

А.М. ЛАВРЕНТЬЄВА, І.І. ХАРЧЕНКО

Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України,  
Україна, 01014 м. Київ, вул. Тімірязєвська, 1

## НАСІННЕВЕ ТА КЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ СОРТІВ SAMELLIA JAPONICA L. В КУЛЬТУРІ IN VITRO

*Наведено результати досліджень насінневого та клонального розмноження чотирьох сортів Samellia japonica L. Була виявлена та показана можливість мікророзмноження шляхом поєднання ембріокультури з множинним пагоноутворенням у культурі in vitro. Розроблені методи розмноження дають змогу отримувати масовий посадковий матеріал камелій.*

Серед тропічних і субтропічних рослин закритого ґрунту особливою декоративністю відзначається камелія японська. У колекції ботанічного саду нараховується близько 20 її сортів та гібридів. Однак її культивування та вегетативне розмноження пов'язані зі значними труднощами. Крім того, деякі сорти камелії зовсім не утворюють насіння.

Перші роботи з насінневого розмноження *S. japonica* в культурі *in vitro* були виконані у 50-х роках ХХ ст. В. Ламмертом [11, 12]. Упродовж кількох наступних десятиліть подібні роботи практично не виконувалися і лише у 80-х роках до них знову повернулися [19]. Досліджувався вплив стерилізації, умов культивування та склад поживних середовищ на розвиток насіння *S. japonica* [2, 3].

Проте деякі етапи насінневого розмноження досі дуже слабо вивчені, а клональне мікророзмноження застосовувалося лише для деяких сортів.

У зв'язку з цим розробка методів насінневого та клонального розмноження перспективних та високодекоративних сортів камелії японської є не тільки актуальним завданням, але має також науковий і практичний інтерес.

Роботи з розмноження проводили в асептичних умовах в лабораторії культури ізолюваних тканин НБС ім. М.М. Гришка НАН України. Насіння пророщували в колбах Ерленмейєра на 250 мл, а експланти – у біологічних пробірках на агаризованих поживних середовищах, склад яких наведено у табл. 1.

Об'єктами наших досліджень були такі сорти *S. japonica*, як 'Eleanor Franchetti', 'Grandiflora rosea', 'Magnoliaeflora', 'Anemonaeflora'.



Колби з насінням та пробірки з експлантами утримували в культуральній кімнаті при температурі 22–27 °С, відносній вологості 70%, фотоперіоді 16 годин, освітленості 6–8 тис. люкс.

Оскільки отриманий нами інтактний матеріал був дуже брудним, тому були розроблені багатоступеневі режими його стерилізації, які забезпечували максимальну стерильність.

Для стерилізації насіння використовували такий режим: 10%-ний хлоракс (20 хв.), 15%-ний перекис водню (15 хв.).

Експланти камелії (листки, пагони, бруньки) стерилізували послідовно у 3%-ному фамосепті (15 хв.), 20%-ному хлораксі (15 хв.) та 15%-ному перекисі водню (15 хв.).

При насіннєвому розмноженні в культурі *in vitro* використовували насіння, зібране в умовах відкритого ґрунту у м. Сухумі та в оранжереях НБС ім. М.М. Гришка НАН України.

Для розмноження з насіння видаляли спермодерму, оскільки вона перешкоджала проростанню. Насіння камелії

Таблиця 1

**Склад поживних середовищ, які були використані для насіннєвого та клонального мікророзмноження *Camellia japonica*, мг/л**

Компоненти	Кнудсона "С"	Muracire – Скуга	Піріка		
			Індукція калусу	Регенерація пагонів	Укорінення пагонів
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	–	1650	825	206	412
KNO <sub>3</sub>	–	1900	950	950	475
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	–	440	440	220	110
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250	370	370	185	42
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250	170	85	85	42
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1000	–	–	–	–
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	25	27,8	27,8	27,8	27,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	–	–	–	–
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	7,5	22,3	22,3	22,3	22,3
Na <sub>2</sub> ЕДТА	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	–	6,2	6,2	6,2	6,2
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	–	8,6	8,6	8,6	8,6
KI	–	0,83	0,83	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	–	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	–	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	–	0,025	0,025	0,025	0,025
Нікотинова кислота	–	0,5	0,5	0,5	0,5
Піридоксин	–	0,5	0,5	0,5	0,5
Тіамін	–	0,4	0,4	0,4	0,4
m-інозит	–	100	100	100	100
Гліцин	–	2,0	2,0	2,0	2,0
2,4-D	–	–	2,0	–	–
БАП	–	–	1,0	–	–
Аденін	4,0	4,0	–	10,0	2,0
НОК	–	2,0	–	–	–
ІОК	–	5,0	–	1,0	–
ІМК	–	–	–	–	10,0
Глюкоза	–	–	30000	–	30000
Сахароза	20000	30000	–	20000	–
pH	4,8–5,2	5,5	5,8–6,0	5,8–6,0	5,8–6,0

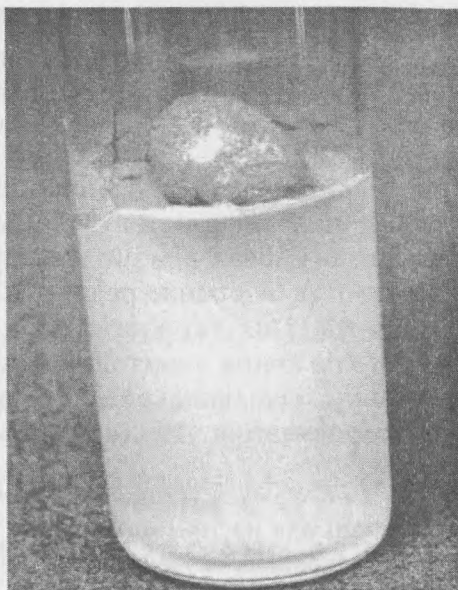


Рис. 1. Насіння *Camellia japonica*, яке було використане для розмноження

мало добре розвинені великі сім'ядолі і зародкову бруньку 3–4 мм завдовжки і 2–3 мм завширшки (рис. 1). Спроба культивувати тільки зародки не дала позитивних результатів.

Стерильне насіння розміщали на поживному середовищі Кнудсона тим кінчиком, де розташований рубчик, оскільки там розміщена основна частина зародка — плюмула, гіпокотиль, зарод-

ковий корінець. Якщо покласти насіння інакше, то морфологічно нормального сіянця отримати не вдається. Після появи кореня пробірки з насінням переносили ближче до світла. Результати вивчення етапів проростання насіння та розвитку сіянців наведено у табл. 2.

Аналізуючи отримані нами дані, слід зазначити, що в культурі *in vitro* строки проростання та розвитку сіянців різних сортів *C. japonica* майже не відрізняються. Насіння починає проростати на 3-й день у 'Eleanor Franchetti' і закінчується на 10-й день у 'Anemonaeflora'. Дещо пізніше проростання насіння цього сорту ми пов'язуємо з розмірами самого насіння (воно вдвічі менше, ніж у інших). Крім того, у рослин інших сортів якість насіння була значно вища. У коробочках все насіння було дозрілим і не мало дефектів.

У цілому процес проростання триває 60–70 днів залежно від сорту. Спочатку через два-три тижні з'являється корінь. Потім відбувається процес його інтенсивного росту. Над поверхнею утворюються повітряні корінці, спершу білого, а потім коричневого кольору. Найчастіше утворюється один корінь,

Таблиця 2

**Тривалість проростання насіння і розвитку сіянців *Camellia japonica* в культурі *in vitro*, кількість днів**

Фази розвитку	Сорти			
	Eleanor Franchetti	Grandiflora rosea	Magnoliaeflora	Anemonaeflora
Початок проростання	3	5	4	10
Утворення кореня	13	15	14	20
Початок росту пагона	20	23	28	36
Початок розвитку листків	30	33	40	45
Рослини з 1–2 коренями і 3–4 листками (висота рослин 10 см)	60	67	70	75

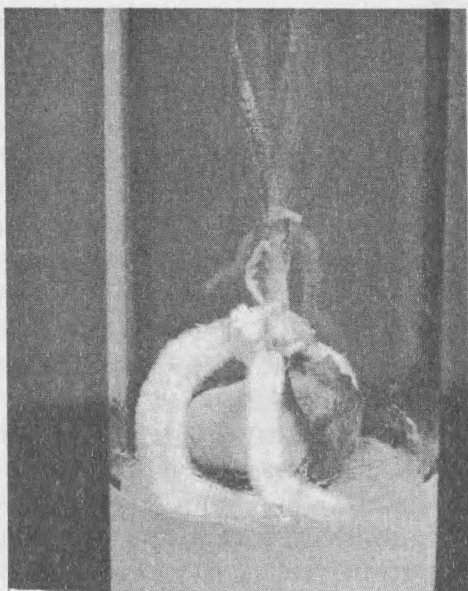


Рис. 2. Утворення пагона та кореня у *Camellia japonica* 'Magnoliaeflora'

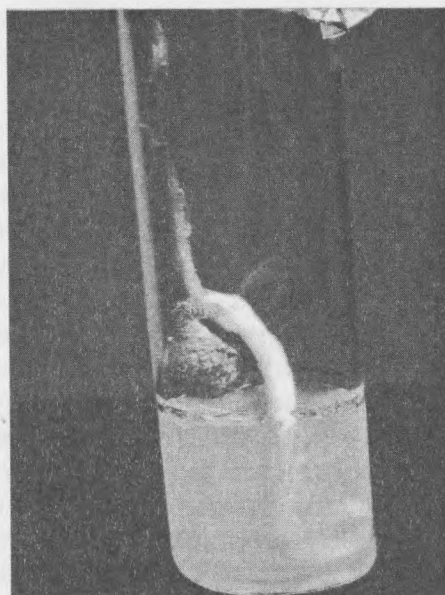


Рис. 3. Ріст пагона та поява листків у *Camellia japonica* 'Anemonaeflora'

рідше два-три (рис. 2). Корені 2-го та 3-го порядків формуються після утворення пагона (рис. 3). Іноді корінь з'являється і починає рости разом з пагоном, немовби обгортаючи його. Через 1–1,5 місяця тонка шкірка сім'ядолей зверху тріскається і між ними можна побачити пагін. Далі впродовж ще одного місяця відбувається інтенсивний ріст пагона і на ньому з'являються листки (рис. 3). На цей час сіянці мають у довжину 10 см і готові до висадження в субстрат. За потребою їх виймали з колб, висаджували у сфагновий мох і поміщали у теплицю при температурі повітря +26–28°C, вологості 80% і освітленні 4–6 тис. люкс.

Для збільшення кількості рослинного матеріалу було проведено живцювання сіянців. Для цього сіянці розрізали в асептичних умовах на сегменти таким чином, що кожен з них мав пазушну бруньку, і окремо розміщали їх у пробірки на поживне середовище з

підвищеними концентраціями регуляторів росту. Цим прийомом ми знімали апікальне домінування, що сприяло активному розвитку пазушних бруньок. Від однієї бруньки було отримано три-п'ять додаткових пагонів (рис. 4). На нашу думку, ювенільний матеріал є більш чутливим до дії цитокінінів та ауксинів, ніж дорослий. Отримані додаткові сіянці вкорінювали, додаючи до поживного середовища ІОК (5 мг/л), НОК (2 мг/л) та активоване вугілля (1 г/л).

При проведенні експериментів з насінневого розмноження сортів *C. japonica* в культурі *in vitro* ми зіткнулися з дуже цікавим проявом морфогенезу – соматичним ембріогенезом. Зазначимо, що це явище спостерігали й інші дослідники [13, 20, 22].

Слід підкреслити, що соматичний ембріогенез відноситься до такого типу клонального мікророзмноження, за якого зародкоподібні структури розвиваються асексуально, поза межами



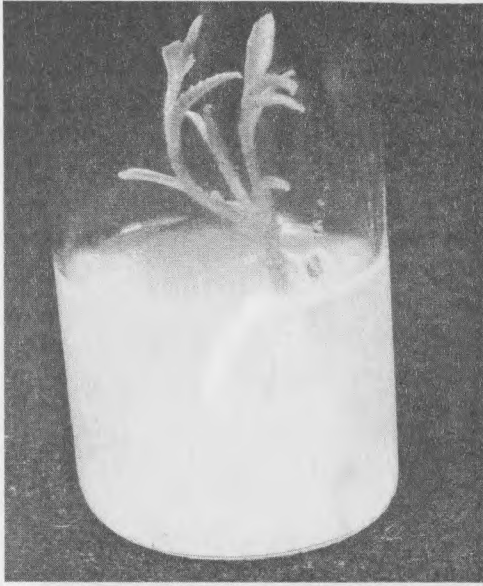


Рис. 4. Формування додаткових пагонів з бруньки на живцях сіянців *Camellia japonica* 'Magnoliaeflora'

зародкового мішка із соматичних клітин культивованих тканин. На даний час соматичний ембріогенез виявлено у 102 видів рослин, однак лише у 51 виду було отримано рослини з ембріодів [21]. Показано, що здатність до соматичного ембріогенезу в культурі тканин передусім залежить від генотипу дослідної рослини [10].

Відомі два типи соматичного ембріогенезу. Перший – прямий ембріогенез, коли зародки з'являються безпосередньо з тканин за відсутності проліферації калусу. Другий – непрямий, коли спочатку відбувається диференціація калусних клітин, а вже потім ембріодів. Поряд з цим зустрічається і вторинний ембріогенез, коли на поверхні соматичних зародків з'являються додаткові ембріоди [18]. Це біполярні структури, які одночасно розвивають як кореневий, так і стебловий апекси. Утворення соматичних зародків є типовим явищем для багатьох тропічних рослин.

За результатами досліджень було встановлено, що після 3–6 місяців культивування на поживному середовищі Кнудсона з 4 мг/л аденіну на деяких частинах сіянців усіх сортів *C. japonica* з'явилися ембріоди (рис. 5). Нами було з'ясовано, що основними параметрами, які визначали соматичний ембріогенез у сортів камелії, є тип експланта, стадія його розвитку та взаємодія між поживним середовищем і експлантом.

Так, наприклад, перші соматичні ембріоди з'явилися на черешках сім'ядолей сіянців (рис. 6). Причому вони диференціювались як з тканин сім'ядолей, так і знизу та зверху черешка сім'ядолі. Аналогічне явище було відмічено й іншими дослідниками [6]. Слід зазначити, що ембріоди, які ми отримали з тканин зародку, при подальшому культивуванні рослин не регенерували. Найбільша кількість соматичних ембріодів була отримана з тканин черешків

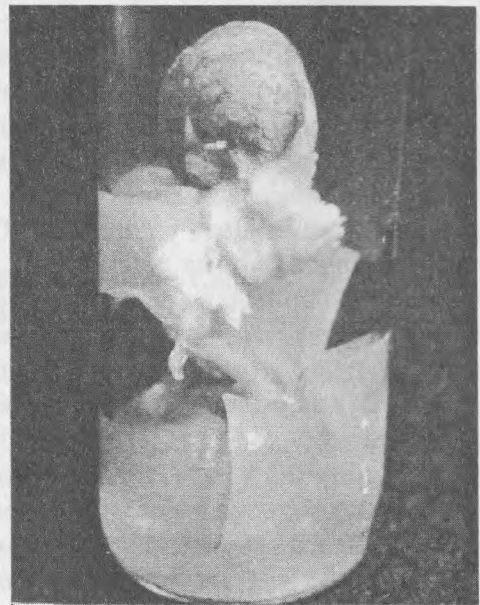


Рис. 5. Утворення ембріодів з тканин сім'ядолей у *Camellia japonica* 'Eleanor Franchetti'



сім'ядолей. Цікаво, що соматичні зародки різних сортів камелії мали досить великі розміри (3–5 мм завдовжки і 2–3 мм завширшки).

Наші дані свідчать про те, що соматичний ембріогенез, завдяки якому були отримані ембріоїди, характеризується трьома напрямками. Було встановлено, що їх диференціація відбувається асинхронно в епідермальних і субепідермальних шарах сім'ядолей, причому саме в тій частині, яка злегка піднімається над поверхнею поживного середовища.

Аналізуючи літературні дані та результати, одержані нами, ми підтримуємо думку, згідно з якою прямий ембріогенез *in vitro* відбувається із клітин, які були детерміновані до ембріогенного розвитку ще до введення їх в ізолювану культуру. Ці ембріогенно детерміновані клітини потребують тільки внесення регуляторів росту до поживних середовищ або сприятливих умов для переходу до

поділу клітин і експресії ембріогенезу. В наших дослідженнях це спостерігалось тоді, коли концентрація аденіну у поживному середовищі була збільшена до 4 мг/л і культури утримувалися в умовах темряви. Після перенесення їх на світло ембріоїди набували зеленого кольору і надалі з них формувалися пагони (рис. 7).

На противагу цьому непрямий ембріогенез потребує редетермінації диференційованих клітин, проліферації калусу та послідовного розвитку ембріогенно детермінованого стану. Для багатьох видів рослин стадія розвитку експланта є критичною для експресії соматичного ембріогенезу і дуже часто включає часткову диференціацію [16]. При прямому соматичному ембріогенезі специфічність стадії розвитку експланта безпосередньо пов'язана з його віком. Крім того, лімітуючим фактором є наявність певного типу клітин [17].

Деякі дослідники відмічають подібність між прямим соматичним ембріо-

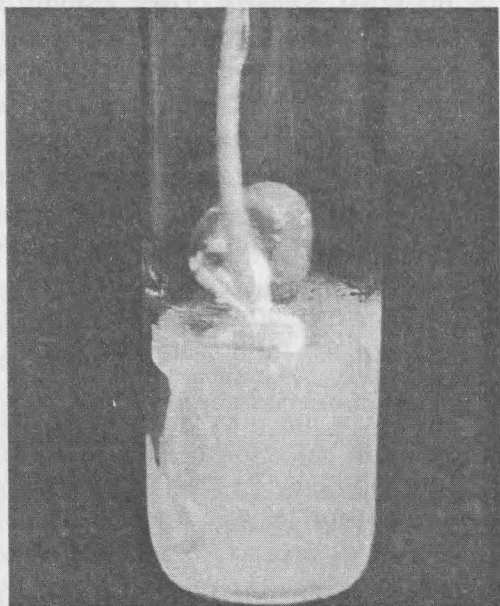


Рис. 6. Регенерація ембріоїдів з тканин черешка сім'ядолі *Camellia japonica* 'Magnoliaeflora'

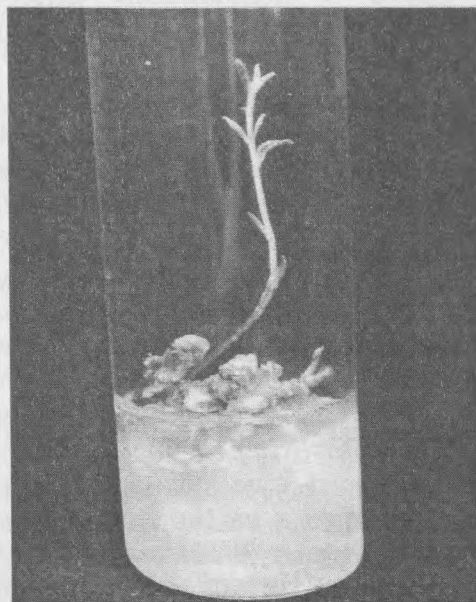


Рис. 7. Розмноження та регенерація пагонів з ембріоїдів у *Camellia japonica* 'Grandiflora rosea' на поживному середовищі Мурасіре – Скуга

генезом та ініціацією до ембріогенезу окремих клітин та багатоклітинних утворень. Багато із відмінностей, які спостерігаються у наших дослідах, пов'язані з необхідністю редетермінації клітин для входження в ембріогенний стан, що збігається з даними інших дослідників [5]. У цілому, тип морфогенезу залежатиме від того, чи зможе така група клітин встановити та підтримувати скоординовану поведінку як ембріогенна одиниця при дії різних чинників, що впливають на міжклітинні зв'язки.

Окрім згаданих вище проявів ембріогенезу, іноді ми спостерігали замість соматичних зародків утворення ембріоподібних структур (неоморфів), які надалі сильно розрослися, але рослин не утворювали.

Отримані нами ембріоїди культивували на різних за складом поживних середовищах [1, 4, 14]. Найбільш оптимальним виявилось середовище Мурасіге – Скуга з половинним вмістом макросолей, модифіковане додаванням аденіну (2–5 мг/л) і НОК (1 мг/л). Отримані рослини вкорінювали на середовищі Кнудсона з 5–10 мг/л ІМК.

Рослини, які утворились із соматичних зародків, можуть проявляти соматоклональну варіабельність, що, у свою чергу, може бути використане для отримання нових вихідних форм у селекції рослин. Крім того, метод соматичного ембріогенезу дасть можливість селекціонерам отримувати велику кількість вегетативно розмноженого матеріалу через культуру зрізів сім'ядолей, виділених з насіння, отриманого в результаті схрещування.

Для клонального мікророзмноження використовували ті ж самі сорти *S. japonica*, що й для насіннєвого. Брали молоді відростаючі пагони дорослих

рослин заввишки 10–15 см та листки цих пагонів. Слід зазначити, що всі експланти дорослих рослин камелії дуже інфіковані як спорами грибів, так і бактеріями. Даний факт підкреслюється багатьма дослідниками [8, 9]. Це негативно впливає як на формування калусу, так і на інші процеси диференціації.

У багатьох випадках успіх мікророзмноження залежить від правильного вибору експланта. В наших дослідженнях експлантами були сегменти листків дорослих рослин, пазушні бруньки молодих відростаючих пагонів, які культивували на поживному середовищі Мурасіге – Скуга. Було також вивчено морфогенетичний потенціал цих експлантів.

Проліферація калусу відбувалася по всьому периметру сегментів листків (рис. 8). Однак найчастіше його диференціація спостерігалася на сегментах, які були взяті з базальної частини листка та по його жилках. Таке явище, на наш погляд, пов'язане з високою морфогенетичною активністю цих зон, які мають велику кількість клітин з достатньо високим мітотичним потенціалом. У культурі *in vitro* вони функціонують як меристематичні клітини, під впливом регуляторів росту регенерують калусну масу.

Найвища інтенсивність калусогенезу була зафіксована на поживному середовищі Мурасіге – Скуга з 2 мг/л 2,4-D. Вона залежала від віку листка та генотипу рослини, що збігається з даними інших дослідників [7, 15]. Отриманий нами калус був неморфогенним і рослини не регенерував.

Регенерація пагонів відбувалася лише з апікальних та пазушних бруньок молодих пагонів (рис. 9). Отримані рослини вкорінювали на поживному сере-





Рис. 8. Регенерація калусу на сегментах листків дорослих рослин *Camellia japonica* 'Анемонаефлора' на поживному середовищі Мурасіге – Скуга з 2,4-D

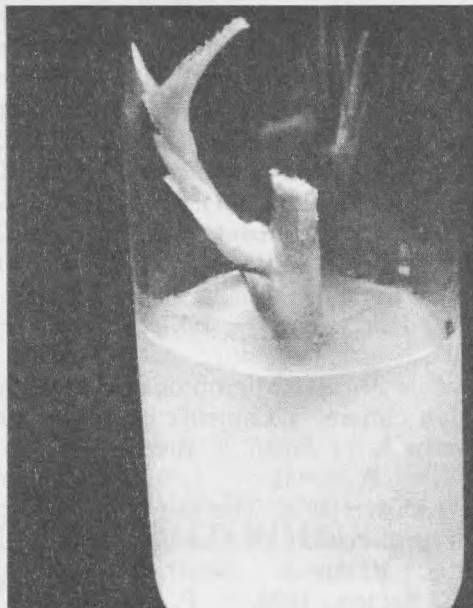


Рис. 9. Утворення пагона зі сплячої бруньки пагона *Camellia japonica* 'Eleanor Franchetti' на поживному середовищі Мурасіге – Скуга

довищі Піріка з 10 мг/л ІМК та 1 г/л активованого вугілля.

Слід зазначити, що всі частини як сіянців, так і рослин-регенерантів можна використовувати як вторинні експланти, збільшуючи тим самим коефіцієнт розмноження і отримуючи додаткову кількість рослин.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу розробити ефективні методи насіннєвого та клонального розмноження сортів *C. japonica*. Вивчено етапи проростання насіння та розвиток сіянців в культурі *in vitro*. Розроблено оригінальні методи збільшення кількості сіянців камелії за допомогою ембріокультури та пагоноутворення, оптимальну біотехнологію цієї культури, за допомогою якої було отримано оздоровлений посадковий матеріал *C. japonica*.

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. – М.: УБК-Пресс, 1999. – 160 с.

2. Вечерина Н.А., Таварткиладзе О.К., Кутубидзе В.В. Пролиферация и морфогенетический потенциал стеблевого каллуса чайного растения сорта "Колхида" // Субтропические культуры. – 1988. – № 6. – С. 54–60.

3. Кутубидзе В.В., Таварткиладзе О.К., Вечерина Н.А. Некоторые особенности введения в культуру *in vitro* пазушных почек чайного растения *Thea sinensis* L. // Там же. – № 1. – С. 80–84.

4. Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Орхидеи в культуре. – К: Наук. думка, 1986. – 200 с.

5. Barciela J., Vieitez A.M. Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. // Ann. Bot. – 1993. – 71. – P. 395–404.

6. Bennett W.Y., Sheibert A. In vitro generation of callus and plantlets from cotyledons of *Camellia japonica* // The Camellia J. – 1982. – N 37. – P. 5–12.



7. Frisch C.H., Camper N.D. Callus from *Camellia sinensis* and *C. japonica* stem tissue // *The Camellia J.* — 1987. — 42, N 3. — P. 26–27.
8. Haldeman J.H., Kathleen J.L. Attempting the infection of *Camellia japonica* leaf discs with *Agrobacterium tumefaciens* // *The Camellia J.* — 1996. — 51 (1). — P. 200–204.
9. Haldeman J., Thomas R.L., McKamy D.L. Use of benomyl and rifampicin for in vitro shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica* // *HortScience.* — 1987. — 22 (2). — P. 306–307.
10. Kato Michyo. Micropropagation through cotyledon culture in *Camellia japonica* L. and *C. sinensis* L. // *Japan. J. Breed.* — 1986. — 36, N 1. — P. 31–38.
11. Lammert W.E. The use of embryo culture in germination of *Camellia* seeds // In *Camellia Research*. Southern California Camellia Society, 1950. — P. 7–8.
12. Lammert W.E. Embryo culture in camellia seeds germination // In Tourje E.C. *Camellia Culture.* — New York, Macmillan Company, 1958. — P. 171–174.
13. Ly T.L. Regeneration of plantlets in cultures of immature cotyledons and young embryos of *Camellia oleifera* Abel. // *Acta Biologiae Experimentalist Sinica.* — 1982. — 15, N 4. — P. 393–403.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — N 15. — P. 473–479.
15. Ogutaga D.B.A., Northcote D.H. Caffeine formation in tea callus culture // *J. Exp. Bot.* — 1970. — 21. — P. 258–273.
16. Pedroso M.C., Pais M. S. Early detection of embryogenic competence and of polarity in *Camellia japonica* L. by electron probe X-ray microanalysis // *Plant Sci.* — 1994. — 96. — P. 189–201.
17. Plata E., Ballester A., Vieitez A.M. An anatomical study of secondary embryogenesis in *Camellia reticulata* // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* — 1991. — 27. — P. 183–189.
18. Rangaswami N.S. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissues and organ cultures // *Proc. Indian. Acad. Sci. Anim. Sci.* — 1986. — 96, N 4. — P. 247–271.
19. Samartin A., Vieitez A.M., Vieitez E. In vitro propagation of *Camellia japonica* se-

edlings // *HortScience.* — 1984. — 19, N 2. — P. 225–226.

20. Vieitez A.M., Barciela Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica* L. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1990. — 21, N 3. — P. 267–274.

21. Williams E.G., Maheswaran G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group // *Ann. Bot.* — 1986. — 57, N 4. — P. 443–462.

22. Zhuang Chengji, Liang Hanxing. *Camellia chrysantha*. Yunnan zhiwu yanjiu // *Acta bot. Yunnanica.* — 1985. — 7, N 4. — P. 446–450.

#### СЕМЕННОЕ И КЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ СОРТОВ *CAMELLIA* *JAPONICA* L. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

А.Н. Лаврентьева, И.И. Харченко

Национальный ботанический сад  
им. Н.Н. Гришко НАН Украины,  
Украина, г. Киев

Приведены результаты исследований семенного и клонального размножения четырех сортов *Camellia japonica* L. Была выявлена и показана возможность микроразмножения путем соединения эмбриокультуры с множественным побегообразованием в культуре in vitro. Разработанные методы размножения позволяют получать массовый посадочный материал камелий.

#### SEED AND CLONAL PROPAGATION OF *CAMELLIA JAPONICA* L. CULTIVARS IN VITRO CULTURE

A.N. Lavrentyeva, I.I. Kharchenko

M.M. Grishko National Botanical Gardens,  
National Academy of Sciences of Ukraine,  
Ukraine, Kyiv

The results of seed and clonal propagation of 4 cultivars of *Camellia japonica* L. are given. It was shown that the best results were obtained using both the method of embryoculture and clonal multiplication of shoots in vitro culture. Elaborated method of propagation gives the opportunity to have a lot of healthy young camellias plants.