
Hibrīdalkšņu pavairošana *in vitro*

A. Gailīte ^{1*}, D. Auzenbaha ¹

Gailīte, A., Auzenbaha, D. (2010). *In vitro* propagation of hybrid alder. *Mežzinātne | Forest Science* 21(54): 65-75.

Kopsavilkums. Pētījuma mērķis – hibrīdalkšņu *in vitro* pavairošanas izpēte. Par eksplantiem izmantoti no pieaugušiem kokiem ņemti lapaini vai koksaini spraudņi ar vienu vai diviem pumpuriem. Secināts, ka sterilas kultūras iegūšana ir problemātiska, jo bieži nepieciešama vairākkārtēja eksplantu dezinficēšana. Dzinumi kultivēti barotnēs ar WPM un MS makroelementiem, citokinīniem, saharozi un/vai glikozi. Proliferācija panākta, barotnei pievienojot 0,1-0,5 mg l⁻¹ 6-benzilaminopurīna (BAP). Rizoģenēzes inducēšanai izmantoti 0,1-0,5 mg l⁻¹ indoliletīkskābes, 0,1-0,3 mg l⁻¹ indolilsviestskābes un 0,05-0,15 mg l⁻¹ naftiletīkskābes. Labākie rezultāti iegūti, iniciācijas barotnei pievienojot WPM makroelementus, kinetīnu, saharozi pilnībā vai daļēji aizstājot ar glikozi. Pavairošanas barotnē ieteicamā BAP koncentrācija ir 0,25-0,5 mg l⁻¹. Dzinumu apsākšanas veicināšanai barotnei pievieno indoliletīkskābi vai naftiletīkskābi. Atzīmējams, ka hibrīdalkšņa apsākšana iespējama arī bezhormonu barotnē.

Sākotnējie rezultāti liecina, ka Latvijas hibrīdalkšņu pavairošana *in vitro* ir iespējama un perspektīva.

Nozīmīgākie vārdi: hibrīdalkšnis, *Alnus*, *in vitro* kultūra, mikroklonālā pavairošana.

•••

Gailīte, A., Auzenbaha, D., LSFRI "Silava". ***In vitro* propagation of hybrid alder.**

Abstract. By the use of *in vitro* propagation, it is possible to obtain a large quantity of genetically uniform planting material in a relatively short time. Techniques for micropropagation of *Alnus incana* and *Alnus glutinosa* have been reported, yet data is lacking about the micropropagation of hybrid alder. It is known that in order to obtain *in vitro* culture, explants preferably be taken from young trees and seedlings. Grafting or cutting techniques are recommended for establishing *in vitro* cultures from mature trees.

For this study the cultures were initiated from cuttings with one or two buds taken from the crown of mature trees during March, May and July. They were surface-sterilized in a solution of bleach ACE/sterile water 1:1, followed by three rinses with sterile distilled water. Hardwood cuttings were sterilized for 20-40 min., softwood – for 6-12 min. Initiation media contained WPM macronutrients, MS micronutrients, vitamins, glutamine, cytokinins, sucrose and/or glucose, 6 g l⁻¹ agar were used; pH was adjusted to 5.9 before autoclaving. Cultures were maintained at 22-25°C under

¹ LVMI "Silava", Rīgas iela 111, Salaspils, LV-2169, Latvija; *e-pasts: agnese.gailite@silava.lv

a 16h photoperiod.

Regardless of the duration of disinfection most of the explants were contaminated and sterilization was repeated after 1 and 2 weeks with 0.1% mercury chloride solution (1.5 min.). Sterile shoots were counted 1 month after *in vitro* establishment. Explants, taken in March, had slightly higher infection rates. However, if sterile shoots were obtained further development is possible. Of 18 hybrid clones initiated into *in vitro* culture, eight were successfully established.

The *in vitro* culture of hybrid alder No. '125' established in 2008 was used for multiplication and rooting studies. Multiplication media contained 0.1-0.5 mg l⁻¹ BAP. Auxins – 0.1-0.5 mg l⁻¹ indoleacetic acid (IAA), 0.1-0.3 mg l⁻¹ indolebutyric acid (IBA) or 0.05-0.15 mg l⁻¹ naphthylacetic acid (NAA) were added to the rooting media. Each experiment was carried out with 30 microcuttings. The results were summarized after 1 month. By including BAP in the medium at concentrations of 0.1-0.5 mg l⁻¹ it was found that the optimal concentration of BAP added to the medium should be 0.25-0.5 mg l⁻¹, while higher concentrations of BAP make the resulting shoots smaller. The effect of various auxins (IAA, IBA, NAA) has been checked on hybrid alder micro-cuttings with a view to promote rooting. Best results were obtained by adding to the medium 0.3 to 0.5 mg l⁻¹ IAA, or 0.1 to 0.15 mg l⁻¹ NAA. Media with 0.1, 0.2 or 0.3 mg l⁻¹ IBA did not differ significantly from the control.

Hybrid alder *in vitro* cultures were obtained from the material collected at different times, yet the main problem is acquisition of a sterile and viable *in vitro* culture. Multiplication medium supplemented with BAP at concentrations 0.25-0.5 mg l⁻¹ is appropriate. BAP at concentration 0.1 mg l⁻¹ is not suitable for reproduction, because of the low proliferation rate. Rooting is promoted by adding IAA or NAA, but is possible also on hormone-free medium.

Key words: hybrid alder, *Alnus*, *in vitro* culture, micropropagation.

•••

Гайлите А., Аузенбаха Д., ЛГИЛН «Силава». **Размножение гибридной ольхи *in vitro*.**

Резюме. Метод микроклонального размножения позволяет получить в большом количестве генетически идентичного посадочного материала в относительно короткий период времени. Целью исследования было изучение процесса размножения гибридной ольхи способом *in vitro*. Использованы экспланты зрелых деревьев, которые помещены в стерильную культуру в марте, в мае и в июле. Выяснено, что метод добычи стерильных эксплантов проблематичен, зачастую требующий повторной дезинфекции. Побеги культивированы в питательной среде с WPM макроэлементами, цитокининами, сахарозой и/или глюкозой. Микрочеренкованию способствовало добавление к питательной среде БАП (0,1-0,5 мг л⁻¹). Для стимулирования корнеобразования использовались ауксины –

ИУК (0,1-0,5 мг л⁻¹), ИМК (0,1-0,3 мг л⁻¹) или НУК (0,05-0,15 мг л⁻¹). Лучшие результаты получены, добавляя к питательной среде ИУК и НУК. По итогам первоначальных результатов следует, что метод размножения гибридной ольхи *in vitro* является применимым и перспективным.

Ключевые слова: *Alnus*, гибридная ольха, *in vitro*, микроклональное размножение.

Ievads

Mikroklonālās pavairošanas metodes pielietojums hibridalkšņa (*Alnus incana* (L.) Moench. × *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) masveida pavairošanā ir viens no veidiem, kā salīdzinoši īsā laika periodā iegūt lielu daudzumu ģenētiski viendabīga stādmateriāla, un ir alternatīva tradicionālajām pavairošanas metodēm. Literatūrā publicēti dati par dažādu alkšņu sugu, t.sk., baltalkšņa un melnalkšņa, mikroklonālo pavairošanu, taču nav ziņu par hibridalkšni. Darbs pie hibridalkšņa mikroklonālās pavairošanas protokola izstrādes uzsākts 2008. gada pavasarī LVMI „Silava” Augu fizioloģijas laboratorijā.

Jebkuras kultūras veiksmīgu iegūšanu *in vitro* nosaka vairāki faktori, no kuriem svarīgākie ir māteskoka vecums, eksplanta ievākšanas laiks un lielums, optimāla dezinfekcijas līdzekļa un laika izvēle, kā arī barotnes sastāvs. Labi mikropavairošanas rezultāti iegūti, izmantojot *Alnus glutinosa* eksplantus no vienu-divus gadus veciem sējeņiem un jauniem kokiem (Tremblay, Lalonde, 1984). Koka vecumam pieaugot un pārsniedzot 10 gadus, strauji samazinās (no 35 līdz 10%) eksplanta spējas attīstīties *in vitro*, kā arī nostabilizēties kultūrā un vairoties (Greenwood, 1987). Ja mātesaugi ir pieauguši koki, pozitīvs rezultāts iegūstams, veicot potēšanu un apgriešanu (Perinet *et al.*, 1988), kā arī par eksplantiem izmantojot

dzinumu galotnes (Lall, 2005). Uzskata, ka optimālākais eksplantu ievadīšanas laiks kultūrā ir pavasaris, kad aktivizējušies koka fizioloģiskie procesi. Ziemā ņemtie eksplanti ir grūtāk dezinficējami, kā arī tiem novērota spēcīgāka infekcija (Smith, 2000). Ievadīšanu sterilajā kultūrā limitē gan eksplantu inficētības risks, gan fenola savienojumu oksidēšanās (Barghchi, 1988). Viens no biežāk pielietotajiem dezinfekcijas līdzekļiem ir nātrija hipohlorīts. Dezinfekcijas ilgums atkarīgs no eksplanta veida un parasti to izvēlas empīriski. Lai mikrodzinumi attīstītos bez vitrifikācijas un pārmērīgas kallusa veidošanās, būtisks ir arī optimāls barotnes sastāvs.

Visbiežāk tiek izmantotas MS (Murashige & Skoog, 1962), WPM (Lloyd and McCown's woody plant medium; Lloyd, McCown, 1981) un Blaydes barotnes un to modifikācijas (Enrico *et al.*, 2005; Perinet *et al.*, 1988; Tremblay, Lalonde, 1984).

A. glutinosa dzinumu attīstības stimulēšanai iniciācijas barotnei pievienoti: MS vai WPM makroelementi, MS mikroelementi, 0,2-0,75 mg l⁻¹ 6-benzilaminopurīna (BAP), 3% saharoze (Tremblay, Lalonde, 1984). *A. incana* pamatbarotnei un multiplicēšanas barotnei izmantoti MS sāļi un BAP (Perinet *et al.*, 1988).

Pavairošanai lietots BAP, taču, piemēram, melnalkšnim raksturīgs augsts endogēno augsīnu līmenis, kas kavē

proliferāciju, tāpēc izmantoti auksīnu transporta inhibitori (Lall *et al.*, 2005).

Apsakņošanai *in vitro* pielietota indolilsviestskābe (ISS), tomēr iespējama arī apsakņošana *ex vitro* ar vai bez apstrādes ar auksīnu (Barghchi, 1988; Enrico *et al.*, 2005; Perinet *et al.*, 1988).

Materiāli un metodes

Mūsu izmēģinājumos par mātesaugiem izmantoti pieauguši hibrīdalkšņi, kas identificēti ar DNS marķieriem Valsts pētījumu programmas (VPP) „Lapu koku audzēšanas un racionālas izmantošanas pamatojums, jauni produkti un tehnoloģijas” ietvaros. Eksplanti – 4-5 cm gari koksnaini un lapaini

spraudeņi ar 1-2 aksilārajiem pumpuriem – ievākti martā, maijā un jūlijā, atbilstoši VPP plānotajiem darbiem. Pirms dezinfekcijas eksplanti mazgāti ziepjūdenī, noskaloti un ievietoti traukā ar destilētu ūdeni. Laminārā eksplanti dezinficēti ar balinātāju ACE/sterils ūdens 1:1. Koksainie spraudeņi dezinficēti 20-40 min., lapainie spraudeņi – 6-12 min. (1. tabula).

Dezinficētie dzinumi 3 reizes 10 minūtes skaloti sterilā destilētā ūdenī un novietoti uz sākotnējās barotnes tīrības izvērtēšanai. Nesterilie dzinumi atkārtoti dezinficēti pēc 1 un 2 nedēļām ar 0,1% dzīvsudraba hlorīda šķīdumu (1,5 min.). *In vitro* kultūras audzētas 22-25°C temperatūrā,

1. tabula, Table 1

In vitro ievadīšanas kalendārais laiks un sākotnējās dezinfekcijas ilgums
Schedule of *in vitro* culture establishment and duration of primary sterilization

Hibrīds <i>Hybrid</i>	Ievadīšanas datums <i>Collecting date</i>	Sākotnējās dezinfekcijas ilgums, min. <i>Primary sterilization, min.</i>
1	06.03.09.	30
29	05., 06.03.09.	20, 30
111	05.03.09.	20
26	10.03.09.	40
115	10.03.09.	40
Hibrīds (Ba) 25	15.05.08.	6-8
Hibrīds 125	15.05.08.	6-8
Hibrīds (Ma)	15.05.08.	6-8
Nr. 4-08	29.05.08.	7-10
Nr. 3-08	29.05.08.	7-10
Nr. 1-08	29.05.08.	7-10
Nr. 2-08	29.05.08.	7-10
22	02.07.09.	10-12
S ₁	02.07.09.	10-12
125	02.07.09.	8
149	02.07.09.	8
166-168	15.07.09.	6
D-8	22.07.09.	6-8

fotoperiods – 16 stundas. Lai atrastu optimālu barotni kultūras uzsākšanai, barotnēm pievienoti WPM vai MS makroelementi, MS mikroelementi, vitamīni, glutamīns, citokinīni, 0,1 mg l⁻¹ indoliletiķskābes (IES), saharoze un/vai glikoze, 6 g l⁻¹ agara. Citokinīni pievienoti dažādās koncentrācijās – 0,2-1 mg l⁻¹ izopenteniladenīna (2-iP), 0,2–0,5 mg l⁻¹ kinetīna, 0,2-2 mg l⁻¹ BAP. Barotnes pH pirms autoklavēšanas – 5,9.

Proliferācijas un rizoģenēzes pētījumiem izmantots 2008. gadā *in vitro* ievadītais hibrīdalksnis '125'. Proliferācijas barotnē lietoti WPM makroelementi, MS mikroelementi, vitamīni, glutamīns, 0,1-0,5 mg l⁻¹ BAP, 30 g l⁻¹ glikozes, 6 g l⁻¹ agara. Pēc mēneša uzskaitīti no eksplanta iegūtie dzinumi.

Apsakņošanas barotnēm pievienoti WPM makroelementi, MS mikroelementi, vitamīni, glutamīns, augsīni – 0,1-0,5 mg l⁻¹ IES, 0,1-0,3 mg l⁻¹ ISS vai 0,05-0,15 mg l⁻¹ naftiletiķskābes (NES), 30 g l⁻¹ glikozes, 6 g l⁻¹ agara. Pēc mēneša uzskaitīts sakņu skaits.

Katrā eksperimentā izmantoti 30 mikrodzinumi, kas audzēti stikla kultivācijas traukos (katra tilpums – 300 ml); barotnes daudzums – 50 ml, trauki noslēgti ar alumīnija folijas vāciņiem.

Rezultāti un diskusija

In vitro kultūras veidošana

Eksplanti ņemti no 18 taksoniem dažādos kalendārajos laikos. Martā ņemtajiem bija vērojama spēcīga infekciju attīstība. Tīri bija tikai 14,8%. Arī literatūrā (Barghchi, 1988) minēts, ka par

eksplantiem ņemot miera periodā esošus aksilāros pumpurus, tos ievadīt *in vitro* ir problemātiski, jo konstatēts augsts infekciju procents, kā arī novērota fenola savienojumu izdalīšanās, kas izraisa barotnes brūnēšanu un eksplanta vitrifikāciju. Jaatzīmē, ka četrus hibrīdus neizdevās dezinficēt ('Nr. 1-08', 'Nr. 2-08', '111' un '166-168') (2. tabula).

Pārējie ik pēc trim nedēļām tika pārstādīti svaigā barotnē. Taksoniem Nr. 4-08 un Nr. 3-08 attīstījās sekundārā infekcija. Fenola savienojumu veidošanos hibrīdalksnim nenovērojām, tomēr daļa eksplantu neveidoja dzīvotspējīgu *in vitro* kultūru un vairs neattīstījās.

Uzsākot darbu 2008. gadā, uzmanība galvenokārt tika veltīta barotņu izstrādei un optimizācijai: izmēģinātas barotnes ar MS un WPM makroelementiem, dažādiem citokinīniem, saharozi un/vai glikozi. MS makroelementi koncentrācijā 1/2 un 3/4 iniciācijas barotnē neuzrādīja pozitīvu rezultātu. Iniciācijas barotnēs tika izmēģināti citokinīni – 0,2-1 mg l⁻¹ izopenteniladenīna (2-iP), 0,2–0,5 mg l⁻¹ kinetīna, 0,2-2 mg l⁻¹ BAP. Konstatēts, ka labāki rezultāti iegūstami, barotnei pievienojot WPM makroelementus, kinetīnu, BAP. Ieteicama saharozes daļēja vai pilnīga aizstāšana ar glikozi. Arī literatūrā uzrādīti dati par dažādu cukuru ietekmi uz kokaugu pavairošanu *in vitro*, un daudzos gadījumos labāki rezultāti iegūti, par oglekļa avotu izmantojot glikozi (Cuenca *et al.*, 2000; Tremblay, Lalonde, 1984). Mūsu izmēģinājumā pēc 10 mēnešiem taksoni 'Hibrīds (Ba) 25', 'Hibrīds 125' un 'Hibrīds (Ma)' bija izveidojuši dzīvotspējīgu *in vitro* kultūru, kas

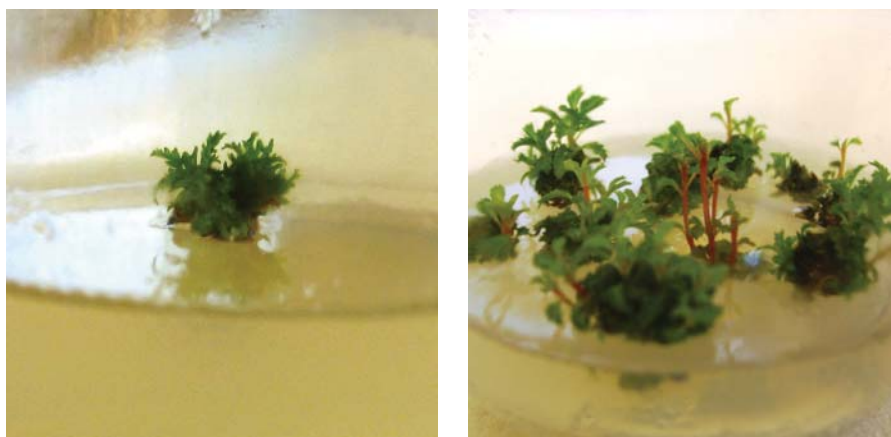
Kultūras iniciācija *in vitro*
In vitro culture establishment

Hibrīds <i>Hybrid</i>	Sterili eksplanti 1 mēnesi pēc ievadišanas, % <i>Sterile explants 1 month after establishment, %</i>	Dzīvotspējīga <i>in vitro</i> kultūra <i>Successful in vitro culture</i>
1	16	
29	28	+
111	0	
26	13	
115	17	+
Hibrīds (Ba) 25	56	+
Hibrīds 125	67	+
Hibrīds (Ma)	58	+
Nr. 4-08	42	
Nr. 3-08	42	
Nr. 1-08	0	
Nr. 2-08	0	
22	87	+
S ₁	66	+
125	50	
149	58	
166-168	0	
D-8	57	+

tālāk izmantojama mikropavairošanai. Tik ilgā laikā stabila *in vitro* kultūra tika iegūta tādēļ, ka, nezinot optimālo barotnes sastāvu, bija nepieciešami attiecīgi eksperimenti ar dažādām vielām dažādā koncentrācijā.

Izmantojot barotnes (3. tabula), kas uzrādījušas labākos rezultātus 2008. gada izmēģinājumā, 2009. g. martā ievadītajam hibrīdaksnim '115' 4,5 mēnešu laikā bija izveidojusies dzīvotspējīga *in vitro* kultūra, jo tas deva proliferējošus dzinumus. Savukārt pēc astoņu mēnešu veiksmīgas kultivēšanas

in vitro šim taksonam novērota pārmērīga kallusa veidošanās, kas varētu būt šī konkrētā hibrīda īpatnība. Lakshmanan (1997) uzsver, ka, augus pavairojot *in vitro*, iespējamās vairākas problēmas – slikta augšana, latentī patogēni (sekundārā infekcija), vitrifikācija, bazālā kallusa pastiprināta veidošanās. Jūlijā ievadītais hibrīds 'D-8' stabili *in vitro* kultūru izveidojis 3,5 mēnešu laikā, bet četros mēnešos panākta arī proliferācija (1. attēls), savukārt hibrīdi 'S₁' un '22' – 5 mēnešos. Arī Perinet



1. attēls. Hibrīds 'D-8': a) 2 mēnešus pēc ievadišanas *in vitro*;
b) 4 mēnešus pēc ievadišanas *in vitro*.

Figure 1. Hybrid alder 'D-8' a) 2 months after establishment *in vitro*,
b) 4 months after establishment *in vitro*.

3. tabula, Table 3

Iniciācijas barotņu varianti hibrīdalkšņa ievadišanai *in vitro*
Media for establishment of in vitro culture of hybrid alder

Ķīmiskās vielas <i>Chemical compounds</i>	1. barotne, mg l ⁻¹ <i>Medium No. 1, mg l⁻¹</i>	2. barotne, mg l ⁻¹ <i>Medium No. 2, mg l⁻¹</i>	3. barotne, mg l ⁻¹ <i>Medium No. 3, mg l⁻¹</i>
WPM makroelementi	+	+	+
MS mikroelementi	+	+	+
Fe hellāts	+	+	+
mezoinozīts	100	100	100
glicīns	2	2	2
tiamīna HCl	0,5	0,5	0,5
piridoksīna HCl	0,5	0,5	0,5
nikotīnskābe	0,5	0,5	0,5
adenīna sulfāts	20	20	20
glutamīns	2	2	2
biotīns	1	1	1
kinetīns	0,2	0,2	0,2
BAP	2	0,5	0,25
IES	0,1	0,1	-
saharoze	20000	15000	-
glikoze	10000	15000	30000
agars	6000	6000	6000

et al. (1988) norāda, ka dzinumu kultūra ir iegūstama pēc 13 nedēļām, ja eksplantu izdevies pilnībā sterilizēt un tā turpmākā attīstība noris bez pastiprinātas kallusa veidošanās vai vitrifikācijas.

Dzinumu pavairošana

Barotnēm pievienojot BAP, notiek dzinumu proliferācija. Jo lielāka ir BAP koncentrācija barotnē, jo lielāks arī pavairošanas koeficients. Barotnei pievienojot BAP 0,1 mg l⁻¹, iegūstami 0,97±0,18 dzinumi no viena eksplanta; pievienojot 0,25 mg l⁻¹, iegūstami 3±0,29 dzinumi; pievienojot 0,3 mg l⁻¹, iegūstami 4,34±0,31 dzinums; pievienojot 0,5 mg l⁻¹, BAP iegūstami 7,7±0,25 dzinumi no viena eksplanta (2. attēls).

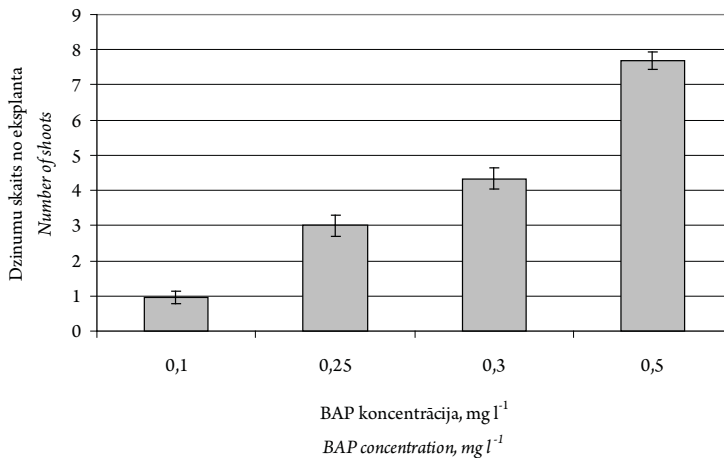
Konstatēts, ka jo lielāka ir BAP koncentrācija, jo iegūtie dzinumi ir sīkāki. Līdz ar to optimālā ieteicamā koncentrācija būtu 0,25-0,5 mg l⁻¹. Literatūrā dzinumu pavairošanai uzrādītā koncentrācija ir

0,5-0,6 mg l⁻¹ (Tremblay, Lalonde, 1984), tomēr atkarībā no sugas un kлона īpatnībām šis skaitlis var būt variabls.

Dzinumu apsākņošana

Ir pārbaudīta dažādu augsīnu (indolilsviestskābe, indoliletīksskābe, naftil-etīksskābe) iedarbība uz hibrīdalkšņa mikrospauļiem ar nolūku veicināt rizoģenēzi. Labākie rezultāti iegūti, barotnei pievienojot 0,1, 0,3 un 0,5 mg l⁻¹ IES vai 0,05-0,15 mg l⁻¹ NES (3. attēls).

Barotnei pievienojot 0,1, 0,2 vai 0,3 mg l⁻¹ ISS, iegūtie rezultāti būtiski neatšķiras no kontroles varianta, t.i., bezhormonu barotnes, kur arī notika sakņu veidošanās. Literatūrā minēts, ka gan *A. glutinosa*, gan *A. incana* apsākņošanai lietojams 0,2 mg l⁻¹ ISS, tomēr jāņem vērā katra kлона īpatnības (Perinet *et al.*, 1988; Tremblay, Lalonde, 1984). Nav arī noliedzams, ka, palielinot ISS koncentrāciju līdz 0,5 mg l⁻¹, apsākņošanās rezultāti varētu

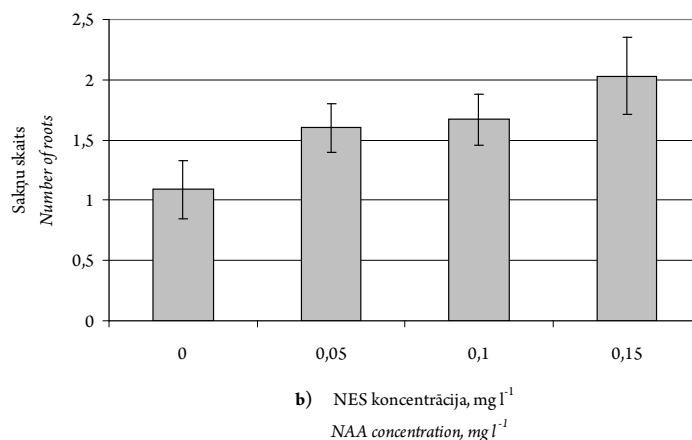
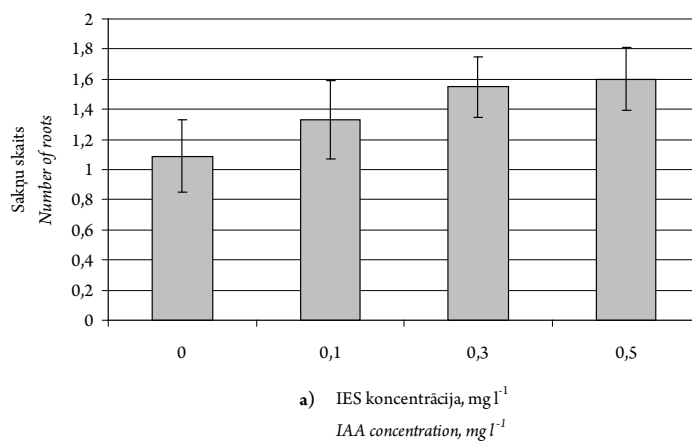


2. attēls. Dažādas koncentrācijas BAP ietekme uz dzinumu skaitu pavairošanas barotnēs.
 Figure 2. Effect of different BAP concentrations on the number of shoots.

būt vēl labāki. Literatūrā minēts, ka augus iespējams apskņot arī *ex vitro*, tikai tas notiek lēnāk (Perinet *et al.*, 1988).

Neraugoties uz eksperimenta ierobe-

žotību laikā un *in vitro* apskņotā materiāla daudzumu, konstatēts, ka substrātā izstādītie (*ex vitro*) mikrospraudņi ir dzīvotspējīgi.



3. attēls. Auksīnu ietekme uz sakņu veidošanos:

a) dažādas koncentrācijas IES ietekme uz sakņu skaitu;

b) dažādas koncentrācijas NES ietekme uz sakņu skaitu.

Figure 3. Effect of auxins on root formation:

a) effect of different IAA concentrations on the number of roots;

b) effect of different NAA concentrations on the number of roots.

Secinājumi

1. Hibridalkšņa ievadišana *in vitro* iespējama dažādos kalendārajos laikos, par eksplantiem izmantojot gan lapainus, gan koksnainus spraudņus, tomēr problemātiska ir sterila un dzīvotspējīga *in vitro* kultūras iegūšana.
2. Dzīvotspējīgu *in vitro* kultūru iegūst, iniciācijas barotnei pievienojot WPM makroelementus, kinetīnu un glikozi.
3. Hibridalksnis pavairojams, pievienojot BAP koncentrācijā 0,25-0,5 mg l⁻¹. BAP koncentrācija 0,1 mg l⁻¹ nav pietiekama, jo pārāk mazs ir pavairošanas koeficients.
4. Hibridalksni iespējams apsakņot arī bezhormonu barotnēs; apsakņošanās veicināšanai pievienojams IES vai NES.
5. Tā kā eksperimentu laiks bija ierobežots un pavairošanai un apsakņošanai kā modelis izmantots viens hibridalksnis, pētījumi būtu turpināmi, lai noskaidrotu optimālo fitohormonu koncentrāciju citu hibrīdu kultivēšanai.

Pētījums veikts VPP projekta „Perspektīvas lapu koku audzēšanas tehnoloģijas izstrāde meža un nemeža zemēs patērētāju nodrošināšanai ar meža izejvielām” ietvaros.

Literatūra

- Barghchi, M.** (1988). Micropropagation of *Alnus cordata* (Loisel.) Loisel. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15: 233-244.
- Cuenca, B., Vieitez, A.M.** (2000). Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in *in vitro* beech cultures. Plant Growth Regulation 32: 1-12.
- Enrico, R.J., Ramirez, S.S., Mroginski, L.A., Wall, L.G.** (2005). *In vitro* plant regeneration of *Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata* and its root nodulation by Frankia. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80: 343-346.
- Greenwood, M.S.** (1987). Rejuvenation of forest trees. Plant Growth Regul., 6: 1-12.
- Lall, S., Mandegaran, Z., Roberts, A.V.** (2005). Shoot multiplication in cultures of mature *Alnus glutinosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 83: 347-350.
- Lakshmanan, P., C.-L.Lee, C.-J. Goh.** (1997). An efficient *in vitro* method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L. Plant Cell Reports 16: 572-577.
- Lloyd, G., McCown, B.H.** (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Propag. Soc. 30: 421-427.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

- Perinet, P., Valee, G., Tremblay, F.M.** (1988). In vitro propagation of mature trees of *Alnus incana* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15: 85-89.
- Smith, R.H.** (2000). *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. Second ed. Academic Press, p. 230.
- Tremblay, F.M., Lalonde, M.** (1984). Requirements for the in vitro propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus species*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3: 189-199.