

## МОРФОГЕНЕЗ И КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *SALVIA SCLAREA L. IN VITRO*

Н.А. ЕГОРОВА\*, кандидат биологических наук;

И.В. СТАВЦЕВА\*, кандидат сельскохозяйственных наук;

И.В. МИТРОФАНОВА\*\*, доктор биологических наук

\*Институт эфиромасличных и лекарственных растений НААН,

\*\*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр НААН

### Введение

Шалфей мускатный занимает одно из ведущих мест среди эфиромасличных культур, возделываемых на юге Украины. Он выращивается для получения из соцветий эфирного и экстрактового масел, склареола и других продуктов [6]. Эфирное масло шалфея используется в парфюмерно-косметической и мыловаренной промышленности. В ликероводочном, кондитерском и табачном производствах его успешно применяют для ароматизации изделий. Частично шалфейным маслом можно заменить такие более дорогостоящие фиксаторы запаха, как амбра и мускус. В медицине успешно применяют эфирное масло, а также водный экстракт (концентрат) при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, периферической нервной системы, псориаза и других болезней.

В последние годы значительно вырос спрос на сырье шалфея мускатного в связи с возможностью использования содержащегося в нем дитерпенового спирта склареола для получения амбриала и амброксиды – душистых соединений, способных фиксировать ароматы. После выделения из экстракта масла абсолю и склареола получают такие ценные продукты, как сальвироны, которые включают в состав парфюмерных композиций с табачными и амбровыми тонами. Получаемое из семян жирное масло шалфея применяется в керамическом, фарфоровом производствах, а также при изготовлении олифы [6].

С этим эфиромасличным растением в ИЭЛР активно проводится селекционная работа, в результате которой были созданы основные выращиваемые на Украине сорта – С-785, Крымский Ранний (С-1122), Крымский Поздний, Крымский Однолетний, Мрия, Ай-Тодор и другие [7]. Однако для дальнейшего повышения эффективности селекционного процесса у шалфея, также как и у других сельскохозяйственных растений, необходимо дополнение традиционных методов современными биотехнологическими подходами. При этом уместно использование как клеточных технологий, способствующих расширению генетического разнообразия (индукция соматической изменчивости, клеточная селекция, мутагенез *in vitro*), так и методов клонального размножения [1, 4, 8]. Разработка таких биотехнологий основана прежде всего на оптимизации режимов асептического культивирования тканей и органов и подборе условий индукции морфогенеза из эксплантов или пассируемых

каллусных тканей. Имеющиеся многочисленные литературные данные по вопросам каллусо- и морфогенеза у основных сельскохозяйственных и декоративных культур свидетельствуют о необходимости проведения для различных генотипов индивидуальной оптимизации режимов и питательных сред для регенерации растений *in vitro* [3-5].

Для различных видов рода *Salvia*, представляющих интерес как лекарственные, ароматические, декоративные или редкие, эндемичные виды, в последние два десятилетия проведен ряд исследований, направленных на усовершенствование методов регенерации *in vitro* и разработку протоколов микроразмножения [10-15, 17, 18]. В этих работах для клонального размножения использовали пазушные или апикальные почки [12, 18], узловыe сегменты стебля [10, 11], различные экспланты из проростков *in vitro* [15]. Например, у *S. nemorosa* L. с целью микроразмножения из проростков вычленили экспланты листьев с черешками, из которых затем наблюдали развитие побегов путем прямого и непрямого органогенеза с суммарной частотой до 66% [17]. Имеются также данные о способности каллусных культур некоторых видов шалфея продуцировать вторичные метаболиты [9, 13, 16]. Так, показана возможность синтеза у *S. chamelaeagnea* розмариновой кислоты [13], у *S. sclarea* – склареола [9], а у *S. officinalis* – фенольных соединений [16].

Тем не менее, в литературе почти нет данных о регенерации из длительно пассируемого каллуса и разработках клеточных технологий создания генетически разнообразного материала у шалфея. Для основных возделываемых на Украине сортов *S. sclarea* таких исследований ранее вообще не проводилось. Поэтому целью данной работы было изучение процессов каллусо- и морфогенеза при культивировании различных эксплантов шалфея мускатного для разработки технологий создания исходного селекционного материала и его ускоренного размножения *in vitro*.

### Объекты и методы исследования

Материалом для исследований служили ткани и органы различных сортов шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) – С-785, С-1122, Ай-Тодор. В качестве эксплантов в данных экспериментах использовали сегменты органов из проростков шалфея, полученных в условиях *in vitro*. Для получения проростков семена стерилизовали в 0,1% растворе диацета, промывали автоклавированной дистиллированной водой и помещали на агаризованную безгормональную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС). Через 3-4 недели из проростков вычленили сегменты листьев, семядолей, корней, гипокотилей, апикальные почки (5-6 мм) и микрочеренки с 1 узлом и 2 пазушными почками (7-10 мм), представляющие собой сегменты стебля с 1 узлом.

Культивирование проводили на различных модификациях среды МС, дополненных регуляторами роста: кинетином (К), бензиламинопурином (БАП), зеатином (З), гибберелловой кислотой (ГК), нафтилуксусной кислотой (НУК), индолилуксусной кислотой (ИУК), индолилмасляной кислотой (ИМК). При культивировании тканей и органов применяли традиционные методы культуры тканей [ 2]. Пассирование каллуса осуществляли каждые 35-40 дней. Каллус культивировали при + 26°C, 70%-ной влажности воздуха и освещенности 600 люкс, а при индукции морфогенеза – при освещенности 2-3 тыс. люкс с 16-часовым фотопериодом. Для микроразмножения полученные *in vitro* побеги разрезали на микрочеренки 8-10 мм с одним узлом и переносили в пробирки на среды для размножения. При расчете коэффициента размножения за один пассаж учитывали количество микрочеренков с 1 узлом, которое можно получить при черенковании основного и дополнительных побегов.

Полученные данные обрабатывали с применением традиционных методов математической статистики на компьютере, используя пакет программ Microsoft Office XP .

### Результаты и обсуждение

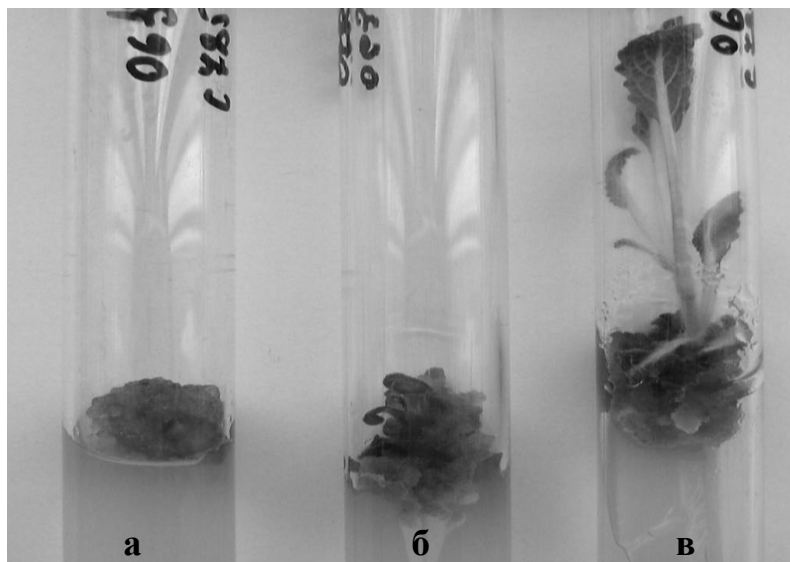
В наших предварительных экспериментах для получения каллусных культур шалфея использовали экспланты листьев взрослых однолетних растений. Однако формирующийся каллус в дальнейшем показали слабую способность к морфогенезу, кроме того для применения таких эксплантов необходимо выращивать растения, а введение в асептическую культуру проводить только в определенное время года. Более удобными и доступными круглый год являются пробирочные растения, полученные из семян *in vitro*. Такой подход нередко использовался у других видов растений, в том числе у *S. nemorosa* и *S. africana-lutea* [15,17]. Поэтому в представленной работе предварительно из семян в асептических условиях на безгормональной среде получали проростки, из которых затем вычленили сегменты листьев, семядолей, корней, гипокотилей, апикальные почки и микрочеренки с одним узлом.

При культивировании этих эксплантов через 2-3 недели происходило формирование каллуса, которое зависело от типа экспланта и состава питательной среды. У сегментов корня, листа и гипокотилия каллус формировался на четырех из шести испытанных сред с частотой от 2,4% до 100,0%, а при культивировании семядолей – только на среде с добавлением НУК и БАП с частотой 96,3%. У почек и микрочеренков происходило формирование каллуса на всех испытанных средах (частота каллусогенеза от 10,2% до 100,0%). При этом у микрочеренков, помещаемых на среду вертикально, наблюдали образование каллуса в базальной части у основания микрочеренка. Максимальная частота

каллусогенеза у всех типов эксплантов была отмечена на среде МС с добавлением НУК (1,0 мг/л) и БАП (0,5 мг/л), которая была оптимальной не только для формирования, но и для длительного субкультивирования каллуса, имеющего разное происхождение. У различных типов эксплантов на этой среде каллусогенез наблюдали с частотой от 84,4% до 100,0%.

Наибольшей способностью к каллусогенезу обладали почки и микрочеренки – у этих эксплантов каллус формировался на всех вариантах сред, как правило, с более высокой частотой и более обильно, чем у других эксплантов. Каллус, полученный из почек и у основания микрочеренков, представлял собой рыхлую, гетерогенную массу клеток светло-бежевого или светло-зеленого цвета с многочисленными ярко-зелеными меристемными зонами.

Следующим этапом исследований была оптимизация режимов стимуляции морфогенеза в каллусных культурах, полученных из разных типов эксплантов. В таблице 1 приведены данные о влиянии типа экспланта и состава питательной среды на частоту морфогенеза в каллусе шалфея сорта С-785. Как видно из представленных результатов, морфогенез был отмечен только в каллусах, полученных из листьев, почек, семядолей и микрочеренков. У каллусов, образовавшихся из корня и гипокотилия, на испытанных питательных средах морфогенных структур не отмечали.



**Рис. 1. Каллус (а), индукция морфогенеза (б) и регенерация растения (в) в культуре *in vitro* у шалфея мускатного**

Следует отметить, что на каллусе листового и семядольного происхождения образовывались только корни. В каллусе, полученном из почек и микрочеренков, через две недели культивирования на морфогенных средах развивались почки, а затем образовывались побеги

без корней или с корнями в зависимости от состава питательной среды (рис. 1). Каллус из почек и базальной части микрочеренков обладал наиболее высоким морфогенным потенциалом, на 9 из 11 модификаций питательной среды МС отмечено формирование почек и побегов с частотой от 2,2 до 94,2%. Даже на среде МС160, являющейся оптимальной для каллусогенеза, в каллусе этого типа отмечали морфогенез с частотой 48,4-58,6%. Обращает внимание широкий спектр сред, на которых была возможна индукция побегообразования в каллусе из почек и микрочеренков у шалфея, – это среды как типичные для морфогенеза с преобладанием цитокининов, так и среды, типичные для каллусогенеза (с преобладанием ауксинов). Наиболее высокая частота морфогенеза (до 84-94%) была достигнута при введении в среду кинетина (0,5 -1,0 мг/л) и ГК (0,1 мг/л).

Таблица 1

**Влияние гормонального состава питательной среды и типа экспланта на частоту морфогенеза в первом пассаже у *S. sclarea* (сорт С-785), %**

Гормональные добавки в питательной среде, мг/л	Тип экспланта				
	семядоля*	лист*	гипоко- -тиль, корень	почка * *	микроче- ренок* *
БАП -1,0	0,0	0,0	0	0	0
К -1,0	0,0	20,3±1,6	0	4,2±0,5	2,2±0,4
БАП-1,0; ГК-0,5	0,0	25,6±2,2	0	32,5±3,0	46,8±5,1
БАП -1,0; НУК-0,5; К-1,0	62,5±7,2	0	0	24,8±2,1	19,5±1,5
К-1,0; НУК-0,5	21,5±1,6	0	0	6,8±0,5	21,6±1,9
НУК-0,5 3 – 1,0	0	0	0	0	0
БАП -0,5; НУК-1,0	0	0	0	48,4±4,2	58,6±5,9
БАП-1,0; НУК-0,5	0	0	0	3,6±0,3	15,4±1,2
К - 0,5; ГК- 0,1	0	0	0	84,5±8,2	94,2±8,5
К -1,0; ГК-0,1	0	0	0	80,7±6,5	88,0±7,3

К -2,0; ГК-0,1	0	0	0	72,6±6,5	82,7±7,7
-------------------	---	---	---	----------	----------

Примечание: \* формирование корней, \*\* формирование побегов

Актуальной проблемой при разработке многих клеточных технологий является сохранение морфогенетических потенций каллуса при длительном субкультивировании. Это связано с возрастающей генетической гетерогенностью культур по мере их пассирования и, следовательно, возможностью получения соматоклональных вариантов для селекции [3, 4, 8].

В таблице 2 представлены данные о влиянии длительности пассирования и гормонального состава питательной среды на частоту морфогенеза в каллусе, полученном из почек и микрочеренков у сорта С-785. При пассировании на этих средах из каллуса развивались побеги в течение достаточно длительного времени. Показано, что морфогенез разной продолжительности наблюдался на всех испытанных вариантах среды МС: на среде с БАП и НУК – до 6-го пассажа, на средах с кинетином и гибберелловой кислотой – до 10 пассажа. Максимальная частота морфогенеза на всех средах отмечена в первых трех пассажах, затем, по мере увеличения длительности культивирования, происходило снижение интенсивности этого процесса. Большая частота индукции побегообразования была характерна для модификации среды МС, содержащей менее высокую концентрацию кинетина (0,5 мг/л) при культивировании каллусов из почек и микрочеренков. Индукция образования каллуса, способного к длительной регенерации побегов, была также показана и для других сортов шалфея – С-1122 и Ай-Тодор. Разработка условий для получения растений при длительном культивировании каллуса очень важна для индукции соматоклональной изменчивости при создании нового исходного материала в селекции.

Таблица 2

**Влияние пассажа, типа экспланта и состава питательной среды на частоту индукции побегообразования в каллусной культуре *S. sclarea* (сорт С-785), %**

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Тип экспланта	Пассаж				
		2	4	6	8	10
БАП-0,5; НУК-1,0	почка	37,5±4,0	25,2±2,1	6,3±0,5	0	0
	микрочеренок	26,7±2,3	19,4±2,5	1,5±0,8	0	0

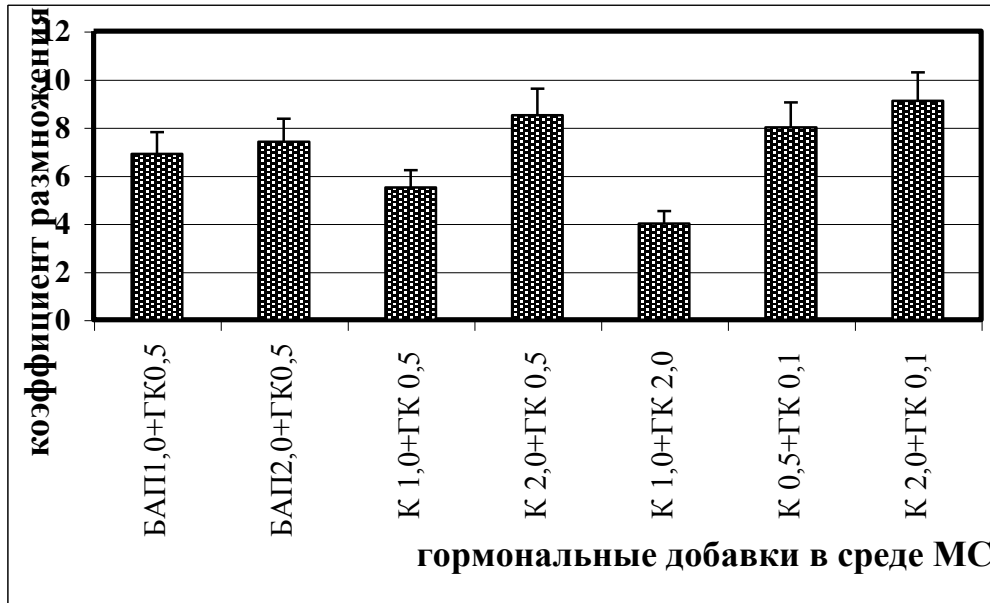
К-2,0; ГК-0,1	почка	72,6±6,6	51,8±4,6	19,4±1,6	4,4±0,3	1,2±0,1
	микро- черенок	94,5±8,8	62,6±6,0	21,3±2,5	12,6±1,1	5,5±0,9
К-0,5; ГК-0,1	почка	84,5±7,9	62,6±7,3	24,9±2,9	12,5±0,9	8,4±0,5
	микро- черенок	98,3±10,2	71,6±6,8	31,5±3,9	20,8±2,6	13,9±1,1

Одной из задач нашего исследования было изучение возможности ускоренного размножения шалфея мускатного в условиях *in vitro*. Это необходимо как для клонирования полученных в каллусной культуре регенерантов, так и для быстрого размножения ценных селекционных образцов этого вида. В этих экспериментах предварительно получали проростки из семян на безгормональной питательной среде МС, а затем из них вычленили сегменты стебля с 1 узлом, то есть микрочеренки с узлом и 2 пазушными почками. При их эксплантации на питательную среду чаще всего наблюдалось развитие одного побега из пазушной почки высотой до 4-8 см с 3-6 узлами. Помимо основного хорошо развитого побега на многих вариантах среды МС происходила индукция множественного побегообразования с частотой до 64-100% за счет развития второй пазушной почки и адвентивных побегов из основания микрочеренка. Такие дополнительные побеги были небольшими (до 2-3 см с 1-3 узлами) и их среднее количество на эксплант колебалось от 0,9±0,1 до 3,8±0,4 штук. Основные показатели развития микрочеренков (число побегов, их высота и количество узлов, частота образования дополнительных побегов, ризогенеза и каллусогенеза) зависели от гормонального состава питательной среды. Учитывая множественное побегообразование, у шалфея для микроразмножения можно использовать не только черенкование основного побега, но и дополнительных, менее развитых побегов. На рис.2 представлены данные о влиянии гормонального состава среды МС на основной показатель развития в культуре микрочеренков – коэффициент размножения за цикл выращивания. Максимальный коэффициент размножения (1:9,1) отмечали на среде МС 358, дополненной кинетином (2,0 мг/л) и гибберелловой кислотой (0,1 мг/л). У других изученных сортов шалфея коэффициенты размножения были несколько ниже: на среде МС 358 у сорта С-1122 – 1:5,4, а у сорта Ай-Тодор – 1:6,8 за один пассаж.

Следует отметить, что при развитии микрочеренков у их основания почти на всех испытанных питательных средах происходило образование каллуса с частотой от 3,4 до 100% , что при разработке методов клонирования не очень желательно из-за возможности соматональных изменений. Такой каллус у шалфея часто был морфогенным с зелеными

меристематическими участками, из которых начинали развиваться почки. Поэтому при размножении такой каллус удалялся, а для дальнейшего черенкования использовали только побеги, образующиеся при прямом органогенезе.

Установлено, что на эффективность микроразмножения оказывало влияние расположение экспланта на проростке, полученном *in vitro*. При культивировании микрочеренков, выделенных из нижней (1-2 узел), средней (3-4 узел) и верхней (5-6 узел) части побега значительно варьировали все изученные показатели (табл. 3).



**Рис. 2. Влияние гормонального состава питательной среды МС на коэффициент размножения при микрочеренковании побегов у шалфея сорта С-785**

Полученные данные свидетельствуют о большей эффективности использования эксплантов из средней или нижней части побега – при использовании таких микрочеренков не только повышалась частота множественного побегообразования, число дополнительных побегов и коэффициент размножения, но и во много раз снижалась частота нежелательного каллусогенеза. Такая разная реакция эксплантов из различных зон проростка связана, по-видимому, с различным уровнем эндогенных фитогормонов, определяющих направленность морфогенетических процессов при введении участков органов в асептическую культуру. При изучении микроразмножения двух эндемичных испанских видов шалфея также было показано, что максимальная пролиферация побегов была при использовании узловых эксплантов стебля, а не его апикальных сегментов [10].



Как было указано выше, при микроразмножении у основания микрочеренка иногда наблюдали не только каллусообразование, но и ризогенез. При этом корни развивались как из основания побегов, так и из каллуса. Однако образование побегов с корнями было достаточно редким событием, поэтому у шалфея, также как и у многих других видов, необходимо для получения растений переносить побеги на среду для укоренения. Как показали наши исследования, наибольшая частота укоренения (до 52-75%) у различных сортов шалфея мускатного была при использовании среды МС с половинной концентрацией макро- и микроэлементов и добавлением 2,0 мг/л ИМК и 1% сахарозы. Полученные растения адаптировали *in situ* в вазонах со смесью торфа и земли с использованием традиционных приемов адаптации пробирочных растений [1, 4].

Таблица 3

**Влияние расположения экспланта на побеге на развитие микрочеренков шалфея сорта С-785**

Расположение экспланта на побеге	Количество побегов на эксплант, шт.	Количество узлов на побег, шт.	Частота множественного побегообразования, %	Частота калусогенеза, %	Коэффициент размножения
1-2 узел	4,1±0,4	1,9±0,2	85,4	7,9	1:7,8
3-4 узел	5,4±0,5	1,9±0,1	96,7	6,8	1:10,3
5-6 узел	1,2±0,1	1,7±0,1	4,8	86,7	1:2,0

В результате проведенных исследований показана возможность получения каллуса из различных эксплантов проростков, культивируемых *in vitro*, а также способность каллусных культур к индукции образования побегов из почек и основания микрочеренков, которую наблюдали достаточно длительный период – до 6-10 пассажа. Разработка условий для длительного сохранения морфогенетической способности у сортов *S. sclarea* является основой для клеточной технологии получения измененных форм – соматоклональных вариантов. Такая длительная регенерация каллусных культур необходима и для клеточной селекции, при которой часто необходимо в течение нескольких пассажей проводить обработки мутагенами и воздействовать стрессовыми факторами [4, 8]. С другой стороны, регенерация растений из первичного каллуса (при которой уровень изменчивости обычно минимален), а также методика размножения с использованием пазушных почек из узловых сегментов

стебля могут быть успешно использованы для ускоренного размножения ценных форм, в том числе и полученных в культуре регенерантов.

У некоторых видов шалфея ранее были изучены процессы морфогенеза при использовании каллуса или прямой регенерации побегов из почек или других эксплантов [10-12, 15]. В основном эти исследования были направлены на размножение ценных генотипов. В ряде экспериментов каллусные культуры, способные к регенерации, получали из эксплантов семядолей, гипокотилия, листа [14, 15], стеблевых апексов [17, 18]. При этом в качестве гормональных добавок к питательной среде исследователи чаще всего использовали БАП или БАП в сочетании с различными ауксинами: 2,4 Д, ИУК, НУК [13, 17, 18]. Так, у *S. sclarea* органогенный каллус с максимальной частотой образования получали из семядолей незрелых зиготических зародышей, вычлененных через 2-3 недели после опыления [14]. Для клонального размножения *S. africana-lutea* из полученных *in vitro* проростков вычленяли семядоли, гипокотили и листья, при этом из всех эксплантов на среде МС, дополненной различными дозами БАП и ауксинов (НУК, ИУК, 2,4Д), формировались одновременно каллус, побеги и корни [15]. Имеются данные о регенерации побегов у *S. officinalis* при использовании в качестве эксплантов верхушек пазушных побегов, полученных из микрочеренков с одним узлом, на среде МС с добавлением 4,5 мкМ тидиазурина [18].

В наших же экспериментах у сортов *S. sclarea* каллусные культуры, способные к регенерации побегов, удалось получить только из эксплантов почек и микрочеренков, другие типы эксплантов при испытанных условиях не формировали каллус, способный к побегообразованию. Анализ гормональных добавок в среде МС показал преимущество применения кинетина с ГК, которые обеспечивали наибольшую частоту морфогенеза. Следует отметить, что подобранные условия способствовали регенерации побегов в течение 6-10 пассажей. В доступной литературе мы не встретили упоминания о такой длительной регенерации в каллусных культурах не только у *S. sclarea*, но и у других видов шалфея. Такая способность к морфогенезу является хорошей основой для многих клеточных технологий.

Вместе с тем, удобным методическим подходом для быстрого размножения ценных селекционных образцов, а также регенерантов, полученных в различных биотехнологических экспериментах (например, в культуре каллусных тканей, в эмбриокультуре, в культуре пыльников), может быть клональное микроразмножение. Судя по имеющимся литературным данным, у других видов шалфея чаще всего для этой цели культивировали апикальные или пазушные почки, узловыe сегменты стебля [10, 11, 17], хотя иногда применяли каллусную культуру [13]. У *S. officinalis* при использовании верхушек побегов наиболее эффективной была среда МС с добавлением 0,5 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК, на которой формировалось в среднем 3 побега на эксплант [12]. В другом исследовании при

использовании узловых эксплантов у этого вида лучшее развитие было достигнуто при введении в среду БАП или кинетина с НУК [11].

Нами для размножения *in vitro* шалфея мускатного были использованы микрочеренки, при этом показана возможность множественного побегообразования и применения черенкования как основного, так и дополнительных побегов. Наиболее подходящей для микроразмножения оказалась среда МС с кинетином и гибберелловой кислотой, на которой коэффициент размножения достигал 1:9 за цикл выращивания. Среди испытанных питательных сред для укоренения побегов в наших опытах была наиболее эффективной среда МС с добавлением 2,0 мг/л ИМК, тогда как у вида *S. chamelaeagnea* – с введением НУК [13], а у *S. valentina* и *S. blancoana* – безгормональная среда [10]. Укоренение побегов *S. africana-lutea* проводили при двухнедельном культивировании на среде ½ МС с 2,5 мкМ ИМК, а затем переносили на среду с 5% активированного угля [15].

### Выводы

В результате проведенных исследований установлены морфогенетические потенции каллусных культур *S. sclarea* и выявлены некоторые факторы, влияющие на процессы каллусообразования и регенерации побегов.

Показана возможность индукции побегообразования из каллуса, полученного из почек и микрочеренков, в течение 6-10 пассажей и подобраны условия для микроразмножения различных сортов.

Данные исследования явились основой для разработки методик создания нового исходного селекционного материала шалфея мускатного и его ускоренного размножения *in vitro*.

### Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учебное пособие. – М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
4. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
5. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур: Автореф. дис...докт. биол. наук: 03.00.20/НБС-ННЦ. – Ялта, 2007. – 40 с.
6. Назаренко Л.Г., Бугаенко Л.А. Эфиромасличные, пряно-ароматические и лекарственные растения. – Симферополь: Таврия, 2003. – 202 с.

7. Назаренко Л.Г. Сорты эфиромасличных культур селекции Института эфиромасличных и лекарственных растений // Научные Труды ИЭЛР. – 2006. – Вып. 26. – С. 49-51.
8. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – Киев.: Наук. думка, 1990.– 280 с.
9. Banthorpe D.V., Brown J.T., Morris G. Accumulation of the anti-fungal diterpene sclareol by cell cultures of *Salvia sclarea* and *Nicotiana glutinosa* // Phytochemistry. – 1990. – V.29, N 7. – P. 2145-2148.
10. Cuenca S., Amo-Marko J.B. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* – 2000. – N 36. – P. 225-229.
11. Gostin I. Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis* cultivated *in vitro* // *Int. J. of Botany.* – 2008. – V.4, N4. – P. 430-436.
12. Grzegorzczuk I., Wysokinska H. Micropropagation of *Salvia officinalis* L. by shoot tips // *Biotechnologia.* – 2004. – N 2. – P. 212-218.
13. Huang L.D., Van Staden J. *Salvia chamelaeagnea* can be micropropagated and its callus induced to produce rosmarinic acid // *S. Afr. J. Bot.* – 2002. – V. 68. – P. 177-180.
14. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis / Liu W., Chilcott C.E., Reich R.C., Hellmann G.M. // *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.* – 2000.– V.36, N3. – P.201–206.
15. Makunga N. P. , Van Staden J. An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2008. – V. 92, N1. – P. 63–72.
16. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.) / Santos-Gomes P.C., Seabra R.M., Andrade P.B., Fernandes-Ferreira M. // *J. Plant Physiol.* – 2003. – V. 160, N9. – P. 1025-1032.
17. Skala E., Wysokinska H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants // *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* – 2004. – V. 40, N 6. – P. 596-602.
18. Tawfik A. A., Mohamed M. F. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus // *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.* – 2007.– V. 43, N1. – P. 21–27.