



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016127313, 06.07.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.07.2016Дата регистрации:
03.08.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.07.2016

(45) Опубликовано: 03.08.2017 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

185910, Респ. Карелия, г.Петрозаводск, ул.
Пушкинская, 11, ФГБУН Институт леса
Карельского научного центра Российской
академии наук

(72) Автор(ы):

Ветчинникова Лидия Васильевна (RU),
Кузнецова Татьяна Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт леса
Карельского научного центра Российской
академии наук (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: SU 1752284 A1, 07.08.1992.**ВЕТЧИННИКОВА Л.В. Возможности**
ускоренного размножения Березы
карельской. Селекция и лесное
семеноводство в Карелии, Петрозаводск,
1993, с.47-55. МАШКИНА О.С. и др.
Длительное культивирование в условиях in
vitro как один из способов сохранения
представителей ценного генофонда
Карельской березы. Достижения и
проблемы (см. прод.)

(54) Способ клонального микроразмножения растений сем. Betulaceae

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ клонального микроразмножения растений сем. Betulaceae, включающий размещение верхушечных и боковых почек на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга *in vitro* для индукции микропобегов и их элонгации, с переносом на жидкую среду для укоренения, где индукцию микропобегов осуществляют из апикальной ткани вегетативных почек экспланта, индукцию, элонгацию и мультипликацию полученных микропобегов проводят на агаризованной питательной среде, содержащей минеральную основу по Мурасиге-Скуга и дополнительно включающей 0,25-2,0 мг/л БАП, 20000-30000 мг/л сахарозы, 6000 мг/л агара, а укоренение осуществляют размещением одновременно необходимого количества

микропобегов в сосуде на перфорированной площадке, закрепленной выше уровня жидкой питательной среды, содержащей уменьшенную вдвое концентрацию макросолей по Мурасиге-Скуга, включающей дополнительно 0,2-0,6 мг/л ИМК и 15000-20000 мг/л сахарозы, и осуществляют в автоматическом режиме циклическое чередование процессов экспозиции микропобегов в воздушной среде, влажностью 80-90%, и погружения их в жидкую питательную среду на 1-3 мин 2-3 раза в сутки путем подъема ее уровня, с дополнительной аэрацией воздуха внутри сосуда по 2-4 минуты через равные промежутки времени от 10 до 15 раз в сутки в течение 16-часового фотопериода. Изобретение позволяет повысить скорость роста и развития микропобегов, активировать корнеобразование *in vitro*, увеличить приживаемость. 2 табл.

(56) (продолжение):

лесной генетики и селекции (к 40-летию НИИЛГиС), Сборник научных трудов, Воронеж, Истоки, 2010, с.30-47.

R U 2 6 2 7 1 9 4 C 1

R U 2 6 2 7 1 9 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A01H 4/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2016127313, 06.07.2016**(24) Effective date for property rights:
06.07.2016Registration date:
03.08.2017

Priority:

(22) Date of filing: **06.07.2016**(45) Date of publication: **03.08.2017** Bull. № 22

Mail address:

**185910, Resp. Kareliya, g. Petrozavodsk, ul.
Pushkinskaya, 11, FGBUN Institut lesa Karelskogo
nauchnogo tsentra Rossijskoj akademii nauk**

(72) Inventor(s):

**Vetchinnikova Lidiya Vasilevna (RU),
Kuznetsova Tatyana Yurevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
uchrezhdenie nauki Institut lesa Karelskogo
nauchnogo tsentra Rossijskoj akademii nauk
(RU)**

(54) **METHOD FOR CLONAL MICRO-REPRODUCTION OF BETULACEAE FAMILY PLANTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a method of clonal micro-reproduction of the Betulaceae family plants, which includes placement of apical and lateral buds on the agarized Murashige-Skoog nutrient medium in vitro for induction of micro-sprouts and their elongation, with transfer to the liquid medium for rooting, where micro-sprouts induction is carried out from the apical tissue of vegetative explant buds, induction, elongation and multiplication of the obtained micro-sprouts are carried out on an agarized nutrient medium containing a mineral base as per Murashige-Skoog and further including 0.25-2.0 mg/l of BAP, 20,000-30,000 mg/l of sucrose, 6000 mg/l of agar, and rooting is performed by simultaneous location of the required amount of

micro-sprouts in a vessel on a perforated platform, fixed above the liquid medium level comprising a double-reduced macro-salts concentration as per Murashige and Skoog, further comprising 0.2-0.6 mg/l of IBA and 15000-20000 mg/l of sucrose, and cyclically alternating exposure of the micro-sprouts in the air with 80-90% humidity, and their immersion in a liquid nutrient medium for 1-3 minutes 2-3 times a day in an automatic way by lifting its level, with additional aeration of air inside the vessel for 2-4 minutes at regular intervals of 10 to 15 times per day for a 16-hour photoperiod.

EFFECT: invention allows to increase the rate of micro-sprouts growth and development, to activate root formation in vitro, to increase survival rate.

2 tbl

Изобретение относится к биотехнологии и воспроизводству лесных древесных растений на искусственных питательных средах в стерильных условиях *in vitro* и может быть использовано в лесном хозяйстве для массового получения посадочного материала древесных растений сем. *Betulaceae*.

5 Известен способ клонального микроразмножения селекционного посадочного материала березы карельской, по которому в качестве экспланта используют проростки гибридных семян. Полученные проростки разрезают на черенки и высаживают на питательную среду Мурасиге-Скуга. На этой же среде проводят мультипликацию побегов, их укоренение и последующую высадку в грунт. Средний прирост к концу
10 вегетационного периода составляет от 20 до 36 см в зависимости от срока высадки растений в грунт (патент РФ №206695, МПК А01Н 4/00, опубл. 27.09.1996 г.).

В указанном способе используются проростки гибридных семян, у которых возможно расщепление признаков в потомстве. Это означает, что часть клонов (не менее чем 10%) в дальнейшем не будет обладать признаками исходных растений. Кроме того,
15 этот способ не подходит для многих других древесных растений, у которых уникальные свойства сохраняются не при семенном, а только при вегетативном размножении.

Наиболее близким к заявленному является способ клонального микроразмножения гибридов карельской березы, по которому в качестве исходных эксплантов используют верхушечные и пазушные почки. Рост каллуса и формирование микропобегов проводят
20 на основной агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей в качестве фитогормонов 80-120 мг/л лизина, 0,05-0,15 мг/л кинетина, 0,6-1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,05-0,08 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК). В последующем удлинение побегов осуществляют на агаризованной питательной среде с уменьшенной вдвое концентрацией макросолей по Мурасиге-Скуга и с добавлением
25 0,6-1,0 мг/л БАП и 0,3-0,5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК). Укоренение осуществляют на жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей дополнительно 0,4-0,6 мг/л ИМК и 0,1-0,3 мг/л НУК. Культуры выращивают при освещении лампами 10000 лк на 16-часовом фотопериоде при 25°C и относительной влажности воздуха 70%. Укорененные растения-регенеранты высаживают в почву в
30 теплицу с последующей высадкой в открытый грунт. Указанный способ позволяет в течение 10-11 недель получить посадочный материал, при этом приживаемость растений составляет в среднем 76% (авторское свидетельство СССР №1752284, МПК А01Н 4/00, публ. 07.08.1992 г.).

Однако согласно данному способу индукцию микропобегов осуществляют из каллуса,
35 что, с одной стороны, повышает коэффициент размножения, а с другой - при прохождении клетками стадии дедифференцировки в условиях *in vitro* не исключает процесс их полиплоидизации и анеуплоидизации, приводящих к соматоклональной изменчивости, в результате чего увеличивается вероятность получения генетически измененного клонового потомства. Для получения каллусной ткани используют
40 дорогостоящие реактивы, например фитогормоны (лизин, НУК, ИУК, БАП, кинетин), кроме того, присутствие этапа каллусообразования удлиняет процесс в целом. Использование большого количества стеклянных сосудов малого объема повышает трудозатраты и требует увеличения площади стеллажей. Поэтому полный цикл получения посадочного материала является трудоемким, дорогостоящим и длительным.
45 Недостатком является также необеспеченность микропобегов оптимальными условиями на этапе укоренения, поскольку при длительном нахождении в жидкой среде они испытывают гипоксию (недостаток кислорода), которая угнетает развитие растений и формирование корневой системы, снижая в дальнейшем их приживаемость.

Задачей настоящего изобретения является разработка экономичного способа клонального микроразмножения растений семейства *Betulaceae*, позволяющего получать одновременно большое количество высококачественных растений-регенерантов *in vitro*, сохраняющих ценные признаки исходных генотипов.

5 Техническим результатом изобретения является повышение скорости роста и развития микропобегов, активизация корнеобразования *in vitro*, увеличение приживаемости, а также удешевление процесса получения посадочного материала, соответствующего исходному генотипу.

Заявленный технический результат достигается тем, что в способе клонального микроразмножения растений сем. *Betulaceae*, включающем размещение верхушечных и боковых почек на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга *in vitro* для индукции микропобегов, их элонгации и мультипликации с переносом на жидкую питательную среду для укоренения, согласно изобретению, индукцию микропобегов осуществляют из апикальной ткани вегетативных почек, индукцию, элонгацию и мультипликацию полученных микропобегов проводят на агаризованной питательной среде, содержащей минеральную основу по Мурасиге-Скуга и дополнительно включающей 0,25-2,0 мг/л БАП, 20000-3000 мг/л сахарозы, 6000 мг/л агара, а укоренение осуществляют путем одновременного размещения необходимого количества микропобегов в сосуде на перфорированной площадке, закрепленной выше уровня жидкой питательной среды, содержащей уменьшенную вдвое концентрацию макросолей по Мурасиге-Скуга, включающей дополнительно 0,2-0,6 мг/л ИМК и 15000-25000 мг/л сахарозы, и осуществляют в автоматическом режиме циклическое чередование процессов экспозиции микропобегов в воздушной среде, влажностью 80-90%, и погружения их в жидкую питательную среду на 1-3 мин 2-3 раза в сутки путем подъема ее уровня, с дополнительной аэрацией воздуха внутри сосуда по 2-4 минуты через равные промежутки времени от 10 до 15 раз в сутки в течение 16-часового фотопериода.

Предлагаемый способ клонального микроразмножения растений семейства *Betulaceae* реализуется следующим образом.

Берут верхушечные и боковые вегетативные почки у растений сем. *Betulaceae* с ауксибластов (молодые побеги текущего года), достигших длины от 1 до 3 см, стерилизуют с помощью антисептических и дезинфицирующих средств. Эксплант, взятый от ауксибласта на ранних этапах его развития, в значительной степени свободен от микрофлоры, что упрощает процесс его стерилизации. В стерильных условиях из них вычлениают апикальную недифференцированную ткань и размещают в небольших стеклянных сосудах, объемом 125 мл, на агаризованной питательной среде (по 15 мл в один сосуд), содержащей минеральную основу по Мурасиге-Скуга, куда дополнительно вносят 0,25-2,0 мг/л БАП, 25000-30000 мг/л сахарозы, 6000 мг/л агара (табл. 1, среда А). На этой среде в течение 2-3 недель индуцируют пазушные побеги. Использование минимального набора фитогормонов (только БАП) в питательной среде на побегообразование является не только экономически выгодным, но также препятствует формированию каллуса и способствует сохранению гарантированных признаков исходного генотипа. Затем осуществляют процесс элонгации и мультипликации путем черенкования полученных микропобегов на сегменты с размещением их на свежей питательной среде того же состава для последующей индукции на них побегов *de novo*. Мультипликацию микропобегов повторяют в зависимости от потребностей в объеме посадочного материала. Для процесса корнеобразования отбирают необходимое количество микропобегов, достигших длины 1,5-3,0 см, с хорошо развитыми листьями и одновременно общей массой размещают в стерильный сосуд, объемом 3,5 л,

содержащий 0,5 л жидкой питательной среды. Микропобеги в сосуде размещают свободно на поверхности перфорированной площадки, которая закреплена выше уровня жидкой питательной среды. Размещение микропобегов без их индивидуальной фиксации в общем сосуде значительно сокращает временные затраты и экономит площадь рабочей поверхности, предназначенной для культивирования. Подготовленная для корнеобразования среда содержит уменьшенную вдвое концентрацию макросолей по Мурасиге-Скуга и дополнительно 0,2-0,6 мг/л ИМК и 15000-25000 мг/л сахарозы (табл. 1, среда Б). Исключение агара из среды на корнеобразование значительно удешевляет процесс получения растений-регенерантов. Укоренение микропобегов проводят на стеллажах при температуре 23-27°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности общей интенсивности от 3000 до 10000 лк в течение 2-3 недель. Формирование корневой системы осуществляют при циклическом чередовании процессов экспозиции микропобегов в воздушной среде, влажностью 80%, и погружения их в жидкую питательную среду на 1-3 мин. Процесс повторяют 2-3 раза в сутки автоматически в соответствии с заданным интервалом времени. Погружение микропобегов обеспечивается путем подъема жидкой питательной среды до уровня, обеспечивающего их покрытие. При этом дополнительно проводят аэрацию воздуха внутри сосуда по 2-4 мин в автоматическом режиме через равные промежутки времени от 10 до 15 раз в сутки в течение 16-часового фотопериода. Заявляемый режим создает оптимальные условия для корнеобразования, обеспечивающие формирование не одного главного корня, а нескольких, причем с боковыми ответвлениями. Кроме того, наблюдается активизация роста и развития растений, благодаря чему они становятся более адаптированными, позволяющими в дальнейшем повысить их приживаемость в условиях *ex vitro*. Экспериментальным путем выявлено, что поднятие уровня жидкой питательной среды на 1-3 мин 2-3 раза в сутки с погружением в нее микропобегов достаточно для поглощения ими необходимого количества питательных веществ. При этом тургор тканей не снижается, а гипоксия практически исключается. Многократная аэрация внутри сосуда оптимизирует условия газообмена и способствует обновлению воздушной среды, препятствуя накоплению в ней этилена и других газов, которые оказывают в основном тормозящее влияние на процессы роста.

Апробация способа проводилась в течение 4-х лет (2012-2015 гг.) в лабораторных условиях, полученные растения-регенеранты высаживали на экспериментальных участках.

Заявляемый способ предназначен для массового получения посадочного материала редких растений сем. *Betulaceae*, имеющих генетически обусловленные изменения в текстуре древесины (карельская береза *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merclin) Hamet-Ahti, ледяная береза - *Ice birch*), форме листовой пластинки (далекарлийская береза *B. pendula* Roth var. *dalecarlica* Schneid. (L. f.), береза иволистная, ольха мелкокорезная *Alnus incana* f. *angustissima* Holmberg ex Nylander) или кроне (береза Юнга *B. pendula* Roth f. *Youngii*), и др., которые относятся к трудно укореняемым.

Пример 1. Материалом для размножения служили деревья карельской березы, зарегистрированные в республиканском реестре плюсовых деревьев Республики Карелия. Возраст деревьев от 15 до 63 лет. Для клонального микроразмножения в качестве экспланта использовали апикальную недифференцированную ткань верхушечных и боковых вегетативных почек, освобожденных от микрофлоры с помощью различных антисептических и дезинфицирующих веществ. Индукцию, элонгацию и мультипликацию микропобегов осуществляли на агаризованной питательной среде А (табл. 1). Микропобеги, достигшие примерно 2,0 см, одновременно,

в варианте 1 - в количестве 11 шт., в варианте 2 в количестве - 352 шт. в асептических условиях размещали хаотично в стерильных сосудах на закрепленной перфорированной площадке. На дно сосуда наливали жидкую питательную среду для корнеобразования (табл. 1, среда Б) с добавлением 0,2 мг/л ИМК и 20000 мг/л сахарозы. Формирование корневой системы у микропобегов происходило на стеллажах при температуре 23-27°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности общей интенсивности от 3000 до 10000 лк в течение 2-3 недель. В процессе укоренения в автоматическом режиме осуществляли циклическое чередование процесса экспозиции микропобегов в воздушной среде, влажностью 90%, и погружения их в жидкую питательную среду путем подъема ее уровня 2 раза в сутки на 1 мин, с дополнительной аэрацией воздуха внутри сосуда через равные промежутки времени по 4 мин 10 раз в сутки в течение 16-часового фотопериода.

Предложенный способ обеспечивает увеличение количества корней на 40-60%, т.к. происходит формирование не только одного главного корня, а нескольких, поскольку имеет место развитие бокового ветвления. При укоренении предлагаемым способом образование корней ускоряется на 2-4 дня. В предложенном способе приживаемость *ex vitro* растений-регенерантов составляет в среднем 84%, в известном способе - 76%. Прирост растений-регенерантов, полученных по предлагаемому способу, варьирует от 45 до 75 см. Предложенный способ позволяет проводить культивирование взрослых деревьев карельской березы в укороченные сроки от 7 до 8 недель, тогда как в известном способе требуется 10-11 недель. Данные по росту растений-регенерантов, развитию их корневой системы, приживаемости и длительности процесса культивирования приведены в табл. 2.

Пример 2. Исходные деревья далекарлийской березы произрастают на экспериментальных участках вблизи г. Петрозаводска. Экспланты в виде апикальной ткани вегетативных почек размещали на агаризованной среде А (табл. 1) и индуцировали пазушные побеги, как в примере 1. Элонгацию и мультипликацию проводили на свежей среде того же состава. Затем микропобеги в количестве 44 штук одновременно свободно размещали в сосуде на перфорированной площадке, закрепленной выше жидкой питательной среды Б (табл. 1). Формирование корневой системы у микропобегов проводили на стеллажах при тех же условиях освещения, как описаны в примере 1. При этом в автоматическом режиме осуществляли циклическое чередование процессов экспозиции микропобегов в воздушной среде, влажностью 80%, и погружения их в жидкую питательную среду на 2 мин 3 раза в сутки путем подъема ее уровня, обеспечивающего покрытие растений. При этом проводили дополнительную аэрацию воздуха внутри сосуда по 3 мин через равные промежутки времени 12 раз в сутки в течение 16-часового фотопериода. Экспериментальные данные по росту растений-регенерантов, развитию их корневой системы, приживаемости и длительности процесса культивирования приведены в таблице 2. Длина стебля полученных растений-регенерантов варьировала от 1,8 до 4,8 см и в среднем составила 3,1 см. Корневая система представлена не одним главным корнем, а 4 и даже 8, с боковым ветвлением, приживаемость составляет 89%.

Пример 3. Материалом для укоренения служили микропобеги ольхи мелкорезной. Индукцию, элонгацию и мультипликацию эксплантов осуществляли, как описано в примере 1, на аналогичной питательной агаризованной среде А (табл. 1). Затем полученные множественные побеги в количестве 63 шт. отделяли и одновременно размещали в общем сосуде на перфорированной площадке, закрепленной выше уровня жидкой питательной среды Б (табл. 1). Формирование корневой системы у микропобегов проводили при циклическом чередовании процессов экспозиции микропобегов в

воздушной среде, влажностью 85%, и последующего погружения их в жидкую питательную среду на 3 мин 2 раза в сутки путем подъема ее уровня, обеспечивающего покрытие растений. При этом обеспечивали дополнительную аэрацию воздуха внутри сосуда по 2 мин через заданные равные промежутки времени 15 раз в сутки в течение 16-часового фотопериода. При увеличении частоты и длительности времени подъема уровня жидкой питательной среды у микропобегов наблюдается витрификация побегов, что препятствует их дальнейшему росту и развитию. Данные по росту растений-регенерантов, развитию их корневой системы, приживаемости и длительности процесса культивирования приведены в таблице 2. Анализ представленных результатов показывает, что совместное культивирование по заявленному режиму на этапе укоренения позволяет значительно сократить временные и трудовые затраты. Растения-регенеранты имели до 4-х корней, длиной до 3,7 см. Укоренение составило 75,2%, приживаемость 82%, общая длительность культивирования составила 7-9 недель.

Таким образом, применение предлагаемого способа клонального микроразмножения позволяет значительно сократить использование дорогостоящих реактивов, таких как фитогормоны и агар, что значительно удешевляет культивирование растений *in vitro* и исключает этап каллусообразования, приводящий к генетическому изменению клонового потомства. Создание оптимальных условий при укоренении микропобегов за счет особого режима кратковременного погружения растений в жидкую питательную и последующего длительного их экспонирования в воздушной среде с высокой влажностью обеспечивает ускоренное формирование корневой системы у микропобегов при сокращении сроков культивирования на 2-3 недели и составляющих 7-8 недель. Высота растений в первый год после их высадки в почву составила от 35 до 75 см. Активизация корнеобразования дает возможность ускорить процесс формирования корневой системы, увеличить количество и длину корней, что способствует повышению жизнеспособности растений, обеспечивающей увеличение их приживаемости до 83% при высадке в грунт. Важным преимуществом предлагаемого способа по сравнению с известными является возможность получать одновременно массовое количество высококачественных растений-регенерантов ценных представителей семейства *Betulaceae* при экономии средств и снижении трудозатрат, что позволяет широко использовать его в практике лесного хозяйства.

35

40

45

Таблица 1

Компоненты питательной среды	Мг/л	Состав среды				
		По прототипу			По предлагаемому способу	
		1	2	3	А	Б
Макроэлементы по Мурасиге-Скуга						
NH_4NO_3	1650	+	Концентрация уменьшена в двое	+	+	Концентрация уменьшена в двое
KNO_3	1900	+		+	+	
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440	-		+	+	
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370	+		+	+	
KH_2PO_4	170	+		+	+	
Микроэлементы						
H_3BO_3	6,2	+	+	+	+	+
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	+	+	+	+	+
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	+	+	+	+	+
KJ	0,83	+	+	+	+	+
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	+	+	+	+	+
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	+	+	+	+	+
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	+	+	+	+	+
Хелат железа						
$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	+	+	+	+	+
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	+	+	+	+	+
Витамины						
РР (никотиновая кислота)	0,5	+	+	+	+	+
B_1 (тиамин)	0,1	+	+	+	+	+
B_6 (пиридоксин)	0,5	+	+	+	+	+
B_8 (мезоинозит)	100	-	-	-	+	0,0
Фитогормоны						
Лизин		80-120	-	-	0,0	0,0
Кинетин		0,05-0,15	-	-	0,0	0,0
БАП		0,6-1,0	0,4-0,6	-	0,25-2,0	0,0
ИУК		-	0,3-0,5	-	0,0	0,0
ПУК		0,05 0,08	-	0,1-0,3	0,0	0,0
ИМК		-	-	0,4-0,6	0,0	0,2-0,6
Сахароза	30 000	20 000	10 000	20 000	25 000-30000	15 000- 25 000
Агар	7 000	4 000	4 000	-	6 000	0,0
Вода дистил.	До 1 л				До 1 л	До 500 мл

Таблица 2

Показатели	Растения сем. <i>Betulaceae</i>				Прототип
	Карельская береза		Далекарлийская береза	Ольха мелкокорезная	
Возраст исходных растений	63	15	35	33	18–23
Режим укоренения					
Количество побегов в одном сосуде (шт.)	11	352	44	63	~5–7
Длительность (мин) нахождения в жидкой питательной среде	1	1	2	3	постоянно
Кратность погружений (раз)	2	2	3	2	отсутствует
Длительность аэрации (мин)	4	4	3	2	отсутствует
Кратность аэрации (раз)	10	10	12	15	отсутствует
Влажность, %	90	90	80	85	70
Показатели роста и развития растений-регенерантов					
Укоренение, %	77,4	80,6	83	75,2	69
Число корней, шт.	до 8	до 6	до 4	до 4	Нет данных
Длина корней, см	до 5,4 с боковым ветвлением	до 5,4 с боковым ветвлением	до 4,5 с боковым ветвлением	до 3,7	3–5
Прирост <i>ex vitro</i> , см	61,5	74,5	72	34	Нет данных
Приживаемость, %	88	80	89	82	76
Общая длительность культивирования (без этапа мультипликации), недель	7–8		7–8	7–9	10–11

(57) Формула изобретения

Способ клонального микроразмножения растений сем. *Betulaceae*, включающий размещение верхушечных и боковых почек на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга *in vitro* для индукции микропобегов и их элонгации, с переносом на жидкую среду для укоренения, отличающийся тем, что индукцию микропобегов осуществляют из апикальной ткани вегетативных почек экспланта, индукцию, элонгацию и мультипликацию полученных микропобегов проводят на агаризованной питательной среде, содержащей минеральную основу по Мурасиге-Скуга и дополнительно включающей 0,25–2,0 мг/л БАП, 20000–30000 мг/л сахарозы, 6000 мг/л агара, а укоренение осуществляют размещением одновременно необходимого количества микропобегов в сосуде на перфорированной площадке, закрепленной выше уровня жидкой питательной среды, содержащей уменьшенную вдвое концентрацию макросолей по Мурасиге-Скуга, включающей дополнительно 0,2–0,6 мг/л ИМК и 15000–20000 мг/л сахарозы, и осуществляют в автоматическом режиме циклическое чередование процессов экспозиции

микробегов в воздушной среде, влажностью 80-90%, и погружения их в жидкую питательную среду на 1-3 мин 2-3 раза в сутки путем подъема ее уровня, с дополнительной аэрацией воздуха внутри сосуда по 2-4 минуты через равные промежутки времени от 10 до 15 раз в сутки в течение 16-часового фотопериода.

5

10

15

20

25

30

35

40

45