



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

- 1
- (21) 4432892/30-13
(22) 14.04.89
(46) 07.10.90. Бюл. № 37
(71) Всесоюзное научно-производственное объединение "Союзлесселекция"
(72) Г.П.Бутова, Т.М.Табанкая и Л.Л.Скрובה
(53) 578.085.23(088.8)
(56) Chalupa V. In vitro propagation of Birch (*Betula verrucosa* Ehrh). - Biol. plant, 1981, v. 23, № 6, p. 472-474.
(54) СПОСОБ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ
(57) Изобретение относится к биотехнологии и касается микроклонального размножения растений, в частности

2

древесной культуры - карельской березы. Целью изобретения является упрощение процесса культивирования, повышение выхода размножаемого материала и повышение его генетической стабильности. Способ состоит в том, что стеблевые эксплантаты помещают на модифицированную среду Мурасиге-Скуга, получают на ней каллус и побеги, которые переносят на безгормональную среду Буле, где получают регенеранты и проводят их мультипликацию путем последовательного и многократного микрочеренкования. Затем размноженный материал высаживают в пленочные теплицы и открытый грунт. 1 з.п. ф-лы, 1 табл.

Изобретение относится к биотехнологии и касается создания лесных культур плантационного типа.

Целью изобретения является упрощение процесса культивирования, повышение выхода размножаемого материала и повышение его генетической стабильности.

Способ состоит в том, что на среде Мурасиге-Скуга с фитогормонами (2,4-Д - 0,5-3,0 мг/л; БАП 0,5 мг/л) в темноте и при 26°С инкубируют межузловые стеблевые сегменты до образования на них сплошного (или участками) слоя каллуса, который затем срезают и рекультивируют на свежей среде Мурасиге-Скуга с БАП 1 мг/л в контролируемых условиях (освещен-

ность 3-4 клк в течение 24 ч при 25-26°С) до формирования адвентивных почек, которые при повторной пересадке культур формируются в побеги. Последние изолируют из каллуса, укореняют и доращивают на среде Буле без гормонов в тех же контролируемых условиях. Полученные регенеранты разрезают на микрочеренки с одной почкой и снова выращивают на той же среде. Процесс микрочеренкования повторяют несколько раз до получения необходимого количества растений, которые затем высаживают в горшочки с субстратом (торф и песок), доращивают в минитеплицах в течение 2-4 мес с постепенным снижением влажности до естественной величины и переносят в пле-

ночные теплицы для закаливания до конца вегетационного периода.

На следующей схеме представлены все этапы клонального микроразмножения карельской березы.

Схема микроклонального размножения карельской березы:

Подготовка эксплантатов (стерилизация, удаление коры, сегментирование побегов)



Культивирование на питательной среде для каллусообразования (среда № 1)



Отделение каллуса от эксплантата, культивирование на среде для индукции побегов (среда № 2)



Изоляция побегов из каллуса, выращивание их на среде для роста и образования корней (среда № 3)



Микрочеренкование регенерантов и выращивание черенков на среде № 3



Мультипликация черенковых растений путем последовательного и многократного микрочеренкования на среде № 3

→ Перенос черенковых растений в субстрат, доращивание в минитеплицах при контролируемых условиях

Перенос растений в пленочную теплицу, доращивание, закаливание

Способ клонального микроразмножения карельской березы осуществляют следующим образом.

Со взрослого дерева карельской березы (30 лет) срезают ветви и помещают в воду до появления на них листьев. Далее отрезки побегов величиной 15–20 см протирают спиртом (96%), стерилизуют в 3%-ном растворе хлорамина в течение 45 мин, трижды промывают стерильной водой и после удаления с них коры разрезают на сегменты до 1–1,5 см каждый.

Питательные среды для каллусообразования (среда № 1) и индуцированного морфогенеза (среда № 2) готовят согласно прописи Мурасиге–Скуга. Исключение составляют: агар 0,6%; сахара 2%; инозит 100 мг/л; аскорбиновая кислота 1 мг/л; глицин 2 мг/л; глютамин 0–25 мг/л; глютамин и гидролизат казеина не используют. В качестве индукторов каллусообразования в среду № 1 вводят 2,4-Д в концентрации 0,5–3,0 мг/л и БАП 0,5 мг/л. Морфоиндукторами в среде № 2 служат БАП и ИУК в концентрациях соответственно

1,0 и 0,1 мг/л. Среду для усиления роста и укоренения побегов (среда № 3) готовят согласно прописи Буле без добавления фитогормонов. Все питательные среды стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 20 мин.

Простерилизованные сегменты помещают горизонтально на среду № 1 и инкубируют в темноте при 26°С. Через 2–4 нед. на стеблевых сегментах (эксплантатах) формируется каллус в виде сплошного слоя или отдельных участками. Эффективность каллусообразования на средах с разным содержанием 2,4-Д различна: минимальная при концентрации 0,5 мг/л (около 10% культур) и максимальная при 3 мг/л (100% культур). Образовавшуюся каллусную ткань срезают и культивируют при контролируемых условиях: круглосуточное освещение при 25–26°С и освещенности 3–4 клк.

Через 4 нед. среди выращиваемых культур выделяют 3 типа каллусов: хорошо растущие желтого и равномерно-зеленого цвета и растущие несколько хуже с плотными темно-зелеными участ-

ками. Каллусов последнего типа отмечается больше, если первичная среда № 1 содержит 2,4-Д в концентрации 0,5 мг/л, и значительно меньше, если количество 2,4-Д составляет 3 мг/л. Повторное выращивание каллусов на среде № 2 приводит к образованию почек в культурах 3-го типа в количестве 5-10 шт. на одну культуру. Каллусы желтого и равномерно-зеленого цвета выраженных морфогенных признаков не проявляют и из дальнейших опытов исключены. Почки, индуцированные в каллусе, через 3-4 нед. формируются в побеги, которые при достижении 1-1,5 см изолируют, помещая на среду № 3. Процессы образования корней и роста побегов происходят одновременно. Укорененные регенеранты величиной 4-6 см разрезают на узловые микрочеренки, которые также выращивают на среде № 3. Образовавшиеся черенковые растения вновь черенкуют и через 3-4 нед. из черенков получают новый материал, пригодный к следующему черенкованию. В условиях указанного режима проводят 4 цикла черенкования, на протяжении которых сохраняются 100%-ная укореняемость черенков и интенсивный рост пазушных побегов. При первом цикле от каждого регенеранта получают по 2-3 микрочеренка, при последующих - количество черенков от каждого растения увеличивается до 4-5. При изменении условий эксперимента: увеличении освещенности до 8-9 клк и уменьшении фотопериода до 16 ч, отмечают заметное торможение роста и укоренения черенков.

Укрепленные черенковые растения высотой от 3 до 6 см извлекают из культуральных сосудов и высаживают в субстрат из торфа и песка (1:1), предварительно промытого и прокаленного. Растения доращивают при повышенной влажности воздуха в полиэтиленовых или пластмассовых минитеплицах при контролируемом режиме в течение 1-4 мес. В пленочную теплицу в естественных условиях растения переводят в мае и июне, при этом высота их варьирует от 3 до 40 см в зависимости от длительности доращивания в контролируемых условиях. Выживаемость растений к концу вегетационного периода составляет 100%.

Пример 1. В соответствии с приведенной методикой проводят

последовательно посадку эксплантатов на среду, получают растения-регенеранты и проводят их клональную мультипликацию путем многократного и последовательного черенкования, при этом в питательную среду для каллусообразования вносят 0,5 мг/л 2,4-Д. При анализе полученного размножаемого растительного материала видно, что при высокой морфогенной активности не проявляется самоклональная изменчивость и отмечается 100%-ная жизнеспособность размножаемого материала.

Примеры 2 и 3. Аналогично примеру 1 используют 2,4-Д в концентрациях 2 и 3 мг/л, при этом отмечают более интенсивное каллусообразование, однако, вместе с тем, повышается вероятность соматклональной изменчивости.

Показатели роста растений, высаженных в пленочную теплицу в разное время, представлены в таблице.

Использование предлагаемого способа клонального микроразмножения карельской березы обеспечивает по сравнению с известными способами следующие преимущества. Сочетание индуцированного морфогенеза в первичном каллусе с микрочеренкованием образующихся регенерантов позволяет размножать взрослые деревья с большой эффективностью и уменьшением или исключением вообще генетической вариабельности вегетативного потомства. Использование микрочеренкования на безгормональной среде Буле позволяет из ограниченного количества исходного материала за короткий срок получить массовое количество жизнеспособных растений. Согласно расчетам, полученным на основании проведенных экспериментов, из одного регенеранта за год можно получить более 1 млн. черенков растений. Внедрение способа в производство позволяет за короткий срок создать плантации карельской березы, обладающей наиболее выраженными декоративными свойствами древесины.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ микроклонального размножения карельской березы, включающий посадку эксплантатов на модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга, индукцию первичного каллуса, побегообразование на ней, получение

регенерантов, их мультипликацию, до-
ращивание и закалывание с последую-
щей пересадкой в открытый грунт, о т-
л и ч а ю щ и й с я тем, что, с це-
лью упрощения процесса культивирова-
ния, повышения выхода размножаемого
материала и повышения его генетичес-
кой стабильности, в качестве эксплан-
татов используют стеблевые сегменты, 10

а получение регенерантов и их мульт-
пликацию осуществляют на безгор-
мональной среде Буле.

5 2. Способ по п. 1, о т л и ч а ю-
щ и й с я тем, что мультипликацию ре-
генерантов проводят путем многократ-
ного и последовательного микрочерен-
кования.

Группа	Зависимость ростовых показателей от времени высадки в теплицу					
	Май			Июль		
	Средняя высота растений, см		Средний прирост, см	Средняя высота растений, см		Средний прирост, см
	Исходная	К концу вегетативного периода		Исходная	К концу вегетативного периода	
1	14,8	45,8	31,0	5,1	13,4	8,3
2	25,5	60,5	35,0	13,0	28,8	15,8

Составитель В. Демкин

Редактор И. Дербак

Техред М. Дидык

Корректор Л. Бескид

Заказ 3032

Тираж 486

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
11 035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101