [26, 28]. Зменшити проблему можна завдяки кришкам із повітропроникними вставками або періодичному провітрюванню без ризику контамінації. Подібний ефект дає скорочення об’єму рідкої фази на поверхні гелю, оскільки тканини в умовах надлишкової вологості втрачають здатність до морфогенезу. У промислових системах ефективними виявилися методи тимчасового занурення, де експланти короткочасно контактують із рідким середовищем, а решту часу перебувають у провітрюваному стані. В результаті поєднується інтенсивне живлення з низькою частотою гіпергідричності та високою морфогенною здатністю.

Сомаклональна мінливість є неминучим супутнім явищем непрямого морфогенезу [6, 18, 32]. Хромосомні перебудови, зміни плоїдності, активація транспозонів та стійкі епігенетичні зсуви накопичуються тим інтенсивніше, чим довше культура підтримується і чим вищий рівень впливу регуляторів. Для отримання клонів із фіксованим хемотипом це становить загрозу, оскільки порушується стабільність профілю ефірної олії або змінюється співвідношення її основних компонентів. Для селекції та біотехнології вторинних метаболітів

такий рівень мінливості, навпаки, може бути корисним, відкриваючи можливість добору ліній з підвищеним умістом цільових сполук. Тому вибір підходу визначається метою: за потреби стабільності зменшують кількість пасажів, скорочують час перебування на регуляторах, регулярно повертаються до меристемного матеріалу й перевіряють отримані лінії за морфологічними, молекулярними та хімічними ознаками. Якщо завдання полягає у відборі нових варіантів, допускають триваліші цикли, але застосовують стандартизовані протоколи скринінгу, щоб серед випадкових змін виокремити потенційно цінні варіанти.

Контамінації часто маскуються під «раптове» буріння калюсу або втрату регенераційної здатності, особливо коли йдеться про латентних ендофітів [19]. М’які схеми поверхневої стерилізації не завжди усувають внутрішніх колоністів, які активуються на багатих середовищах. У таких випадках доречні поєднання кількох засобів для стерилізації, швидка робота, обмеження площі рани й інколи – меристемна санація з подальшим переходом у калюс уже з оздоровленого матеріалу. Антибіотики і фунгіциди застосовують обережно, бо вони нерідко б’ють по самій регенерації; краще працюють профілактика, селективне вилучення підозрілих ліній на ранніх етапах.

Особливості родів із високим вмістом фенольних сполук і терпенів, зокрема шавлії, проявляються на всіх етапах культивування [9, 14, 16]. Епідерміс із залозистими трихомами є водночас цінним джерелом ароматичних метаболітів і фактором підвищеної чутливості до механічних пошкоджень, а також чинником, що впливає на газовий та леткий баланс усередині посудини для культивування. Акуратні маніпуляції й чисті зрізи зменшують механічне вивільнення фенолів у середовище. Раннє потемніння тканин у багатьох випадках пов’язане не з дією регуляторів, а з надмірною травмою та затримкою під час перенесення експлантів. Для шавлії ефективними є стратегії з використанням невеликих інокулюмів, частими пересадженнями, короткою фазою темряви, сорбентами фенолів і швидким зниженням концентрації ауксину після появи перших меристемних ділянок. На стадії повторної диференціації

невеликі дози цитокінінів підтримують формування пагонів без склоподібності, тоді як додаткове кальцієве живлення та належна вентиляція сприяють розвитку міцних, стійких до ламкості пагонів.

Якість кінцевого матеріалу визначається не лише морфологічними ознаками, а й функціональною спроможністю. Рослини, відновлені через калюс, потребують акліматизації з поступовим зняттям захисту від випаровування, і саме на цьому етапі виявляються приховані дефекти провідної системи та механічних тканин. Якщо внутрішні елементи сформовані неправильно, рослини, які зовні виглядають здоровими, швидко в’януть після пересадки. Профілактичні заходи включають ранній перехід на середовища з мінімальними або відсутніми регуляторами росту, використання щільніших гелів, розсіяне освітлення та субстрати з високою повітропроникністю під час укорінення. Частина методик передбачає перенесення укорінення в умови ex vitro після короткочасного ауксинового впливу; у такому випадку корені анатомічно наближаються до природних і краще функціонують у ґрунті [25].

Практичний досвід непрямого морфогенезу свідчить про необхідність чіткого фазового контролю та дисципліни процесу [17, 33]. Стадії мають бути розмежовані: індукція – коротка й достатня для запуску поділів, повторна диференціація – своєчасна й під належним світловим режимом, дозрівання ембріоїдів – завершене до проростання, акліматизація – поступова. Не існує універсального регулятора чи єдиної рецептури; результат забезпечує сукупність дрібних рішень, які разом утримують калюс у межах морфогенної компетентності. Чим точніше витримано це «вікно», тим вищі шанси отримати життєздатні та вирівняні рослини з прийнятним рівнем генетичної стабільності.

У випадках, коли важливо зберегти незмінність ознак, непрямий шлях поєднують із періодичним поверненням до меристемної регенерації та регулярним контролем ліній за морфологічними й хімічними показниками [4, 18]. Там, де пріоритетом є пошук нових варіантів, калюсна культура виступає джерелом різноманітності, але успіх визначається не кількістю отриманих форм,

а здатністю відібрати й стабілізувати ті, що зберігають корисні властивості поза умовами *in vitro*.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об’єкти і методи дослідження

Дослідження проводилися на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України протягом 2025 року у стерильних умовах.

Об’єктом дослідження була шавлія (рід *Salvia*, родина Lamiaceae), представлена трьома видами, серед яких шавлія лікарська (*Salvia officinalis*) від двох виробників та один вид шавлії мускатної (*Salvia sclarea*). Рослини цього роду характеризуються високим вмістом ефірних олій, фенольних сполук і терпеноїдів [34]. Завдяки здатності до регенерації та утворення калюсних структур вони є придатним матеріалом для біотехнологічних досліджень.

Метою роботи було вивчення особливостей непрямого морфогенезу шавлії та оптимізація умов культивування рослинного матеріалу *in vitro*. Дослідження ґрунтувалося на методах культури тканин і мікроклонального розмноження, що передбачають індукцію калюсної тканини з подальшим формуванням пагонів або коренів.

Як вихідний матеріал використовували стерильні експланти, отримані з материнських рослин. Для введення в культуру *in vitro* відбирали верхівкові й бічні меристеми, а також сегменти пагонів із вузлами, оскільки саме такі типи експлантів забезпечують високу відновлювальну здатність клітин.

Перед висаджуванням проводили дезінфекцію насіння стерилізуючими агентами з подальшим промиванням стерильною водою. Експланти розміщували на стандартні живильні середовища Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням 6-бензиламінопурину (БАП). Культивування проводили в пробірках або колбах за температури 23 ± 3 °C, фотоперіоду 16/8 годин та освітленості близько 2-3 тис. лк.

Після введення в культуру проводили спостереження за ростом експлантів, формуванням калюсу та розвитком регенерантів. Фіксували морфологічні зміни, колір і структуру калюсної тканини, появу бруньок чи коренів. Отримані зразки

використовували для подальшого культивування з метою оцінки їхнього морфогенетичного потенціалу.

2.2. Загальна схема проведення досліджень

Робота виконувалася відповідно до стандартних методик введення рослин у культуру *in vitro*. Основною метою було отримання стерильних експлантів *Salvia* та визначення умов, що сприяють утворенню калюсної тканини та прояву непрямого морфогенезу.

Загальна схема досліджень включала кілька послідовних етапів (рис. 2.1).

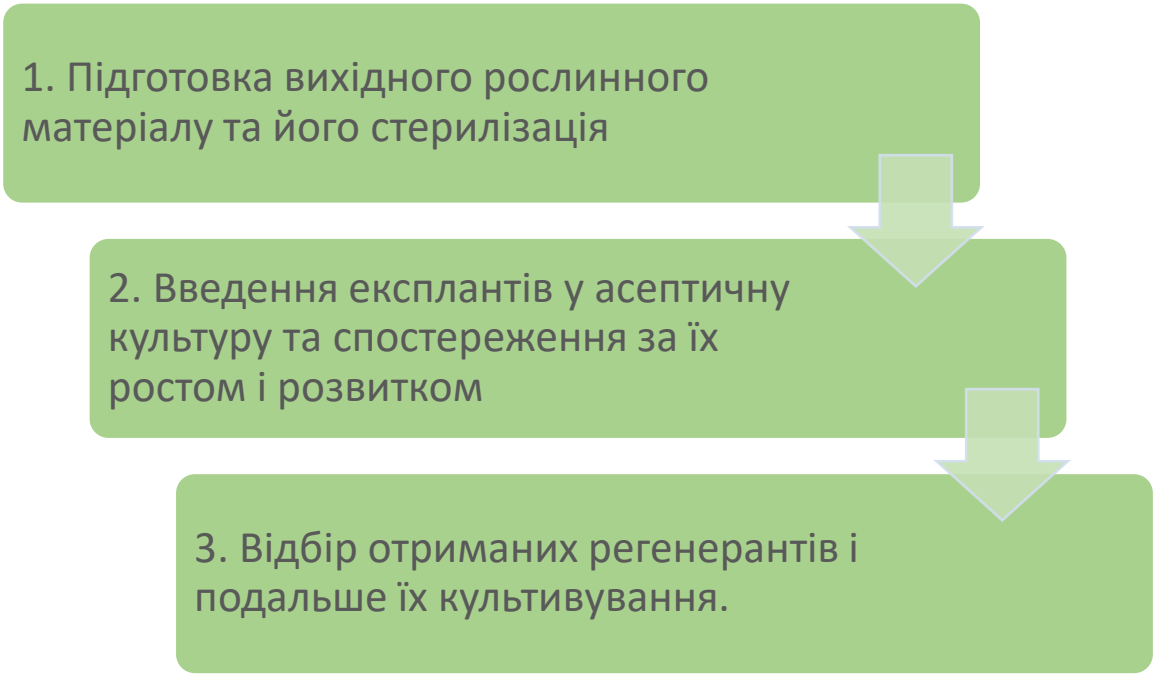

Рис. 2.1 – Схема проведення дослідження

Материнські рослини шавлії вирощувались в тепличних умовах. Для одержання експлантів відбирали вегетативні частини рослин без механічних пошкоджень, ознак ураження фітопатогенними мікроорганізмами. Вибір зумовлений тим, що молоді тканини мають вищу мітотичну активність, краще пристосовуються до умов *in vitro* і швидше формують калюсну тканину. Залежно від експериментальної серії для ініціації культури відбирали верхівкові або бічні частини пагонів, фрагменти стебел з вузлами та листкові пластинки.

Відібране насіння промивали у проточній воді для видалення механічних забруднень. Попереднє очищення проводили безпосередньо перед перенесенням у стерильні умови. Стерилізацію здійснювали в ламінарній шафі з використанням хімічних стерилізуючих агентів. Після дезінфекції матеріал ретельно промивали стерильною дистильованою водою для усунення залишків реагентів.

Підготовлені експланти висаджували на тверде живильне середовище, яке містило необхідний комплекс макро- і мікроелементів, вітамінів, цукрів та регуляторів росту рослин. У якості гелеутворювача застосовували агар, що забезпечував стабільну структуру середовища. Середовище стерилізували в автоклаві при 121 °C протягом 15-20 хвилин. Перед висаджуванням експлантів перевіряли герметичність посуду та стерильність робочого місця.

Упродовж перших тижнів після введення експлантів у культуру проводили регулярне візуальне спостереження за їхнім станом. Відмічали появу ознак контамінації, ступінь виживання, зміни кольору тканин, а також утворення первинних калюсних структур. Калюсна тканина, що з’являлася на місці поранень або зрізів, фіксувалася за морфологічними ознаками: колір, щільність, структура. У подальшому відстежували розвиток вторинних структур – формування адвентивних пагонів або коренів. Отримані дані фіксували у робочих журналах для кожного варіанта досліду.

У разі появи добре розвинених калюсних мас проводили їх поділ і перенесення на свіже живильне середовище для подальшого росту. Пересаджування виконували стерильно з інтервалом 3-4 тижні, щоб запобігти виснаженню поживних речовин. Культури підтримували у стабільних умовах до появи ознак морфогенетичної диференціації. Для зразків, що проявили регенераційні ознаки, відбирали окремі експланти для подальшого дослідження структури та морфологічних особливостей калюсу.

Результати кожного етапу дослідження фіксували шляхом опису морфологічних характеристик і фотографування. Оцінювали частку життєздатних експлантів, відсоток зараження, швидкість утворення калюсу,

зовнішній вигляд тканин та наявність органогенезу. Усі спостереження проводили в динаміці для відстеження послідовності змін у культурі.

2.3. Приготування живильних середовищ

У культурі рослинних тканин *in vitro* вирішальне значення має склад живильного середовища, яке забезпечує клітини необхідними речовинами для росту, поділу та диференціації. Від концентрації та співвідношення його компонентів залежить характер морфогенетичної реакції – утворення калюсу, органів або цілих рослин. Базові рецептури, такі як середовище Мурасіге і Скуга (МС), а також його модифікації з різними комбінаціями регуляторів росту, найчастіше використовуються для представників роду *Salvia*.

Живильні середовища для культури тканин складаються з кількох функціональних груп компонентів: макроелементів, мікроелементів, джерел вуглецю, вітамінів, регуляторів росту та гелеутворювача. Кожна група виконує специфічну роль у забезпеченні життєдіяльності клітин.

Макроелементи. До складу середовищ зазвичай входять нітрат амонію, нітрат калію, фосфат калію, сульфат магнію та хлорид кальцію. Перераховані сполуки забезпечують клітини основними елементами живлення: азотом, фосфором, калієм, кальцієм, магнієм і сіркою.

Азот у формі NH_4^+ і NO_3^- бере участь у синтезі білків, нуклеїнових кислот і хлорофілу. Калій підтримує осмотичний баланс клітини, активує ферменти фотосинтезу та дихання. Кальцій зміцнює клітинні стінки, регулює проникність мембран і бере участь у сигнальних процесах. Фосфор необхідний для енергетичного обміну, а магній входить до складу хлорофілу та активує численні ферменти.

Мікроелементи. Мікроелементи додають у дуже малих концентраціях; вони беруть участь у ферментативному каталізі, фотосинтезі та процесах дихання клітин. Бор регулює транспорт вуглеводів і синтез клітинних стінок, марганець активує ферменти, пов’язані з фотолізом води, цинк стимулює синтез

ауксинів, мідь бере участь у реакціях окиснення, а кобальт потрібний для синтезу вітаміну B_{12}.

Молібден входить до складу ферментів, які каталізують відновлення нітратів. Для попередження дефіциту заліза використовують його хелатну форму (Fe-EDTA), яка запобігає випаданню іонів у нерозчинні сполуки та забезпечує стабільну наявність Fe^{2+} у розчині.

Вітамінний комплекс. Вітаміни слугують кофакторами ферментів, що каталізують реакції росту рослини. У рецептурах для культур *Salvia* найчастіше використовують тіамін (B_1), піридоксин (B_6) і нікотинову кислоту. Тіамін бере участь у синтезі амінокислот і ліпідів, піридоксин впливає на азотний обмін, а нікотинова кислота входить до складу NAD і NADP.

Джерела вуглецю. Сахароза є головним енергетичним субстратом для клітин, що ростуть *in vitro*. Її оптимальна кількість (20–30 г/л) забезпечує необхідний рівень осмотичного тиску й підтримує гомеостаз клітинного середовища. При низькій концентрації сахарози ріст експлантів сповільнюється, при надлишку – можливе зневоднення й некроз тканин. Крім енергетичної функції, сахароза впливає на регуляцію генів, пов’язаних з морфогенезом.

Регулятори росту рослин. У процесах морфогенезу особливу роль відіграє співвідношення ауксинів і цитокінінів. Ауксини (індолілоцтова, нафтилоцтова кислота) стимулюють подовження клітин і утворення калюсу, тоді як цитокініни (кінетин, БАП) активують клітинні поділи й формування пагонів.

Серед цитокінінів найбільш поширеним є 6-бензиламінопурин (БАП). У концентрації 0,5–1,0 мг/л він стимулює диференціацію клітин і появу адвентивних пагонів. Вищі концентрації можуть викликати надмірне розростання тканини без подальшого формування органів.

Гелеутворювач. Агар-агар застосовується для створення напівтвердого середовища, яке підтримує стабільну структуру і дозволяє закріпити експланти. Оптимальна кількість 7-8 г/л забезпечує необхідну міцність гелю та доступність поживних речовин. Зменшення дози призводить до розм’якшення середовища, збільшення – до надмірної жорсткості, що гальмує ріст тканин.

Таблиця 2.1

Середовище для асептичних проростків *Salvia*

Компоненти	Кількість на 1 л	
	МС	МС + БАП
Маточні розчини макросолей	100 мл	100 мл
Маточні розчини мікросолей	1 мл	1 мл
Fe-хелат	5 мл	5 мл
Вітаміни	0,5 мг	0,5 мг
Сахароза	20 г	20 г
Агар-агар	7 г	7 г
6-БАП	-	0,8 мг
pH	5,5-5,8	5,5-5,8

Кислотність середовища. Оптимальне значення pH – 5,5–5,8, за якого більшість елементів перебувають у розчиненій формі. При більш кислому середовищі можливе випадання солей фосфору та заліза, при лужному – погіршення засвоєння мікроелементів. Корекцію pH здійснюють за допомогою розчинів NaOH або HCl.

Компоненти середовища зважують на аналітичних терезах і розчиняють у дистильованій воді в певній послідовності: спочатку макроелементи, потім мікроелементи, Fe-хелат, сахарозу й вітаміни. Після повного розчинення додають агар-агар і доводять об’єм до 1 л. Суміш нагрівають до утворення однорідного гелю, після чого розливають у скляний посуд об’ємом 10-20 мл. Стерилізацію проводять в автоклаві при 121 °C протягом 20 хвилин.

Після охолодження середовище має бути прозорим, без осаду чи каламутності. Зберігають його у закритому вигляді при кімнатній температурі не довше 7-10 днів, уникаючи потрапляння прямого сонячного світла. Перед використанням перевіряють стерильність методом інкубації контрольних зразків.

Базове середовище МС застосовується для підтримання росту і розвитку асептичних проростків або первинного калюсу, коли необхідно забезпечити лише мінеральне й енергетичне живлення клітин без впливу регуляторів росту. Його склад вважається універсальним і придатним для більшості рослинних об’єктів.

Модифіковані варіанти середовища ґрунтуються на рецептурі МС, але доповнюються фітогормональними регуляторами. Найпоширеніша модифікація – МС + БАП, у якій додавання цитокініну сприяє активації ділення клітин і формуванню пагонів.

2.4. Стерилізація насіння

Насіння, навіть ретельно відібране, завжди містить на поверхні значну кількість мікроорганізмів – бактерій, спор грибів, водоростей чи найпростіших, що потрапляють із ґрунту або повітря під час зберігання. Потрапляння таких мікроорганізмів у живильне середовище призводить до контамінації та повного знищення культури, тому основним завданням стерилізації є усунення поверхневої мікрофлори при збереженні життєздатності насіння.

Для проведення дезінфекції відбирали повноцінне насіння без механічних пошкоджень і без ознак ураження фітопатогенними грибами чи бактеріями. Відібраний матеріал попередньо промивали у проточній воді, щоб видалити залишки пилу, ґрунту та органічних речовин, які можуть знижувати ефективність подальшої обробки. Етап також полегшує доступ стерилізуючих агентів до поверхні оболонки насіння.

Процес стерилізації складався з кількох послідовних стадій, що відрізнялися типом реагентів і тривалістю впливу. Спочатку проводили короткочасну обробку у 70%-му етиловому спирті. Етанол діє як дегідратуючий агент і забезпечує видалення воскової плівки з поверхні насінини, підвищуючи проникність клітинних оболонок для наступного дезінфектанта. Тривалість цього етапу становить близько однієї хвилини.

Після спиртової обробки насіння переносили у розчин гіпохлориту натрію. Використовували розведений розчин побутового відбілювача («Білизна»), що містить активний хлор у концентрації 3-5 %. Розводили його стерильною дистильованою водою у співвідношенні приблизно 1:3, додаючи одну краплю нейтрального миючого засобу для зменшення поверхневого натягу. Насіння витримували у розчині протягом 15-20 хвилин при періодичному легкому струшуванні, що забезпечувало рівномірну дію реагенту.

Після завершення дії гіпохлориту насіння кілька разів промивали стерильною дистильованою водою для повного видалення залишків хлору, який у надлишку може бути токсичним для насіння. Кожне промивання тривало 3-5 хвилин, воду замінювали щоразу на свіжу. Промите насіння переносили на стерильний фільтрувальний папір для короткочасного підсушування (рис. 2.2).

Рис. 2.2 – Процес стерилізації насіння

Усі маніпуляції проводили в умовах асептики – у ламінарній шафі, з використанням стерильних пінцетів, колб і пробірок. Робочі поверхні та інструменти попередньо обробляли 70% етиловим спиртом або

ультрафіолетовим випромінюванням. Стерильність контролювали шляхом візуального огляду посуду після автоклавування.

У випадках, коли насіння мало підвищений рівень контамінації, застосовували додаткову дезінфекцію 3%-м розчином перекису водню або слабким розчином марганцевокислого калію. Обробку проводили протягом кількох хвилин, після чого насіння також багаторазово промивали стерильною водою.

Особливу увагу приділяли тривалості дії стерилізуючих агентів, оскільки надмірна експозиція може призвести до пошкодження зародкових тканин, зниження енергії проростання та подальших порушень розвитку. Водночас недостатня обробка спричинює залишкову контамінацію, що проявляється через кілька днів після висаджування на живильне середовище.

Ефективність стерилізації значною мірою залежить і від умов після обробки. Висушене насіння не повинно тривалий час залишатися відкритим, тому його переносили на середовище одразу після завершення останнього промивання. У деяких випадках проводили попереднє пророщування у стерильних чашках Петрі з вологою фільтрувальною паперовою основою, що дозволяло контролювати асептичність і оцінити життєздатність матеріалу перед введенням у культуру.

При правильному дотриманні режиму стерилізації насіння зберігає високу схожість і є придатним для подальшого використання як джерело експлантів. Отриманий асептичний матеріал переносили на живильне середовище для пророщування та одержання стерильних проростків, які надалі використовували для індукції калюсоутворення та морфогенезу.

2.5. Одержання первинного калюсу

Після проведення стерилізації насіння та одержання асептичних проростків наступним етапом було введення експлантів у культуру *in vitro* для індукції калюсоутворення. У якості вихідного матеріалу використовували

стерильні фрагменти вегетативних органів рослин шавлії, переважно листкові пластинки, черешки та сегменти пагонів. Вибір типу експланта обумовлювався його фізіологічним станом і рівнем меристематичної активності.

Для індукції калюсоутворення використовували два варіанти живильного середовища: стандартне середовище Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням БАП у концентрації 0,8 мг/л та модифіковане середовище МС із підвищеним вмістом БАП – 4,0 мг/л.

Відомо, що утворення калюсу тісно пов’язане зі співвідношенням цитокінінів та ауксинів у середовищі. Ауксини (зокрема індоліл-3-оцтова кислота або нафталоцтова кислота) стимулюють ділення клітин у зоні поранення, тоді як цитокініни сприяють подальшому їх росту та проліферації. Надмірна концентрація будь-якого з гормонів може гальмувати розвиток культури або змінювати напрямок морфогенезу. Оптимальне співвідношення цих регуляторів забезпечує формування активної калюсної маси, придатної для подальшої диференціації.

Після висаджування експлантів у стерильних умовах проводили культивування за контрольованих фізичних параметрів середовища. Температуру підтримували на рівні 20-26 °С, освітлення – розсіяне, з фотоперіодом 16 годин світла та 8 годин темряви. Вологість повітря утримували в межах 70–80 %.

На цьому етапі створюються умови, за яких клітини рослинного матеріалу переходять у стан активного ділення. У місцях контакту тканини з поверхнею середовища починають відбуватись структурні зміни, пов’язані з реактивацією меристематичної активності клітин. У результаті формується ділянка проліферації, яка є початковою стадією калюсоутворення.

Важливим фактором успішності індукції калюсу є фізіологічний стан рослин, з яких отримано експланти. Найвищу регенераційну здатність мають молоді, активно зростаючі частини рослин, у клітинах яких зберігається потенціал до поділу. Використання старих або механічно пошкоджених органів

часто знижує частоту утворення калюсу та спричинює розвиток некротичних ділянок.

Після розміщення експлантів на середовище культуральні ємності закривали та розміщували у термостаті або ростовій камері. Протягом цього етапу підтримували стабільність температури, світлового режиму та вологості. Будь-які коливання умов можуть уповільнювати перебіг фізіолого-біохімічних процесів і знижувати потенціал до проліферації клітин.

Індукція калюсоутворення зазвичай триває кілька тижнів. У цей період клітини в місцях поранень зазнають деформацій, втрачають первинну полярність і переходять до мітотичного поділу. Змінюється активність ферментів, відбувається інтенсивне споживання поживних речовин і накопичення білків, нуклеїнових кислот та гормонів, необхідних для формування недиференційованої маси.

На ранніх стадіях формування калюсу важливим є контроль за станом експлантів та середовища. Ознаками успішного проходження процесу є збереження життєздатності тканин, відсутність потемніння зрізів і проявів контамінації. Наявність колоній бактерій або грибів свідчить про порушення асептичних умов і вимагає вилучення заражених зразків.

Для подальшого розвитку культур проводиться субкультивування – перенесення експлантів на свіже середовище. Етап дає змогу підтримувати метаболічну активність клітин і готує умови для наступного періоду проліферації тканин.

Одержання первинного калюсу є проміжною стадією у процесі мікроклонального розмноження шавлії. На цьому етапі відбувається формування тканини, здатної до подальшої морфогенетичної диференціації. Від умов, за яких здійснюється індукція калюсу, залежить його подальша здатність до утворення органів і стабільність ростових характеристик.

Після утворення стабільної калюсної маси частину зразків переносили на середовище зниженої концентрації фітогормонів або на базове МС без регуляторів росту для стимулювання диференціації. Через 3-4 тижні

спостерігали появу меристемоподібних ділянок, з яких формувалися адвентивні бруньки та пагони. Отримані пагони дорощували до формування коренів, після чого рослини-регенеранти переводили на середовище для вкорінення та подальшої акліматизації в умовах *in vitro*.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

На першому етапі дослідження проводили спостереження за ростом трьох варіантів культур роду *Salvia*:

- *Salvia sclarea* L.,
- *Salvia officinalis* L. (насіння виробника Професійне насіння),
- *Salvia officinalis* L. (насіння виробника SeedEra).

Після стерилізації вихідного рослинного матеріалу експланти розміщували у культуральні посудини з живильними середовищами на основі МС та МС з додаванням БАП (рис. 3.1).

Рис. 3.1 – Експланти *Salvia* spp. у культуральних посудинах на початковому етапі росту

Протягом перших днів фіксували загальний стан тканин, наявність або відсутність потемніння, ступінь збереження тургору та ознаки адаптації до умов *in vitro*

Через сім днів після введення експлантів у культуру *in vitro* відмічено появу перших морфологічних ознак росту у всіх трьох варіантах *Salvia* (рис. 3.2; рис. 3.3). На цьому етапі спостерігали формування парних сім'ядольних листків і початкове витягування гіпокотиля.

Рис. 3.2 – Ріст експлантів *Salvia* spp. на восьмий день культивування

За результатами вимірювань встановлено, що *Salvia sclarea* характеризувалася найвищими темпами росту серед досліджуваних культур. На середовищі MS із додаванням БАП довжина пагонів досягала 2,5-3,0 см, тоді як довжина кореневої системи становила до 4,0 см.

На безгормональному середовищі МС приріст був менш інтенсивним: середня довжина пагонів становила близько 2,0 см. Проте навіть за відсутності регуляторів росту спостерігали стабільне наростання біомаси.

Рис. 3.3 – Вид знизу культуральної посудини з експлантом *Salvia* spp. на восьмий день культивування

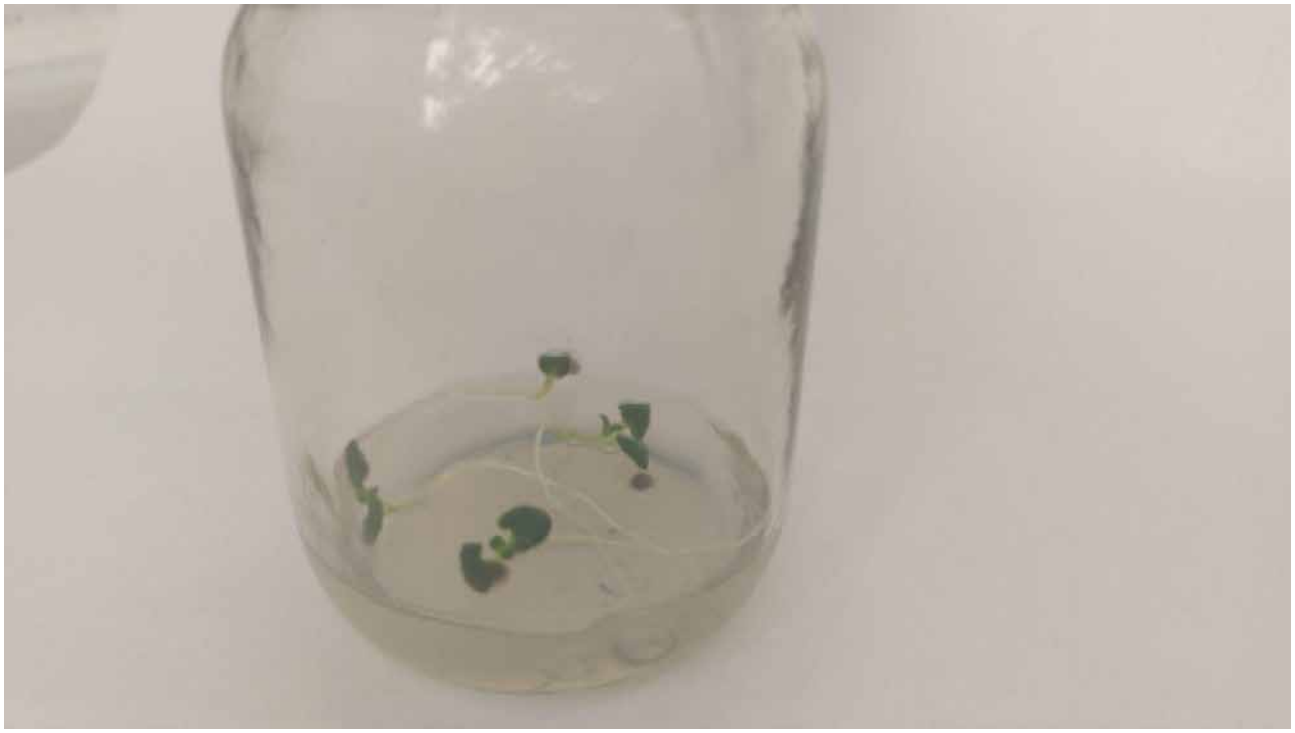

Рис. 3.4 – Експлант *Salvia* spp. на восьмий день культивування

У *Salvia officinalis* (насіння виробника Професійне насіння) ріст був помірним — близько 1,8 см на восьмий день культивування. У варіанті з *Salvia*

officinalis (насіння виробника SeedEra) активного росту практично не спостерігали. Такі відмінності можуть бути зумовлені генотиповими особливостями вихідного матеріалу або відмінностями у фізіологічному стані експлантів на момент введення в культуру.

Експланти *S. sclarea* формували більш масивні листкові пластинки та демонстрували ранній розвиток кореневої системи, тоді як *S. officinalis* (насіння виробника SeedEra) зберігала компактну форму без виражених ознак росту.

На чотирнадцятий день після введення в культуру *in vitro* спостерігали суттєве збільшення біомаси у всіх варіантах *Salvia*, проте інтенсивність ростових процесів істотно відрізнялася між досліджуваними видами. У культуральних посудинах формувалися добре розвинені пагони з характерними видовими ознаками листків та активно зростаючою кореневою системою. Вегетативні органи набували насиченого зеленого забарвлення, що свідчило про стабільний фотосинтетичний апарат і добру адаптацію до штучного середовища (рис. 3.5, 3.6, рис. 3.7).

Рис. 3.5 – Розвиток експлантів *Salvia* spp. на 14-й день культивування

Рис. 3.6 – Розвиток експлантів *Salvia* spp. на 14-й день культивування

Рис. 3.7 –*Salvia* spp. на 14-й день культивування (вид знизу)

Рис. 3.8 – Біометричні показники трьох варіантів *Salvia* spp. на 14-й день культивування

Найвищий рівень приросту демонструвала *Salvia sclarea* (рис. 3.9), яка зберігала тенденцію швидкого розвитку, зафіксовану на сьомий день дослідження. *Salvia sclarea* формували довші пагони та активніше нарощували листкову пластину.

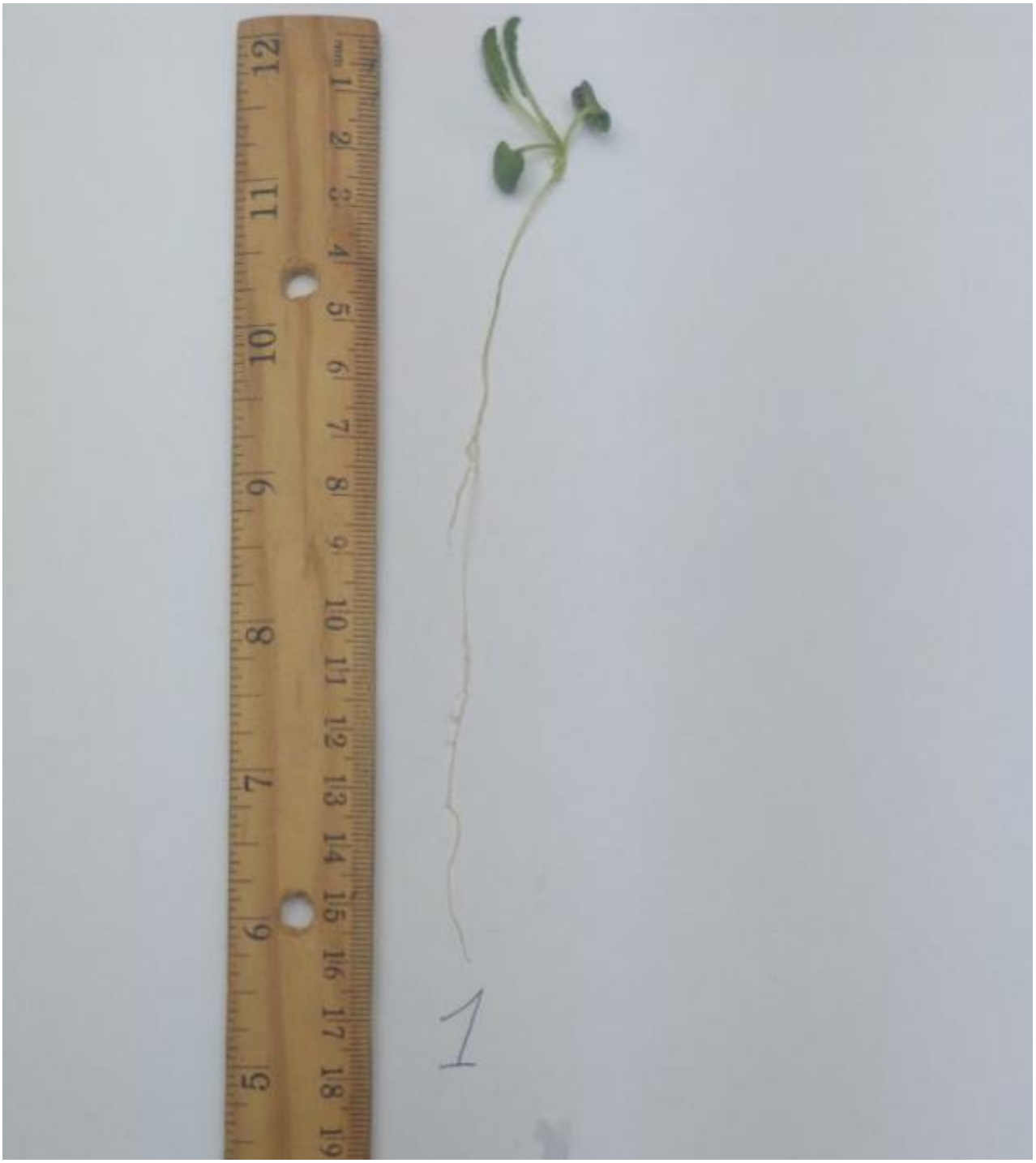

Рис. 3.9 – Біометричні показники *Salvia sclarea* на 14-й день культивування

У *Salvia officinalis* (насіння виробника Професійне насіння) (рис. 3.10) ріст залишався помірним. Формувалися рівномірні за довжиною пагони та достатньо розвинена коренева система, хоча темпи приросту поступалися мускатній шавлії.

Рис. 3.10 – Біометричні показники *Salvia officinalis 1* на 14-й день культивування

У *Salvia officinalis* (насіння виробника SeedEra) (рис. 3.11) спостерігали найнижчу інтенсивність морфогенезу: пагони залишалися коротшими, кількість листків була меншою, а коренева система — менш розгалуженою. Вірогідно,

різниця пов’язана з генотиповими особливостями та початковим фізіологічним станом експлантів.

Рис. 3.11 – Біометричні показники *Salvia officinalis* (насіння виробника SeedEra) на 14-й день культивування

Після завершення 14-денного періоду первинного культивування рослини *Salvia* spp. демонстрували достатній рівень розвитку для переходу до наступного етапу дослідження — індукції калюсоутворення. Сформовані пагони обережно вилучали з культуральних посудин та видаляли кореневу систему, оскільки вона не бере участі у формуванні калюсної тканини (рис. 3.12).

Рис. 3.12 – Пересадка експлантів на живильні середовища для індукції калусогенезу

На чотирнадцятий день після перенесення експлантів на живильні середовища спостерігали формування калюсної тканини у всіх досліджуваних варіантах *Salvia* (рис. 3.13-3.15).

Калюс локалізувався у зоні поранення, мав світло-кремове забарвлення та однорідну структуру, що є типовою ознакою раннього етапу непрямого морфогенезу. Тканина щільно прилягала до поверхні середовища та рівномірно наростала по периметру зрізу.

Найвиразніше калюсоутворення спостерігали у *Salvia sclarea*, що узгоджується з попередніми результатами щодо її вищих темпів росту та кращої

адаптації до умов культури *in vitro*. У цьому варіанті калюс формувався швидше, мав більшу площу розростання та більш щільну консистенцію.

.

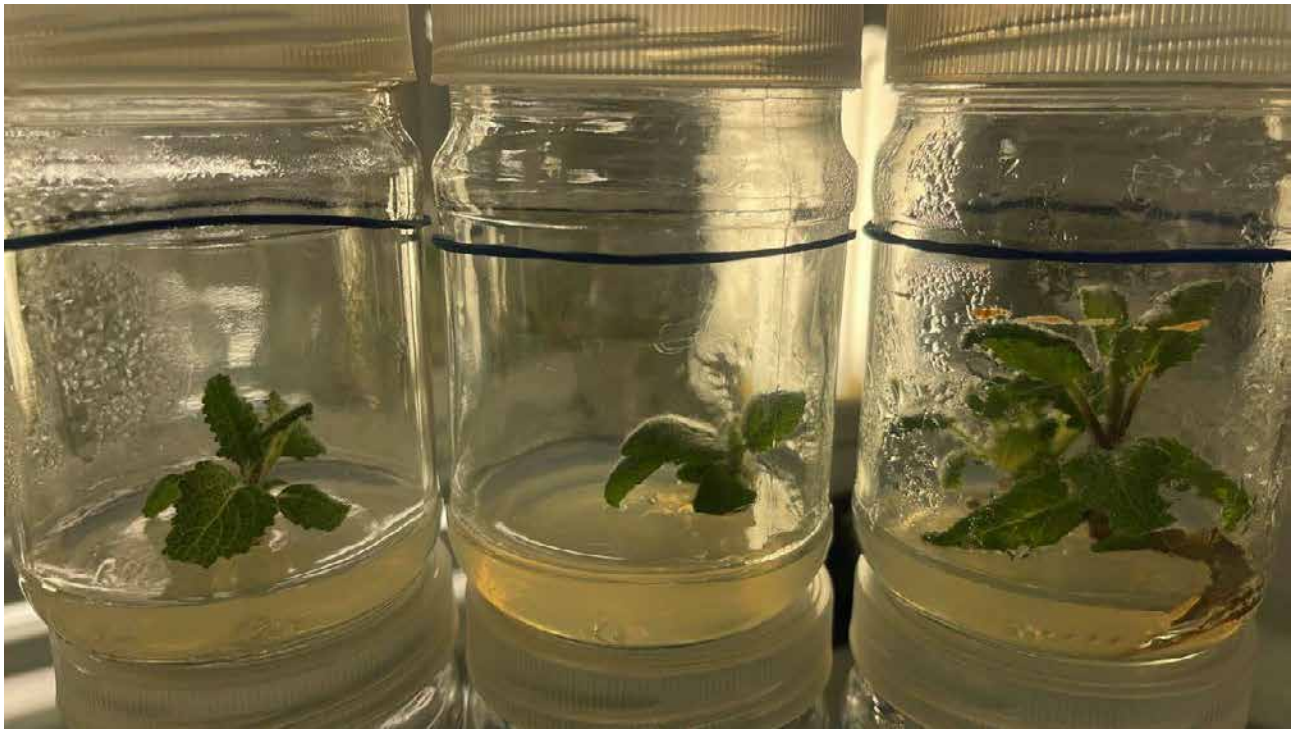

Рис. 3.13 – Чотирнадцятий день непрямого морфогенезу *Salvia* spp.

У *Salvia officinalis* (насіння виробника Професійне насіння) калюсоутворення було помірним, але стабільним: тканина формувалася по всьому колу зрізу, однак її маса та темпи наростання поступалися *Salvia sclarea*. Найменш інтенсивне калюсоутворення спостерігали у *Salvia officinalis* (насіння виробника SeedEra), де калюс був менш об’ємним і мав повільніший темп формування.

Подальше оцінювання перебігу калюсогенезу проводили у динаміці на 14-й, 21-й і 28-й день після пересадки експлантів на живильні середовища. Упродовж цих термінів фіксували частоту утворення калюсу для кожного з досліджуваних варіантів, а також характерні морфологічні ознаки тканини, включно з її кольором і структурою. Додатково відстежували появу ранніх

проявів редиференціації, до яких належать зелені ділянки або локальні ущільнення, що вказують на потенційну активацію меристематичних зон.

Рис. 3.14 – Калюсоутворення на експланті *Salvia* spp. на 14-й день непрямого морфогенезу

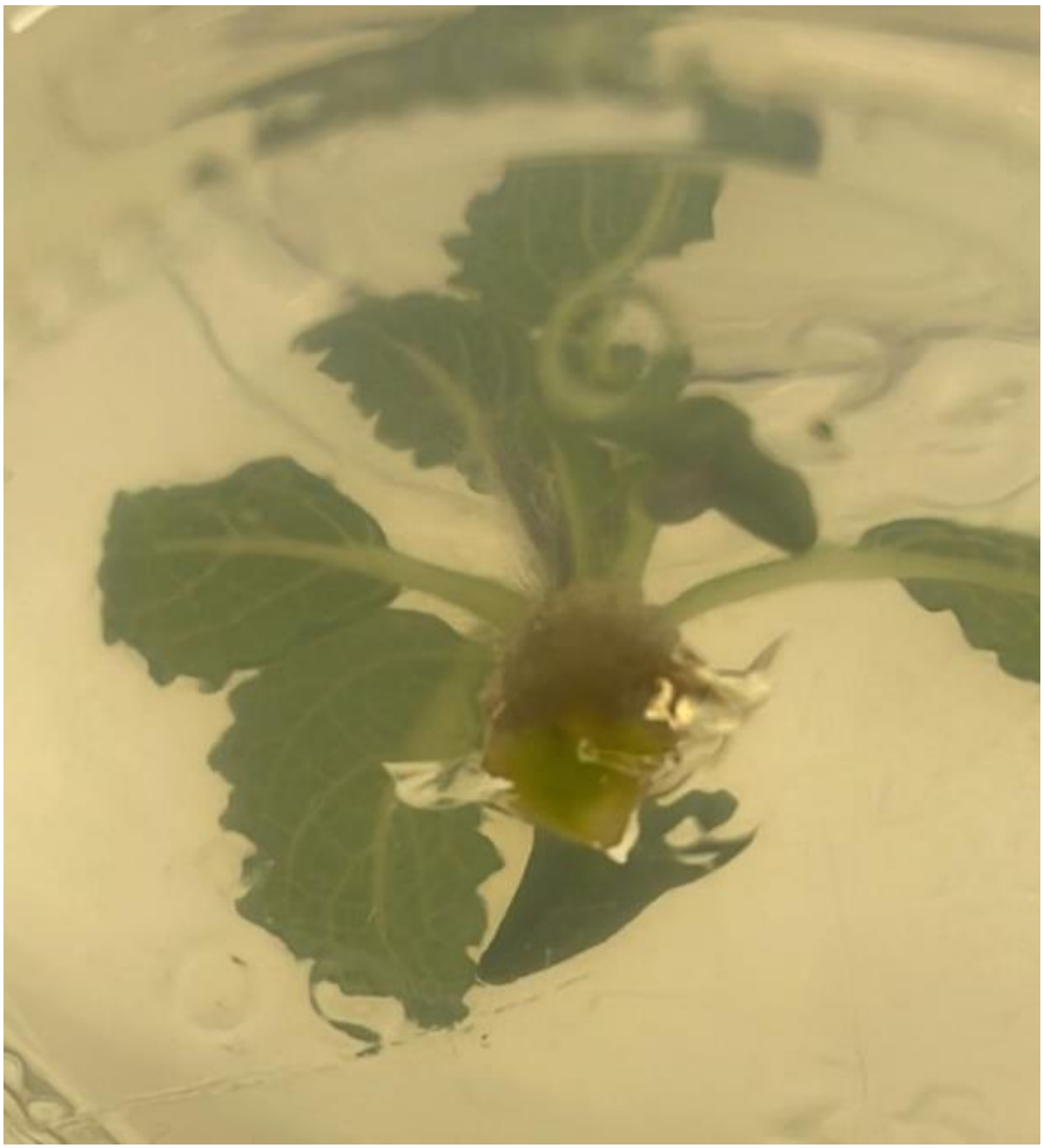

Рис. 3.15 – Калюсоутворення на експланті *Salvia* spp. на 14-й день непрямого морфогенезу (вид знизу)

Оцінювання калюсоутворення показало стійкі відмінності між трьома досліджуваними видами *Salvia* та двома варіантами середовищ (табл. 3.1). *Salvia sclarea* демонструвала найвищу реактивність протягом усього періоду спостережень. На середовищі МС+2,0БАП калюс формувався вже на ранніх термінах та зберігав повну частоту утворення на наступних етапах оцінювання. На МС+0,8БАП індукція калюсу відбувалася дещо повільніше.

Таблиця 3.1

Частота утворення калюсу (%) на 14, 21 і 28 день

	Середовище	14 день	21 день	28 день
S. sclarea	МС + 0,8БАП	50 %	100 %	100 %
	МС + 2,0БАП	100 %	100 %	100 %
S. officinalis (насіння виробника Професійне насіння)	МС + 0,8БАП	50 %	50 %	100 %
	МС +2,0 БАП	100 %	100 %	100 %
S. officinalis (насіння виробника SeedEra)	МС + 0,8БАП	50 %	50 %	100 %
	МС + 2,0БАП	50 %	100 %	100 %

У *S. officinalis* (насіння виробника Професійне насіння) калюс формувався послідовно, хоча інтенсивність процесу була нижчою, ніж у *S. sclarea*. У варіанті з МС+0,8БАП спостерігали більш поступове наростання частоти калюсоутворення, тоді як підвищена концентрація БАП прискорювало появу калюсних структур і вирівнювало показники до кінця експерименту.

Salvia officinalis (насіння виробника SeedEra) характеризувалася найнижчою здатністю до калюсоутворення. На МС+0,8БАП реакція була слабкою протягом усього періоду спостережень, а індукція калюсу відбувалася повільно і залишалася нестабільною. На середовищі МС+2,0БАП калюсоутворення активувалося швидше, однак інтенсивність процесу все одно поступалася іншим варіантам.

Колір і структура калюсу у трьох варіантах *Salvia* демонстрували стабільні відмінності, які зберігалися протягом усього періоду культивування. Найоднорідніша та передбачувану морфологію мала *S. sclarea*. Уже на 14 день її калюс був світло-кремовим і формувався рівномірно, з чіткою щільністю тканини. На 21 день структура ставала густішою й гранульованою, а до 28 дня калюс набував добре вираженої компактності та зберігав світле забарвлення (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Колір та структура калюсу на 14, 21 і 28 день

	14 день	21 день	28 день
S. sclarea	Світло-кремовий, однорідний, середньої щільності; калюс формується рівномірно	Кремовий, щільніший, поверхня стає більш гранульованою	Кремово-зеленуватий, щільний, добре структурований
S. officinalis (насіння виробника Професійне насіння)	Світлий, м'який, місцями пухкуватий	Кремовий або жовтуватий, щільність середня;	Кремовий, більш щільний
S. officinalis (насіння виробника SeedEra)	Світлий або злегка жовтуватий, пухкий	Пухкий, місцями зі слабкою прозорістю	Пухкий або напівщільний, забарвлення від світло-кремового до жовтуватого

У *S. officinalis* (насіння виробника Професійне насіння) калюс на ранньому етапі мав світлий, більш м'який вигляд і формувався нерівномірно. До 21 дня тканина ставала щільнішою, інколи з жовтуватими відтінками, а на 28 день мала стабільну структуру з помірною щільністю, характерною для середньої реактивності експлантів.

У *S. officinalis* (насіння виробника SeedEra) калюс залишався найлегшим і найпухкішим серед трьох варіантів. На початковому етапі він був світлим або злегка жовтуватим, а до 21 дня зберігав пухку структуру з окремими напівпрозорими ділянками. На 28 день тканина ставала дещо щільнішою, але загалом залишалась менш компактною порівняно з іншими видами.

Потенціал до редиференціації виявився різним для трьох досліджуваних варіантів *Salvia* (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Потенціал до редиференціації калюсу на 14, 21 і 28 день

	14 день	21 день	28 день
S. sclarea	Ознак немає	Невеликі локальні ущільнення на поверхні калюсу	Поодинокі зеленуваті ділянки, характерні для ранньої редиференціації
S. officinalis (насіння виробника Професійне насіння)	Ознак немає	Структура залишається рівномірною, без помітних змін	Місцеві слабкі ущільнення, без чітких ознак органогенезу
S. officinalis (насіння виробника SeedEra)	Ознак немає	Ознак немає	Калюс стабільний, без проявів редиференціації

Найбільш виразні зміни зафіксовано у *S. sclarea*, у якої наприкінці експерименту спостерігали поодинокі зеленуваті ділянки та локальні ущільнення поверхні калюсу, що може свідчити про підготовку тканин до подальшої диференціації. У *S. officinalis* (насіння виробника Професійне насіння) ці зміни були слабшими і проявлялися лише у вигляді незначних ущільнень на пізньому етапі культивування. Калюс *S. officinalis* (насіння виробника SeedEra) залишався морфологічно стабільним протягом усього періоду спостережень і не демонстрував ознак, пов’язаних із початком редиференціації.

Отримані результати свідчать про істотні відмінності у ростовій реакції трьох варіантів *Salvia* та їхній здатності до калюсоутворення в умовах культури *in vitro*. На етапі первинного культивування найвищу інтенсивність розвитку стабільно демонструвала *S. sclarea*, що проявлялося у швидкому нарощуванні

пагонів, формуванні розвиненої кореневої системи та кращій адаптації до середовища МС+0,8БАП і МС+2,0БАП. *S. officinalis* (насіння виробника Професійне насіння) характеризувалася помірними темпами росту, тоді як *S. officinalis* (насіння виробника SeedEra) залишалася найменш активною.

Після перенесення на індукційні середовища всі експланти формували калюсну тканину, однак інтенсивність і морфологічні ознаки калюсу залежали як від виду, так і від складу середовища. Найщільніший та найоднорідніший калюс утворювала *S. sclarea*, тоді як у *S. officinalis* (насіння виробника SeedEra) він залишався м'яким і менш структурованим. Додавання БАП сприяло прискоренню калюсоутворення та покращенню морфології тканин.

Результати дослідження свідчать, що перебіг непрямого морфогенезу у *Salvia officinalis* значною мірою залежить від фізіолого-генетичних властивостей вихідного матеріалу та складу живильного середовища. На основі отриманих спостережень можна запропонувати кілька загальних підходів для підвищення ефективності морфогенетичної відповіді.

Доцільно використовувати живильні середовища, збагачені цитокінінами, оскільки саме їх наявність стимулювала активніше калюсоутворення та сприяла рівномірнішому наростанню тканини у варіантів з нижчою реактивністю. Разом із тим підтримання збалансованого співвідношення фітогормонів залишається важливим чинником, що визначає щільність і морфологічні характеристики калюсу. Для експлантів із повільним або слабко вираженим калюсоутворенням доцільно проводити додатковий добір умов культивування, зокрема випробовувати різні комбінації регуляторів росту.

У дослідженні найкращий ріст і найстабільніший морфогенез спостерігали у варіантах, отриманих із молодших і фізіологічно активних частин пагонів, отже використання саме таких експлантів підвищує ймовірність успішного формування калюсу та забезпечує рівномірніші подальші морфогенетичні зміни в культурі тканин.

ВИСНОВКИ

1. Проведений аналіз літературних джерел показав, що *Salvia officinalis* має складну морфогенетичну організацію, високу біохімічну активність та виражену залежність морфогенезу від віку тканин, джерела експлантів і складу живильного середовища. Узагальнено дані щодо анатомічних і фізіологічних особливостей, що визначають її поведінку в культурі тканин.

2. Огляд сучасних досліджень морфогенезу роду *Salvia* у культурі *in vitro* показав, що представники групи демонструють значну мінливість у здатності до прямого та непрямого морфогенезу. Встановлено, що непрямий шлях частіше використовується для генотипів з низькою регенеративною здатністю та забезпечує ширший діапазон морфогенетичних відповідей.

3. Проаналізовано вплив біотичних та абіотичних факторів на морфогенетичні процеси шавлії. Найбільше значення мають вік тканин, ступінь їх диференціації, наявність поранення, концентрація регуляторів росту, стерильність середовища, температура та інтенсивність освітлення.

4. Визначено об’єкти й методи дослідження, оптимальні для культивування *S. officinalis* в умовах *in vitro*. Доцільним є використання молодих вегетативних органів із високою меристематичною активністю, середовища МС як базового, контрольованих світлових і температурних умов, а також поетапного субкультивування.

5. Розроблено й описано повну схему проведення експерименту, що включала стерилізацію рослинного матеріалу, первинне вирощування на МС + 0,8БАП і МС + 2,0БАП, вилучення пагонів після 14 днів культивування, індукцію калюсоутворення та подальше оцінювання калюсної тканини на 14, 21 і 28 день.

6. У ході дослідження встановлено умови формування первинного калюсу та виявлено істотний вплив складу середовища на інтенсивність калюсоутворення. *S. sclarea* продемонструвала найвищу реактивність, рівномірний світлий калюс і ранні морфологічні зміни. *S. officinalis* (насіння

виробника Професійне насіння) мала середній рівень калюсоутворення, тоді як *S. officinalis* (насіння виробника SeedEra) характеризувалася найслабшим наростанням тканини. Використання підвищеної концентрації БАП стабільно посилювало калюсоутворення у всіх варіантах.

7. На основі експериментальних даних сформульовано рекомендації щодо оптимізації умов непрямого морфогенезу *S. officinalis*: доцільно застосовувати середовище МС із додаванням цитокініну, використовувати молоді експланти з активною меристемою та своєчасно проводити субкультивування для збереження структури та життєздатності калюсу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mot M. D., Gavrilas S., Lupitu A. I., et al. *Salvia officinalis* L. Essential Oil: Characterization, Antioxidant Properties, and the Effects of Aromatherapy in Adult Patients. Antioxidants. 2022. Vol. 11, No 5. Art. 808.

2. European Medicines Agency. Assessment report on *Salvia officinalis* L., folium and *Salvia officinalis* L., aetheroleum (EMA/HMPC/150801/2015). London: EMA, 2016. 42 p.

3. Neves M., et al. Modulation of Organogenesis and Somatic Embryogenesis: The Yin and Yang of Plant Cell Totipotency. Frontiers in Plant Science. 2021. Vol. 12. Art. 664919.

4. George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 1159 p.

5. Polivanova O. B., et al. Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. Plants. 2022. Vol. 11, No 23. Art. 3313.

6. Miguel C., Marum L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany. 2011. Vol. 62, No 11. P. 3713–3725.

7. Lahlou Y., Moujabbir S., Aboukhalaf A., El Amraoui B., Bamhaou T. Antibacterial Activity of Essential Oils of *Salvia officinalis* Growing in Morocco. Rocz Panstw Zakl Hig. 2023. Vol. 74, No 4. P. 459–468.

8. Raal A., Orav A., Ilina T., et al. Variation in the Composition of the Essential Oil of Commercial *Salvia officinalis* L. Leaves Samples from Different Countries. Phyton (Int. J. Exp. Bot.). 2024. Vol. 93, No 8. P. 2051–2062.

9. Jažo Z., et al. Chemical Composition and Biological Activity of *Salvia officinalis* L. Essential Oil. Plants. 2023. Vol. 12, No 9. Art. 1794.

10. Contributeurs aux projets Wikimedia. Sauge officinale – Wikipédia. Wikipédia, l'encyclopédie libre. URL: https://fr.wikipedia.org/wiki/Sauge_officinale#/media/Fichier:Salvia_officinalis_p1150380.jpg (date of access: 05.10.2025).

11. Nanos C., Tsoulpha P., Kostas S., et al. Asexual Propagation of Greek *Salvia officinalis* L. Populations Selected for Ornamental Use. Horticulturae. 2023. Vol. 9, No 7. Art. 847.

12. Papafotiou M., et al. Investigation of the Effects of the Explant Type and Different Plant Growth Regulators on Micropropagation of Five Mediterranean *Salvia* spp. Native to Greece. Horticulturae. 2023. Vol. 9, No 1. Art. 96.

13. Contributeurs aux projets Wikimedia. Sauge officinale – Wikipédia. Wikipédia, l'encyclopédie libre. URL: https://fr.wikipedia.org/wiki/Sauge_officinale#/media/Fichier:Graines_sauge.jpg (date of access: 05.10.2025).

14. Permadi N., Akbari S. I., Prismantoro D., et al. Traditional and next-generation methods for browning control in plant tissue culture: current insights and future directions. Current Plant Biology. 2024. Art. 100339.

15. European Medicines Agency. Public statement on *Salvia officinalis* L., aetheroleum (thujone) (EMA/HMPC/41843/2009). London: EMA, 2016. 2 p.

16. Santos-Gomes P. C., Fernandes-Ferreira M. Organ- and season-dependent variation in the phenolic constituents of cultivated sage (*Salvia officinalis* L.). Plant Science. 2002. Vol. 162, No 6. P. 981–987.

17. Teixeira da Silva J. A., et al. Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal. Planta. 2020. Vol. 252. Art. 78.

18. Duţă-Cornescu G., et al. Somaclonal Variation–Advantage or Disadvantage in Medicinal Plants? Agronomy. 2023. Vol. 13, No 3. Art. 730.

19. Bethge H., Mohammadi Nakhjiri Z., Winkelmann T. Towards automated detection of hyperhydricity in plant *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2023. Vol. 154, No 3. P. 551–573.

20. Grzegorczyk-Karolak I., Hnatuszko-Konka K., Krzemińska M., et al. Cytokinin-Based Tissue Cultures for Stable Medicinal Plant Production: Regeneration and Phytochemical Profiling of *Salvia bulleyana* Shoots. Biomolecules. 2021. Vol. 11, No 10. Art. 1513.

21. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15, No 3. P. 473–497.

22. Erland L. A. E., Giebelhaus R. T., Victor J. M. R., Murch S. J., Saxena P. K. The Morphoregulatory Role of Thidiazuron: Metabolomics-Guided Hypothesis Generation for Mechanisms of Activity. Biomolecules. 2020. Vol. 10, No 9. Art. 1253.

23. Guo B., Abbasi B. H., Zeb A., Xu L. L., Wei Y. H. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. African Journal of Biotechnology. 2011. Vol. 10, No 45. P. 8984–9000.

24. Singh P., Jaiswal P. S., Jaiswal U. A two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient shoot regeneration from cotyledonary node explants of chickpea (Cicer arietinum L.). BMC Plant Biology. 2013. Vol. 13. Art. 118.

25. Lawson J. D., Bridges W., Adelberg J. IBA Delivery Technique and Media Salts Affected In Vitro Rooting and Acclimatization of Eight Prunus Genotypes. Horticulturae. 2023. Vol. 9, No 1. Art. 36.

26. Vollmer R., Espirilla J., Espinoza A., et al. Effect of Gas Exchange Rate, Vessel Type, Planting Density, and Genotype on Growth, Photosynthetic Activity, and Ion Uptake of *In Vitro* Potato Plants. Plants. 2024. Vol. 13, No 19. Art. 2830.

27. Liu Y., Zhang X., Yang S., et al. Boron and calcium deficiency disturbing the growth and pectin composition of tobacco roots. Protoplasma. 2019. Vol. 256. P. 1403–1417.

28. Pepe M., Leonardos E. D., Herppich W. B., et al. A Noninvasive Gas Exchange Method to Test and Model Photosynthetic Proficiency and Growth Rates of *In Vitro* Plant Cultures: Preliminary Implication for Cannabis sativa L. Biology (Basel). 2022. Vol. 11, No 5. Art. 729.

29. Ng M. J., Binte Mostafiz S., Johon N. S., Abdullah Zulkifli N. S., Wagiran A. Combination of Plant Growth Regulators, Maltose, and Partial Desiccation Treatment Enhance Somatic Embryogenesis in Selected Malaysian Rice Cultivar. Plants. 2019. Vol. 8, No 6. Art. 144.

30. Carrión-Pereira A. V., Takamori L. M., Yaguinuma D. H., de Oliveira A. M., Ribas A. F. Maltose in culture media improves the *in vitro* regeneration of Urochloa brizantha cv. ‘Marandu’ plants. Biotecnología Vegetal. 2019. Vol. 19, No 3. P. 205–212.

31. Long Y., Yang Y., Pan G., Shen Y. New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. Frontiers in Plant Science. 2022. Vol. 13. Art. 926752.

32. Orłowska R., Zimny J., Zebrowski J., Androsiuk P., Bednarek P. T. An insight into tissue culture-induced variation origin shared between anther culture-derived triticale regenerants. BMC Plant Biology. 2024. Vol. 24. Art. 43.

33. Kikowska M., et al. Application of temporary immersion system RITA for efficient biomass multiplication and production of artificial seeds for ex situ conservation of Linnaea borealis L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2022. Vol. 151. P. 1–14.

34. Hadri A., et al. Cytotoxic activity of α-humulene and trans-cario-phyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. An R Acad Nac Farm. 2010. Vol. 76. P. 343–356.

ДОДАТКИ

Додаток А

ЛЬВІВСЬКИЙ НАУКОВИЙ ФОРУМ

МАТЕРІАЛИ

XVI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ

ПРАКТИЧНІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ РОЗВИТКУ НАУКИ ТА ОСВІТИ

22-23 листопада 2025 року

ЗМІСТ

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ 8

Майданович Н.Р. НОВІ ПІДХОДИ ДО ВИВЧЕННЯ ОТРИМАННЯ БЕЗВІРУСНОГО ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН НА ПРИКЛАДІ SALVIA OFFICINALIS L. **8**

Павленко Ю.С., Коломієць Ю.В. ВПЛИВ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ НА МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ THUJA OCCIDENTALIS В УМОВАХ IN VITRO **10**

ДЕРЖАВНЕ УПРАВЛІННЯ 14

Мельничук Н.Б. РІВЕНЬ ПРОТИДІЇ КОРУПЦІЇ В РЕГІОНАХ СВІТУ. ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ **14**

ЕКОНОМІЧНІ НАУКИ 18

Михайлова С.С. ПОРІВНЯННЯ ЕКОНОМІЧНИХ МОДЕЛЕЙ ВЕЛИКОЇ БРИТАНІЇ ТА УКРАЇНИ: СУЧАСНИЙ СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ **18**

Пінчук В.В. FINANCIAL PERFORMANCE AND MARKET POSITION OF ASML HOLDING: A STRATEGIC ANALYSIS **22**

ІСТОРИЧНІ НАУКИ 26

Березовська Т.І. МОЛОДЬ ЯК РУШІЙ ПЕРЕОСМИСЛЕННЯ ІСТОРИЧНОЇ ПРАВДИ **26**

Гончаренко С.В., Соколова Н.Д. ВІЙСЬКОВІ ТРАДИЦІЇ УКРАЇНСЬКОГО КОЗАЦТВА **29**

Осіпік К.О. РОЛЬ ОРГАНІЗАЦІЇ ОБ'ЄДНАНИХ НАЦІЙ У СТАНОВЛЕННІ СИСТЕМИ МІЖНАРОДНОГО ЗАХИСТУ ПРАВ ЛЮДИНИ **34**

Пруденко Г.М., Запорожченко Ю.В. «САМОСТІЙНА УКРАЇНА» М.МІХНОВСЬКОГО: ГОЛОВНІ ІДЕЇ ТА ЇХ ВПЛИВ НА РОЗВИТОК УКРАЇНСЬКОГО НАЦІОНАЛІЗМУ» **37**

МЕДИЧНІ НАУКИ 39

Вояківський А., Тяпченко О.М. ЦИФРОВА ВЗАЄМОДІЯ МЕДИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ: СТАНДАРТИ ПЕРЕДАЧІ ДАНИХ У СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ **39**

Кузюра К.В., Тяпченко О.М. ЕЛЕКТРОННА МЕДИЧНА КАРТА: ПЕРЕВАГИ, ПРОБЛЕМИ ВПРОВАДЖЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ В УКРАЇНІ **41**

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

Майданович Надія Романівна
студентка,
Національний університет
біоресурсів та природокористування України,
м. Київ

НОВІ ПІДХОДИ ДО ВИВЧЕННЯ ОТРИМАННЯ БЕЗВІРУСНОГО ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН НА ПРИКЛАДІ SALVIA OFFICINALIS L.

Salvia officinalis є цінною лікарською культурою з високою біохімічною активністю. Листки та верхівки пагонів містять ефірну олію, у складі якої поєднуються туйон, камфора, цинеол та інші терпенові сполуки, а також фенольні компоненти (розмаринова кислота, флавоноїди, дубильні речовини) [1].

Завдяки такому хімічному профілю шавлія має багатостороннє використання: у фармакопеї як протизапальний та антисептичний засіб, у харчовій промисловості як пряність, у парфумерії та косметології як джерело ароматичних речовин [2]. Поєднання лікарської й господарської цінності робить цей вид привабливим об'єктом для сучасних біотехнологічних підходів, зокрема для клонального розмноження в умовах *in vitro*.

Культивування рослин *in vitro* – це метод вирощування рослинних клітин, тканин або органів у стерильних контрольованих умовах на спеціальних поживних середовищах [3]. Даний підхід забезпечує повну ізоляцію від зовнішніх контамінацій, дозволяє регулювати склад живильного середовища, концентрацію фітогормонів, освітлення та інші фактори, що впливають на ріст і розвиток.

Оптимізація умов культивування *in vitro* важлива для отримання стерильного вихідного матеріалу, стабільного росту та контролю морфогенетичних процесів. Вивчення калюсоутворення та непрямого морфогенезу дозволяє визначити реактивність різних генотипів та підвищити ефективність мікроклонального розмноження. Непрямий морфогенез у культурі рослин – це відновлення пагонів, коренів або цілої рослини через стадію калюсної тканини, коли первинна організація рослини руйнується, клітини повертаються до поділу, а далі з маси недиференційованих клітин виринають нові органи або соматичні ембріоїди [4].

Основу нашої роботи становило дослідження особливостей непрямого морфогенезу *Salvia officinalis L.* в умовах *in vitro*, що включало отримання стерильної культури експлантів, індукцію калусогенезу, оптимізацію складу поживного середовища для регенерації пагонів та подальшу їх адаптацію до умов *in vivo*.

На етапі введення експлантів у культуру *in vitro* було проведено підбір ефективної схеми стерилізації. Використання розчину «Білизни» у співвідношенні 1:3 протягом 20 хвилин забезпечило низький рівень контамінації; інфікування насіння не спостерігалося, а ефективність стерилізації становила 85%.

Перші ознаки індукції калусної тканини на експлантах шавлії лікарської спостерігалися на 14 добу культивування. Калус був світло-кремового або зеленуватого забарвлення, з пухкою або компактною текстурою залежно від складу середовища.

Активізація процесів морфогенезу та формування меристематичних ділянок у калусі відбувалася на 25 добу, що свідчило про високу морфогенетичну здатність тканин *Salvia officinalis L.* Введення та культивування здійснювали на модифікованому поживному середовищі Мурасіге і Скуга (МС) із додаванням регуляторів росту, зокрема цитокініну БАП в концентрації 0,8 мг/л, що забезпечило оптимальний баланс для індукції непрямого морфогенезу.

На 30 добу культивування були отримані добре сформовані регенеранти шавлії лікарської, що утворювались із калусної тканини через адвентивні меристеми. Мікропагони характеризувалися стабільним ростом, типовою морфологією та були придатні для подальшого вкорінення й адаптації до умов *ex vitro*.

Отримані результати підкреслюють актуальність подальших досліджень, спрямованих на удосконалення технологій розмноження рослин в лабораторних умовах, а саме непрямого морфогенезу. Розробка таких підходів дозволить стандартизувати отримання безвірусних та високопродуктивних зразків, оптимізувати їх ріст і розвиток, а також створити передумови для впровадження сучасних технологічних рішень у виробництво ефіроолійних культур.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mot M. D., Gavrilas S., Lupitu A. I., et al. Salvia officinalis L. Essential Oil: Characterization, Antioxidant Properties, and the Effects of Aromatherapy in Adult Patients. Antioxidants. 2022. Vol. 11, No 5. Art. 808.

2. European Medicines Agency. Assessment report on Salvia officinalis L., folium and Salvia officinalis L., aetheroleum (EMA/HMPC/150801/2015). London: EMA, 2016. 42 p.

3. Каралія Е., Дахія С., Тарковський П. та Зелькович С.Ц. (2022). Вплив екологічних стресів, пов'язаних із кліматом, на економічно важливі ефірні олії середземноморської шавлії sp. Front Plant Sci., 4 травня 13, 864807. doi:10.3389/fpls.2022.864807.

4. Neves M., et al. Modulation of Organogenesis and Somatic Embryogenesis: The Yin and Yang of Plant Cell Totipotency. Frontiers in Plant Science. 2021. Vol. 12. Art. 664919.

ЛЬВІВСЬКИЙ НАУКОВИЙ ФОРУМ

СЕРТИФІКАТ

№ 25-3001

Даний сертифікат підтверджує, що

Майданович Надія Романівна

взяв(ла) участь у роботі

XVI Міжнародній науково-практичній конференції

«Практичні та теоретичні питання розвитку науки та освіти»

тривалістю 15 годин / 0,5 кредиту ЄКТС

22-23 листопада 2025 року

Голова оргкомітету конференції

В. Бондар