УДК 633.81: 578.085.2

Клональне мікророзмноження *in vitro* ефіроолійних рослин родини *Lamiaceae Lindl.*

Анотація. Актуальність дослідження щодо розробки біотехнології клонального мікророзмноження рослин родини *Lamiaceae* Lindl. зумовлюється необхідністю масового одержання оздоровленого чистосортного садивного матеріалу для закладання промислових плантацій та розширення площ ефіроолійних культур в Україні. Метою досліджень було розробити біотехнологічні заходи клонального мікророзмноження ефіроолійних рослин родини *Lamiaceae* – *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha x piperita* L., *Salvia officinalis* L. і *Monarda fistulosa* L. Завдання досліджень – підібрати оптимальні умови для ефективного культивування рослин родини *Lamiaceae* на чотирьох етапах клонального мікророзмноження. Основні методи дослідження: лабораторний, польовий, аналітичний і математико-статистичний. Визначено оптимальні для індукції морфогенезу *in vitro* та етапу мультиплікації живильні середовища на основі базового середовища Мурасиге і Скуга: для *L. angustifolia* доповнене кінетином (1,0 мг/л) і гібереловою кислотою (1,0 мг/л), для *M. x piperita* – 6-бензиламінопуріном (1,0 мг/л) і гібереловою кислотою (0,1 мг/л), для *S. officinalis* – 6-бензиламінопуріном (1,0 мг/л) та ІОлК (0,5 мг/л), для *M. fistulosa* – 6-бензиламінопуріном (1,0 мг/л) та β-індоліл-3-олійною кислотою (0,1 мг/л). На етапі мультиплікації доцільно проводити сім-вісім циклів культивування. На етапі укорінення мікропагонів найбільш ефективним для усіх досліджуваних видів рослин визначено живильне середовище Мурасиге і Скуга зі зменшеною вдвічі концентрацією компонентів, доповнене β-індоліл-3-олійною кислотою (0,5 мг/л) та β-індоліл-3-оцтовою кислотою (0,5 мг/л). Оптимальним для адаптації рослин до умов *in vivo* визначено субстрат торф: перліт у співвідношенні за об'ємом 3:1. Включення розробленої біотехнології клонального мікророзмноження до системи насінництва ефіроолійних культур родини *Lamiaceae* дозволить прискорено одержувати оздоровлений чистосортний садивний матеріал та впроваджувати нові продуктивні сорти у виробництво

Ключові слова: *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha x piperita* L., *Salvia officinalis* L., *Monarda fistulosa* L.,коефіцієнт розмноження

Вступ

Родина *Lamiaceae* Lindl. є однією з найбільших родин квіткових рослин, що включає близько 250 родів і понад 7000 видів, поширених по всьому світу. Вважається важливим джерелом ефірних олій і таких цінних їх компонентів як ментол, гераніол, евкаліптол, камфора та тимол (Mesquita et al., 2019). Рослини цієї родини – це трави або чагарники, які виробляють велику кількість ефірної олії, що дозволяє їм витримувати високі температури влітку (Raja, 2012).

Ефірні олії у різних видів рослин накопичуються у різних органах: квітках, листках, плодах, насінні, кореневищах та інших. До складу цих летких ароматичних речовин входить суміш органічних сполук: вуглеводнів, спиртів, монотерпенів, фенолів, ефірів, альдегідів, кетонів та органічних кислот (Rozhkov & Ogurcov, 2017; Dehsheikh et al., 2020). Отримують ефірну олію шляхом парової перегонки, вона має заспокійливі, діуретичні, загальнозміцнюючі, спазмолітичні та антисептичні властивості (Raja, 2012). Використовують її у фармацевтичній промисловості, парфумерії, косметології та харчовій галузі (Rozhkov & Ogurcov, 2017). Останніми науковими дослідженнями доведено протипухлинні властивості ефірних олій із рослин родини *Lamiaceae* (Mesquita et al., 2019). Види даної родини є перспективними потенційними джерелами природних антиоксидантів завдяки високому вмісту поліфенолів. Крім того, все більше наукових та епідеміологічних даних пов'язує

споживання продуктів, багатих поліфенолами, з перевагами для здоров'я, такими як зниження ризику серцево-судинних захворювань через протизапальну дію (Tzima et al., 2018).

В Україні як ефіроолійні рослини родини *Lamiaceae* культивують лаванду вузьколисту, м'яту перцеву, шавлію лікарську, шавлію мускатну, монарду, гісоп, мелісу, непету, розмарин, чабер та інші (Rozhkov & Ogurcov, 2017). У сучасних умовах важливими є агроекологічні переваги вирощування рослин цієї родини, такі як здатність рости на малопродуктивних еродованих ґрунтах, формувати стійкі фітоценози на техногенно порушених землях та виступати як фітомеліоранти (Dobrovolskyi et al., 2021).

Лаванда вузьколиста *Lavandula angustifolia* Mill. – багаторічний вічнозелений напівчагарник, що містить 1-2,5% ефірних олій у суцвіттях (Lis-Balchin, 2002; Manushkina, 2019). Основними компонентами ефірної олії лаванди є ліналоол (10-20%) і ліналілацетат (30-50%) (Küçük et al., 2018; Pokajewicz et al., 2021).

М'ята перцева *Mentha x piperita* L. – багаторічна трав'яниста рослина, яка є гібридним видом м'яти, що не зустрічається в дикому вигляді. Ефірні олії містяться в усіх надземних органах рослин: листках (2-4%), суцвіттях (4-6%), стеблах (до 0,3% маси сухої речовини). Як сировину використовують надземні частини рослин у зів'ялому стані або сухе листя. Основні компоненти ефірної олії м'яти перцевої є ментол (41-92%), ментон (9-25%), пінен, лімонен та інші речовини, а також фенольні сполуки з антиоксидантними властивостями (Rozhkov & Ogurcov, 2017).

Шавлія лікарська *Salvia officinalis* L. – багатостебловий напівчагарник, що досягає у висоту 80 см. Основними біологічно активними речовинами є фенольні сполуки (флавоноїди, таніни, гідроксикоричні кислоти) і терпеноїди (Jasicka-Misiak et al., 2018). Різні лікарські форми, що створені на основі поєднання цих груп біологічно активних речовин із рослинної сировини характеризуються високим антимікробним та антиоксидантним потенціалом лікарських засобів на основі шавлії лікарської (Hudz et al., 2020; Schmiderer & Novak, 2020; Francik et al., 2020). Вміст фенольних кислот та флафоноїдів залежить від сорту рослин та екологічних умов вирощування (Ćavar Zeljković et al., 2021; Karalija et al., 2022).

Монарда трубчаста *Monarda fistulosa* L. – багаторічна трав'яниста ефіроолійна та декоративна рослина. Ефірна олія має антисептичні, відхаркувальні і репелентні властивості (Shanajda & Mashtaler, 2016). Відноситься до неофіцинальних лікарських рослин, не занесена до Державної фармакопеї України, проте є перспективною до використання ефіроолійною рослиною (Shanajda & Pokryshko, 2015).

У зв'язку із зазначеними економічними та екологічними перевагами ефіроолійних рослин родини *Lamiaceae* доцільним є збільшення їх площ в Україні, зокрема, вирощування їх як нішевих культур. Від чистосортності садивного матеріалу, що використовується для закладання плантацій, значно залежить урожайність, вихід і якість ефірної олії. Оскільки у багатьох видів родини *Lamiaceae* за насіннєвого розмноження спостерігається розщеплення за господарсько цінними ознаками, у насінництві застосовується вегетативне розмноження. Цей спосіб дозволяє підтримувати генетичну ідентичність садивного матеріалу, проте має низький коефіцієнт розмноження та високу вірогідність перенесення інфекційних хвороб.

Наразі для ефективного вегетативного розмноження рослин доцільно застосовувати метод клонального мікророзмноження у культурі *in vitro,* який характеризується високим коефіцієнтом розмноження, збереженням генотипу, оздоровленням від патогенів садивного матеріалу. За сучасною класифікацією виділяють два типи клонального мікророзмноження – активація розвитку вже наявних у рослині меристем та індукція розвитку бруньок або ембіоїдів *de novo* шляхом прямого або непрямого морфогенезу. Для більшості рослин розмноження в культурі *in vitro* здійснюють за першим типом, оскільки він забезпечує збереження генотипу одержаних саджанців ідентичного до вихідних рослин. Підтримання генетичної стабільності апікальних меристем забезпечується рядом механізмів: клітини містять диплоїдний набір хромосом, підтримуються в ембріонально активному стані, вони

організовані у вигляді дискретних зон, які характеризуються високою активністю систем репарації ДНК і негативною селекцією змінених клітин. У зв'язку із зазначеним актуальними є дослідження щодо розробки технологічних заходів клонального мікророзмноження ефіроолійних рослин родини *Lamiaceae* для масового одержання чистосортного садивного матеріалу.

Завдання досліджень – підібрати оптимальні умови для ефективного культивування рослин родини *Lamiaceae* на чотирьох етапах клонального мікророзмноження.

Метою досліджень було розробити біотехнологічні заходи клонального мікророзмноження ефіроолійних рослин родини *Lamiaceae L. angustifolia* Mill*., M. x piperita* L*., S. officinalis* L*., M. fistulosa* L.

Матеріали та методи

Експериментальну роботу проводили на базі лабораторії клонального мікророзмноження Фермерського господарства «Агролайф» (далі – ФГ «Агролайф») Миколаївської області – філії кафедри землеробства, геодезії та землеустрою Миколаївського національного аграрного університету. Як матеріал для проведення досліджень використовували рослини лаванди вузьколистої *L. angustifolia* сортів Синєва, Хемус, Імперіал Джем*,* м'яти перцевої *M. x piperita* L. сортів Лебедина пісня, Мама*,* шавлії лікарської *S. officinalis* L. сорту Шанс*,* монарди трубчастої *Monarda fistulosa* L. сорту Фортуна.

Основні методи дослідження: загальнонаукові (аналіз, синтез, узагальнення) та спеціальні (лабораторний, польовий). У ході проведення експериментальних досліджень застосовували загальноприйняті у біотехнології рослин методи (Kalinin et al., 1984; Kumar & Loh, 2012).

Розробку біотехнологічних заходів проводили на чотирьох етапах клонального мікророзмноження: I етап – ізолювання експланта, введення й ініціація його розвитку в умовах *in vitro*; II етап – мультиплікація; III етап – укорінення мікропагонів; IV етап – адаптація мікророслин до умов *in vivo*.

На I та II етапах використовували як базове живильне середовище Мурасиге і Скуга (МС) (Murashige & Skoog, 1962). На III етапі як базове застосовували живильне середовище МС зі зменшеною вдвічі концентрацією компонентів (½ МС). На перших трьох етапах клонального мікророзмноження змінювали склад гормонів у живильному середовищі у різних поєднаннях та концентраціях для стимулювання необхідного шляху морфогенезу (таблиця 1).

Таблиця 1. Гормони, що включали до складу живильних середовищ для клонального мікророзмноження рослин родини *Lamiaceae*

Назва гормону українською мовою		**Назва гормону англійською мовою**	
Повна назва	**Умовне позначення**	**Повна назва**	**Умовне позначення**
6-бензиламінопурін	БАП	6-benzyloaminopurine	BAP
6-фурфуриламінопурін	кінетин	6-furfurilaminopurin	kinetin
гіберелова кислота	ГК	gibberellic acid	GA
β-індоліл-3-олійна кислота	ІОлК	β-indolyl-3-butyric acid	IBA
β-індоліл-3-оцтова кислота	ІОцК	β-indolyl-3-acetic acid	IAA

Джерело: *авторська розробка*

Кислотність середовища доводили до pH 5,5-5,6 з допомогою 0,1н HCl або 0,1н KOH перед автоклавуванням. Живильне середовище автоклавували при температурі 120 ºС, тиску 0,8 атм. протягом 20 хв.

Донорні рослини вирощували в умовах закритого ґрунту. Пагони відділяли від рослини, промивали у мильному розчині, відмивали у проточній воді та у стерильній дистильованій воді. Потім їх розділяли на відрізки з однією парою бруньок і застосовували

ступінчасту стерилізацію за схемою: етанол 70%-й розчин (40 с), гіпохлорит натрію 1%-й розчин (5 хв). Після стерилізації виділяли верхівкові або пазушні бруньки та вводили в культуру *in vitro*. Асептичну роботу проводили в ламінарному боксі ББП02а. Виділення експлантів проводили під бінокулярним мікроскопом МБС-9 та культивували по одному у хімічних пробірках з об'ємом живильного середовища 10 мл.

На етапі мультиплікації мікропагони, розвиток яких ініційовано на першому етапі, розділяли на мікроживці довжиною 5-10 мм з однією парою пазушних бруньок і відділяли додаткові мікропагони та культивували у посудинах об'ємом 250 мл із об'ємом живильного середовища 30 мл. У одну культуральну посудину вносили 6 експлантів.

На етапі укорінення основний пагін одержаних меристемних рослин розрізали на мікроживці довжиною 5-10 мм з однією парою листків, а також відділяли додаткові мікропагони. Культивували у посудинах об'ємом 250 мл із об'ємом живильного середовища 30 мл по 6 мікропагонів. Для стимулювання ризогенезу до живильного середовища додавали ауксини.

На трьох етапах клонального мікророзмноження *in vitro* експланти культивували в термостатованій культуральній кімнаті. Умови культивування: температура 25-26 С, освітленість 2-3 клк, фотоперіод 16 годин, відносна вологість повітря 60-70 %.

На етапі адаптації до умов *in vivo* мікророслини вирощували у касетах в кліматичних камерах за температури 20-22 ºС і постійного зволоження, при періодичному провітрюванні, час якого збільшували при збільшенні терміну адаптації. Субстрати для культивування у касетах складалися з торфу та перліту в різних співвідношеннях за об'ємом – 1:1; 2:1; 3:1; 4:1; 5:1. Адаптовані рослини пересаджували у горщики об'ємом 250 мл та культивували в умовах кліматичної камери упродовж 30–56 діб залежно від виду рослин.

Повторність усіх експериментів двократна, обсяг вибірки – 20 рослин.

Коефіцієнт розмноження розраховували за формулою 1:

$$КР = \frac{Чр \times Коп \times Кпл}{100} + Чудп \quad Кдп \qquad (1)$$

де *Чр* – частота регенерації, %,
Коп – кількість основних пагонів, шт.,
Кпл – кількість пар листків на основному пагоні, шт.,
Чудп – частота утворення додаткових пагонів, %,
Кдп – кількість додаткових пагонів, шт.

Математичну обробку результатів виконували у програмі Microsoft Office Excel 2007 методом описової статистики (Rozhkov et al., 2016). Розраховували статистичні характеристики кількісної мінливості: середню арифметичну ( ), помилку середньої арифметичної (S) Достовірність різниці між середніми величинами визначали за t-критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

І етап – ізолювання експланта, введення й ініціація його розвитку в умовах *in vitro.* Після застосування ступінчастої стерилізації з використанням етанолу та гіпохлориту натрію інфікованість експлантів усіх видів рослин не перевищувала 15 %, життєздатність становила не менше 80 %. Частота регенерації досягала 90,0-100,0 %. Проте гормональний склад живильних середовищ значно впливав на формування пагонів, а отже, і на коефіцієнт розмноження, який є інтегральним параметром, що включає частоту регенерації та формування основного і додаткових пагонів (рис. 1).

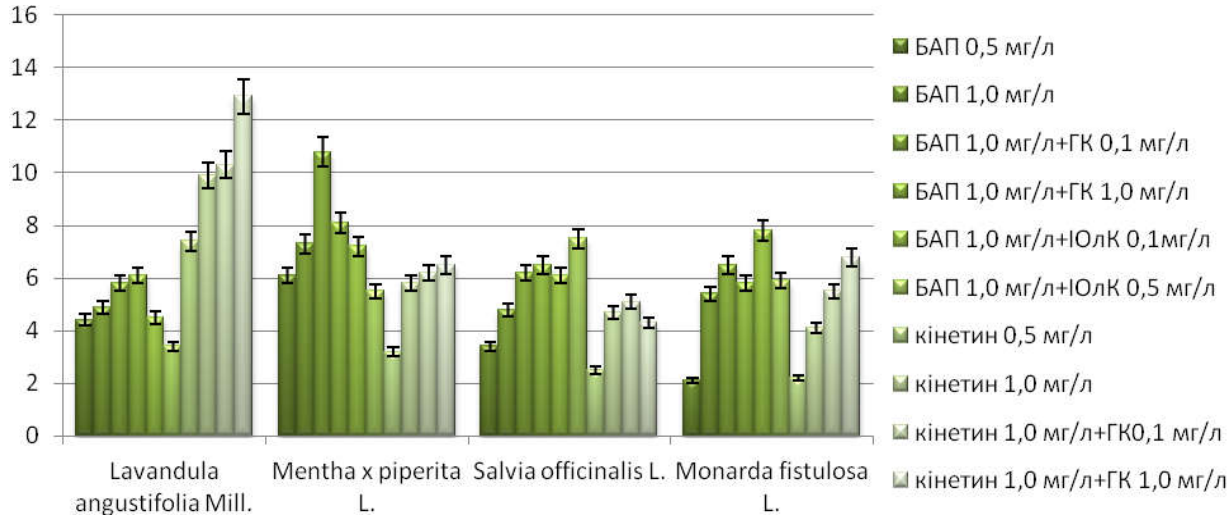

Рисунок 1. Коефіцієнт розмноження рослин родини *Lamiaceae* на етапі ізолювання експланта, введення й ініціації його розвитку в умовах *in vitro* залежно від складу гормонів
Джерело: *авторська розробка*.

Визначено, що оптимальними для індукції морфогенезу *in vitro* є живильні середовища на основі базового середовища МС: для *Lavandula angustifolia* Mill. доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л), для *Mentha x piperita* L. – БАП (1,0 мг/л) та ГК (0,1 мг/л), для *Salvia officinalis* L. – БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,5 мг/л), для *Monarda fistulosa* L. – БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,1 мг/л).

ІІ етап – мультиплікація. На другому етапі мультиплікація пагонів досягається двома шляхами. По перше, за рахунок додавання до живильного середовища підвищених концентрацій цитокінінів для зняття апікального домінування та стимулювання розвитку бічних і адвентивних бруньок. По друге, за рахунок проведення декількох циклів субкультивування до одержання необхідної кількості пагонів. Поєднуючи ці два шляхи, за рік можливо досягати коефіцієнта розмноження до 10^5-10^6 (Kalinin et al., 1984). На етапі мультиплікації оцінювали ефективність гормонального складу живильних середовищ за показником коефіцієнта розмноження (рис. 2).

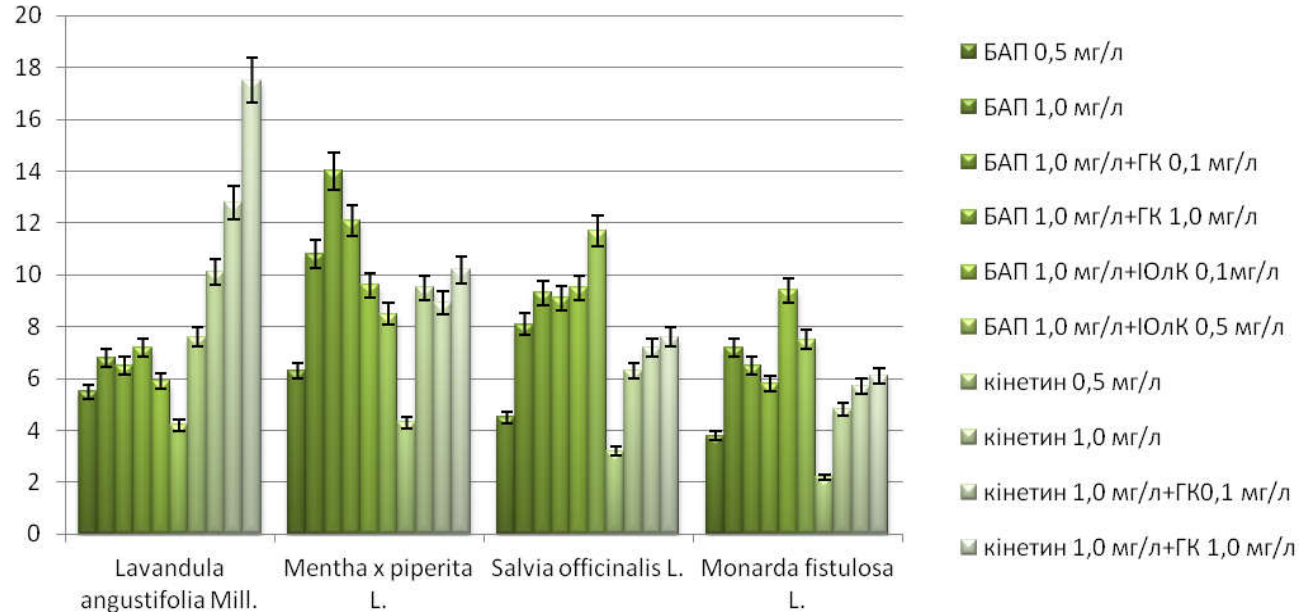

Рисунок 2. Коефіцієнт розмноження рослин родини *Lamiaceae* на етапі мультиплікації залежно від складу гормонів

Джерело: *авторська розробка.*

Установлено, що для культивування *in vitro* рослин *L. angustifolia* на етапі мультиплікації оптимальним є живильне середовище МС із додаванням кінетину (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л), що забезпечувало найвищий коефіцієнт розмноження – 17,5. Відмічено тенденцію, що живильні середовища із додаванням кінетину більше стимулювали процес формування пагонів порівняно із цитокініном БАП, за використання якого формувалися вітрифіковані пагони (до 65 %), які не припустимо використовувати для подальшого мікророзмноження. Додавання ГК сприяло збільшенню довжини міжвузль пагонів, що дозволяє розділяти їх на окремі мікроживці з однією парою бруньок для подальшого культивування у наступному циклі, а відповідно, збільшує коефіцієнт розмноження. Включення до живильних середовищ, що містили БАП, ауксину ІОлК зумовлювало формування калюсу біля основи живця, при чому зі збільшенням концентрації збільшувалася частота та інтенсивність калюсогенезу. Формування калюсу є недопустимим при клональному мікророзмноженні, оскільки можливі прояви непрямого гемогенезу та формування сомаклональних варіантів.

Для культивування експлантів *M. x piperita, S. officinalis* та *M. fistulosa* додавання до базового живильного середовища МС БАП було більш сприятливим для стимулювання гемогенезу порівняно із кінетином. На середовищах із БАП відмічено розвиток більшої кількості додаткових та адвентивних пагонів, при цьому не спостерігалося їх вітрифікації як у експлантів *L. angustifolia.* Додавання ГК або ІОлК сприяло оптимізації розвитку пагонів. Визначено оптимальні для індукції морфогенезу *in vitro* та етапу мультиплікації живильні середовища на основі базового середовища МС: для для *M. x piperita* – БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,1 мг/л), для *S. officinalis* – БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,5 мг/л), для *M. fistulosa* – БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,1 мг/л).

На етапі мультиплікації розмноження мікроропагонів можна здійснювати за декілька циклів культивування для досягнення необхідної кількості рослин, тому доцільним є вивчення впливу циклу мікророзмноження на морфогенез у культурі *in vitro*. Це дозволяє з'ясувати можливість проводити субкультивування без зміни морфометричних параметрів і коефіцієнта розмноження. Динаміка коефіцієнта розмноження рослин родини *Lamiaceae* упродовж десяти циклів культивування залежала від виду рослин (рис. 3).

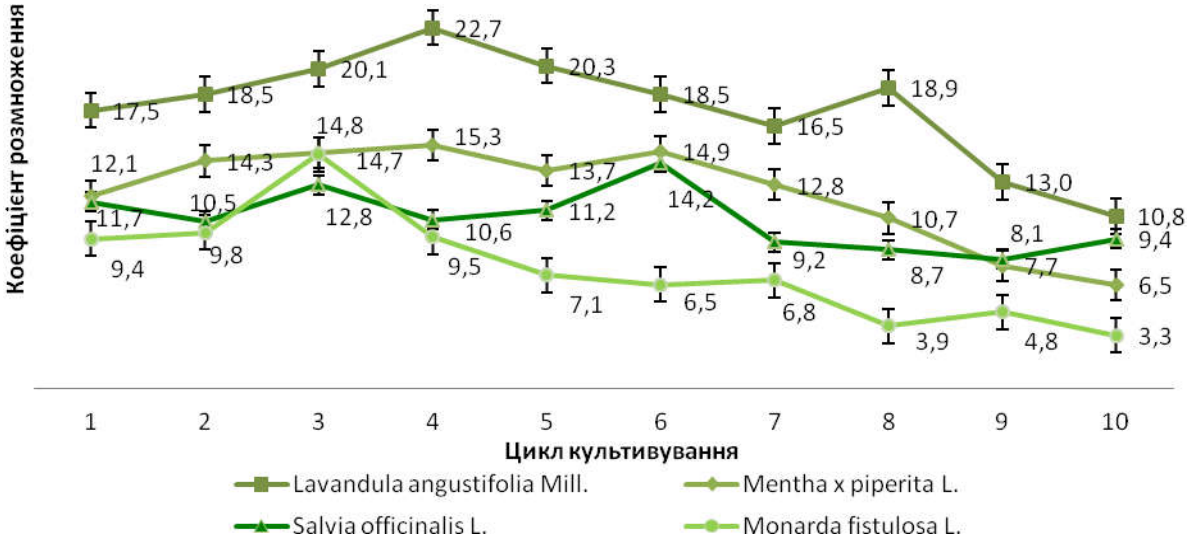

Рисунок 3. Коефіцієнт розмноження рослин родини *Lamiaceae* залежно від циклу культивування

Джерело: *авторська розробка.*

Найвищий коефіцієнт розмноження відмічено у рослин *L. angustifolia*, він коливався у межах 16,5-22,7 і залишався стабільно високим з 1-го по 8-й цикл культивування, а знижувався до 10,8-13,0 у 9-10-му циклах. У рослин *M. x piperita* спостерігалася аналогічна тенденція, стабільним коефіцієнт розмноження зберігався упродовж восьми циклів культивування у межах 10,7-15,3, а в подальших циклах зменшувався до 8,1-6,5. Коефіцієнт розмноження *S. officinalis* був найвищим у 6-му циклі культивування – 14,2, найнижчим – 7,7 у 9-му пасажі, та дещо збільшувався до 9,4 у 10-му пасажі. Коефіцієнт розмноження *M. fistulosa* був найнижчим із досліджуваних видів рослин і коливався у межах 6,5-9,4 упродовж 1-7 циклів культивування, за винятком 3-го циклу, коли даний параметр був максимальним – 14,7. Істотне зниження коефіцієнту розмноження до 4,8-3,3 спостерігалося у 7-10 циклах.

Одержані дані дозволяють рекомендувати при клональному мікророзмноженні рослин родини *Lamiaceae* проводити сім-вісім циклів культивування, упродовж яких вони зберігають високі морфогенетичні потенції та забезпечують стабільний коефіцієнт розмноження 6,5-22,7 залежно від біологічних особливостей виду.

ІІІ етап – укорінення мікропагонів. Стимулювання ризогенезу у рослин здійснюється під впливом ауксинів, що індукують поділ клітин паренхіми пагона, внаслідок чого в його базальній частині відбувається диференціація кореневих зачатків.

Показано, що для укорінення в умовах *in vitro* мікропагонів рослин родини *Lamiaceae* оптимальним є живильне середовище ½ МС, доповнене ІОлК (0,5 мг/л) та ІОцК (0,5 мг/л) (рис. 4). На даному живильному середовищі частота укорінення становила 80,0-97,5 %, також формувалися пагони найбільшої висоти – 56,8-51,5 мм та найбільша кількість коренів – 3,5-4,7 шт.

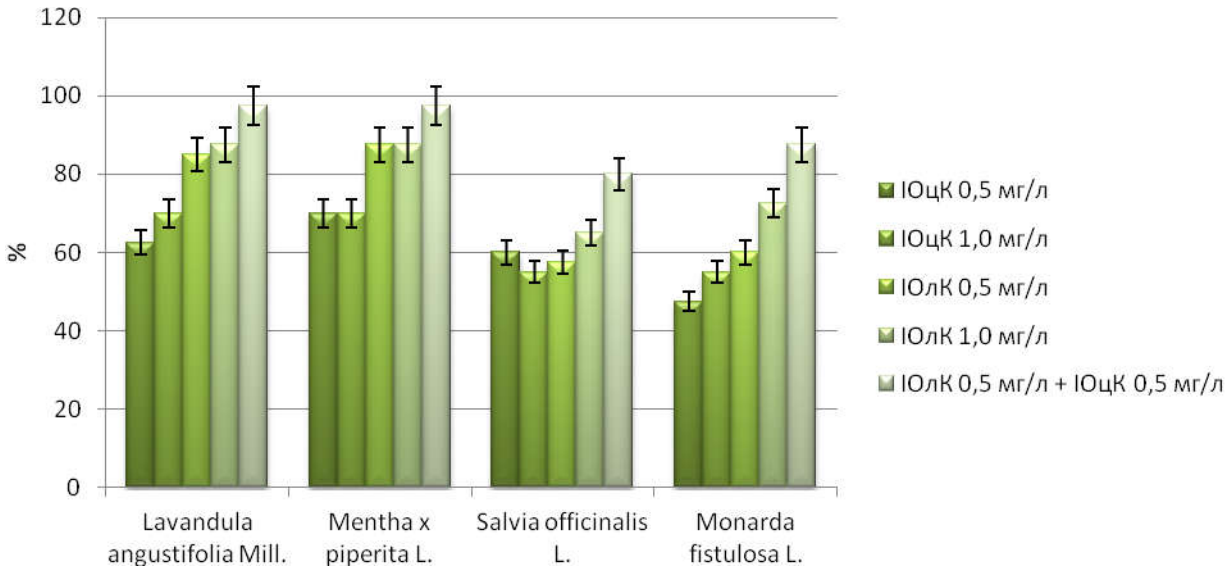

Рисунок 4. Частота укорінення мікропагонів рослин родини *Lamiaceae* залежно від складу ауксинів

Джерело: *авторська розробка.*

Очевидно, що ауксини ІОлК та ІОцК у поєднанні забезпечували ефект синергізму. При додаванні кожного окремо вони діяли менш ефективно навіть у концентрації 1,0 мг/л. Частота регенерації була достовірно нижчою порівняно із цим показником на середовищі з поєднанням ауксинів. Також при збільшенні концентрації ауксинів до 1,0 мг/л спостерігали пригнічення росту пагона.

IV етап – адаптація мікророслин до умов *in vivo.* Під час переведення рослин із умов *in vitro* в умови *in vivo* змінюються параметри культивування – температура, відносна вологість повітря, субстрат, освітленість. Тому важливо розробити заходи адаптації, які сприяють оптимальному виживанню мериклонів.

У рослин родини *Lamiaceae* через 7-10 діб залежно від виду були добре помітні ознаки відростання пагонів та формування кореневої системи. Визначено, що для адаптації меристемних рослин достатньо 14-20 діб, за які формувалося 2-3 пари листків. Слід зазначити, що приживлюваність меристемних рослин та їх ріст значно залежали від складу субстрату. Установлено, що оптимальним субстратом для адаптації є торф: перліт у співвідношенні за об'ємом 3:1, на якому приживлюваність усіх видів рослин, що досліджувалися, становила 82,5-100,0 %, тоді як при збільшенні чи зменшенні частки перліту у суміші даний показник зменшувався.

Упродовж періоду адаптації та вирощування у колекційному розсаднику меристемні рослини усіх видів, що досліджувалися, мали типові для сортів морфологічні ознаки. З метою подальших досліджень процесів росту і розвитку рослин, одержаних у культурі *in vitro,* закладено модельний дослід у колекційному розсаднику МНАУ, при цьому приживлюваність рослин становила 95,0-100,0 %.

У результаті проведених експериментів досліджено процеси морфогенезу у культурі *in vitro L. angustifolia, M. x piperita, S. officinalis* і *M. fistulosa* та розроблено технологічні заходи на чотирьох етапах клонального мікророзмноження (рис. 5).

а б в

г

д е є

Рисунок 5. Розвиток рослин родини *Lamiaceae* на різних етапах клонального мікророзмноження: а – *M. fistulosa* (I етап); б – *L. angustifolia* (II етап)*;* в – *M. x piperita* (III етап); г – *S. officinalis* (II етап); д – *L. angustifolia* (IV етап); е – *L. angustifolia* (колекційний розсадник); є – *M. x piperita* (колекційний розсадник).

Джерело: *авторська розробка.*

Виявлені особливості культивування, зокрема, оптимальний склад живильного середовища, коефіцієнт розмноження та його динаміка залежно від циклу культивування, умови укорінення та адаптації мікророслин відрізнялися для *L. angustifolia, M. x piperita, S. officinalis* і *M. fistulosa*. Для клонального мікророзмноження *L. angustifolia* найбільш ефективним на етапах введення в культуру *in vitro* та мультиплікації визначено живильне середовище на основі базового середовища МС, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л). D. Leelavathi & N. Kuppan (2013), T. Manushkina (2017) також вказують, що використання кінетину вплинуло на формування більшої кількості пагонів без морфологічних змін у *L. angustifolia*. A. Hamza, O. Abd El-Kafie & M. Kasem (2011), D. Andrys, D. Kulpa, M. Grzeszczuk, M. Bihun & A. Dobrowolska (2017) виявили, що найбільшу кількість пагонів утворили рослини, які вирощували на середовищі з БАП (0,8-2,0 мг/л). За даними A. Kumar, S. Kaushal, & S. Sharma (2015), використання МС з додаванням цитокініну БАП (2,0 мг/л) та ауксину ІОцК (0,5 мг/л) впливає на збільшення кількості пагонів. Дане дослідження показало, що культивування сортів, взятих на вивчення, на живильному середовищі МС із додаванням БАП (1,0 мг/л) стимулювало розвиток пагонів, проте 65 % із них були вітрифікованими, надмірно гідратованими, а додавання до живильного середовища БАП разом з ІОлК зумовлювало формування калюсу біля основи

живця. Обидва процеси є недопустимими при клональному мікророзмноженні. J. Koefender, C. Manfio, J. Camera, A. Schoffel & D. Golle (2021) також відмічали надмірну гідратованість у рослин *Lavandula dentata* за культивування на середовищі МС із додаванням БАП (5,0 мкМ).

Для *M. x piperita* визначено, що на перших двох етапах культивування оптимальним є живильне середовище МС, доповнене БАП (1,0 мг/л) і ГК (0,1 мг/л). Такі результати узгоджуються із отриманими у роботі A. Islam, M. Islam & M. Alam (2017), у якій застосовували вказані гормони, але поетапно. Найбільшу кількість пагонів отримали на середовищі, що містило БАП (3,0 мг/л). Для подальшого подовження мікропагони переносили на середовища з різною концентрацією ГК. Найбільша довжина пагонів із частотою 100% була досягнута на середовищі з вмістом 1,0 мг/л ГК. У роботі T. Talankova-Sereda, Yu. Kolomiets & P. Hrygoriuk (2016) також як оптимальне визначено середовище МС, доповнене БАП (0,75 мг/л) і ГК (0,5 мг/л), але додатково застосовували аденін та ІОцК у концентрації 0,05 мг/л.

Ініціація розвитку та мультиплікація пагонів у культурі *in vitro S. officinalis* найбільш ефективно відбувалися на живильному середовищі МС із додаванням БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,5 мг/л), а *M. fistulosa* – із додаванням БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,1 мг/л). Подібні результати представили M. Petrova, M. Nikolova, L. Dimitrova & E. Zayova (2015), які показали максимальну проліферацію пагонів із сегментів проростків, отриманих *in vitro,* при культивуванні в середовищі МС, доповненому БАП (2,22 мкМ) та ІОлК (0,57 мкМ). I. Grzegorczyk-Karolak, K. Hnatuszko-Konka, M. Krzemińska, M. Olszewska & A. Owczarek (2021) підчас клонального мікророзмноження *Salvia bulleyana* на основі листкових сегментів найвищу частоту регенерації (95%) отримали на середовищі МС, що містило БАП (2,0 мг/л) і нафтилоцтову кислоту (НОК) (0,1 мг/л). Разом із тим, дослідники P. Santos-Gomes & M. Fernandes-Ferreira (2003) показали, що найбільше накопичення ефірних олій і найбільший приріст біомаси пагонів було отримано при додаванні до середовища кінетину (2,0 мг/л) та 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (0,05 мг/л).

На етапі укорінення мікропагонів рослин родини *Lamiaceae* найвищу частоту укорінення (80,0-97,5 %) забезпечено на живильному середовищі ½ МС, доповненому ІОлК (0,5 мг/л) та ІОцК (0,5 мг/л). Такі ж ауксини у концентрації 0,5-2,0 мг/л використані у роботі (Islam et al., 2017) для укорінення мікропагонів *M. x piperita.* Серед них найбільшу проліферацію коренів було отримано на середовищі, що містить ІОлК (1,5 мг/л). J. Łyczko, K. Piotrowski, K. Kolasa, R. Galek & A. Szumny (2020) виявлено високий ступінь укорінення (97-100 %) на середовищі МС із додаванням ІОлК (0,5 мг/л). У роботі (Andrys et al., 2017) показано значний вплив генотипу *L. angustifolia* на процес укорінення. Для двох сортів оптимальний вплив на довжину коренів відмічено на живильному середовищі ¼ МС із додаванням 0,2 мг/л ІОлК або (НОК), тоді як для третього сорту найкращі результати одержано на середовищі МС із додаванням 0,2 мг/л НОК. У роботі (Hamza et al., 2011) виявлено, що використання середовища ½ МС із додаванням НОК (1,0 мг/л) призвело до більшої кількості коренів, однак ІОлК (2,0 мг/л) найбільш позитивно впливало на довжину коренів.

Приживлюваність рослин, одержаних методом клонального мікророзмноження, у польових умовах становила 95,0-100,0 %. Аналогічні результати отримали у роботі (Islam et al., 2017).

Загалом, направленість морфогенетичних процесів на окремих етапах клонального мікророзмноження рослин родини *Lamiaceae* була подібною. Проте, гормональна регуляція морфогенезу різнилася, що, очевидно, обумовлено генотиповими відмінностями морфогенетичних реакцій рослин у культурі *in vitro,* а також різними експлантами, умовами вирощування донорних рослин, сезоном експлантації та іншими чинниками. У роботах (Andrys et al., 2017; Islam et al., 2017) підкреслено, що гормональні умови для розмноження залежать від виду і сорту вихідних рослин. Розроблені у даному дослідженні біотехнологічні заходи клонального мікророзмноження ефіроолійних рослин родини *Lamiaceae* є

ефективними та можуть бути рекомендовані для включення до технологій одержання садивного матеріалу.

Висновки

На основі наукових досліджень розроблено біотехнологічний метод клонування та мікророзмноження ефіроолійних рослин *Lamiaceae L. angustifolia* Mill*., M. x piperita* L*., S. officinalis* L*., M. fistulosa* L.

Найбільш ефективними для етапів введення в культуру *in vitro* та мультиплікації є живильні середовища на основі базового середовища МС, доповнені гормонами: для *L. angustifolia* – кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л), для *M. x piperita* – БАП (1,0 мг/л) і ГК (0,1 мг/л), для *S. officinalis* – БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,5 мг/л), для *M. fistulosa* – БАП (1,0 мг/л) та ІОлК (0,1 мг/л).

На етапі мультиплікації рослини зберігають високі морфогенетичні потенції в культурі *in vitro* та забезпечують стабільний коефіцієнт розмноження 6,5-22,7 упродовж семи-восьми циклів культивування залежно від біологічних особливостей виду.

На етапі укорінення мікропагонів оптимальним визначено живильне середовище ½ МС, доповнене ІОлК (0,5 мг/л) та ІОцК (0,5 мг/л), що забезпечувало частоту укорінення 80,0-97,5 %.

Найбільш ефективним для адаптації рослин до умов *in vivo* є субстрат, що містить торф і перліт у співвідношенні за об’ємом 3:1, на якому приживлюваність усіх видів рослин, що досліджувалися, становила 82,5-100,0 %.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробці інтегрованої системи насінництва ефіроолійних рослин з метою одержання стандартного садивного матеріалу та вивченні особливостей росту і розвитку, формування продуктивності рослин родини *Lamiaceae* для розробки технологічних заходів їх вирощування в умовах Південного Степу України.

Подяки

Автори висловлюють подяку Володимиру Петровичу Хомуту, директору ФГ «Агролайф» Миколаївської області, за надану лабораторну базу для проведення дослідження.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють, що дослідження було проведено за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які могли б бути витлумачені як потенційний конфлікт інтересів.

References

1. Andrys, D., Kulpa, D., Grzeszczuk, M., Bihun, M., & Dobrowolska, A. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of *Lavandula angustifolia* Mill. field-grown and propagated in vitro. *Folia Horticulturae*, 29(2), 161-180. doi:10.1515/fhort-2017-0016.
2. Ćavar Zeljković, S., Šišková, J., Komzáková, K., De Diego, N., Kaffková, K., & Tarkowski, P. (2021). Phenolic Compounds and Biological Activity of Selected *Mentha* Species. *Plants (Basel)*, Mar 15, 10(3), 550. doi:10.3390/plants10030550.
3. Dehsheikh, A. B., Sourestani, M. M., Dehsheikh, P. B., Mottaghipisheh, J., Vitalini, S., & Iriti, M. (2020). Monoterpenes: Essential Oil Components with Valuable Features. *Mini Rev Med Chem.,* 20(11), 958-974. doi:10.2174/1389557520666200122144703.
4. Dobrovolskyi, P., Andriichenko, L., Kachanova, T., & Manushkina, T. (2021). Creating hyssop phytocenoses in anthropogenically transformed ecosystems. *E3S Web of Conferences,* 255, Article number 01009, doi: 10.1051/e3sconf/202125501009.
5. Francik, S., Francik, R., Sadowska, U., Bystrowska, B., Zawiślak, A., Knapczyk, A., & Nzeyimana, A. (2020). Identification of Phenolic Compounds and Determination of Antioxidant Activity in Extracts and Infusions of Salvia Leaves. *Materials*, 13, 5811. doi:10.3390/ma13245811.

6. Grzegorczyk-Karolak, I., Hnatuszko-Konka, K., Krzemińska, M., Olszewska, M.A., & Owczarek, A. (2021). Cytokinin-Based Tissue Cultures for Stable Medicinal Plant Production: Regeneration and Phytochemical Profiling of *Salvia bulleyana* Shoots. *Biomolecules*, 11, 1513. doi:10.3390/biom11101513.
7. Hamza, A., Abd El-Kafie, O., & Kasem, M. (2011). Direct micropropagation of english lavender (*Lavandula angustifolia* Munstead) plant. *Journal of Plant Production*, 2(1), 81-96. doi:10.21608/jpp.2011.85464 .
8. Hudz, N., Shanaida, M., & Darmogray, R. (2020). Salvia officinalis L.: prospects of using the raw material as a source of herbal medicines with the antioxidant and antimicrobic activity. *News of pharmacy*, 2(100), 11-19. doi:10.24959/nphj.20.27.
9. Islam, A. T. M. R., Islam, M. M., & Alam, M. F. (2017). Rapid *in vitro* Clonal Propagation of Herbal Spice, *Mentha piperita* L. Using Shoot Tip and Nodal Explants. *Research in Plant Sciences*, 5(1), 43-50. doi:10.12691/plant-5-1-5.
10. Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Petecka, M., Buslovych, O., Shlyapnikov, V., & Wieczorek, P. (2018). Antioxidant Phenolic Compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecological Chemistry and Engineering*, 25, 133-142. doi:10.1515/eces-2018-0009.
11. Kalinin, F. L., Sarnackaja, V. V., & Polishhuk V. E. (1980). *Methods of tissue culture in the physiology and biochemistry of cultivated plants*. Kyiv: Science opinion.
12. Karalija, E., Dahija, S., Tarkowski, P., & Zeljković, S.Ć. (2022). Influence of Climate-Related Environmental Stresses on Economically Important Essential Oils of Mediterranean *Salvia* sp. *Front Plant Sci.*, May 4, 13, 864807. doi:10.3389/fpls.2022.864807.
13. Koefender, J., Manfio, C.E., Camera, J.N., Schoffel, A., & Golle, D.P. (2021). Micropropagation of lavender: a protocol for production of plantlets. *Horticultura Brasileira*, 39, 404-410. doi:10.1590/s0102-0536-20210409.
14. Küçük, S., Çetıntaş, E., & Kürkçüoğlu, M. (2018). Volatile compounds of the Lavandula angustifolia Mill. (Lamiaceae) Species Cultured in Turkey. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 5(3), 1303-1308. doi:10.18596/jotcsa.463689.
15. Kumar, A., Kaushal, S., & Sharma, S. (2015). Studies on influence of growth regulators in micropropagation of *Lavandula angustifolia*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 6(2), 73-77.
16. Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). 9 - Plant tissue culture for biotechnology. Editor(s): Altman, A., Hasegawa, P. M. *Plant Biotechnology and Agriculture,* Academic Press, 131-138. doi:10.1016/B978-0-12-381466-1.00009-2.
17. Leelavathi, D., & Kuppan, N. (2013). Protocol for rapid clonal multiplication using in vitro apical bud of *Lavandula angustifolia*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 7(3), 96-98. doi:10.9790/3008-0739698.
18. Lis-Balchin, M. (2002). Lavender: The Genus Lavandula, 1st ed.; London: Taylor &Francis, Great Britain, 296. doi: 10.1201/9780203216521.
19. Łyczko, J., Piotrowski, K., Kolasa, K., Galek, R., & Szumny, A. (2020). *Mentha piperita* L. Micropropagation and the Potential Influence of Plant Growth Regulators on Volatile Organic Compound Composition. *Molecules*, 25(11), 2652. doi:10.3390/molecules25112652.
20. Manushkina, T. M. (2017). Biotechnology of aromatic plants clonal micropropagation of Lamiaceae Lindl. family in conditions *in vitro*. *Ukrainian Black Sea region agrarian science*, 3(95), 121-127.
21. Manushkina, T. M. (2019). Growth, development and productivity formation of the spike lavender in the conditions of Southern Steppe of Ukraine. *Scientific horizons*, 7(80), 48-54. doi:10.33249/2663-2144-2019-80-7-48-54.
22. Mesquita, L. S. S., Luz, T. R. S. A., Mesquita, J. W. C., Coutinho, D. F., Amaral, F. M. M., Ribeiro, M. N. S., & Malik, S. (2019). Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. *Food Reviews International*, 35(2), 105-131. doi:10.1080/87559129.2018.1467443.
23. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays

with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

24. Petrova, M., Nikolova, M., Dimitrova, L., & Zayova, E. (2015). Micropropagation and evaluation of flavonoid content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. *Genetics and Plant Physiology*, 5, 48-60. https://www.researchgate.net/publication/301888959.
25. Pokajewicz, K., Białoń, M., Svydenko, L., Fedin, R., & Hudz, N. (2021). Chemical Composition of the Essential Oil of the New Cultivars of Lavandula angustifolia Mill. Bred in Ukraine. *Molecules*, 26(18), 56-81. doi:10.3390/molecules26185681.
26. Raja, R. (2012). Medicinally Potential Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family: An Overview. *Research Journal of Medicinal Plant*, 6, 203-213. doi:10.3923/rjmp.2012.203.213.
27. Rozhkov, A. O., Ogurcov, Je. M. (2017). *Plant growing*. Kherson: Tim Publishing Group.
28. Rozhkov, A.O., Puzik, V.K., Kalenska, S.M., Puzik, L.M., Popov, S.I., Muzafarov, N.M., Bukhalo, V.Ya. & Kryshtop, E.A. (2016). *Research case in agronomy: training. manual: in 2 books. Book 2. Statistical processing of agronomic research results*. Kharkiv: Maidan.
29. Santos-Gomes, P.C., & Fernandes-Ferreira, M. (2003). Essential Oils Produced by in Vitro Shoots of Sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51(8), 2260-2266. doi:10.1021/jf020945v.
30. Schmiderer, C., & Novak, J. (2020). *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticose* Mill.: Dalmatian and Three-Lobed Sage. In: Novak, J., Blüthner, WD. (eds) *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. Handbook of Plant Breeding*, 12. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-38792-1_16.
31. Shanajda, M. I., & Mashtaler, V. V. (2016). Microscopic analysis of monarda tuberous grass (*Monarda fistulosa* L.) of the Lamiaceae family. *Pharmaceutical journal*, 5, 76-85.
32. Shanajda, M. I., & Pokryshko, O. V. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated members of the Lamiaceae family Juss. *Annals of Mechnikov Institute*, 4, 66-69.
33. Talankova-Sereda,T. Ye., Kolomiets, Yu. V., & Hrygoriuk P. (2016). Clonal micropropagation of peppermint (*Mentha piperita* L.) varieties of Ukrainian breeding. *Plant Varieties Studying and Protection*, 2(31), 50-56. doi:10.21498/2518-1017.2(31).2016.70277.
34. Tzima, K., Brunton, N., & Rai, D. (2018). Qualitative and Quantitative Analysis of Polyphenols in Lamiaceae Plants–A Review. *Plants,* 7, 25. doi:10.3390/plants7020025.