

Мікророзмноження представників колекції горобини (*Sorbus* spp.)

Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України

Михайло В. Небиков¹ ✉, Тетяна А. Небикова²

¹Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України, м. Умань
e-mail: nebykov@ukr.net, ORCID ID 0000–0001–9734–1730

²Уманський державний педагогічний інститут ім. Павла Тичини
e-mail: tania.nebykova@gmail.com, , ORCID ID 0000-0002-6872-617X

✉ nebykov@ukr.net

Реферат.

Мета. Аналіз існуючих, удосконалення та розробка нових технологій мікророзмноження рослин роду *Sorbus* L. **Матеріали і методи.** За експланти використовували пагони з апікальною меристемою завдовжки 1,0–1,5 см з трьох-п'ятирічних рослин *S. aucuparia* L., *S. domestica* L., *S. ×hybrida* L., *S. rosea* McAll., *S. sambucifolia* (Cham.et Schlecht.) M.Roem., *S. torminalis* (L.) Crantz. та форм *S. aucuparia* 'Невеженська'; *S. aucuparia* 'Edulis'; *S. aucuparia* 'Kubova'. Стерилізацію, введення й проліферацію рослинного матеріалу проводили за близькими до загальноновживаних протоколами з відповідними їх коригуваннями насамперед щодо балансу ауксинів і цитокінінів у модифікованих середовищах для оптимізації морфогенезу, так само, як і акліматизацію рослин-регенерантів і дорощування їх до товарних гатунків.

Результати та обговорення. Життєздатність і якісні характеристики експлантів, а також вирощених із них рослин-регенерантів представників роду *Sorbus* у середньому були кращими на модифікованих за базовим прописом Мурасіге і Скуга живильних середовищах і адаптацією до нестерильних умов *ex vitro* за розробленими нами протоколами, яку проводили у торф'яних дисках у спеціальних камерах з регульованим штучним освітленням при фотоперіоді 16 год. й інтенсивністю освітлення 1–3 клк, температурою 22–24 °С та вологістю

повітря 80–90%. Краще приживлювання адаптованих у торф'яних дисках рослин отримали на субстраті з ґрунту лісового, піску, перліту та верхового мохового торфу у співвідношенні: 50:20:20:10. Приживлюваність висаджених у відкритий ґрунт розсадника у другій декаді травня контейнерних рослин-регенерантів за дводобого притінення і наступного постійного крапельного зрошування досягала близько 100%. **Висновки.** Вдосконалена технологія мікророзмноження, адаптації й дорощування мікроклонів може бути використана для масового розмноження та збереження видів *Sorbus* в умовах *ex situ*.

Ключові слова: адаптація, *ex vitro*, *in vitro*, експлант, живильне середовище, мікроклони, морфогенез, ризогенез, фітогормони.

Micropropagation of mountain ash (*Sorbus* spp.) specimens of the National dendrological park “Sofiyivka” collection

Mykhajlo V. Nebykov^{1✉}, Tatiana V. Nebykova²

¹National dendrological park «Sofiyivka» of NAS of Ukraine, Uman, Cherkasy region, Ukraine, e-mail: nebykov@ukr.net, ORCID ID0000–0001–9734–1730

²Pavlo Tychyna Uman State Pedagogical University
e-mail: tania.nebykova@gmail.com, , ORCID ID0000-0002-6872-617X

✉ nebykov@ukr.net

Abstract.

Aims. Analysis of technologies existing, their improvement, and development of new technologies of the genus *Sorbus* L. plants micropropagation. **Methods.** The shoot tips (ranging from 1.0 to 1.5 cm in length with apical meristems) were cut from three- to five-year-old plants of six species of *Sorbus* (*S. aucuparia* L., *S. domestica* L., *S. ×hybrida* L., *S. rosea* McAll., *S. sambucifolia* (Cham. et Schlecht.) M.Roem., and *S. torminalis* (L.) Crantz.) and of three cultivars of *S. aucuparia* (*S. aucuparia* 'Nevezhens'ka', *S. aucuparia* 'Edulis', and *S. aucuparia* 'Kubova') and they were used as explants for micropropagation. The plant materials decontamination, introduction, and proliferation were carried out according to commonly used protocols with appropriate adjustments, beginning with the balance of auxins and cytokines in modified media for optimizing morphogenesis and acclimatization techniques of plant-regenerants and growing them to commercial qualities. **Results.** The viability and quality characteristics of *Sorbus* explants, as well as of plant-regenerants growing out of them, were on average higher on basic of Murashige and Skuga nutrient media

modified according to our developed protocols. The plant-regenerants adaptation to non-sterile *ex vitro* conditions, which was carried out in peat discs in special chambers with artificial light regulation at a 16-hour photoperiod and light intensities of 1–3 kilolux, and temperature of 22–24 °C, and air humidity of 80–90% was successful. The adapted peat disks plants took root better on a substrate made of forest soil, sand, perlite, and mountain moss peat in the ratio: of 50:20:20:10. The survival rate of regenerating container plants transferred to the open soil of the nursery in the second decade of May under two-day shading and subsequent constant drip irrigation reached about 100%. **Conclusions.** Our improved micropropagation technology, adaptation, and growing microclones can be used for mass propagation and preservation of *Sorbus* spp. in *ex situ* conditions.

Key words: adaptation, *ex vitro*, *in vitro*, explant, nutrient medium, microclones, morphogenesis, rhizogenesis, phytohormones.

Вступ/Introduction. Під *Sorbus* L. (*Rosaceae* Juss.) належить до таксономічно складних поліморфних груп, у якому сучасні систематики нині нараховують близько тисячі видових наукових назв, з яких від 102 (*Sorbus...*, 2022) до 244 (*Sorbus...*, 2013) відносять до визнаних видів. Ревізія роду триває дотепер (Németh, 2010; Németh et al., 2016). Центром походження й первинного розвитку роду вважається Східно-азійська флористична область, де росте найбільша кількість примітивних видів і внутрішньовидових таксонів. Третина видів роду *Sorbus* ідентифікована у Центральному Китаї, а понад чверть їхньої чисельності — у Середземномор'ї. Деякі види *Sorbus* існували ще у третинному періоді. Імовірно, що предкові форми горобини з'явилися у крейдяному періоді (Gabrielian, 1978).

Таксономічні труднощі *Sorbus* зумовлені внутрішньовидовим поліморфізмом багатьох видів, їхніми великими ареалами, що перекриваються, а також часто слабкою міжтаксонною репродуктивною ізоляцією. Це призводить до утворення численних міжвидових і часто міжродових гібридів ($\times$ *Sorbopyrus* Schneid., $\times$ *Sorbaronia* Schneid., $\times$ *Sorbocotoneaster* Pojark., $\times$ *Amelosorbus* Rehd., $\times$ *Crategosorbus* Makino ex Koidz., $\times$ *Malosorbus* Browicz та інші). Міжвидова й міжродова гібридизація, спільно з властивими для цього роду апоміксисом і поліплоїдією ускладнюють аналіз його таксономічної структури (Poiarkova, 1953; Robertson et al., 1991; Postman, 2011).

Види роду *Sorbus* характеризуються різною плоїдністю. Найчастіше у його представників трапляються хромосомні набори: $2n = 34$, 51 та 68 (McAllister, 2005).

У виданому у 2000 році Каталозі рослин дендрологічного парку «Софіївка» було представлено лише п'ять видів *Sorbus* (Bilyk et al., 2000). У наступні роки колекція представників роду *Sorbus* зросла до 38 видо-сортотразків (Opalko et al., 2020), а на 2022 рік досягла 45, зокрема 18 видів, 17 плодових та 10 декоративних форм і сортів.

Декоративні якості багатьох видів горобини, лікувально-профілактичні

властивості, медоносні й перганосні характеристики, а також цінна деревина, що використовується у столярній справі й для виготовлення музичних інструментів (Nebykov et al., 2020, 2021), зумовлюють необхідність удосконалення існуючих та розробки нових технологій розмноження рослин роду *Sorbus*, зокрема методами *in vitro*.

Загалом технологічний процес мікроклонального розмноження рослин роду *Sorbus* принципово мало відрізняється від технологій розмноження у культурі *in vitro* інших рослин і включає декілька класичних послідовних етапів: стерилізація рослинного матеріалу; введення *in vitro*; підбір та оптимізація живильних середовищ для морфогенезу; одержання рослин-регенерантів та адаптація отриманих пробіркових рослин до умов *ex vitro* (Arrillaga et al., 1991; George, 2008).

Стерилізація рослинного матеріалу належить до найважливіших етапів розмноження *in vitro*. На поверхні органів вегетуючої рослини (пагонах, бруньках, проростках та інших джерелах експлантів) знаходиться велика кількість різноманітних мікроорганізмів. При введенні таких експлантів гриби й бактерії у процесі свого росту та розвитку не тільки поглинають поживні речовини живильного середовища, а також сповільнюють ростові процеси в експлантах, а в наступному, якщо рослина не загинула, гальмують усі її біологічні процеси. Правильний вибір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона згубно діяла на всі мікроорганізми і водночас мінімально пошкоджувала тканини розмножуваної рослини (Arrillaga et al., 1991; Piagnani et al., 2012).

При підборі та оптимізації живильних середовищ для проліферації і ризогенезу спостерігається багато спільних для різних рослин закономірностей, однак видова й сортова специфічність умов культивування *in vitro* та режиму живлення (Bilous & Matiashuk, 2021; George & De Klerk, 2008; Thorpe et al., 2008), і насамперед щодо вмісту підрегулюючих речовин, (Machackova et al., 2008; Van Staden et al., 2008; Moshkov et al., 2008) мають враховуватись на кожному етапі мікророзмноження (Lall et al., 2006; Ördögh et al., 2006; Piagnani et al., 2012). Завершальний етап мікророзмноження пов'язаний з адаптацією отриманих пробіркових рослин до нестерильних умов *ex vitro*. Хоча вже видано чимало праць присвячених проблемам адаптації й дорощуванню розмножених *in vitro* рослин до умов *ex vitro*, однак чимало питань залишаються нерозв'язаними дотепер, що зумовлює актуальність пошукових досліджень (Chalupa, 1992; Đurković & Mišalová, 2009; Emam & Esfahan, 2014; Yang et al., 2012).

Зазначені та інші проблеми мікророзмноження горобини (*Sorbus* spp.), а також цінність ряду представників цього роду для декоративного садівництва й перспективність упровадження у плідівництво та фармацію спонукали до активного пошуку вдосконалення способів їх розмноження *in vitro*.

Матеріали і методи/Materials and Methodology. За вихідний матеріал для введення *in vitro* представників роду *Sorbus* L. використовували пагони з апікальною меристемою завдовжки 1,0–1,5 см, які були взяті з 3–5 річних рослин: *S. aucuparia* L., *S. domestica* L., *S. ×hybrida* L., *S. rosea* McAll.,

S. sambucifolia (Cham.et Schlecht.) M.Roem., *S. torminalis* (L.) Crantz. та форм *S. aucuparia* 'Невеженська'; *S. aucuparia* 'Edulis'; *S. aucuparia* 'Kubova'.

Стерилізацію рослинного матеріалу розпочинали з промивання експлантів проточною водою. Наступним етапом стерилізації було їх занурення у водний розчин стерилізатора, після чого виконували триразове споліскування в дистильованій стерильній воді. До розчину стерилізатора додавали одну–дві краплі емульгатору Twin-80 для більш ефективної дії стерилізатора. Як стерилізуючі речовини вивчали: гіпохлорит натрію (NaOCl), дихлорид ртуті (HgCl₂) та нітрат срібла (AgNO₃). Після промивання у стерильній воді експланти висаджували на попередньо підібрані живильні середовища модифіковані нами на основі базового — Мурасиге–Скуга (Murashige & Skoog, 1962). Впродовж семи діб у кожному з варіантів визначали ефективність стерилізації, підраховуючи відсоток стерильних та інфікованих експлантів. Життєздатність введених експлантів оцінювали через 25 діб після введення. Стерилізований рослинний матеріал на живильному середовищі культивували за температури 25±1°C, 16-ти годинного фотоперіоду з інтенсивністю освітлення 1–3 клк і відносної вологості повітря 75%.

Важливим фактором-регулятором успішної диференціації і морфогенезу ізольованих тканин, є вміст у живильному середовищі регуляторів росту — ауксинів, цитокінінів, гібереліну, тому при модифікуванні базових середовищ ми змінювали концентрацію та/або форму регуляторів росту, звертаючи увагу на їх співвідношення. Для регульованого морфогенезу нами було проаналізовано у живильних середовищах 48 варіантів балансу ауксинів і цитокінінів (табл. 1).

Таблиця 1. Варіанти співвідношення вмісту ауксинів і цитокінінів, мг/л
Table 1. Variants of cytokinin-to-auxin ratios content, mg/L

Ауксини/ Auxins	Цитокініни/Cytokinins							
	0	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	5,0
0	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01	9	10	11	12	13	14	15	16
0,05	17	18	19	20	21	22	23	24
0,10	25	26	27	28	29	30	31	32
0,25	33	34	35	36	37	38	39	40
0,50	41	42	43	44	45	46	47	48

У кожному із цих варіантів досліджували у різних співвідношеннях макро- і мікроелементи у складі середовищ за прописами Мурасиге і Скуга (Murashige & Skoog, 1962) та Ллойда і Мак Коуна, (Lloyd & McCown, 1980), а також різний

вміст вітамінів і амінокислот, унаслідок чого попередні досліди включали близько 250 варіантів модифікації базових середовищ. На етапі пошуку оптимальної основи мінерального живлення життєздатні, стерильні експланти завдовжки 10–15 мм висаджували на базові живильні середовища без додавання регуляторів росту (по 50 експлантів на кожне середовище).

У процесі розмноження для гальмування апікального домінування та стимулювання росту пазушних бруньок у живильні середовища додавали 6-бензиламінопурин (6-БАП) у комбінації з іншими регуляторами росту: індолил-3-оцтовою (ІОК) та індолилмасляною (ІМК) кислотами і гібереліном (A_3).

Оцінювання ефективності середовищ та облік коефіцієнтів розмноження проводили після четвертого пасажу. Для з'ясування залежності ефективності морфогенезу експлантів від вмісту й джерел вуглеводів додавали сахарозу, глюкозу, фруктозу або мальтозу у кількості від 10 до 40 г/л.

Для адаптації до умов *ex vitro* рослини-регенеранти обережно, щоб не пошкодити кореневу систему, виймали з пробірок, сортували за розмірами, промивали у слабкому розчині перманганату калію ($KMnO_4$) і висаджували у торф'яні диски. Культивування висаджених рослин проводили у спеціальних камерах з регульованим штучним освітленням при фотоперіоді 16 год., температурі 22–24 °C та вологості повітря 80–90%. Впродовж однієї–двох діб камери залишали закритими для підтримання у них достатнього рівня вологості, після чого їх поступово відкривали, тим самим зменшуючи вологість повітря до 70–60% для пристосування до умов з меншою вологістю повітря.

Частково адаптовані у дисках рослини пересаджували у наповнені різнокомпонентними сумішами контейнери, які для подальшої акліматизації переставляли на стелажі в адаптаційну кімнату. У другій декаді травня рослини-регенеранти висаджували у відкритий ґрунт розсадника, де дорощували до товарних гатунків.

Результати та обговорення/Results and Discussion. У попередніх дослідах з'ясувалось, що життєздатність і якісні характеристики експлантів представників роду *Sorbus* у середньому були кращими за культивування на живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга, на якому було отримано 93,3% життєздатних, добре забарвлених експлантів, з високими потенціями до активного росту, тоді як на середовищі за прописом Ллойда і Мак Коуна було отримано 76,6% блідо-зелених експлантів задовільного стану і задовільними темпами росту.

Найбільший відсоток стерильних мікропагонів (74,7–90,1%) було одержано за стерилізації експлантів у 0,1% $HgCl_2$, з них 53,5–78,0% були життєздатними, в яких спостерігали явище прямого органогенезу. Кращі результати отримано за 1,5-хвилинної експозиції (рис. 1).

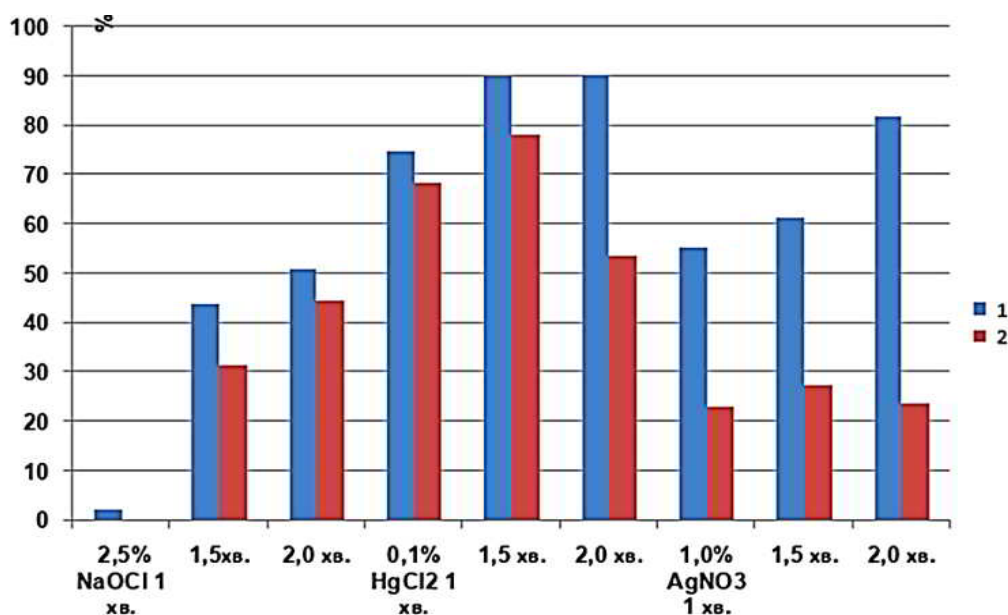


Рисунок 1. Ефективність стерилізації експлантів рослин роду *Sorbus*, %
(1 — стерильні експланти; 2 — життєздатні експланти).

Figure 1. The efficiency of sterilization of *Sorbus* plants explants, %
(1—sterile explants; 2—viable explants).

Необхідно зазначити, що при збільшенні часу дії HgCl_2 понад 2,0 хв. експланти втрачали свою життєздатність і були непридатні для подальшого культивування.

Життєздатність стерилізованих експлантів значною мірою залежала від їхнього онтогенетичного стану зумовленого строком введення в культуру (табл. 2).

Порівнюючи результативність введення живців у культуру *in vitro* у різні строки слід зауважити, що живці взяті на початку вегетації були менш заражені, однак їхній фізіологічний стан був близький до трав'янистих рослин. Тому вихід стерильних, однак нежиттєздатних експлантів був значно більший, а відсоток життєздатних суттєво знижений унаслідок високої частки некротичних живців, тож при введенні рослинного матеріалу *in vitro* у першій декаді квітня вихід стерильних життєздатних експлантів у середньому складав лише п'ять відсотків. Натомість у другій декаді квітня, за аналогічної стерилізації живців, їхній вихід значно збільшувався і складав 14,3%. Ця тенденція збільшення кількості експлантів, здатних до прямого органогенезу продовжувалась, і до третьої декади травня в середньому досягла 82,0%.

У наступному, за стерилізації рослинного матеріалу в першій декаді червня, середній вихід стерильних-життєздатних живців знизився до 63,1%. Впродовж другої та третьої декади червня відсоток життєздатних експлантів продовжував зменшуватися з 39,9% до 18,0%. Тож кращими строками для введення експлантів представників роду *Sorbus* була друга-третья декада травня, коли було отримано 74,6–82,0% здатних до прямого органогенезу експлантів.

Таблиця 2. Життєздатність стерилізованих експлантів рослин роду *Sorbus* залежно від термінів введення в культуру, %
Table 2. Viability of sterilized *Sorbus* plants explants depending on the date of introduction, %

Вид, форма/ Species, form	Дата введення/Date of introduction								
	5.04	11.04	26.04	4.05	18.05	24.05	3.06	13.06	22.06
<i>S. aucuparia</i>	24,2	38,3	51,9	72,9	78,2	70,8	58,2	10,8	0,2
<i>S. aucuparia</i> 'Невеженська'/ <i>S. aucuparia</i> 'Nevezhens'ka'	0	21,1	50,7	60,8	71,4	61,8	52,2	41,1	31,8
<i>S. aucuparia</i> 'Edulis'	0,6	16,3	39,0	61,4	81,9	88,6	59,2	54,5	27,2
<i>S. aucuparia</i> 'Kubova'	0	0,3	32,1	47,3	69,2	88,6	71,2	51,1	22,2
<i>S. domestica</i>	0,2	0,1	19,0	40,9	78,1	93,3	69,2	49,2	22,1
<i>S. ×hybrida</i>	19,8	33,3	55,6	64,3	76,9	85,7	70,0	45,7	1,9
<i>S. rosea</i>	0	0	19,3	54,2	77,1	71,2	47,8	11,1	0
<i>S. sambucifolia</i>	0,3	19,2	42,2	52,2	69,4	85,1	68,4	53,6	35,8
<i>S. torminalis</i>	0	0,4	21,2	54,5	69,1	92,9	72,1	41,9	21,1
Середнє/ Average	5,0	14,3	36,8	56,5	74,6	82,0	63,1	39,9	18,0

У процесі підбору найбільш ефективного живильного середовища для проліферації з'ясувалось, що в середньому з усіх вивчених представників роду *Sorbus* найвищі у досліді коефіцієнти розмноження було отримано на середовищах МС-225, МС-106 та МС-223, відповідно 5,88; 5,24 та 5,10. При цьому для *S. aucuparia* і його внутривидових таксонів кращим виявилось середовище МС-223 з показниками коефіцієнтів розмноження від 5,61 до 7,33. На середовищі МС-225 успішно розмножувались *S. ×hybrida*, *S. domestica* та *S. torminalis* з показниками 7,04; 6,92 та 6,42, відповідно. Показник коефіцієнта розмноження *S. aucuparia* на цьому середовищі був 5,71, що більше, ніж отримані на решті середовищ показники. На МС-106 істотно краще розмножувались *S. rosea* та *S. sambucifolia* з коефіцієнтами 7,51 та 7,53, що найбільше в досліді (табл. 3).

Таблиця 3. Коефіцієнт розмноження представників роду *Sorbus* на модифікованих МС-середовищах
Table 3. Multiplication coefficient *Sorbus* specimens on modified MS-media

Вид, форма/ Species, form	Модифіковане МС-середовище/ Modified MS-medium					
	МС- 216/ MS- 216	МС- 226/ MS- 226	МС- 106/ MS- 106	МС- 225/ MS- 225	МС- 223/ MS- 223	МС- 220/ MS- 220
<i>S. aucuparia</i>	2,71	3,86	5,14	5,71	6,56	2,62
<i>S. aucuparia</i> 'Невеженська'/ <i>S. aucuparia</i> 'Nevezhens'ka'	2,41	2,73	4,92	4,91	5,61	2,32
<i>S. aucuparia</i> 'Edulis'	1,65	2,55	4,03	4,89	6,44	1,33
<i>S. aucuparia</i> 'Kubova'	2,71	4,81	6,01	6,03	7,33	2,74
<i>S. domestica</i>	1,34	2,69	4,43	6,92	5,21	1,31
<i>S. ×hybrida</i>	1,59	2,77	4,28	7,04	5,19	1,49
<i>S. rosea</i>	1,11	3,78	7,51	4,52	2,81	
<i>S. sambucifolia</i>	1,79	5,41	7,53	4,93	3,76	2,81
<i>S. torminalis</i>	1,14	1,52	3,34	6,42	4,53	1,24
Середнє/Average	1,83	3,35	5,24	5,88	5,10	1,93

На підставі того, що для *S. aucuparia* і його внутривидових таксонів кращим було середовище МС-223, саме ця модифікація базового МС-середовища (табл. 4) була використана в досліді з визначення залежності морфогенезу експлантів представників роду *Sorbus* від вмісту джерел вуглеводів, зокрема сахарози, глюкози, фруктози чи мальтози. Річ у тім, що функції вуглеводів за нефотосинтетичних рівнів світла, властивих технологіям розмноження *in vitro*, суттєво зростають. Тож хоча періодично з'являються пропозиції щодо зменшення вмісту вуглеводів у живильних середовищах зі збільшенням інтенсивності освітлення на ранніх етапах до фотосинтетичних рівнів, однак більшість культур наразі залишаються залежними від джерела вуглеводів і їхньої кількості аж поки пробіркові рослини не досягають готовності до акліматизації (Bonga et al., 1992).

Таблиця 4. Модифіковане МС-середовище (МС-223)
Table 4. Modified MS-medium (MS-223)

Компонент/ Component	мг/л/ mg/L	Компонент/ Component	мг/л/ mg/L
NH ₄ NO ₃	1650	Na ₂ ЕДТА×2H ₂ O/ Na ₂ EDTA×2H ₂ O	37,3
KNO ₃	1900	Тіамін HCl/Thiamine HCl	1,0
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440	Піридоксин-HCl/Pyridoxine HCl	1,0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370	Нікотинова кислота/Nicotinic acid	0,5
KH ₂ PO ₄	170	Аскорбінова кислота/Ascorbic acid	0,5
H ₃ BO ₃	6,2	Мезоінозит/ Meso-inositol	100
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3	Амінооцтова кислота/ Aminoacetic acid	1,0
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025	6-бензиламінопурин/ 6-Benzylaminopurine,	1,0
CuSO ₄ ×H ₂ O	0,025	β-індолилоцтова кислота/ Indole-3-acetic acid	0,5
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,6	Сахароза/Sucrose	20000
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	Агар-агар/Agar-agar	7000
KJ	0,83	pH 5,6	
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,8		

На середовищі МС-223 в усіх вивчених 126 варіантах, в яких вміст сахарози й інших джерел вуглеводів був від одного до чотирьох відсотків, понад 90% морфогенних експлантів представників роду *Sorbus* було отримано у варіантах з 1,0 та 4,0% вмістом сахарози та 2,0% фруктози (табл. 5).

Натомість максимальна кількість пагонів на один експлант (7,2±0,36) була у варіанті з 3,0% глюкози. Ця ж 3,0% концентрація була кращою при використанні за джерело вуглеводів сахарози й фруктози з показниками 6,7±0,39 та 6,1±0,46 відповідно. У дослідях з мальтозою кращим був варіант з 4,0%, у якому в середньому сформувалося по 5,9±0,40 пагонів на один експлант. Хоча висока частота регенерації пагонів спостерігалася у варіантах з 3% і глюкози, і сахарози, але отримана істотна перевага у варіанті з 3% глюкозою може бути

підставою для подальшого вивчення глюкози за джерело вуглеводів у дослідах з різними середовищами.

Таблиця 5. Морфогенез експлантів представників роду *Sorbus* на модифікованому живильному середовищі (МС-223) залежно від вмісту джерел вуглеводів (у середньому по вивчених представниках роду *Sorbus*)
Table 5. *Sorbus* specimen's explants morphogenesis on modified MS-medium (MS-223) depending on the carbohydrates source (on average for all studied *Sorbus* specimens)

Джерело вуглеводів та їх вміст/ Carbohydrates source and content, %	Кількість морфогенних експлантів/ Shoot regeneration response	Кількість пагонів на експлант, шт./ Number of shoots per explant	Середня довжина пагона, см/ Average shoot height, cm
Сахароза/Sucrose			
1,0	95±7,6	4,6±0,23	1,6±0,08
2,0	78±5,9	6,1±0,41	4,7±0,24
3,0	85±6,7	6,7±0,39	8,6±0,43
4,0	93±7,4	2,2±0,11	7,9±0,40
Глюкоза/Glucose			
1,0	41±2,3	3,9±0,20	0,9±0,05
2,0	71±5,2	6,1±0,36	4,8±0,24
3,0	46±2,7	7,2±0,36	7,4±0,37
4,0	69±5,9	4,7±0,24	6,2±0,31
Фруктоза/Fructose			
1,0	47±2,9	2,3±0,12	2,8±0,14
2,0	91±6,9	5,3±0,37	3,9±0,20
3,0	52±3,8	6,1±0,46	6,5±0,48
4,0	81±6,3	1,4±0,07	5,0±0,25
Мальтоза/Maltose			
1,0	33±2,1	3,4±0,17	2,8±0,14
2,0	73±4,2	5,2±0,31	4,3±0,22
3,0	32±2,6	5,3±0,32	7,7±0,39
4,0	83±9,1	5,9±0,40	5,1±0,26

Для прискореного мікророзмноження довжина пагонів пробіркових рослин має дещо менше значення, аніж їхня кількість, однак цей показник було також проаналізовано з метою повнішого уявлення про фізіологічну дію різних джерел вуглеводів на ріст і розвиток розмножуваних *in vitro* представників роду *Sorbus*. Пагони, що розвинулися на доповненому 3% сахарози середовищі МС-223, в середньому мали найбільшу в досліді довжину — $8,6 \pm 0,43$ см. При цьому 3,0% концентрація у варіантах з рештою джерел вуглеводів була кращою, з майже однаковими показниками, $7,7 \pm 0,39$ см на мальтозі і $7,4 \pm 0,37$ см на глюкозі, та дещо нижчим — $6,5 \pm 0,48$ на фруктозі.

Від результативності ризогенезу мікроклонів значною мірою залежить загальний успіх мікророзмноження. Серед анатомічних чинників закладання кореневих примордіїв має велике значення близькість клітин до судинних тканин, а життєздатність вкорінених рослин залежить від місця закладання коренів, особливо отриманих *in vitro* (Iliev et al., 2021, Meier et al., 2020). У деяких варіантах навіть за достатньої кількості вкорінених *in vitro* пробіркових рослин спостерігали майже повну загибель рослин після перенесення їх у нестерильні умови. За вдалого поєднання складу середовища з умовами вкорінення та приведення їх у відповідність з генотипом рослини, тривалість індукції й ініціації росту коренів складає 10–15 діб. При цьому зменшення інтенсивності освітлення прискорює початок утворення коренів. Як відповідь на зумовлені дефіцитом світла стресові умови утворюються специфічні білки-рецептори, що мають високу спорідненість з ауксинами. Також підвищується активність пероксидази та ІОК-оксидази на перших етапах закладання коренів. Недостатній розвиток кореневих волосків особливо небезпечний на етапі адаптації пробіркових рослин до нестерильних умов *ex vitro* (Matskevich, 2020; Meier et al., 2020).

У кращому варіанті вкорінення експлантів розпочинали після шостого пасажу. Живці, що *in vitro* досягли 2,5–3,0 см завдовжки, відокремлювали від утворених конгломератів і пересаджували на живильні середовища з додаванням ауксинів. Ризогенез проходив за стандартної температури 25 ± 1 °C і 16-ти годинного фотоперіоду, проте зі зменшеною інтенсивністю освітлення до 1,0 кілолюкса. При цьому, після 4–5 тижнів культивування розпочиналось утворення коренів. Облік кількості вкорінених експлантів, кількості коренів на мікропагін, вимірювання довжини новоутвореного коріння виконували після семи тижнів укорінення.

Для стимулювання ризогенезу в мікропагонах представників роду *Sorbus* у процесі їхнього розмноження *in vitro* до приготованого за МС-прописом середовища зі зменшеним удвічі вмістом макро- і мікроелементів та заміною глюкози на сахарозу у кількості 20 г/л додавали ауксини, зокрема індолилмасляну (ІМК), індолилоцтову (ІОК) та нафтилоцтову (НОК) кислоти у різних концентраціях. За контрольний варіант використовували середовище без ауксинів (табл. 6).

За результатами аналізу вкорінення мікропагонів залежно від концентрацій ауксинів з'ясовано, що ризогенез найбільш ефективно відбувався на середовищі з додаванням 0,5 мг/л ІМК, на якому пагони починали формувати корені через

20–25 діб. Укорінення у цьому варіанті в середньому досягло 92,5% за досить високої якості вкорінення *in vitro* рослин починаючи з ранніх етапів адаптації до нестерильних умов *ex vitro*.

Таблиця 6. Ризогенез експлантів представників роду *Sorbus* на модифікованому живильному середовищі (МС-238) залежно від вмісту ауксинів (у середньому по вивчених представниках роду *Sorbus*)
Table 6. *Sorbus* specimen's explants rhizogenesis on modified MS-medium (MS-238) depending on the auxins content (on average for all studied *Sorbus* specimens)

Ауксин/Auxin	Вміст, мг/л Content, mg/L	Середня кількість укоріненнях мікропагонів/Average number of rooted microshoots		Середня кількість коренів/Average root number
		шт./ microshoots	%	
ІОК/ІАА	0	0	0	0
	0,1	4±0,2	10,0±0,4	0,7±0,1
	0,5	19±1,1	47,5±2,2	4,7±0,1
	1,0	17±1,2	42,5±1,9	2,4±0,1
	1,5	9±0,8	22,5±1,3	0,6±0,2
ІМК/ІВА	0	0	0	0
	0,1	8±0,8	20,0±1,2	3,4±0,1
	0,5	37±1,9	92,5±6,3	5,6±0,1
	1,0	25±1,6	62,5±2,8	4,9±0,2
	1,5	15±0,9	37,5±2,2	2,9±0,1
НОК/НАА	0	0	0	0
	0,1	2±0,2	5,0±0,2	0,5±0,1
	0,5	30±2,0	75,0±5,7	4,1±0,2
	1,0	21±1,5	52,5±4,1	3,8±0,1

Через 11–14 діб після пересаджування на це середовище, на поверхні торф'яних дисків з'явилися біленькі корінчики (рис. 2), що засвідчило активний

плин ростових процесів у рослин. На даному етапі спостерігали не лише ріст кореневої системи, а й ріст апікальної частини рослини, у результаті чого з'являлося по дві–три пари новоутворених листків.



вкорінена пробіркова рослина/
rooted *in vitro* regenerant



адаптована пробіркова рослина у
торф'яному дискові/adapted *in vitro*
regenerant in peat planting disc



рослина-регенерант у пластиковому
контейнері/*in vitro* regenerated plant
in plastic pot



рослина-регенерант на ділянці
дорощування/*in vitro* regenerated
plant at the nursery

Рисунок 2. Рослина-регенерант *S. x hybrida* на етапах адаптації
Figure 2. *In vitro* regenerated plant of *S. x hybrida* on the stages of
adaptation

Не менше значення при дорощуванні розмножених *in vitro* рослин мав склад ґрунтосумішей. Краще приживлення адаптованих у торф'яних дисках рослин спостерігали за першого варіанту ґрунтосуміші: ґрунт лісовий, пісок, перліт та торф у співвідношенні:50:20:20:10 (табл. 7).

Таблиця 7. Приживання рослин-регенерантів представників роду *Sorbus* залежно складу субстрату
Table 7. Percentage survival of regenerated plantlets of *Sorbus* specimens depending on the substrate composition

Варіант/ Variant	Компонент субстрату/ Substrate component	Вміст компоненту у субстраті, % Percentage of substrate component	Приживання рослин- регенерантів, % Percentage survival of regenerated plantlets
контроль/ control	ґрунт лісовий/ forest soil	100	21,2±1,1
I	ґрунт лісовий/ forest soil	50	92,4±4,6
	торф верховий моховий/ peat riding moss	20	
	пісок річковий/ river sand	20	
	перліт/pearlite	10	
II	ґрунт лісовий/ forest soil	40	74,1±3,7
	торф верховий моховий/ peat riding moss	30	
	пісок річковий/ river sand	30	
III	ґрунт лісовий/ forest soil	60	60,5±3,0
	пісок річковий/ river sand	20	
	перліт/pearlite	20	

Такий склад ґрунтосуміші забезпечив приживання в середньому 92,4% рослин. Натомість у варіанті II, за відсутності у субстраті перліту, спостерігали зниження відсотку приживання рослин до 74,1%, а у варіанті III, в якому не було торфу верхового мохового, збільшено частки ґрунту лісового й перліту до 60 й

20 відсотків відповідно, приживання в середньому становило 60,5%. Можна припускати, що зменшення відсотку приживання рослин за відсутності у складі ґрунтосуміші торфу верхового мохового можна пояснювати зниженням пухкості субстрату. Адже у контрольному варіанті зі 100-відсотковим вмістом ґрунту лісового, тобто в якому не було ні торфу верхового мохового, ані піску річкового, приживання було найменшим і в середньому становило лише $21,2 \pm 1,1\%$.

За пересаджування рослин-регенерантів у відкритий ґрунт розсадника у другій декаді травня, з дводобовим притіненням і постійним крапельним зрошуванням, приживлюваність контейнерних рослин досягала близько 100%. На початкових етапах росту на розмножуваних рослинах спостерігали незначні морфологічні зміни листкового апарату та стебла, однак до кінця вегетації вони набували вигляду, характерного для рослин-донорів експлантів.

Висновки/Conclusions. Результати дослідів з мікророзмноження представників колекції горобини (*Sorbus* spp.) Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України дають підстави рекомендувати використовувати за експланти заготовлювані у другій-третьій декадах травня і стерилізовані протягом 1,5-хвилинної експозиції у 0,1% розчині HgCl_2 мікроживці для введення на модифіковані на основі базового пропису Мурасиге і Скуга середовища з наступним їх укорінюванням на МС-середовищі з половинним вмістом базових солей та додаванням по 0,5 мг/л ауксинів (індолилцетової або індолилмасляної кислоти). Вдосконалена технологія мікророзмноження, адаптації й дорощування мікроклонів може бути використана для масового розмноження та збереження видів *Sorbus* в умовах *ex situ*.

Подяки/Acknowledgement. Матеріали статті частково ґрунтуються на виконаних за темою «Фактори специфічності адаптаційних процесів у розмножуваних *in vitro* плодо-декоративних деревних рослин (номер державної реєстрації 0117U000459). Автори висловлюють щирі вдячність завідувачеві відділу генетики, селекції і репродуктивної біології рослин НДП «Софіївка» НАН України професору О. А. Балабаку та провідному науковому співробітникові цього відділу професору А. І. Опалку за цінні поради щодо проведення спостережень і слушні зауваження при підготовленні рукопису.

Список посилань/References

Arrillaga, I., Marzo, T., & Segura, J. (1991). Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant cell, tissue and organ culture*. Vol. 27. No 3. P. 341–348.

Bilous, S. Y., & Matiashuk, R. K. (2021). Primary morphogenesis of *Sorbus torminalis* L. (Grantz) into *in vitro* culture. *Ukrainian Journal of Forest and Wood Science*. Vol. 12. No 4. P. DOI: <http://dx.doi.org/10.31548/forest2021.04.006>. (in Ukrainian).

Bilyk, O. V., Wegera, L. V., Jim, M. M., Kozlov, V. G., Koldar, L. A., Kosenko, I. S., Marno, L. I. ... & Sobchenko, V. F. (2000). *The Plant Catalog of the Dendrological Park “Sofiyivka”* [Ed.: Ivan S. Kosenko]. Uman: Dendrological Park “Sofiyivka” of NAS of Ukraine. 160 p. (in Ukrainian).

Bonga, J. M., Aderkas, P., & von Aderkas, P. (1992). 3. Media preparation. *In vitro culture of trees*. Dordrecht: Springer Science & Business Media. Vol. 38. Forestry Sciences. P. 12–54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-015-8058-8>.

Chalupa, V. (1992). Micropropagation of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) and wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) Cr.]. *High-tech and Micropropagation II* [Ed.: Y. P. S. Bajaj] Berlin, Heidelberg: Springer. P. 211–226. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6_11.

Đurković, J., & Mišalová, A. (2009). Wood formation during *ex vitro* acclimatisation in micropropagated true service tree (*Sorbus domestica* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. Vol. 96. No 3. P. 343–348.

Emam, M., & Esfahan, E. Z. (2014). Effect of chemical (enriched-CO₂ and sucrose-free medium) and physical factors (light period and temperature) on rooting and hardening of *Sorbus aucuparia* L. plantlets. *International Journal of Biosciences (IJB)*. Vol. 4. No 5. P. 176–181.

Gabrielian, E. Ts. (1978). *Riabiny (Sorbus L.) Zapadnoy Azii i Gimalaev*. Erevan: Izd-vo AN Arm. SSR. 258 s. (in Russian).

George, E. F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. The Background. (3rd Edition). Dordrecht: Springer. Ch. 1. P. 1–28.

George, E. F., & De Klerk, G. J. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. (3rd Edition). Dordrecht: Springer. Ch. 3. P. 65–113.

Iliev, I., Kitin, P., & Funada, R. (2001). Morphological and anatomical study on *in vitro* root formation of silver birch (*Betula pendula* Roth.). *Propagation of ornamental Plants*. Vol. 1 P. 10–19.

Lall, S., Mandegaran, Z., & Roberts, A. V. (2006). Shoot multiplication and adventitious regeneration in *Sorbus aucuparia*. *Plant cell, tissue and organ culture*. Vol. 85. No 1. P. 23–29. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9045-3>.

Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*. Vol. 30. P. 421–427.

Machackova, I., Zazimalova, E. & George, E. F. (2008). Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. (3rd Edition). Dordrecht: Springer. Ch. 5. P. 175–204.

Matskevich, V. V. (2020). *Microclonal propagation of plant species in vitro and their post-septic adaptation*: Qualifying scientific work on the rights of the manuscript. The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of agricultural sciences on a specialty 06.01.05 – breeding and seed-growing". Sumy national agrarian university of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy. 478 p.

McAllister, H. (2005). *The Genus Sorbus: Mountain Ash and Other Rowans*. Richmond, Surrey, UK: Royal Botanic Gardens, Kew. 305 p.

Meier, M., Liu, Y., Lay-Pruitt, K. S., Takahashi, H., & von Wirén, N. (2020). Auxin-mediated root branching is determined by the form of available nitrogen. *Nature Plants*. Vol. 6. No 9. P. 1136–1145. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00756->

2.

Moshkov, I. E., Novikova, G. V., Hall, M. A. & George, E. F. (2008).

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiology of plant*. Vol. 15. No 13. P. 473–497.

Nebykov, M. V, Koldat L. A., Oksantiuk, V. M, & Koval, M. M. (2020). *Fundamental and Applied Aspects of Plant Introduction in the Context of Global Environmental Change*: materials of the International Scientific Conference dedicated to the 85th anniversary of founding M. M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine (Kyiv, July 5-7, 2021). Kyiv: Lira-K. P. 385–388. (in Ukrainian).

Nebykov, M. V, Oksantiuk, V. M, & Nebykova, T. A. (2021). Medicinal properties of *Sorbus aucuparia* L. *Ethnobotanic traditions in agronomy, pharmacy and garden design*: materials of the Fourth International Scientific Conference dedicated to the 30th anniversary of independence of Ukraine (Uman, July 5-7, 2021). Uman: Vizavi. P. 159–163. (in Ukrainian).

Németh, C., Barabits, E., & Bílá, J. (2016). New *Sorbus* subg. *Tormaria* (*S. latifolia* agg.) species from the southwestern part of the Transdanubian Mountain Range (Keszthely Mts, Hungary). *Studia botanica hungarica*. Vol. 47. No 2. P. 297–318. DOI: <http://dx.doi.org/10.17110/StudBot.2016.47.2.297>.

Németh, Cs. (2010). Taxonomic revision, typification and validation of *Sorbus* (*Rosaceae*) taxa in the Herbarium Carpato-Pannonicum in Budapest I. *Acta Botanica Hungarica*. Vol. 52. No 3–4. P. 377–397. DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/ABot.52.2010.3-4.14>.

Opalko O., Kucher N., Andrienko O., Nebykov M., Serzhyk O., Konopelko A., Opalko A. (2020). The pome fruit (*Malinae* Rev.) collections of the National dendrological park “Sofiyivka” of NAS of Ukraine. *International Conferences “Plant Diversity: Status, Trends, Conservation Concept” 2020. BIO Web of Conferences*. Vol. 24. P. 00065 (1–5 p.). DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/bioconf/20202400065>.

Ördögh, M., Jámor-Benczúr, E., Mándy, A. T., & Lelik, L. (2006). The effects of growth regulators in proliferation of *Sorbus redliana* 'Burokvölgy'. *International Journal of Horticultural Science*. Vol. 12. No 1. P. 77–83.

Piagnani, M. C., Zaccheo, P., & Crippa, L. (2012). Micropropagation of service tree (*Sorbus domestica* L.): role of some factors on *in vitro* proliferation and rooting, and *extra vitro* acclimatization. *Agrochimica*. Vol. 56. No. 4-5. P. 219–233.

Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Absciscic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. (3rd Edition). Dordrecht: Springer. Ch. 7. P. 227–281.

Poiarkova, A. I. (1953). *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark.. — novyy estestvennyy mezhrodovoy gibrid. *Bot. mat-ly gerbariia Bot. in-ta im. V. L. Komarova AN SSSR*. T. 15. S. 92–108.

Postman, J. D. (2011). Intergeneric hybrids in *Rosaceae* subtribe *Pyrinae* (formerly subfamily *Maloideae*) at USDA genebank. *Acta Horticulturae (ISHS)*. Vol. 918. P. 937–943

Robertson, K. R., Phipps, J. B., Rohrer, J. R., & Smith, P. G. (1991). A synopsis of genera in *Maloideae* (*Rosaceae*). *Systematic botany*. Vol. 16. No 2. P. 376–394.

Sorbus L. (2013). The Plant List is a working list of all known plant species. Version 1.1. September 2013. URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rosaceae/Sorbus/> (Accessed 10 August 2022).

Sorbus L. (2022). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet. URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30004837-2> (Accessed 10 August 2022).

Thorpe, T. A., Stassolla, C., Yeung, E.C., Klerk, G.-J., Roberts, A. V., & George, E. F. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. (3rd Edition). Dordrecht: Springer. Ch. 4. P.115–173.

Van Staden, J., Zazimalova, E., & George, E. F. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. (3rd Edition). Dordrecht: Springer. Ch. 6. P. 205–226.

Yang, L., Wang, J., Bian, L., Li, Y., & Shen, H. (2012). Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in mountain ash (*Sorbus pohuashanensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. Vol. 111. No 2. P. 173–182. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0181-2>.