

ГОЛУБЕНКО А. В.<sup>✉</sup>, НУЖИНА Н. В.

ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна, 01032, м. Київ, вул. Симона Петлюри, 1, e-mail: anastasiaholubenko@gmail.com, nuzhynan@gmail.com

<sup>✉</sup> anastasiaholubenko@gmail.com, (096) 318-23-87

## ЯВИЩЕ ВІТРИФІКАЦІЇ ПРИ РОЗРОБЦІ ТЕХНОЛОГІЇ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ РІДКІСНОЇ РОСЛИНИ *SALVIA SCABIOSIFOLIA* LAM.

**Мета.** Порівняння анатомічної будови нормальних та вітрифікованих *in vitro*-рослин *Salvia scabiosifolia* Lam.; підбір регуляторів росту в живильному середовищі для мінімалізації (редукції) вітрифікації. **Методи.** Застосовано методи культури *in vitro*. Рослини вирощували на живильному середовищі МС, доповненому ІОК, НОК та БАП у різних поєднаннях концентрацій. Анатомічні зрізи листків завтовшки 10 мкм забарвлювали ацетоорсеїном та сафраніном. **Результати.** Виявлено анатомічні відмінності між будовою нормальних і вітрифікованих листків *S. scabiosifolia*. Мінімального рівня вітрифікації та високої ефективності утворення нормальних пагонів було досягнуто на живильних середовищах, доповнених: 0,2 мг/л ІОК + 1 мг/л БАП; 0,2 мг/л ІОК + 2,5 мг/л БАП; 0,2 мг/л ІОК + 0,1 мг/л НОК + 2 мг/л БАП. **Висновки.** Анатомічні особливості будови вітрифікованих листків свідчать про порушення транспірації, швидкості поділу і росту клітин епідермісу та мезофілу. Знизити рівень вітрифікації можна, змінюючи вміст регуляторів росту в середовищі. Провідну роль у виникненні вітрифікації регенерантів *S. scabiosifolia* відіграють ауксини, а поєднання їх з цитокінінами викликають суттєве її зниження.

**Ключові слова:** *Salvia scabiosifolia* Lam., *in vitro*, анатомія рослин, вітрифікація, ауксини, БАП.

*Salvia scabiosifolia* Lam. (сальвія скабіозолиста) – кримський ендемік, занесений до Червоної книги України, який, водночас, є перспективною лікарською рослиною як джерело ефірних олій та інших біологічно активних речовин [1]. У Ботанічному саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка рослини цього виду зберігаються у живих колекціях трав'янистих рослин відкритого ґрунту та *in vitro*. За

умов асептичної культури було виявлено здатність рослин *S. scabiosifolia* до нормальної вегетації на безгормональному живильному середовищі. Проте, на такому середовищі вегетативне розмноження шляхом живцювання пагонів виявилось малоєфективним. Додавання регуляторів росту навіть у низьких концентраціях, поряд з утворенням додаткових бруньок та листкових розеток з них, викликало деформацію, зміну забарвлення (потемніння або, навпаки, хлороз) листків і призводило до подальшої загибелі експлантів. Цю деформацію нами було визначено як гіпергідратацію, або вітрифікацію. З літературних джерел відомо, що явище вітрифікації виникає як реакція на стрес, викликаний такими абіотичними факторами як фітогормональний склад середовища, тип гелеутворюючого компонента (агар-агар, модифікований крохмаль), умови освітлення, температури тощо [2, 3]. та є значною перешкодою при розробці технологій мікроклонального розмноження та інших біотехнологій [4, 5]. Вітрифікація тісно пов'язана зі змінами в анатомічній будові рослин, які часто є незворотними [6]. Мінімізувати утворення вітрифікованих форм можна, регулюючи концентрації регуляторів росту та інших нутрієнтів у живильних середовищах, а також, підвищуючи його осмотичний потенціал шляхом збільшення концентрації гелеутворювальних речовин [7].

Метою дослідження було: виявити відмінності нормальних та вітрифікованих рослин *S. Scabiosifolia*, отриманих *in vitro*, та встановити наявність типових для вітрифікації порушень анатомічної будови; підібрати комбінації регуляторів росту в живильному середовищі для мінімалізації (редукції) явища вітрифікації регенерантів під час клонального мікророзмноження.

### Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були особливості морфогенезу *in vitro* рослин *S. scabiosifolia*, зокрема явище вітрифікації при розробці технології мікроклонального розмноження. Як експериментальний матеріал були використані вузлові сегменти асептично вирощених проростків *S. scabiosifolia* з насіння репродукції Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для дослідження морфогенезу застосовували загальноприйнятні методи культури рослин *in vitro* [8, 9]. Базовим живильним середовищем для культивування рослин *S. scabiosifolia* було модифіковане безгормональне агаризоване (8% агар-агару) середовище Мурасіге-Скуга (МС) з розведеним удвічі вмістом мінеральних макро- та мікроелементів (МС/2), доповнене вітамінами (0,5 мг/л В1; 0,5 мг/л В6; 1 мг/л РР), з додаванням 100 мг/л мезоінозиту та 20 г/л сахарози [10]. Рослини культивували за температури 25 °С, за 16-годинного фотоперіоду. Для ініціації морфогенетичних реакцій *in vitro* до складу живильних середовищ включали також ауксин- та цитокінінактивні регулятори росту (індолил-оцтову (ІОК) та 1-нафтилоцтову кислоти (НОК), 6-бензиламінопурін (БАП)), у різних поєднаннях концентрацій. Для тестування було

розроблено 15 варіантів (3 блоки) середовищ: 0,1 мг/л НОК + 0,5–2,5 мг/л БАП; 0,2 мг/л ІОК + 0,5–2,5 мг/л БАП; 0,1 мг/л НОК + 0,2 мг/л ІОК + 0,5–2,5 мг/л БАП (табл.1). Як контроль (К) використовували безгормональне середовище МС/2.

Результати з ініціації морфогенезу *in vitro* відображали у таких показниках:

- частота регенерації нормальних пагонів (відсоток експлантів, на яких утворилися нормальні пагони-регенеранти);
- ефективність регенерації нормальних пагонів (відношення кількості новоутворених нормальних пагонів-регенерантів до початкової кількості висаджених вихідних експлантів – вузлових мікроживців, у відсотках);
- висота нормальних пагонів-регенерантів, см;
- частота вітрифікації (відсоток експлантів, на яких утворилися вітрифіковані регенеранти);
- розмір вітрифікованих мікрокущів (умовна незлічувана величина, яка візуально відображає об'єм мікрокущів, утворених вітрифікованими пагонами чи листками: до 1 см – \*; від 1 до 1,5 см – \*\*; більше 1,5 см – \*\*\*);
- частота ризогенезу (відсоток експлантів з коренями).

Таблиця 1. Вміст регуляторів росту в експериментальних живильних середовищах

Код середовища	Концентрації регуляторів росту, мг/л		
	ІОК	НОК	БАП
1.1.1	–	0,1	0,5
1.2.1	–	0,1	1
1.3.1	–	0,1	1,5
1.4.1	–	0,1	2
1.5.1	–	0,1	2,5
1.1.2	0,2	–	0,5
1.2.2	0,2	–	1
1.3.2	0,2	–	1,5
1.4.2	0,2	–	2
1.5.2	0,2	–	2,5
1.1	0,2	0,1	0,5
1.2	0,2	0,1	1
1.3	0,2	0,1	1,5
1.4	0,2	0,1	2
1.5	0,2	0,1	2,5
½ МС (К)	–	–	–

Для анатомічних досліджень брали середню частину листової пластинки (по 6 листків для кожної групи). Фіксували матеріал у розчині FAA (формалін, ацетат, альдегід) та заливали в желатин за стандартною методикою [11]. За допомогою заморожувального мікротома виготовляли поперечні зрізи товщиною 10 мкм, які забарвлювали ацетоорсеїном та сафраніном. Додатково листки мацерували для детального вивчення адаксіальної та абаксіальної епідерми. При описуванні епідерми листової пластинки використовували методики Захаревича і Баранової [12, 13]. Виміри проводили за допомогою програми Image J та мікроскопа XSP-146TR та тринокулярного мікроскопа Konus Crystal-45.

Статистична обробка даних проводилась за допомогою програми Statistica 8.0, достовірність результатів визначали за t-критерієм

Стьюдента. Фотографії зроблені за допомогою цифрової камери Canon Power Shot A630.

### Результати та обговорення

У результаті тестування 15 модифікацій живильних середовищ (табл. 1) було отримано як мікрокущі з пагонами різної оводненості – нормальними видовженими та вітрифікованими розеткового типу (рис. 1), так і мікрокущі, які склалися з суцільно вітрифікованих розеткоподібних пагонів-регенерантів (рис. 2).

Зміни морфометричних характеристик вітрифікованих листків *S. scabiosifolia*, які відмічені у нашому дослідженні (табл. 2, рис. 3–4), виявилися подібними до таких, що описані в літературі для інших рослин, які культивуються *in vitro* та мають ознаки вітрифікації [11].

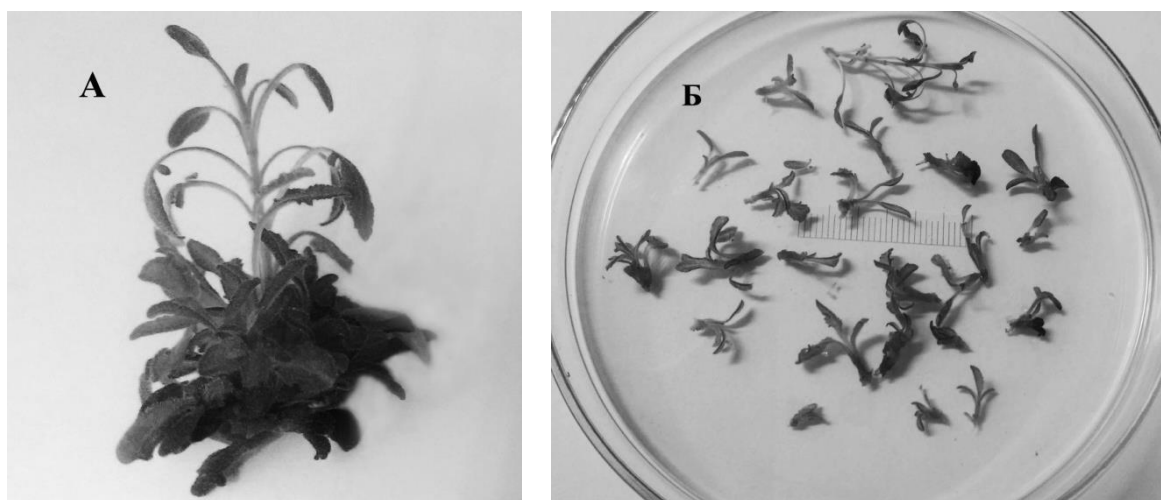


Рис. 1. Мікрокущ змішаного типу *S. scabiosifolia in vitro*: А) мікрокущ з нормальними і вітрифікованими мікрокронами; Б) відокремлені мікроклони.

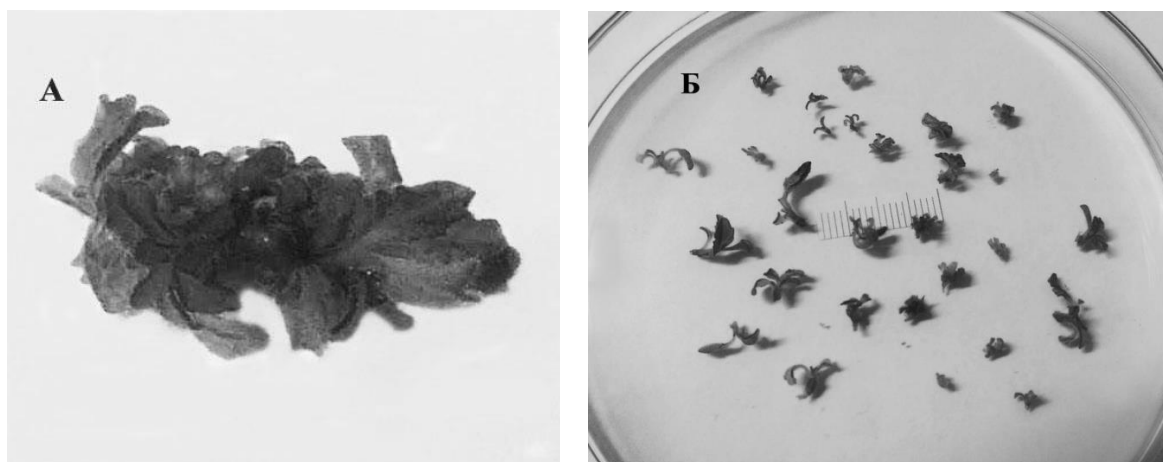


Рис. 2. Вітрифікована форма *S. scabiosifolia in vitro*: А) мікрокущ з вітрифікованими мікрокронами; Б) відокремлені мікроклони.

Таблиця 2. Морфометричні параметри листків *S. scabiosifolia* (n=60, M±SD)

Морфометричних параметри	Нормальні листки	Вітрифіковані листки
Товщина листка	160±18	321±71***
Товщина адаксіального епідермісу (ад. еп.)	17,58±3,7	21,01±6*
Товщина зовнішньої клітинної стінки ад. еп.	3,23±1,3	4,75±1,5**
Товщина абаксіального епідермісу (аб. еп.)	14,08±3,4	24,23±6,5***
Товщина зовнішньої клітинної стінки аб. еп.	3,22±1,2	5,71±1,1***
Площа клітин мезофілу	521±192	1981±629***
Довжина продихів ад. еп.	35,9±4,5	36,9±4,4
Ширина продихів ад. еп.	27,2±2,9	29,8±6 *
Довжина продихів аб. еп.	35±3,7	33,7±4,4
Ширина продихів аб. еп.	26,5±4,4	32,7±6,2***
Площа епідермоцитів ад. еп.	3614±1136	2677±1872*
Площа епідермоцитів аб. еп.	2869±1067	1643±1024***
Кількість продихів ад. еп.	30,11±6,7	35,98±3,1*
Кількість продихів аб. еп.	27,65±3,8	55,11±11,4***

Примітки: \* – P<0,05 порівняно з контролем (листки в нормі); \*\* – P<0,001; \*\*\* – P<0,0001.

У нормі листок *S. scabiosifolia* амфістоматичний, ізолатеральний, продихи полощитного типу. З обох боків епідерміс вкритий залозистими трихомами, які складаються з одноклітинної голівки та багатоклітинної ніжки. З абаксіального боку трихоми розміщені щільніше. Епідермоцити з обох боків листка мають крупнохвилясті обриси та витягнуту або розпластану проекцію. Листок вкритий одношаровим епідермісом, кутикула не виражена. Продихи дещо підняті над рівнем епідермісу та наявні великі під продихові камери. Мезофіл лише губчастого типу, клітини мезофілу овальної форми, розподілені невеликими міжклітинниками. Елементи механічної тканини відсутні (рис. 3А, 4А).

Загалом, вітрифіковані листки мають подібну анатомічну будову, однак, наявні деякі відмінності. Зокрема, вітрифікований листок удвічі товщий (рис. 3Б). Потовщення відбувається нерівномірно, переважно в області центрального пучка, за рахунок збільшення площі клітин мезофілу майже у 4 рази, при чому з абаксіального боку часто спостерігається інтенсивне розтягнення цих клітин, внаслідок чого утворюється псевдопалісадний мезофіл. Клітини губчастого мезофілу округлої, овальної та неправильної форми з більшими міжклітинниками, порівняно з нормальними листками. Провідні пучки розміщені несиметрично, на відміну від таких у невітрифікованих листків. Варто відмітити і морфометричні відмінності. Так, у вітрифікованих листків спостерігається потов-

щення епідермісу та його зовнішньої клітинної стінки з обох боків листка, при чому з нижнього боку – майже удвічі. Водночас, спостерігається зменшення площі перерізу епідермоцитів, що може вказувати на більш швидкий поділ та ріст клітин. Також у вітрифікованих листків зростає кількість продихів на одиницю площі епідерми: помірно з адаксіального боку та удвічі з абаксіального боку, що теж підтверджує інтенсивніші процеси поділу у видозмінених листків (рис. 4А, 4Б). У вітрифікованих листків спостерігається збільшення ширини продихів особливо з абаксіального боку, це пояснюється в першу чергу значно більшою відкритістю продихів (рис. 4А, 4Б). Збільшення кількості продихів удвічі, поряд з ширше відкритими продиховими щілинами, вказує на значне посилення транспірації у цих листків, порівняно з нормальними, що, у свою чергу, свідчить про високий осмотичний тиск у живильному середовищі, який є стресовим чинником.

Тестування обраних 15 модифікацій живильних середовищ (табл. 1) та безгормонального середовища МС/2, як контролю, показало досить високу здатність *S. scabiosifolia* до морфогенезу *in vitro*. Однак, наявність будь-яких регуляторів росту підвищували частоту появи аномально оводнених регенерантів, що свідчить про підвищену чутливість експлантів *S. scabiosifolia* до фітогормонального складу живильного середовища (табл. 3)

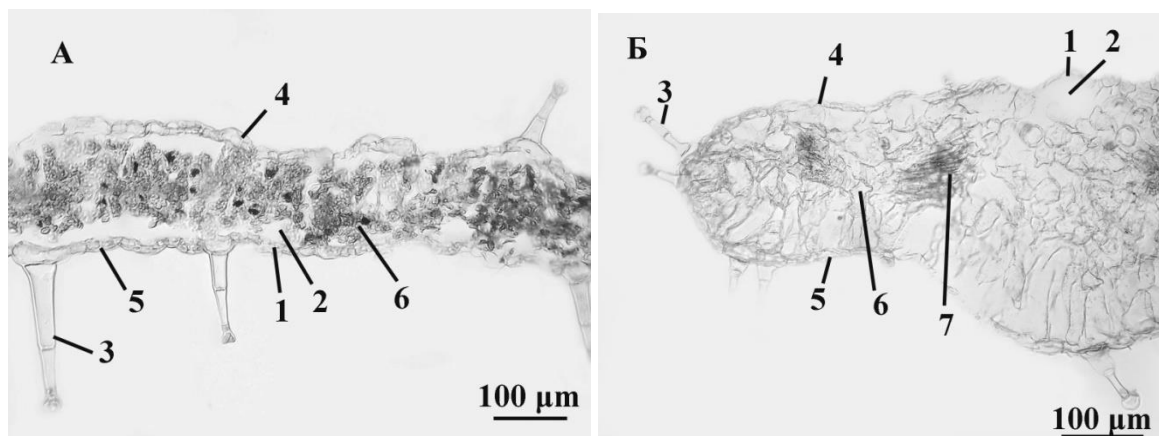


Рис. 3. Мікрофотографії поперечного перерізу листка *S. scabiosifolia*: А) у нормі; Б) вітрифікованого, де: 1-продих, 2-підпродихова камера, 3-залозиста трихома, 4-адаксіальна епідерма, 5-абаксіальна епідерма, 6- губчастий мезофіл, 7-провідний пучок.

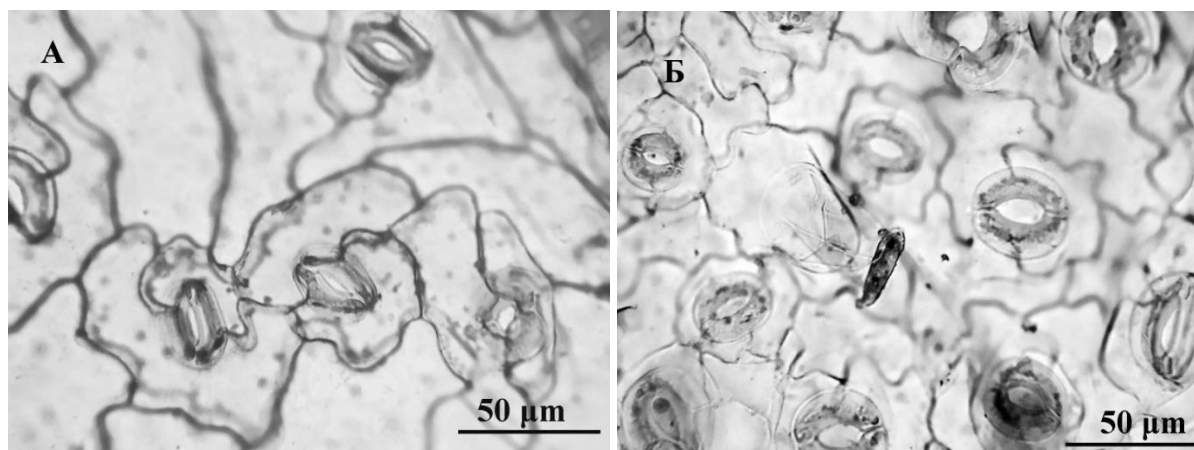


Рис. 4. Мікрофотографії абаксіальної епідерми листка *S. scabiosifolia*: А) листок у нормі; Б) вітрифікована форма.

Відсутність регуляторів росту у контролі (К) дозволило уникнути вітрифікації, проте швидкість росту та ефективність вегетативного розмноження виявилися надзвичайно низькими, а частота окислення і загибелі експлантів – високою. У зв'язку з цим було проведено двохетапне дослідження культивування рослин *S. scabiosifolia* на середовищі МС/2. На першому етапі вузлові живці культивували на безгормональному середовищі впродовж місяця, у результаті чого вижило і утворило мікрокущі з дуже дрібних адвентивних бруньок 42,11 % експлантів, а решта – окислились і загинули. На другому етапі, після пасажу мікрокущів на свіже живильне середовище МС/2 за місяць культивування, було отримано нормальні пагони, придатні для живцювання – частота регенерації нормальних пагонів становила 75 % від тих, що вижили, а

ефективність регенерації нормальних пагонів – 150 %. У середньому, за двохмісячний період культивування мікроживців та мікрокущів з мікроклонів, які на них утворилися, на контрольному середовищі частота регенерації нормальних пагонів становила 31,58 %, а ефективність регенерації – 63,16 %. У дослідних групах показниками, нижчими за контрольну групу, були лише показники блоку середовищ з додаванням 0,1 мг/л НОК у практично всіх варіантах поєднань з БАП (табл. 3). Отже, отримані результати на живильних середовищах, які містять навіть низькі концентрації НОК, виявилися найнижчими і свідчать про неефективність використаного ауксиноподібного регулятора росту при клональному мікророзмноженні *S. scabiosifolia*.

Таблиця 3. Морфогенетичні реакції вузлових експлантів (мікроживців) *S. scabiosifolia* на експериментальних живильних середовищах

Код середовища	Частота регенерації нормальних пагонів, %	Ефективність регенерації нормальних пагонів, %	Висота нормальних пагонів, см	Частота вітрифікації, % / розмір вітрифікованих мікрокущів*	Частота ризогенезу, %
1.1.1	9,09	18,18	1-1,5	100 / ***	0
1.2.1	10	20	1-1,5	100 / ***	0
1.3.1	20	20	1-1,5	100 / ***	0
1.4.1	28,57	28,57	1-1,5	100 / ***	0
1.5.1	33,33	44,44	1-1,5	88,88 / ***	0
1.1.2	57,14	192,86	2,5-4	50 / *	21,43
1.2.2	<b>64,29</b>	<b>200</b>	<b>3,5-7</b>	<b>35,71 / *</b>	<b>7,14</b>
1.3.2	66,67	150	2,5-5	33,33 / *	0
1.4.2	52,63	147,37	2,5-4	47,37 / **	5,26
1.5.2	<b>90</b>	<b>200</b>	<b>2,5-4</b>	<b>10 / *</b>	<b>10</b>
1.1	28,57	28,57	1,5-2	71,43 / ***	0
1.2	33,33	83,33	1-1,5	66,67 / ***	0
1.3	37,5	162,5	1-3,5	62,5 / ***	0
1.4	<b>80</b>	<b>165</b>	<b>2,5-7</b>	<b>35 / *</b>	<b>50</b>
1.5	50	150	1,5-3	50 / **	0
½ МС (К)	31,58	63,16	2,5-4	0	0

*Примітка.* Напівжирним шрифтом позначено середовища з найвищою ефективністю регенерації і, водночас, із найменшим ступенем вітрифікації.

При застосуванні БАП у поєднанні з ІОК або з комбінацією ІОК / НОК кількість вітрифікованих пагонів зменшується, а частота та ефективність регенерації нормальних пагонів зростає (табл. 3). Мінімального рівня вітрифікації та, при цьому, високої ефективності утворення нормальних, придатних для мікроживцювання пагонів-регенерантів з проявами ризогенезу, було досягнуто на живильних середовищах 1.2.2. (0,2 мг/л ІОК + 1 мг/л БАП), 1.5.2. (0,2 мг/л ІОК + 2,5 мг/л БАП) та 1.4. (0,2 мг/л ІОК + 0,1 мг/л НОК + 2 мг/л БАП). Деякі інші середовища також показали високу частоту та ефективність регенерації нормальних пагонів, яка, проте, поєднувалася з високою частотою вітрифікації, тому ці середовища ми вважали неефективними. Повної редукції явища вітрифікації досягти не вдалося, але, аналізуючи отримані результати, можна стверджувати, що ауксиноподібні регулятори росту відіграють провідну роль у виникненні гіпергідратації регенерантів *S. scabiosifolia*, а поєднання їх з цитокінінами викликає суттєве її зниження. Отримані

результати не повністю збігаються з результатами досліджень, опублікованими в літературних джерелах, де, наприклад, повідомляється, що саме вміст БАП у живильному середовищі може бути причиною вітрифікації [2]. Однак, інші можливі причини і шляхи усунення вітрифікації залишаються нез'ясованими для *S. scabiosifolia*, що відкриває ряд нових завдань для нових досліджень.

#### Висновки

Рослини *S. scabiosifolia* мають високу схильність до вітрифікації *in vitro*. Анатомічні особливості будови вітрифікованих листків свідчать про порушення транспірації, швидкості поділу і росту клітин епідермісу та мезофілу. Доведено, що знизити рівень вітрифікації можна, регулюючи вміст регуляторів росту в живильному середовищі. Провідну роль у виникненні вітрифікації регенерантів *S. scabiosifolia* відіграють ауксиноподібні регулятори росту, а поєднання їх з цитокінінами викликають суттєве її зниження.

#### References

1. Chervona knyha Ukrainy. Roslynnyy svit / za red. Didukha Ya. P. K.: Hlobalkonsaltnyh, 2009. 900 s. [in Ukrainian] / Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Дідуха Я.П. К.: Глобалконсалтинг, 2009. 900 с.

2. Debergh P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium *Physiologia plantarum*. 1983. Vol. 59 (2). P. 270–276. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb00770>
3. Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J. F., Dommes J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*. 2002. Vol. 37. P. 263–285.
4. Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A., Meryman H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiol.* 1984. 21. P. 407–426.
5. Hammerschlag F.A. Temperate fruits and nuts. In: “Tissue culture as a plant production system for horticultural crops”, Zimmerman R.H., Griesbach R.J., Hammerschlag F.A. and Lawson R.H. (eds). Martinus hoff Publishers, Dordrecht. 1986. P. 221–236.
6. Pasqualetto P.-L. Vitrification in Plant Tissue Culture. In: “Plant Aging”. Rodríguez R., Tamés R.S., Durzan D.J. (eds) NATO ASI Series (Series A: Life Sciences) Springer, Boston, MA. 1990. Vol. 186. P. 133–137. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5760-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5760-5_16).
7. Chandrika R., Shivakameshwari M.N., Thara Saraswathi K.J. Reduction of vitrification in in vitro shoot cultures of *Eryngium foetidum* L. – a potential aromatic and medicinal herb. *Indian Journal of Plant Sciences*. An Open Access, Online International Journal. 2015. Vol. 4 (2). P. 52–58. URL: <http://www.cibtech.org/jps.htm> (last accessed: 02.08.2019).
8. Kushnir H.P., Sarnatska V.V. Mikroklonalne rozmnozheniya roslyn. K.: Naukova dumka, 2005. 272 s. [in Ukrainian] / Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. К.: Наукова думка, 2005. 272 с.
9. Mel'nuchuk M.D., Novak T.V., Kunakh V.A. Biotekhnolohiia roslyn. Kyiv: Polihraf Konsaltynng, 2003. 520 s. [in Ukrainian] / Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. К.: Поліграф Консалтинг, 2003. 520 с.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
11. Romeis B. Mikroskopische Technik. München: R. Oldenbourg, 1948. 695 p.
12. Zakharevich S.F. K metodike opisaniya lista. *Vestnik Leningradskogo universiteta*. 1954. № 4. S. 65–75. [in Russian] / Захаревич С.Ф. К методике описания листа. *Вестник Ленинградского университета*. 1954. № 4. С. 65–75.
13. Baranova M.A. Klassifikatsiya morfologicheskikh tipov ust'its. *Botanicheskiy zhurnal*. 1985. T. 70, № 12. S. 1585–1595. [in Russian] / Баранова М.А. Классификация морфологических типов устьиц. *Ботанический журнал*. 1985. Т. 70, № 12. С. 1585–1595.

#### HOLUBENKO A. V., NUZHYNAN N. V.

*Educational and Scientific Centre “Institute of Biology and Medicine” of Taras Shevchenko National University of Kyiv,*

*Ukraine, 01032, Kyiv, Symon Petliura str., 1, e-mail: anastasiaholubenko@gmail.com, nuzhynan@gmail.com*

#### VITRIFICATION DURING DEVELOPMENT OF CLONAL MICROPROPAGATION TECHNOLOGY FOR RARE PLANT SPECIES OF *SALVIA SCABIOSIFOLIA* LAM.

**Aim.** Anatomical structure comparison of normal and vitrified *Salvia scabiosifolia* Lam plants *in vitro*; nutrient medium growth regulator selection for vitrification minimization. **Methods.** *In vitro* culture methods were used. Plants were grown on MS nutrient medium, enriched by peroxyacetic and indoleacetic acids and BAP with different combinations and concentrations. Anatomical leaf slices 10 μm thick were dyed with aceto-orcein and safranin. **Results.** Anatomical differences between the structures of normal and vitrified *S. scabiosifolia* leaves were detected. Minimal vitrification was achieved by using nutrient mediums with 0.2 mg/l IAA + 1 mg/l BAP; 0.2 mg/l IAA + 2.5 mg/l BAP; 0.2 mg/l IAA + 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP. **Conclusions.** Anatomical structural features of vitrified leaves indicate abnormal transpiration, division and growth speed of epidermis and mesophyll cells. Vitrification can be lowered by variation of growth regulation content in the nutrient medium. Major role in causing vitrification in *S. scabiosifolia* is played by auxins, but combining them with cytokinins lowers vitrification significantly.

**Keywords:** *Salvia scabiosifolia* Lam., *in vitro*, plant anatomy, vitrification, auxins, BAP.