



## Tehnoloģijas apraksts

# BĒRZA KLONU RŪPNIECISKĀS PAVAIROŠANAS METODE *IN VITRO*

**IZVEIDOTĀJS:** Latvijas Valsts mežzinātnes institūts “Silava”

**PĒTĪJUMA ZINĀTNISKAIS  
VADĪTĀJS:**

**Dr. Mārtiņš Zeps,  
LVMI Silava vadošais pētnieks**

Tehnoloģija apstiprināta ar LVMI Silava direktora 18.07. 2022 rīkojumu Nr. Silava 1.1.1.1/18/A/138/6

**Salaspils, 2022**

NACIONĀLAIS  
ATTĪSTĪBAS  
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA  
Eiropas Reģionālās  
attīstības fonds

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

## Metodes apraksts

Bērza klonu pavairošanas metode ar mikrospraudeņiem *in vitro* paredzēta izmantošanai jau ievadītām un nostabilizētām bērza klonu kultūrām. Tehnoloģijas izstrādāta desmit bērza klonu pavairošanai *in vitro*, balstoties uz šo klonu padziļinātu izpēti, analizējot to atbildes reakcijas uz dažādu gaismas spektru un intensitāti caur morfoloģiskajām, fizioloģiskajām un anatomiskajām īpašībām. Izmantotā pieeja ir balstīta uz katra klona specifiskajām reakcijām, grupējot un kombinējot tās. Rezultātā izstrādātā tehnoloģija ir sekmīgi pielietojama desmit bērza klonu Nr. 40; 257; 229; 286; 299; 353; 498, 805; M29 un Med36 pavairošanai, ņemot vērā šo klonu specifiskās reakcijas.

Tehnoloģija sastāv no diviem posmiem – *in vitro* un *ex vitro*. Posmi ir jāveic secīgi, ievērojot aprakstītos pamatprincipus un nodrošinot atbilstošos apstākļus. *In vitro* posms ir nepārtraukts audzēšanas process, kura mērķis, pavairojot materiālu uz mākslīgas barotnes, sasniegt vajadzīgo apsākņojamo spraudēju skaitu marta beigās un maijā. Jāņem vērā, ka ir jāatstāj no katra klona atbilstošs materiāla daudzums *in vitro* stadijā, lai nodrošinātu izejas materiālu nākamajai audzēšanas sezonai.

*Ex vitro* posms ir daļēji pieskaņots augu veģetācijas periodam, lai maksimāli izmantotu dabiskos apstākļus apsākņoto spraudēju izaudzēšanai līdz stādu izmēriem. Mikrospraudeņu apsākņošanas uzsākšanas brīdis ir atkarīgs no pieejamās infrastruktūras, galvenokārt no slēgtām audzēšanas kamerām (telpām) apsākņošanas veikšanai un siltumnīcas stādu aklimatizācijai. Jo augstāks klimatkameru un siltumnīcu aprīkojuma līmenis, jo ātrāk pavasarī var uzsākt apsākņošanu.

**Brīdinājums!** *Tehnoloģija ir izmantojama konkrēto klonu pavairošanai noteiktos apstākļos. Efektīvai tehnoloģijas ieviešanai ražošanā ir nepieciešama tehnoloģijas adaptēšana esošas vai topošas pavairošanas laboratorijas ražošanas sistēmā.*

## 1. Posms. Audzēšana un pavairošana *in vitro*.

### 1.1. Barotnes pagatavošana

Bērza klonu *in vitro* pavairošanai LVMI Silava Augu fizioloģijas laboratorijā tiek izmantota modificēta kokaugu audzēšanas barotne (O'Dowd, 2004), kas satur makro un mikroelementus, vitamīnus, saharozi, agaru un augšanas regulatorus.

1. tabula

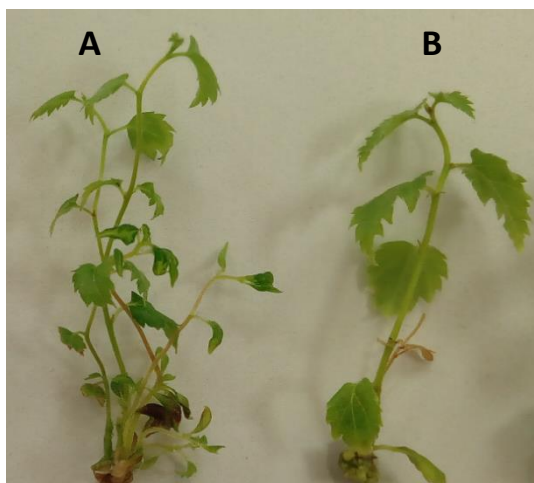
#### LVMI Silava augu fizioloģijas laboratorijā izveidotās bērza klonu *in vitro* pavairotu kokaugu audzēšanas barotnes ķīmiskais sastāvs

| Barotnes komponenti                                  | (mg/l)   |
|--|----------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 0        |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O | 250      |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1000     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 200      |
| KCl  | 75       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 0        |
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0        |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                       | 0        |
| CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O                 | 0        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 135      |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 125      |
| EDTA Ferric Sodium                                   | 36,7     |
| MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O                  | 16,9     |
| ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 8,6      |
| CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O                 | 0,025    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O  | 0,125    |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 6,2      |
| CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O                 | 0,025    |
| KI   | 0,83     |
| Tiamīns*HCl  | 1,0      |
| Nikotīnskābe   | 1,0      |
| Piridoksīns*HCl                                      | 1,0      |
| Glicīns  | 2,0      |
| Biotīns  | 0,065    |
| Folijskābe   | 0,55     |
| <i>Mio</i> -Inozitols                                | 100      |
| Zeatīns  | 0,1- 0,2 |
| Saharoze   | 20000    |
| Agars  | 6600     |

#### Barotnes pagatavošana:

- Katru barotnes komponentu nosver uz svariem.
- Katru mikro un makroelementu atsevišķi izšķīdina vārglāzē nelielā destilētā ūdens daudzumā un ielej traukā, kurā gatavo barotni (darba optimizēšanai mikro– un makroelementiem var izveidot gatavus šķīdumu maisījumus, ko lieto, ievērojot minētās minerālelementu devas).
- Vitamīniem un aminoskābēm pagatavo šķīdumu maisījumus, rēķinot uz 1 mg/l, bet zeatīnam 0,1 mg/l. Vajadzīgo vielu daudzumu vienam litram barotnes mēra ar automātisko pipeti, iestatot nepieciešamo tilpumu.
- Nosvērto saharozes, mio-inozitola un EDTA Ferric Sodium daudzumu ieber traukā, kurā atrodas pārējās barotnes sastāvdaļas.
- Atsevišķā traukā ieber agaru (1.tab.), pievieno ūdeni (apmēram 500 ml vienam litram barotnes) un karsē mikroviļņu krāsnī līdz agarš ir izkusis (apmēram 10 min).
- Kad visas sastāvdaļas ievietotas traukā, to uzpilda ar karstu (~50 līdz 60°C) destilēto ūdeni līdz viena litra atzīmei.
- Pirms autoklāvēšanas izmēra barotnes pH, izmantojot pHmetru un noregulē uz 5,8, izmantojot 0,1 M HCl un 1 M NaOH.
- Karstu barotni iepilda tīrās 300 ml stikla burkā un aizvāko ar alumīnija folijas (vai cita piemērota materiāla) vāciņu.
- Burkas ar barotni autoklāvē 20 min 110 kPa 121°C.

Bērzu pavairošanai vienlaicīgi gatavo divas barotnes, kurām ir vienāds sastāvs, bet atšķirīga augšanas regulatora – zeatīna koncentrācija. To izvēlas atkarībā no augu dzinumu lieluma. Augiem ar labi attīstītu galveno dzinumu un bez sāndzinumiem (1.B.att.) tiek izmantota barotne ar zeatīna koncentrāciju 0,2 mg/l, bet proliferējošiem augiem ar daudziem tieviem sāndzinumiem (1.A.att.) - zeatīns 0,1 mg/l.



1. attēls. Bērza klona dzinumi in vitro

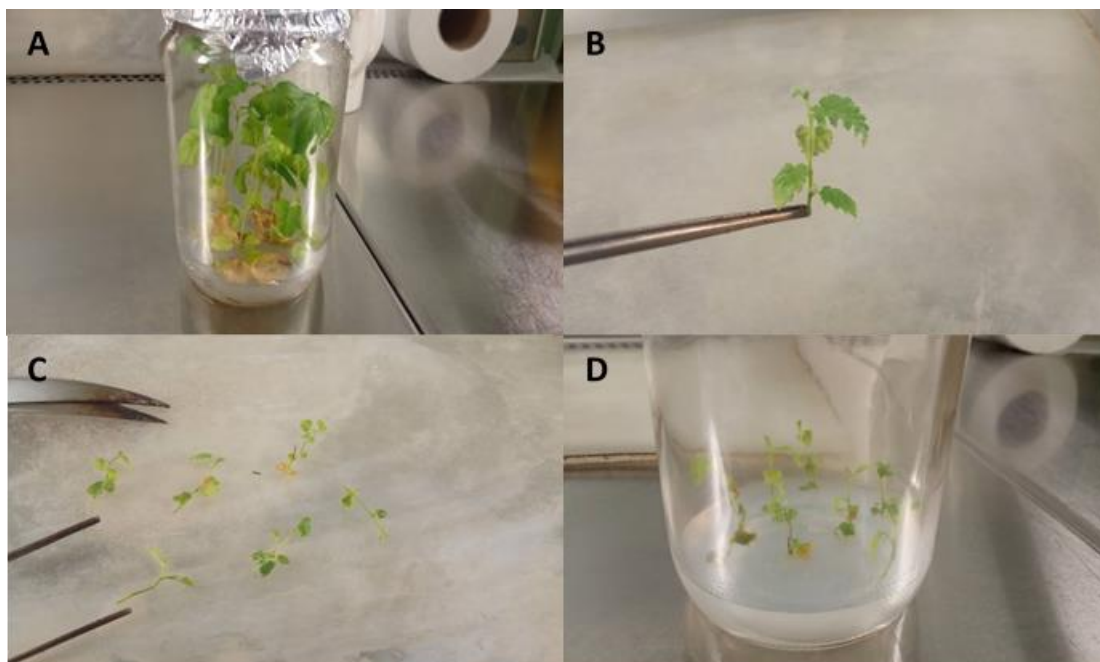
## 1.2. Pavairošanas manipulācijas laminārboksos

Priekšnoteikums *in vitro* kultūru pavairošanai ir sterilitātes ievērošana visos procesa etapos. No barotnes pagatavošanas un tās autoklavēšanas brīža, visas manipulācijas veic aseptiskos apstākļos – laminārboksā. Pirms darba uzsākšanas:

- 1) laminārboksu ~15 minūtes dezinficē ar UV lampu;
- 2) veic virsmu dezinfekciju ar 70% etanola šķīdumu;
- 3) pārlicinās, vai izmantojamie instrumenti (pincetes, šķēres un skalpeļi) ir tīri (ja radies organisks apaugums, to notīra ar abrazīvu sūkli);
- 4) tīrus instrumentus pirms darba uzsākšanas sterilizē, karsējot 15 min pērlīšu sterilizatorā ~200°C temperatūrā;
- 5) sterilizētos instrumentus iemērc etanola šķīdumā un nodedzina ar liesmu.

Darba vidi (instrumentus, spirta trauku, burkas ar barotnēm) organizē tā, lai pārstādīšanas laikā būtu pēc iespējas mazāk jātur rokas virs pavairojamā materiāla, tādējādi novēršot iespējamību, ka no rokām vai apģērba kultūrās nonāks mikroorganismi.

Pavairošanu veic, reģenerētus bērzus ar pinceti izņemot no burkas (2.A.att.), ar šķērēm vai skalpeļi nogriežot sakņu sistēmu (2.B.att.), vai izveidojušos kallusu, tad sadalot reģenerēto augu ~1.5 cm garos galotnes un/vai posmu mikrospraudeņos tā, lai katram mikrospraudeņim paliktu divas veselīgas, neskartas lapas (2.C.att.), kuru žāklēs atrodas meristematiskie audi.



**2. attēls.** Bērza klonu pavairošanas process ar mikrospraudeņiem: A – apmēram piecas nedēļas vecas, reģenerētas kultūras pārstādīšanai; B – reģenerēts augs ar nogrieztu sakņu sistēmu; C – pārstādīšanai gatavi mikrospraudeņi; D – mikrospraudeņi pārnesti uz svaigas barotnes.

Iegūtos mikrospraudeņus pārnes uz svaigas, iepriekš sagatavotas un kultivēšanas traukos sapildītas barotnes (skatīt 1.1. apakšnodaļu). Pārnesšanas procesā ar pincetēm nostiprina mikrospraudeņu kātiņus barotnē (2.D.att.), ievēro mikrospraudeņu vertikālo orientāciju un nodrošina katram spraudenim ~3 cm<sup>2</sup> lielu platību.

LVMI Silava Augu fizioloģijas laboratorijā bērza klonu pavairošanai izmanto 300 ml stikla burkas, katrā ievietojot 8-10 mikrospraudeņus, kuras pēc mikrospraudeņu ievietošanas aizvāko ar alumīnija foliju, lai kultūrās nenonāktu mikroorganismi, un novieto zem mākslīgā apgaismojuma audzēšanas telpā (skatīt 1.3. apakšnodaļu). Pēc katra pārstādītā veģetācijas trauka (burkas), visas darba virsmas vēlreiz dezinficē ar etanola šķīdumu un instrumentus nodedzina ar liesmu. Darbam ieteicams izmantot vairākus instrumentu komplektus (šķēres, skalpeļi, pincetes), lai tie starp nodedzināšanas reizēm paspēj atdzist, tādējādi neradot mikrospraudeņiem karstuma stresu.

Pavairošanas procesā svarīgi nodrošināt pavairojamā materiāla – konkrētā klona izsekojamību un nesajaukšanos ar citiem. Pavairošanas procesā darbinieks konkrētajā brīdī laminārboksā strādā tikai ar vienu klonu. Nav pieļaujama pat cita klona pavairošanas trauku atrašanās blakus. Pirms klona nomaiņas tiek veikta darba vietas sakārtošana un dezinfekcija. Tādējādi novēršot infekciju izplatību un materiāla nesajaukšanos.

### **1.3. Audzēšanas *in vitro* apstākļi**

Audzēšanas telpai jābūt aprīkotai ar ventilācijas un gaisa kondicionēšanas sistēmu, nodrošinot telpā stabilu gaisa temperatūru 23±1°C, gaisa relatīvais mitrums ~30%RH visā diennakts laikā. Audzēšanai *in vitro* izmanto vertikālās daudzstāvu plauktu sistēmas ar četriem plauktiem. Starp plauktiem nodrošina ~40 cm attālumu un virs katra plaukta 30 cm attālumā instalē LED gaismekļus ar diodēm kuras nodrošina zilu, zaļu, dzeltenu, oranžu sarkanu un tālu sarkano gaismas spektra daļu (2.tab.). Fotonu plūsmas blīvums 40±10 mol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (diapazonā no 400 līdz 750nm) un dienas/nakts periods 16/8 stundas.

#### **Nepieciešamais aprīkojums un izmantošanas mērķis**

1. Mikrospraudeņu audzēšanai *in vitro* nepieciešama audzēšanas telpa ar ventilācijas un kondicionēšanas sistēmu, papildus aprīkota ar daudzstāvu plauktu sistēmām, kurās instalēti atbilstošas gaismas intensitātes un spektra gaismekļi.
2. Laminārbokss. Paredzēts darbam sterilos kontrolētos vides apstākļos.
3. UV lampa. Paredzēta laminārboksa dezinfekcijai.
4. Pērlīšu sterilizators. Paredzēts instrumentu dezinfekcijai.
5. Spirta lampiņa. Paredzēta instrumentu dezinfekcijai ar liesmu.
6. Instrumenti – pincetes, šķēres un skalpeļi. Paredzēti eksplantu satveršanai, sadalīšanai, ievietošanai jaunā barotnē.
7. Audzēšanas trauki – 300 ml stikla burkas. Paredzētas mikrospraudeņu audzēšanai.
8. Autoklāvs. Paredzēts audzēšanas trauku ar barotni sterilizācijai.

9. Laboratorijas trauku mazgājamā mašīna. Paredzēta audzēšanas trauku mazgāšanai.
10. Žāvētājs. Paredzēts izmazgāto audzēšanas trauku žāvēšanai un papildu sterilizācijai.
11. Laboratorijas analītiskie svāri. Paredzēti barotnes sastāvdaļu precīzai svēšanai.
12. pH metrs. Paredzēts barotnes pH noteikšanai.
13. Mikroviļņu krāsns (vai plītiņa). Paredzēta agara izkausēšanai.
14. Ledusskapis. Paredzēts šķīdumu koncentrātu, augšanas regulatoru, vitamīnu un aminoskābju uzglabāšanai.

2. tabula

**Gaismas spektra sadalījums % no kopējās gaismas fotonu plūsmas (no 400 līdz 750nm)**

| Gaismas spektrs                  | Gaismas spektra kompozīcija, % |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Zils 400 – 500 nm                | 17                             |
| Zaļš 500 – 570 nm                | 17                             |
| Dzeltens 570 - 590               | 3                              |
| Oranžš 590 - 625                 | 5                              |
| Sarkans 625 - 700 nm;            | 56                             |
| Tālu sarkans 700 - 750           | 2                              |
| Sarkans:Zils (R:B)               | 3,29                           |
| Sarkans:Tālu sarkans:-red (R:FR) | 28                             |
| Zils:Zaļu (B:G)                  | 1                              |

## **2. Posms. Apsakņošana un audzēšana *ex vitro*.**

### **2.1. Mikrospraudeņu sagatavošana apsakņošanai**

Apsakņošanu var uzsākt aprīlī vai marta beigās atkarībā no pavairojama materiāla daudzuma un pieejamajām telpām apsakņošanas veikšanai. Mikrospraudeņu sagatavošanu veic līdzīgi, kā pavairojot *in vitro* – no veģetācijas trauka izņem piecas līdz sešas nedēļas vecus, reģenerētus augus, kuriem nogriež saknes, sadala ~3 cm garos galotnes vai posmu fragmentos, atstājot vismaz divas līdz trīs veselīgas lapas un iegūtos spraudēņus uz 30 minūtēm ievieto ūdenī, kuram pievienoti augšanas veicinātāji Kelpak vai Radifarm, apsakņošanas stimulēšanai. Pēc tam sagatavotos spraudēņus ar pinceti nostiprina mitrā kūdras substrātā, pa vienam spraudenim katrā kasetes šūnā (3.att.). Pirmajās divās nedēļās veic kūdras virskārtas rušināšanu, novēršot aļģu vai sūnu savairošanos, kuras traucē normālu ūdens režīmu.



**3.attēls.** Bērza mikrospraudeņi dēstu kasetēs.

## **2.2. Apsakņošanas kasešu sagatavošana**

Spraudeņu apsakņošanai un stādu audzēšanai izmanto neitralizētu (pH 5.9) kūdras substrātu – sfagnu kūdra, daļiņu lielums no 0 līdz 15mm, kaļķis  $4.2\text{kg/m}^3$ ; NPK 15-5-24,  $\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$  15-12-29  $1.0\text{ kg/m}^3$ , kam papildus pievieno bioloģiskos preparātus, piemēram, bacilonu, kas uzlabo substrāta īpašības un kavē nevēlamu organismu un kaitēkļu kāpuru attīstību. Šādā veidā sagatavotu kūdras substrātu pilda dēstu kasetēs. Īsi pirms mikrospraudeņu ievietošanas kasetēs, ar kūdras substrātu pildītu kaseti samērcē iegremdējot ūdenī vai izmantojot laistāmo stieni. Apsakņošanai *ex vitro* ir piemērotas dēstu kasetes ar šūnas tilpumu no 70 līdz 90 ml.

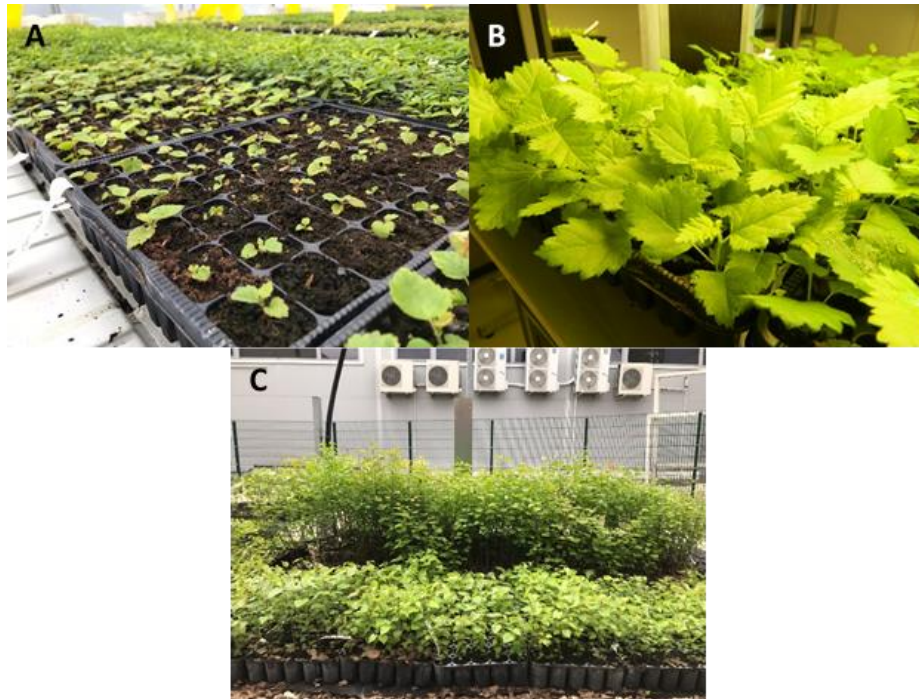
*! Jāpievērš uzmanība kūdras substrāta uzglabāšanas apstākļiem. Nav vēlams kūdras substrāts, kas ilgstoši uzglabāts āra apstākļos. Nekvalitatīva substrāta izmantošanas gadījumā iespējama masveida kaitēkļu, piemēram, trūdodiņa (*Sciaridae sp.*) savairošanās.*

## **2.3. Apsakņošanas un audzēšanas apstākļi**

Audzēšanas telpā jānodrošina gaisa relatīvais mitrums no 80 līdz 90%RH, gaisa temperatūra  $23\pm 2^\circ\text{C}$ . Gaisa apmaiņa apsakņošanas telpā jānodrošina vismaz 10 reizes diennaktī. Dienas/nakts režīms 16/8 stundas, gaismas intensitāte  $110\pm 10\text{ mol m}^2\text{ s}^{-1}$  (diapazonā no 400 līdz 750nm). Spektrs atbilst *in vitro* posmā izmantotajam (2.tab.).

Apsakņošanās notiek apmēram divu līdz trīs nedēļu laikā no spraudņu ievietošanas substrātā un novēro virszemes daļu augšanu. Šajā posmā apsakņošanas telpā jānodrošināts gaisa relatīvais mitrums 80 līdz 90RH%. Pēc trijām nedēļām samazina gaisa relatīvo mitrumu līdz 50%RH vai pārvieto kasetes uz siltumnīcu aklimatizācijai (4.A.att.). Apmēram piecas līdz septiņas nedēļas no spraudņu iespraušanas brīža stādiņi sasniedz ~5 cm garumu (4.B.att.) un ir aklimatizējušies augšanai *ex vitro* apstākļos. Stādus pārskolo lielākos podos un novieto poligonā (4.C.att.).





**4.attēls.** Apsakņots stādmateriāls: A – no audzēšanas telpas pārvietoti 3 nedēļas veci bērza mikrospraudeņi siltumnīcā; B – septiņas nedēļas veci, pārstādīšanai gatavi bērza stādiņi; C – pārskoloti stādi novietoti audzēšanai poligonā.

### **Nepieciešamais aprīkojums un izmantošanas mērķis**

1. Mikrospraudeņu apsākņošanai *ex vitro* nepieciešama slēgta audzēšanas telpa, aprīkota ar specifiskā režīmā darbināmu kondicionēta gaisa pieplūdes un nosūces sistēmu, audzēšanas galdiem, gaisa mitrināšanas sistēmu (augstspiediena miglas sistēma) un atbilstošas gaismas intensitātes un spektra gaismekļiem.
2. Dēstu kasetes ar tilpumu no 70 līdz 90 ml. Paredzētas mikrospraudeņu apsākņošanai.
3. Kūdras substrāts. Paredzēts pildīt dēstu kasetēs mikrospraudeņu apsākņošanai.
4. Instrumenti – pincetes, šķēres un skalpeļus. Paredzēti eksplantu satveršanai, sadalīšanai, ievietošanai kūdras substrātā.
5. Stādu audzēšanas kasetes, šūnas tilpums vismaz 250ml. Paredzētas apsākņoto mikrospraudeņu audzēšanai līdz stādu izmēram.
6. Siltumnīca, aprīkota ar audzēšanas galdiem, laistīšanas un mēslošanas sistēmu, vēdināšanas lūkām. Paredzēta apsākņoto mikrospraudeņu aklimatizācijai.
7. Audzēšanas poligons, aprīkots ar laistīšanas un mēslošanas sistēmu. Paredzēts aklimatizēto mikrospraudeņu audzēšanai līdz stādu izmēram.

### **Informācijas avoti**

O'Dowd N. 2004. The improvement of Irish birch. Phase 1: Selection of individuals and populations. Dublin: COFORD, 56 pp.