

**Р.М. ГРЕЧАНИК<sup>1</sup>, М.М. ГУЗЬ<sup>2</sup>, Н.О. ОЛЕКСІЙЧЕНКО<sup>3</sup>**

**ОСОБЛИВОСТІ ЕТАПУ НАМНОЖЕННЯ У  
МІКРОКЛОНУВАННІ ШОВКОВИЦІ БІЛОЇ (*MORUS ALBA LINN.*)  
IN VITRO**

*Представлено стислий огляд літературних джерел, що стосуються особливостей множення у культурі тканин шовковиці білої. Розроблено ефективну технологію мультиплікації. Отримано найвищу частку експлантів, які утворили адвентивні мікропагони; найбільшу кількість нових мікропагонів на експлант і нових сегментів на мікропагін. На цьому етапі для ініційованих експлантів акліматизованої в Україні *Morus alba Linn.* оптимальним було середовище MS, доповнене 1,0 мг/л 6-BA і 0,5 мг/л KT. Окреслено перспективні напрямки подальших досліджень.*

**Ключові слова:** *in vitro*, шовковиця біла, експлант, середовище, мультиплікація.

---

<sup>1</sup> ГРЕЧАНИК Руслан Мар'янович – кандидат сільськогосподарських наук, доцент. Національний лісотехнічний університет України. Україна, м. Львів, 79057. Тел. моб.: +38-067-255-28-82. E-mail: rugrech@gmail.com

<sup>2</sup> ГУЗЬ Микола Михайлович – дійсний член Лісівничої академії наук України, доктор сільськогосподарських наук, професор. Національний лісотехнічний університет України. Україна, м. Львів, 79057. Тел. моб.: +38-050-315-23112. E-mail: mguz@ukr.net

<sup>3</sup> ОЛЕКСІЙЧЕНКО Надія Олександрівна – дійсний член Лісівничої академії наук України, доктор сільськогосподарських наук, професор. Національний університет біоресурсів і природокористування України. Україна, м. Київ. Тел. моб.: +38-098-330-22-78. E-mail: nooalex@bigmir.net

**Вступ.** Особливості введення шовковиці білої (*Morus alba* Linn.) в культуру *in vitro* представлено у наших роботах, що стосуються відбору, деконтамінації та ініціації експлантів досліджуваного виду [18-19].

Наступний відповідальний етап у мікроклонуванні шовковиці білої – множення експлантів. При цьому основним завданням

біотехнологів є підвищення частоти регенерації – частки експлантів, які утворили адвентивні мікропагони; кількості нових мікропагонів на експлант і кількості нових сегментів на мікропагін [20].

Основні результати розроблення технологій множення експлантів *Morus alba* L. у культурі *in vitro* наведено в табл. 1.

**Табл. 1. Технології множення у культурі *Morus alba* L. *in vitro***

Джерело і тип експлантів	Середовище для множення ініційованих експлантів / Результат	Автор(и)
1	2	3
Бруньки культивування Mysore-5	MS + 5,0 мг/л 6-BA + 1,1 мг/л КТ / R = 94,0 %	V. Balakrishnan, M. Ram Latha, K.C. Ravindran, J. Philip Robinson [1]
Пагони з верхівковими бруньками (4,0 см) 4-річних рослин	MS + 0,5 мг/л 6-BA + 0,5 мг/л ANA / SH = 8,0 із сер. довжиною адвентивних пагонів 7,13 см	E.S. Barbosa, D. Agramonte, R. Barb'n, F. Jiminez, R. Collado, M. Purez, O. Gutierrez [2]
Бруньки 80-річних дерев культивування 'Fontanarossa Bianca'	MS + 30 г/л цукрози + 500 мг/л аскорбінової кислоти + 0,3 мг/л 2,4-D / після чотирьох місяців культивування утворилось 28,3 нових пагонів.	C. Benedetta, P. Germana, MA. Germana [3]
Листки і бруньки культиварів 'Chinese White', 'Kokuso-27' та 'Ichinose'	MS + 1,0 мг/л 6-BA + 30 г/л цукрози / множення спостерігали до 4-5-и субкультивувань	B.S. Bhau, A.K. Wakhlu [4]
Молоді листки гібриду <i>Morus alba</i> var. S54 x <i>Morus alba</i> var. Noi	MS (pH = 5,8) + 0,25 мг/л 6-BA + B5 + 2 % цукрози + 0,1 % активованого вугілля / найкращий результат множення	S. Chaicharoen, S. Akrapanthu [5]
Пазушні бруньки культиварів 'Chinese White', M-5, S-36 і S-13.	MS + 2,22 µM 6-BA + 30 г/л фруктози / енергійне множення у всіх 4-ох культиварів.	D.S. Vijaya Chitra, G. Padmaja [6]
Листки	MS + 2,22 мкМ 6-BA / SH = 9,4-10,6	D.S. Vijaya Chitra, G. Padmaja [7]
Пагони з бруньками 24 культиварів (1,0-1,5 см)	MS + 1,0 мг/л 6-BA / найкращий результат множення	S. Enmoto [8]
Верхівки та вузлові сегменти пагонів (4-5 см)	MS + 1,0 мг/л 6-BA + 0,5 мг/л КТ / R = 100 % усіх типів експлантів за 6 днів (SH = 6,2 за середньої довжини адвентивних пагонів 4,92 см)	A. Habib, M.R. Ali, M.N. Amin and M.M. Rahman [9]
Пазушні бруньки	MS + 0,5 мг/л IBA + вітаміни LS / найкращий результат множення	A.K. Jain, S.B. Dandin, K. Serigupta [10]
Пазушні бруньки	MS + 5,0 µM 6-BA / SH = 1,7	A. Karknen, L.K. Simola, T. Coponen [11]
Вузлові сегменти пагонів (1,5-2,0 см) M. alba 'Sujanpuri'	MS + 3 % цукрози + 2,5 мг/л 6-BA + 0,3 мг/л GA3 + 0,1 % NaCl (або без NaCl) / У експлантів, зібраних з липня по жовтень SH=8, з листопада по лютий – SH=10	S. Kashyap, S. Sharma [12]
Зачатки листків, відібраних взимку бруньок <i>Morus alba</i> L. 'Ohyutaka'	MS + 1,0 мг/л 6-BA / добре утворювались додаткові бруньки, особливо на світлі	H. Machii [13]
Вузлові сегменти пагонів 5-річного культивування S-1	MS + 2,0 мг/л 6-BA / R = 50 %, SH = 10-20	P. Narayan, S. Chakraborty, G.S. Rao [15]
Вузлові сегменти 3-4-річних парникових рослин <i>Morus alba</i> L.	MS + 3 % цукрози + 2,5 µM 6-BA / SH ≤ 13	Kiran K. Sharma, Trevor A. Thorpea [16]
Бруньки верхівкових пагонів 12-річного культивування S1	MS + 1,0 мг/л 6-BA + 1,0 мг/л КТ / SH = 8,35. Субкультивування було можливим до 7 разів	A. Zaman, R. Islam, O.I. Joarder, M. Islam [17]

**Матеріали і методи.** Після появи пагонів на ініціальних експлантах (через 4-6 тижнів ініціації), їх було поділено на верхівки пагонів та сегменти вузлів і надалі використовували для пасажів з вертикальним розміщенням експлантів на базові середовища MS [14], доповнені різними комбінаціями та концентраціями (0-1,5 мг/л) фітогормонів 6-BA і КТ. Вибір середовища MS, вмісту та концентрації фітогормонів ґрунтувався на найефективнішому їх застосуванні у дослідженнях, результати яких представлено в опрацьованих літературних джерелах [1-13, 15-17]. Кожний варіант досліду передбачав пасаж 100 ініційованих асептичних експлантів Ma3 і Ma50 у пропорції 1:1 (по 50 шт.). Експланти позначали першими літерами видової назви із зазначенням віку донора. До кожного середовища додавали 7 г/л агару. Автоклавування проводили за температури 121 °C і тиску 1,2 кгс/см<sup>2</sup> протягом 20 хв. з попереднім доведенням рН до 5,73. Експланти

вирощували у культуральній кімнаті за температури 25<sup>±1</sup> °C, відносної вологості 65-70 % та фотоперіоду 16/8 год. з інтенсивністю світлового потоку 3000 lx (ЛБ Philips). Кожних 14 діб експланти пасажували на свіже живильне середовище. Продуктовані адвентивні пагони відбирали що 30 діб або ділили і субкультивували на свіжому середовищі до 4 разів. У всіх випадках в кінці кожного нового субкультивування занотовували частку експлантів, які утворили адвентивні мікропагони (R); кількість нових мікропагонів на експлант (SH) і кількість нових сегментів на мікропагін (SE). Середні значення показників множення експлантів визначено з урахуванням усіх варіант генеральної сукупності.

**Результати досліджень і дискусія.** На стадії множення експлантів *Morus alba* Linn. на модифікованому середовищі MS отримали регенеранти з добре розвиненими адвентивними

пагонами (рис. 1). Результати культивування експлантів Ma3 і Ma50 протягом 30 діб наведено у табл. 2.



Рис. 1. Етап намноження експлантів *Morus alba* Linn. у культурі in vitro

Табл. 2. Показники намноження різних типів експлантів шовковиці білої на модифікованих поживних середовищах MS (30 діб культивування)

Варіант досліджу	Фітогормони		Показники намноження експлантів					
			Ma3			Ma50		
	6-BA	КТ	R, %	SH, шт.	SE, шт.	R, %	SH, шт.	SE, шт.
1	–	0,5	78,0	5,3	1,7	76,0	2,9	1,3
2	–	1,0	84,0	6,1	1,6	76,0	3,1	1,4
3	–	1,5	90,0	5,7	1,6	80,0	3,3	1,6
4	0,5	–	82,0	5,2	1,3	76,0	3,0	1,1
5	1,0	–	88,0	5,3	1,4	78,0	2,9	1,2
6	1,5	–	88,0	7,0	1,4	80,0	3,3	1,4
7	0,5	0,5	92,0	5,9	2,0	86,0	3,4	1,8
8	0,5	1,0	98,0	8,3	3,8	90,0	4,4	2,2
9	0,5	1,5	98,0	8,6	3,9	94,0	6,1	2,0
10	1,0	0,5	100,0	10,3	4,6	98,0	7,5	2,7
11	1,0	1,0	100,0	8,8	3,5	96,0	7,4	2,6
12	1,0	1,5	96,0	8,9	3,0	96,0	6,8	2,3
13	1,5	0,5	98,0	8,4	3,4	92,0	5,7	2,0
14	1,5	1,0	96,0	8,9	3,2	94,0	5,7	2,2
15	1,5	1,5	90,0	7,2	2,5	94,0	4,6	1,9

У всіх клонів у процесі культивування спостерігали проліферацію калюсу при основі експланта. Сформований калюс був щільним і мав зелене забарвлення. На наш погляд, завдяки великій адсорбційній поверхні калюс сприяв проникненню у експлант живильних елементів.

Дані табл. 2 свідчать, що у експлантів Ma3 і Ma50 на етапі намноження існує клонова різниця у кількості новоутворених мікропагонів на експлант і кількості нових сегментів на мікропагін. Вищі показники SH і SE спостерігали в експлантів Ma3, що пояснюється молодшим віком донорів і, відповідно, кращою здатністю до регенерації. Частка клонів, які утворили адвентивні мікропагони (R) у Ma3, теж була дещо вищою порівняно з Ma50. Усі апробовані клони, на наш погляд, добре зреагували (76-100%) на умови культивування на етапі намноження.

**Висновки.** Для намноження ініційованих експлантів шовковиці білої найбільш придатним виявилось середовище MS, доповнене 7 г/л агару і 30 г/л цукрози. Найкращого результату мультиплікації – найвищу частку експлантів, які утворили адвентивні мікропагони; найбільшу кількість нових мікропагонів на експлант і нових сегментів на мікропагін отримали на середовищі MS, доповненому 1,0 мг/л 6-BA і 0,5 мг/л КТ. Наступним етапом досліджень є з'ясування особливостей укорінення отриманих регенерантів in vitro і адаптації їх ex vitro.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Balakrishnan V. Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants / V. Balakrishnan, M. Ram

Latha, K.C. Ravindran, J. Philip Robinson // Botany Research International. – IDOSI Publications. – 2009. – Vol. 2 (1). – P. 42-49.

2. **Barbosa E.S.** Propagacion in vitro de *Morus alba* L. en medio de cultivo semisolido / E.S. Barbosa, D. Agramonte, R. Barbon, F. Jimenez, R. Collado, M. Purez, O. Gutierrez // *Biocologia Vegetal*. – Clara (Cuba) : Science Publishers Inc., 2005. – Vol. 5, № 2. – P. 81-87.

3. **Benedetta C.** In vitro response of two Sicilian genotypes of *Morus* (L.) through axillary bud culture / C. Benedetta, P. Germana, M.A. Germana // *Caryologia*. – Hosted by University of Florence, 2007. – Vol. 60. – № 1-2. – P. 178-181.

4. **Bhau B.S.** Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry / B.S. Bhau, A.K. Wakhlu // *Biologia Plantarum*. – Praha 6, April. – 2003. – Vol. 46. – № 3. – P. 349-355.

5. **Chaicharoen S.** In vitro plant regeneration through young leaf culture in mulberry (*Morus alba* var. S54 x *Morus alba* var. Noi) / S. Chaicharoen, S. Akrapanthu // *Journal of the Science Society of Thailand*. – Science Society of Thailand. – 1995. – Vol. 11. – P. 137-146.

6. **Chitra Vijaya D.S.** Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry / D.S. Vijaya Chitra, G. Padmaja // *Scientia Horticulturae*. – Elsevier Science Publishing Company, Inc., 2002. – Vol. 92, № 1. – P. 55-68.

7. **Chitra Vijaya D.S.** Shoot regeneration via direct organogenesis from in vitro derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine / D.S. Vijaya Chitra, G. Padmaja // *Scientia Horticulturae*. – Elsevier Science Publishing Company, Inc., 2005. – Vol. 106, № 4. – P. 593-602.

8. **Enmoto S.** Preservation of genetic resource of mulberry by means of tissue culture / S. Enmoto // *Japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)*. – Japan International Research Center for Agricultural Sciences. – 1987. – Vol. 21, № 3. – P. 205-210.

9. **Habib A.** Clonal propagation of white mulberry (*Morus alba* L.) using in vitro technique / A. Habib, M.R. Ali, M.N. Amin and M.M. Rahman // *Journal of Biological Sciences*. – Ivspring International Publisher, 2003. – Vol. 3. – is. 12. – P. 1181-1187.

10. **Jain A.K.** In vitro propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes / A.K. Jain, S.B. Dandin and K. Serigupta // *Plant cell reports*. – Springer Verlag. – 1990. – Vol. 8. – P. 737-740.

11. **Kirkinen A.** Micropropagation of several Japanese woody plants for horticultural purposes / A. Kirkinen, L.K. Simola, T. Coponen // *Annales Botanici Fennici*. – Helsinki: Finnish Zoological and Botanical Publishing Board. – 1999. – Vol. 36. – P. 21-31.

12. **Kashyap S.** In vitro selection of salt tolerant *Morus alba* and its field performance with bioinoculants / S. Kashyap, S. Sharma // *Horticultural Science*. – Prague, 2006. – Vol. 33(2). – P. 77-86.

13. **Machii H.** Organogenesis from immature leaf cultures in mulberry, *Morus alba* L. / H. Machii // *The Journal of Sericultural Science of Japan*. – Ibaraki: The Japanese Society of Sericultural Science. – 1992. – Vol. 61 (6). – P. 512-519.

14. **Murashige T.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Pl.* – Copenhagen. – 1962. – № 15. – P. 493-497.

15. **Narayan P.** Regeneration of plantlets from the callus of stem segments of mature plants of *Morus alba* L. / P. Narayan, S. Chakraborti, G.S. Rao // *Proc. Indian natn. Sci. Acad.* – Indian National Science Academy. – 1989. – B 55, Nos. 5&6. – P. 469-472.

16. **Sharmaa Kiran K.** In vitro propagation of mulberry (*Morus alba* L.) through nodal segments / Kiran K. Sharmaa, Trevor A. Thorpea // *Scientia Horticulturae*. – Elsevier BV. – 1990. – Vol. 42(4). – P. 307-320.

17. **Zaman A.** Micropropagation of *Morus alba* CVS, from shoot apices of mature trees / A. Zaman, R. Islam, O.I. Joarder, M. Islam // *Journal King Saud Univ.* – Riyadh : Science. – 1998. – Vol. 10 (1). – P. 7-14.

18. **Гречаник Р.М.** Особливості введення в культуру in vitro шовковиці білої (*Morus alba* Linn.) / Р.М. Гречаник, М.М. Гузь, Н.О. Олексійченко // *Науковий вісник НЛТУ України* : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2011. – Вип. 21.17. – С. 8-22.

19. **Гречаник Р.М.** Клонування *Morus alba* Linn. in vitro: селекція та деконтамінація експлантів // *Наукові основи підвищення продуктивності та біологічної стійкості лісових та урбанізованих екосистем* : тези 61-ої наук.-техн. конф. проф.-викл. складу, наукових працівників, докторантів та аспірантів

за підсумками наук. діяльності у 2010 р., 4-6 травня 2011 р., м. Львів / Р.М. Гречаник. – Львів : РВВ НЛТУ України, 2011. – С. 38-40.

20. **Митрофанова І.В.** Соматичний ембріогенез та органогенез як основа біотехнології отримання і збереження багаторічних садових культур : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біолог. наук: спец. 03.00.20 – "Біотехнологія" / І.В. Митрофанова; Нікітський ботанічний сад Національного наукового центру УААН. – Ялта, 2007. – 36 с.

*Р.М. Гречаник, Н.М. Гузь, Н.О. Олексійченко*

## ОСОБЕННОСТИ ЭТАПА НАМНОЖЕНИЯ В МИКРОКЛОНИРОВАНИИ ШЕЛКОВИЦЫ БЕЛОЙ (*MORUS ALBA* LINN.) IN VITRO

Представлен краткий обзор литературных источников, касающихся особенностей размножения в культуре тканей шелковицы белой. Разработана эффективная технология мультипликации. Получена высокая доля эксплантов, образовавших адвентивные микропобеги; наибольшее количество новых микропобегов на эксплант и новых сегментов на микропобег. На этом этапе для инициированных эксплантов акклиматизированной в Украине *Morus alba* Linn. оптимальной была среда MS, дополненная 1,0 мг/л 6-BA и 0,6 мг/л КТ. Очерчены перспективные направления дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** in vitro, шелковица белая, экспланты, среда, мультипликация.

*R.M. Hrechanyk, M.M. Guz, N.O. Oleksiychenko*

## PECULIARITIES OF REPRODUCTION STAGE IN WHITE MULBERRY (*MORUS ALBA* LINN.) IN VITRO MICROCLONING

The paper presents a short review of the publications which discuss a peculiarities of white mulberry reproduction in tissue culture. The high performance technology of multiplication has been developed. There has been received the highest part of explants that formed adventives microshoots, most of new microshoots on the explants and new segments on microshoot. On this stage for initiating explants of acclimatized in Ukraine *Morus alba* Linn optimum an environment of MS was supplemented by 1,0 mg/l 6-BA and 0,5 mg/l KT. The prospective directions of studies have been outlined.

**Keywords:** in vitro, white mulberry, explants, environment, multiplication.

