

Клональное микроразмножение карельской березы в Карелии

Л. В. Ветчинникова¹

Т. Ю. Ветчинникова

А. В. Устинова

Институт леса Карельского научного центра РАН,
Петрозаводский государственный университет

АННОТАЦИЯ

Рассматриваются основные этапы клонального микроразмножения карельской березы. Приводятся результаты опытно-производственных испытаний, излагаются перспективы использования.

Ключевые слова: карельская береза, клональное микроразмножение.

SUMMARY

Basic stages of the Karelian Birch micropropagation are researched. The results of experimental-production tests are listed and usage prospects are reported.

Keywords: Curly birch, micropropagation.

Одним из символов и национальным достоянием Республики Карелия является карельская береза (рис. 1). Помимо Карелии в небольших количествах она встречается на территории Северной Европы и местами в Центральной Европе. Лесов не образует, запасы ограничены. Мировую известность карельская береза получила благодаря декоративной узорчатой текстуре древесины (рис. 2), которая высоко ценится на мировом рынке и продается в килограммах, а не в кубических метрах.

В последние годы, к сожалению, генетические ресурсы карельской березы в Республике Карелия значительно снизились. Это связано не только с ширококомасштабными браконьерскими рубками, наблюдавшимися в течение последних двух столетий, но и с возрастом деревьев. К настоящему времени большинство естественных насаждений по возрастной структуре (70 лет и более) являются перестойными или спелыми (в отличие от обычной березы, у которой предельный возраст составляет 120–140 лет). Естественное возобновление карельской березы осуществляется крайне слабо [7].

К 2004 г. в Карелии общее число деревьев естественного происхождения составляет менее 3 тысяч. Если учесть, что в Карелии произрастает наибольшее число деревьев карельской березы в нашей стране, то становится очевидным, что карельская береза нахо-

дится на грани исчезновения и необходимо принятие срочных мер по сохранению и восстановлению ее генофонда.

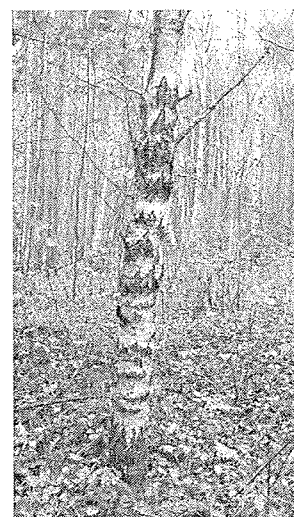


Рис. 1. Внешний вид ствола карельской березы

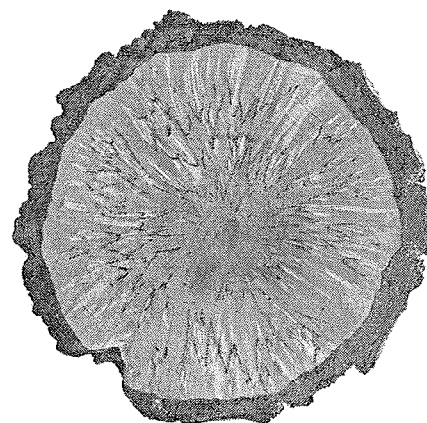


Рис. 2. Узорчатая текстура древесины карельской березы на поперечном срезе

Широкие перспективы для массового размножения ценных и редких растений открывает биотехнология. Среди современных технологий наиболее эффективным является метод клонального микроразмножения растений в культуре *in vitro*.

Первые работы по культуре тканей появились еще в XIX веке, но клональное микроразмножение древесных пород получило развитие только с середины 70-х годов XX века. Преимущества этого метода очевидны. С его помощью за короткий срок можно вырастить достаточно большое количество однородного посадочного материала, при этом коэффициент размножения достигает 10^5 – 10^7 растений в год, что в несколько тысяч раз больше по сравнению с традиционными способами вегетативного размножения [2, 3, 9, 10, 6]. Стерилизация тканей, вводимых в культуру, обеспечивает оздоровление растительного материала. Метод клонального микроразмножения *in*

¹ Авторы – соответственно ведущий научный сотрудник, аспирантка и студентка кафедры лесного хозяйства.

in vitro дает возможность размножить растения, которые с трудом или совсем не размножаются вегетативно. В культуре тканей можно поддерживать морфогенез независимо от сезона, что особенно важно для древесных растений, имеющих многолетний цикл развития. Этот метод позволяет сохранять растительный материал, создавая банк генов долгосрочного хранения растительного материала.

В основе метода клонального микроразмножения в культуре *in vitro* лежит реализация потенциальной способности соматических клеток высших растений дифференцироваться в целый организм (явление тотипотентности). Тотипотентная клетка содержит всю генетическую информацию, необходимую для роста и развития целого организма. Это означает, что при введении в культуру изолированной меристематической ткани (экспланта), она способна при наличии определенных гормонов и соответствующих условий культивирования *in vitro* давать начало множественному числу новых растений. С помощью данного метода за довольно короткий срок можно вырастить достаточно большое количество однородного посадочного материала.

Однако способность к регенерации органов и целых растений из соматических тканей *in vitro* у большинства лесных древесных растений значительно ниже, чем у травянистых. Кроме того, важно иметь в виду, что далеко не каждый орган дерева или участок ткани проявляет тотипотентность в культуре *in vitro*. В значительной степени это зависит от видовых и генотипических особенностей организма в целом, а также от возраста и состояния изолированного экспланта. Не играет большой роли физиологическая фаза развития растений, при которой можно индуцировать каллусные культуры, тем не менее инициация роста побегов более эффективна в период активной деятельности камбия [13].

Анализируя и обобщая отечественный и зарубежный опыт клонального микроразмножения березы, с самого начала мы вели исследования в двух направлениях: индукция морфогенеза из вегетативных тканей и по типу «клонирование семян» (Ветчинникова, 1993, 1998). Изучение потенциальной способности различных тканей и органов карельской березы к морфогенезу и регенерации в культуре *in vitro* показало, что наибольшая меристематическая активность и высокая степень побегообразования присущи тканям проростков. Причем в этом случае формирование побегов происходило с пониженной активностью образования каллуса, что весьма существенно, так как в литературе неоднократно указывалось о возможных отрицательных последствиях точковых мутаций, довольно часто сопровождающих процесс каллусообразования [12, 13, 15, 11]. По мнению многих ученых, метод, получивший название «клонирование семян», является очень эффективным для быстрого увеличения числа ценных гибридов, полученных при контролируемом скрещивании селекционных форм. Особое значение он получил при размножении лесных древесных пород.

Для выяснения возможности клонального микроразмножения карельской березы и массового получения жизнеспособных растений-регенерантов дальнейшие этапы клонального микроразмножения мы отработывали, используя в качестве экспланта, в первую очередь, гибридные семена карельской березы, полученные в результате контролируемого опыления особей, отличающихся ярко выраженными косвенными признаками наличия узорчатой текстуры в древесине. При этом учитывали результаты длительного испытания гибридов первого поколения (F_1), которые показали, что при скрещивании внутри карельской березы (♀ – карельская береза × ♂ – карельская береза) появляется наибольшее число (80–90%) потомков с узорчатой текстурой древесины [17, 8]. В результате нами были отработаны основные этапы клонального микроразмножения карельской березы от введения исходных тканей (эксплантов) в культуру до массового воспроизводства с целью получения растений-регенерантов (или растений, полученных в стерильной культуре *in vitro*).

Целью данной работы явилась отработка последовательных этапов клонального микроразмножения карельской березы в сочетании с опытными производственными испытаниями.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При выполнении данных исследований использовались преимущественно гибридные семена карельской березы, полученные в результате контролируемого опыления, проведенного в мае 2003 г. сотрудниками Карельского проектного селекционно-семеноводческого центра. Родительскими растениями служили прививки, созданные от плюсовых деревьев карельской березы и произрастающие на участке архива клонов Петрозаводской ЛСП. Родительские пары, участвующие в 22 вариантах скрещивания, в основном имели одинаковое между собой происхождение, из них 13 (варианты № 1–6, 11, 16, 17, 20–22) представляли генофонд популяций карельской березы из Заонежья, № 7, 8 – из Спасской Губы, № 13–15 – из Каккорово. Два варианта являлись смешанными и были получены от скрещивания деревьев спасскогубской популяции с заонежской (№ 9) и заонежской с каккоровской (№ 19).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходным материалом (эксплантом) для введения в культуру *in vitro* служили гибридные семена, полученные в результате контролируемого опыления. В качестве питательной среды использовали минеральную основу MS [16]. Дополнительно вносили органические добавки, витамины, гормоны, сахарозу, агар. После стерильного введения экспланта в среду (в ламинар-боксе) пробирки размещали на светоплощадке. Фотопериод составлял 8 часов, температура воздуха – +20–22 °С. В ходе экспериментов проводили наблюдения за качественными и количественными изменениями в развитии меристемы, ведущими к формированию растительного организма. Затем отмечали высоту и число дифференцирующихся стеблевых побегов, число и длину корней. После высадки

в грунт у растений-регенерантов учитывали высоту, состояние, длину корней, число листьев и приживаемость.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Процесс клонального микроразмножения в культуре *in vitro* состоит из ряда последовательных этапов [9, 1, 6, 7], каждый из которых имеет свои особенности (рис. 3). Первый этап (рис. 3, I) включает отбор экплантов и введение их в культуру. Определяющее значение здесь имеет получение культуры, свободной

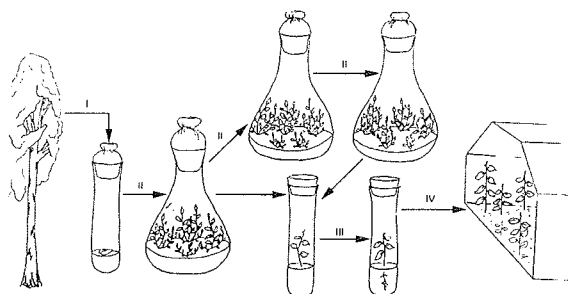


Рис. 3. Основные этапы клонального микроразмножения березы: I – отбор экплантов и введение в культуру, II – собственно размножение, III – корнеобразование, IV – адаптация к нестерильным условиям среды

от инфекций и выживание экпланта на питательной среде. Следующим этапом является собственно размножение (мультипликация) или увеличение числа побегов *de novo* (см. рис. 3, II). Здесь важную роль играют сортовые и видовые особенности размножаемого растения, физиологическое состояние экпланта, его происхождение, состав питательной среды, физические условия культивирования. Способность растений к размножению, как известно, генетически обусловлена, отсюда и неоднородность их поведения в культуре изолированных тканей и органов: они проявляют различную степень тотипотентности. Важный этап процесса микроразмножения – это индукция корней (см. рис. 3, III). Последний этап – адаптация полученных растений к нестерильным условиям или перенос *ex vitro* (см. рис. 3, IV). На этом этапе важно определить условия выращивания, а также оптимальную фазу развития растений, когда при их переносе из стерильных условий в обычные потери будут минимальными. Полученные *in vitro* растения-регенеранты высаживаются сначала в почву в теплицу, а затем – в открытый грунт. Рассмотрим полученные результаты в соответствии с этими этапами.

Получение стерильной культуры. Наиболее ответственным этапом при клональном микроразмножении является получение стерильной культуры вводимого *in vitro* растительного материала. Известно, что среди всех растений древесные породы – самые трудные и сложные объекты для культуры *in vitro*, так как все типы тканей и органов у них сильно заражены, что значительно затрудняет обеспечение асептики экс-

плантов [4]. Используемый при стерилизации дезинфицирующий раствор должен обеспечить уничтожение микроорганизмов, находящихся на поверхности растительной ткани, не снижая при этом ее морфогенетическую потенцию или способность тканей к делению и последующему размножению. Для получения тканевой меристемы требуется определенное время, длительность которого может составлять 2–3 месяца. Это определяется многими обстоятельствами.

Работы по введению гибридных семян карельской березы в культуру *in vitro* нами были начаты 14 мая и продолжались по 31 августа 2004 г. Семена стерилизовали и вводили в культуру первоначально по 100 штук, а после серии многократного заражения, число одновременного введения семян по вариантам уменьшили вдвое. Всего работы по стерилизации семян и введения их в культуру были осуществлены 97 раз, из них 47 – по 100 шт. и 50 – по 50 шт. семян. В среднем всхожесть семян составила 16% (рис. 4). Максимальная (50%) была достигнута в варианте скрещивания № 6 (заонежская популяция). К сожалению, при проращивании все семена, находившиеся в чашках Петри, при заражении исключались из эксперимента и в дальнейших исследованиях не участвовали. Для получения меристемы использовано 452 проростка. Подготовка семян (стерилизация и проращивание) для культуры занимала около 4–5 недель. Затем из каждого гибридного семени (стерильно) мы получали проростки и разрезали (черенковали) их на несколько частей (фрагментов), размещая на поверхности твердой питательной среды для побегообразования.

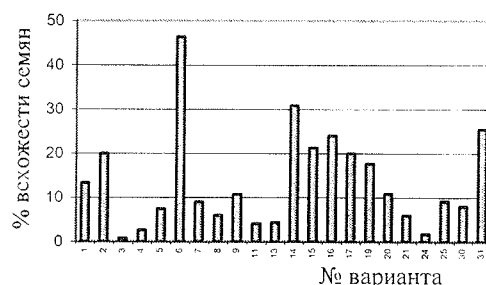


Рис. 4. Средняя всхожесть гибридных семян карельской березы по вариантам скрещивания

Мультипликация побегов *in vitro*. Стерильную меристему тканей проростков гибридных семян использовали в качестве экпланта при мультипликации (многократного увеличения) побегов в культуре *in vitro*. Через 2–3 недели при соответствующей температуре, освещении и других условиях на каждом отдельном фрагменте *in vitro* образовались побеги в виде пучков, состоящих из 10–20 стебельков с листьями (рис. 5А). Происходил процесс мультипликации или многократного увеличения числа побегов (см. рис. 3, II). Проведенные нами эксперименты показали, что вводимые в культуру экпланты гибридных семян способны к органогенезу, при этом из меристемы образуется достаточно большое число вновь сформированных побегов. Максимально на отдель-

ном фрагменте исходной ткани удалось получить пучок более чем из 25 новых побегов за один пассаж (т. е. за 28–30 суток), которые хорошо развивались, и в дальнейшем каждый из них дал полноценное растение. На используемой питательной среде одновременно с мультипликацией побегов происходит их элонгация, т. е. удлинение.

Спустя 3–4 недели после введения экспланта в культуру и получения меристемы с минимальным числом побегов черенкование повторяли (см. рис. 3, II). Через 2–3 недели на каждом фрагменте вновь образовывался пучок, состоящий из десятка и более новых побегов. Этот процесс может продолжаться многократно и поддерживаться путем субкультивирования (постоянной пересадки тканей меристемы на свежую питательную среду) столь долго, сколько растений требуется получить.

В культуре *in vitro* выращивание меристемы обычно проводится круглогодично. Согласно нашим данным, возможности по реализации тотипотентности тканей в течение календарного года варьируют. Так, в весенне-летние месяцы (март–август) наблюдался усиленный рост меристемы и мультипликации побегов, в то время как в осенне-зимний период (сентябрь–февраль) прирост замедлялся, образующиеся листья и побеги становились более мелкими.

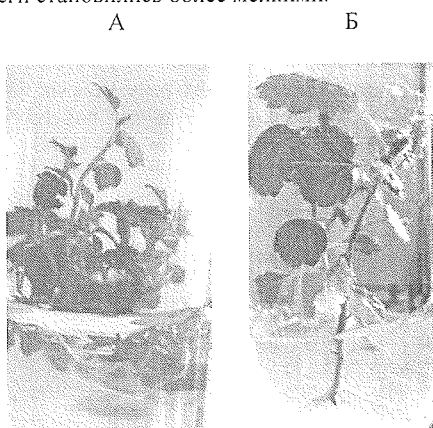


Рис. 5. Мультипликация побегов березы (А) и образование корней (Б) в культуре *in vitro*

Следовательно, годичный ритм развития растений в культуре тканей меристемы соответствует фазам ее развития в природе: активный морфогенез в весенний период и в течение вегетации, а в дальнейшем к осени – замедление процессов роста и развития. Периода покоя, однако, замечено не было. Рост и побегообразование продолжались даже при пониженной температуре воздуха (+4°C) и отсутствии света, когда растительный материал был размещен в холодильной камере с целью его «консервации». При этом наблюдалось удлинение побегов и образование листового аппарата, хотя и более мелких размеров; иногда отмечалось подсыхание верхушки побегов. После консервации в течение 150–275 дней у 80% растений отмечено активное развитие меристемы и побегообразование (от 1 до 8 побегов *de novo*) с приростом от 1,8 до 3 см и формирование настоящих листьев от 4

до 6 на побег. У отдельных клонов отмечено развитие до 20 побегов *de novo* и более из одного сегмента с максимальной высотой до 3,7 см, образование настоящих листьев до 7 штук на побег и корней длиной около 1,5 см, растущих на среде в течение 35 дней и более. Морфологические характеристики побегов на стадии мультипликации определяются главным образом генотипом растений. Это означает, что уровень мультипликации, размеры листовой пластинки, высота побегов являются достаточно стабильными показателями и почти не изменяются от одной субкультуры меристемы к другой, даже спустя один–два года и более.

Образование корней. Получая при размножении в культуре тканей значительное число побегов, мы выбирали среди них наибольшие по размерам, которые достигали в высоту 1,5–2,5 см и имели хорошо развитый листовый аппарат. Затем их отделяли и переносили на питательную среду для корнеобразования. Формирование корней у побегов происходило обычно в течение 10–18 дней и составляло от 83 до 98% (рис. 5Б). Эксперименты показали, что ризогенез побегов у березы *in vitro* зависит в основном от видовых особенностей экспланта. Высокий процент корнеобразования, по всей вероятности, связан с омоложением тканей в культуре *in vitro*. Меристему субкультивировали.

Эффективность клонального микроразмножения в значительной степени определяется правильным подбором питательной среды. Химический состав и физические свойства ее должны соответствовать требованиям, которые выполняет среда на каждом этапе микроразмножения [9]. Питательная среда, необходимая для оптимального роста меристемы *in vitro*, меняется в зависимости от биологических особенностей исходной ткани.

Адаптация растений-регенерантов *ex vitro*. После образования корней на побегах полученные растения-регенеранты переносили из стерильных (*in vitro*) в нестерильные (*ex vitro*) условия в теплицу с полиэтиленовым покрытием (см. рис. 3, IV). Этот этап очень ответствен, поскольку полученные в стерильных условиях растения-регенеранты испытывают значительный стресс, попадая в нестерильные условия среды. По мнению Йокинен с соавторами [14], пересадка растений из стерильных условий *in vitro* в почву является наиболее ответственным этапом в микроразмножении.

Растения-регенеранты, имеющие листья, стебель и корневую систему, мы высаживали в условия тепличного комплекса лесопитомника «Вилга» (Петрозаводский лесхоз). Внешне растения-регенеранты перед высадкой в грунт напоминают всходы, полученные из семян. Небольшие размеры: высота – от 2 до 4 см, диаметр – около 1 мм, зеленый окрас листьев свойствен как тем, так и другим растениям. Тем не менее растения-регенеранты отличаются от всходов главным образом отсутствием округлых супротивно расположенных семядольных листьев с ровным кра-

ем. Последующие (настоящие) листья имеют зубчатый край, по форме и положению они очередные, т. е. похожие на таковые взрослого растения.

Посадку растений-регенерантов в сезон 2004 г. (рис. 6) мы осуществляли 6 раз: 20 июня, 7, 16, 23 июля, 2 и 19 августа. Всего высадили 1810 растений-регенерантов. К началу сентября было подготовлено еще 260 растений, которые в связи с поздними для посадки в теплицу сроками высажены в кассеты в условиях лаборатории. В результате в условиях культуры *in vitro* в 2004 г. нами было получено 2070 укорененных растений-регенерантов.



Рис. 6. Посадка растений-регенерантов, полученных в культуре *in vitro*

Наблюдения за ростом и развитием растений-регенерантов проводились как в культуре *in vitro*, так и в условиях теплицы. К осени высота растений-регенерантов в условиях грунта составила от 2 до 7 см, что связано, вероятно, с довольно поздними сроками их посадки (рис. 7). Уместно отметить, что при использовании теплиц с туманообразующей системой полива средний прирост растений-регенерантов, высаженных нами 17 июня и 2 июля 1993 г., составил осенью около 40 см и 20 см соответственно.

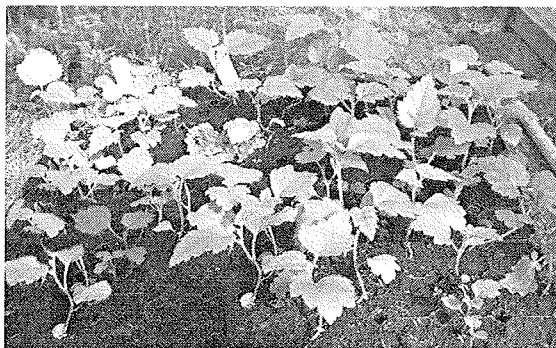


Рис. 7. Растения-регенеранты карельской березы, полученные в культуре *in vitro*, спустя 2 месяца после посадки

Во время опытно-производственных испытаний нами был отмечен интересный факт, что в случаях отсутст-

вия внешне заметных корней, после посадки в почву растения-регенеранты сохраняли свою жизнеспособность. Видимо, выдерживание их в среде для корнеобразования стимулирует образование корневых очагов, которые долгое время себя не обнаруживают *in vitro*, но в дальнейшем *ex vitro* дают начало развитию корневой системы. Вместе с тем ее формирование, по данным Веландер [18], в значительной степени зависит от температуры почвы.

Наши и литературные данные [14] показывают, что существенное значение в период адаптации растений после культуры *in vitro* (первые две недели) имеет влажность воздуха. Если она ниже 90%, то растения могут погибнуть. Такой факт мы наблюдали, когда полученные в сентябре 260 растений-регенерантов высадили в условия лаборатории. Из-за недостаточной влажности воздуха в помещении к весне следующего года выжили только отдельные из них.

Вместе с тем с началом весны культивируемая меристема активно использована нами для дальнейшего развития и получения массового количества растений-регенерантов. 106 генотипов карельской березы от 26 вариантов скрещивания нам удалось «консервировать» и к началу апреля несколько сотен растений уже пренесены на среду для корнеобразования. Весной 2005 г. тысячи растений-регенерантов карельской березы готовятся для высадки в условия тепличного комплекса в более ранние сроки (конец мая-начало июня), чтобы к осени получить полноценный посадочный материал.

В целом в культуре *in vitro* нами получена меристема клонов и отработана лабораторная схема клонального микроразмножения карельской березы, которая исключает вероятность самоклональной изменчивости исходного материала ввиду отсутствия этапа активного каллусообразования.

Экспериментальные исследования показали, что высадка неокрепших растений в грунт в условиях тепличного комплекса в конце лета или осенью нежелательна, что необходимо учитывать при планировании и проведении подобного вида работ. Для этого экспланты лучше вводить в культуру в феврале-марте, а субкультивирование меристемы осуществлять с учетом своевременной подготовки растений-регенерантов к переносу их в почву к началу июня. Растения, получаемые позднее, рекомендуется высаживать в отопляемую теплицу с туманообразующей установкой (для создания необходимой влажности воздуха), либо «консервировать» полученную меристему до следующей весны.

Результаты показали достаточно высокую тотипотентность меристематической ткани проростков: опытным путем удалось получить более 25 побегов *de novo* из одного экспланта за один пассаж (т. е. за 28–30 дней). Через 7–9 недель выращенные *in vitro* растения-регенеранты, имеющие стебель, листочки, корневую систему, можно переносить из стерильных условий в теплицу. Обязательным фактором успеш-

ной адаптации растений *ex vitro* является обеспечение 90%-й относительной влажности в теплице в течение первых двух-трех недель.

На наш взгляд, анализ представленных результатов свидетельствует о целесообразности использования метода культуры тканей при размножении карельской березы и других представителей сем. *Betulaceae* L. в производственных масштабах. При использовании технологии клонального микроразмножения можно не только возобновлять и тиражировать перспективные селекционные формы, но и расширять внутривидовое разнообразие, в данном случае, уже редкой и исчезающей карельской березы, что имеет большое значение для селекции и практики лесного хозяйства. Изучение вопросов морфогенеза растений с использованием культуры *in vitro* предоставляет широкие возможности для постановки экспериментов, направленных на выяснение причин формирования узорчатой текстуры древесины, и позволяет предполагать возможность управления этими процессами в ближайшем будущем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байбурина Р. К. Микроклональное размножение взрослых гибридных деревьев *Betula pendula* Roth var. *carelica* Mercl / Р. К. Байбурина // Растительные ресурсы. 1998. Т. 34, вып. 2. С. 9–22.
2. Бутенко Р. Г. От свободноживущей клетки – к растению / Р. Г. Бутенко. М.: Колос. 1971. 95 с.
3. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений / Р. Г. Бутенко. М., 1975. 51 с.
4. Бутова Г. П. Клональное микроразмножение лесных древесных растений / Г. П. Бутова // Экспресс инф. гос. ком. СССР по лесн. хоз-ву. ЦБНТИ «Лесоводство, лесоведение, лесные пользования». М., 1987. С. 2–18.
5. Ветчинникова Л. В. Возможности ускоренного размножения березы карельской / Л. В. Ветчинникова // Селекция и лесное семеноводство в Карелии. Петрозаводск, 1993. С. 47–55.
6. Ветчинникова Л. В. Клональное микроразмножение селекционного материала березы карельской / Л. В. Ветчинникова // Научные основы селекции древесных растений Севера. Петрозаводск, 1998. С. 73–87.
7. Ветчинникова Л. В. Карельская береза: ареал, разнообразие, охрана и перспективы воспроизводства / Л. В. Ветчинникова // Труды КарНЦ РАН. Петрозаводск, 2004. Вып. 6. С. 1–16.
8. Ермаков В. И. Закономерности наследования узорчатой текстуры древесины в гибридном потомстве березы карельской / В. И. Ермаков // Селекция и лесное семеноводство в Карелии. Петрозаводск, 1979. С. 4–20.
9. Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. М., 1983. 96 с.
10. Родин А. Р. Методы культуры тканей: перспективы использования / А. Р. Родин, Е. А. Калашникова // Лесное хозяйство. 1995. № 3. С. 9–11.
11. Табацкая Г. М. Каллусная культура как источник получения генетически измененных растений / Г. М. Табацкая, Г. Л. Бутова // Достижения лесной генетики и селекции – научно-техническому прогрессу. Воронеж. 1988. С. 17–20.
12. Ballester A., Vieitez A. M. Factores que afectan la micropropagation del abedul / A. Ballester, A. M. Vieitez // An. edafol. G. agrobiol. 1987. 46. № 5–6. P. 741–747.
13. Huhtinen, Yahyaoglu, Huhtinen O., Yahyaoglu Z. Das frühe Blühen von aus Kalluskulturen herangezogenen Pflänzchen bei der Birke (*Betula pendula* Roth) // Silvae Genetica. 1974. Vol. 23. N (1–3). P. 32–34.
14. Jokinen K. J. Biotechnology of the silver birch (*Betula pendula* Roth.) / K. J. Jokinen, J. Hohkanen, P. Seppänen, T. Törmälä // Agro Industry Hi-Tech. 1991. P. 23–26.
15. Matschke J. Möglichkeiten der beschleunigten Vermehrung von Braunmasebirken / J. Matschke, D. Ewald, G. Bolland, H. Schneck // Beitr. Forstwirtschaft. 1987. B. 21, N. 1. S. 21–25.
16. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant 1962. Vol. 15. P. 437–497.
17. Sarvas R. Visakoivikon perustaminen ja hoito / R. Sarvas. Metsätal. Aikakauslehti 8. 1966. P. 1–3.
18. Welander M. Influence of environment, fertilizer and genotype on shoot morphology and subsequent rooting of birch cuttings / M. Welander // Tree Physiology. 1995. N 15. P. 11–18.