

Глава 3.

**БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**

УДК 633.72:631.52

doi:10.31360/2225-3068-2021-76-81-88

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА  
ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*  
МИКРОПОБЕГОВ РАСТЕНИЙ ЧАЯ  
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE)**

**Гвасалия М. В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр  
«Субтропический научный центр Российской академии наук»,  
г. Сочи Россия, e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru*

Для поддержания микропобегов чая в стадии пролиферативной активности была проведена оптимизация ранее использованного протокола микроразмножения. Необходимым условием для роста адвентивных микропобегов чая является наличие в питательной среде МС двух основных регуляторов роста – БАП 3 мг/л + ГК<sub>3</sub> 0,5–1 мг/л, обеспечивающих выход 6,8–7,4 шт. с одного экспланта. Гибберелловая кислота способствует увеличению количества адвентивных микропобегов, их кущению и показала эффективность в повышении морфогенного потенциала. Установлено, что повышение концентрации БАП до 5–7 мг/л приводит к ингибированию роста, вследствие пролиферации каллусной ткани. При этом, наблюдалось удлинение междоузлий, появление дефектных по морфологии листьев, их скручивание. Вместе с тем, по выходу зелёной массы с одного экспланта, самый большой вес – 385 мг был получен на среде МС + 5 мг/л БАП + 1 мг/л ГК<sub>3</sub>. Увеличение концентраций БАП до 7 мг/л и ГК<sub>3</sub> (0,5–1 мг/л) вызывало каллусогенез и снижение веса зелёной массы.

**Ключевые слова:** растение чая, пересадочная культура чая *in vitro*, микропобеги, питательная среда, протокол микроразмножения, регуляторы роста растений.

Отдел биотехнологии ФИЦ СНЦ РАН располагает уникальной коллекцией микропобегов чая сорта ‘Колхида’, местной популяции, а также соматических клонов, полученных из каллусной ткани. Сорт ‘Колхида’ является лучшим и единственным сортом, который возделывается в промышленных масштабах во влажных субтропиках России [7]. В пересадочной культуре *in vitro* он поддерживается в качестве эталона и модельного контрольного сорта для использования в различных

селекционных программах (грантах, тематиках НИР ФИЦ СЦ РАН) [5, 16, 17]. Местная популяция составляет основу всех чайных насаждений нашего региона и по своим генетическим особенностям представляет исключительную ценность. Её геном насыщен наследственным материалом всех известных популяций чая (японской, китайской, китайско-индийской) и является важным источником генов устойчивости к болезням и вредителям, засухе и морозостойкости [1]. Растения-регенеранты, выращенные из местной популяции чая в культуре *in vitro*, могут восстановить в себе весь скрытый генетический полиморфизм, который свойственен всем разновидностям чая. Исходя из этого, в целях создания перспективных форм чая, притока и поиска новых генов, отвечающих за те или иные хозяйственные признаки, местная популяция в наших исследованиях была выбрана в качестве базовой. В частности, именно из каллуса микропобегов местной популяции чая был индуцирован геммогенез и получены соматические клоны, имеющие целый спектр фенотипических различий [4, 8, 11, 15]. Методом проточной цитометрии, а также методом ISSR-маркирования была подтверждена их изменчивость на генетическом уровне [3, 9, 12, 13, 14, 18].

На протяжении 11 лет весь этот богатый растительный материал поддерживается в коллекции *in vitro* [1, 2]. Сохранение его морфогенного потенциала требует проведения ряда обязательных мероприятий [6, 19]. Это регулярное субкультивирование на свежие питательные среды (1 раз в 2–3 месяца), выбраковка дефектных по морфологии и инфицированных грибковой флорой микропобегов, снижение или повышение концентрации фитогормонов, в отдельных случаях их полное исключение. Практически каждые 2–3 года вносятся изменения в протоколы микроразмножения. Так, после угрозы потери всей коллекции в 2019 г., вследствие резкого снижения пролиферативной активности микропобегов чая потребовался дополнительный пересмотр всех ранее использованных протоколов [10]. Поэтому целью данных исследований явилась оптимизация концентраций основных компонентов питательной среды с целью сохранения коллекции микропобегов чая в стадии активного роста.

**Объекты и методы исследований.** Модификация питательной среды была апробирована на коллекции микропобегов чая сорта 'Колхида', местной популяции и соматических клонов. Весь растительный материал культивируется *in vitro* в стеклянных сосудах на протяжении 11 лет, при соблюдении 65–70 % относительной влажности, температуре  $25 \pm 2$  °С, освещении 3 000 люкс люминесцентными лампами

дневного света (OSRAM L 36 W/765), фотопериодом 16/8 час. Базовая питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга (МС), с использованием стандартных солей [19] при рН = 5,8. В 1 серии опытов для размножения использовалась среда МС, с добавлением БАП в концентрации (0 – контроль, 1, 2, 3, 4, 5 мг/л), 4 варианта, 3 повторности, 20 стеклянных сосудов в каждой). Вторая серия опытов состояла из комбинации БАП с ГК<sub>3</sub> (8 вариантов, 2 повторности, 20 стеклянных сосудов в каждой):

- Контроль (БАП – 0 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 0 мг/л);
- Вариант I (БАП – 1 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 0,5 мг/л);
- Вариант II (БАП – 1 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 1 мг/л);
- Вариант III (БАП – 3 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 0,5 мг/л);
- Вариант IV (БАП – 3 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 1 мг/л);
- Вариант V (БАП – 5 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 0,5 мг/л);
- Вариант VI (БАП – 5 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 1 мг/л);
- Вариант VII (БАП – 7 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 0,5 мг/л);
- Вариант VIII (БАП – 7 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 1 мг/л).

Подсчёт среднего количества микропобегов, индуцированных с 1 экспланта проводился через 3–4 недели культивирования. С каждого микропобега собиралась зелёная масса, далее в условиях ламинар-боксов она взвешивалась на электронных весах. Среднее количество микропобегов на эксплант для всех комбинаций БАП и ГК<sub>3</sub> в каждой субкультуре объединялась и использовалась для сравнения среди субкультур, посредством дисперсионного анализа. Результаты обработаны статистическими методами в приложении Microsoft Excel, при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Из цитокининовой группы – БАП является основным регулятором роста, стимулирующим процесс микро-размножения растений чая. Вместе с тем, особое внимание следует уделить правильному выбору его концентрации, так как при высоких дозах БАП в питательной среде активизируется каллусогенез, который всегда сопровождается ингибированием морфогенеза. В этом случае, необходимо срочно провести субкультивирование на обеднённые среды и полностью исключить БАП из состава питательной среды. Проведённый эксперимент показал, что для поддержания пролиферации на высоком уровне наиболее оптимальной является концентрация БАП – 3 мг/л, именно на этой среде было получено максимальное количество – 5,6 микропобегов с одного экспланта (табл. 1).

В варианте с концентрацией БАП – 5 мг/л происходило нарастание каллусной массы и снижение побегообразовательной способности экспланта, и как следствие, получено минимальное количество микропобегов (2,2 шт./эксп.).

**Количество микропобегов чая  
с одного экспланта, полученных при разных концентрациях БАП  
в питательной среде МС, шт.**

Питательная среда МС		Количество микропобегов чая с 1 экспланта, шт.
Контроль	БАП – 0 мг/л	1,1
I	БАП – 1 мг/л	3,1
II	БАП – 2 мг/л	4,2
III	БАП – 3 мг/л	5,6
IV	БАП – 5 мг/л	2,2
НСР <sub>05</sub>		0,7

Для индукции адвентивного побегообразования и увеличения выхода микропобегов с одного экспланта был поставлен эксперимент, где на фоне различных концентраций БАП (1...3...5...7 мг/л) питательная среда дополнительно была обогащена ГК<sub>3</sub> (0,5–1 мг/л). После двух недель культивирования наблюдалась активная пролиферация и умножение микропобегов на всех вариантах, по сравнению с опытом, где присутствовал только один БАП. Следует отметить, что при концентрации БАП – 3 мг/л (без ГК<sub>3</sub>) получено в среднем 5,6 шт./экспл., в сочетании с ГК<sub>3</sub> это количество увеличилось до 6,8–7,4 шт./экспл. (табл. 2).

Таким образом, увеличение побегообразовательной способности растений чая *in vitro* может быть достигнуто при сочетании определённых концентраций БАП (3 мг/л) и ГК<sub>3</sub> (0,5–1 мг/л). На этой среде на четвертой субкультуре был индуцирован рост микропобегов, составивший 6,8–7,4 штук с одного высаженного экспланта. Именно гибберелловая кислота вызвала активную пролиферацию и умножение адвентивных микропобегов, и стимулировала процесс микроразмножения (рис. 1).

Вместе с тем, повышение концентрации БАП до 5–7 мг/л в комбинации с ГК<sub>3</sub> вызвало угнетение морфогенеза и привело к появлению таких нежелательных признаков, как удлинение междоузлий, витрификации и фасциации побегов, изменению морфологии и скручиванию листьев. Кроме этого, активизировались процессы каллусогенеза. Все это негативно может сказаться на культивировании коллекции, её морфогенном потенциале.

Таблица 2

**Влияние различных концентраций  
БАП в сочетании с ГКЗ (мг/л) на количество полученных  
микропобегов с одного экспланта, шт.**

Питательная среда МС		Количество микропобегов чая (шт.) с 1 экспланта
Варианты опыта		
Контроль	БАП – 0 мг/л ГК <sub>3</sub> – 0 мг/л	1,1
I	БАП – 1 мг/л ГК <sub>3</sub> – 0,5 мг/л	5,7
II	БАП – 1 мг/л ГК <sub>3</sub> – 1 мг/л	4,8
III	БАП – 3 мг/л ГК <sub>3</sub> – 0,5 мг/л	6,8
IV	БАП – 3 мг/л ГК <sub>3</sub> – 1 мг/л	7,4
V	БАП – 5 мг/л ГК <sub>3</sub> – 0,5 мг/л	5,9
VI	БАП – 5 мг/л ГК <sub>3</sub> – 1 мг/л	5,2
VII	БАП – 7 мг/л ГК <sub>3</sub> – 0,5 мг/л	3,2
VIII	БАП – 7 мг/л ГК <sub>3</sub> – 1 мг/л	2,3
НСР <sub>05</sub>		0,8



**Рис. 1.** Микроразмножение чая на питательной среде МС  
в комбинации с БАП – 3 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 1 мг/л

В третьей серии опытов были проведены исследования по изучению среднего веса зелёной массы, собранной с одного экспланта. Результаты продемонстрировали большой разброс полученных данных. Увеличение массы микропобегов напрямую было связано с увеличением концентрации БАП (3–5–7 мг/л) и ГК<sub>3</sub> (1 мг/л). Обосновать же увеличение их зелёной массы при БАП (5–7 мг/л) можно только тем, что фиксировалось утолщение побегов и удлинение междоузлий. Больше всего зелёной массы (385,3 мг) было отмечено на среде МС + 5 мг/л БАП + 1 мг/л ГК<sub>3</sub> (в четвёртой субкультуре) (рис. 2).



**Рис. 2.** Средний вес зеленой массы с одного экспланта (мг) на питательной среде МС с различными комбинациями регуляторов роста, НСР<sub>05</sub> – 12,2

**Заклучение.** Для сохранения коллекции микропобегов чая в фазе активного роста рекомендуется в качестве основных регуляторов роста использовать сочетание БАП с ГК<sub>3</sub>, в строго регламентированной концентрации (БАП – 3 мг/л + ГК<sub>3</sub> – 1,0 мг/л). Установлено, что при наличии этих фитогормонов в питательной среде, можно получить максимальное воспроизводство микропобегов чая (до 7,4 шт./эксплант).

*Публикация подготовлена в рамках реализации  
ГЗ ФИЦ СХЦ РАН № 0492-2021-0005  
(Разработка методов биотехнологии для целей  
сохранения генетических ресурсов субтропических,  
плодовых, декоративных культур и видов  
природной флоры как источников ценных признаков  
и селекционных исследований)*

**Библиографический список**

1. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Алтайский ГУ, 2004. – 205 с. – ISBN 5-7904-0389-1.
2. Высоцкий В.А. Биотехнологические приёмы в современном садоводстве // Садоводство и ягодоводство России: сб. науч. раб. – М., ВСТИСП, 2011. – Т. XXVI. – С. 3-10. – ISSN 2073-4948.
3. Гвасалия М.В., Самарина Л.С. Изучение внутригеномной изменчивости соматоклонов чая // Вестник Мичуринского ГАУ. – 2019. – № 3(58). – С. 57-61. – ISSN 1992-2582.
4. Кунах В.А. Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сб. тез. – Казань, Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 2013. – С. 47. – ISBN 978-5-93962-626-2.
5. Малюкова Л.С., Нечаева Т.Л., Зубова М.Ю., Гвасалия М.В., Конинская Н.Г., Загоскина Н.В. Физиолого-биохимические характеристики микропобегов чая (*Camellia sinensis* L.) в условиях *in vitro*: норма, осмотический стресс, влияние кальция // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55. – № 5. – С. 970-980. – doi 10.15389/agrobiology. 2020.5.970rus.
6. Плаксина Т.В., Пищева Г.Н. Биотехнология в селекции, размножении и сохранении растений // Бюл. Бот. Сада-института ДВО РАН. – 2014. – Вып. 12. – С. 22-29. – ISSN 2222-5579. – doi: 10.17581/bbgi.
7. Рынди́н А.В., Туов М.Т. Научное обеспечение чаеводства в России и приоритетные направления исследований для дальнейшего развития отрасли // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2010. – Т. 43. – № 1. – С. 6-10. – ISSN 2225-3068.
8. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н, Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – Киев: Наукова Думка, 2008. – 560 с. – ISBN 978-966-00-0702-4.
9. Якупов Т.Р., Фаизов Т.Х. Молекулярная биотехнология: учебник. – СПб.: Лань, 2019. – 160 с. – ISBN 978-5-8114-3719-1.
10. Agarwal B., Singh U., Banerjee M. In vitro clonal propagation of tea (*Camellia sinensis* L.) K. // Plant Cell Tissue and Organ Cult. – 1992. – № 30. – P. 1-5. – ISSN 0167-6857.
11. Chen L., Apostolides Z., Chen Z.M. Tea breeding and selection techniques // Global Tea Breeding. Achievements, Challenges and Perspectives. – Zhejiang University Press, 2012. – P. 88-95. – ISBN 978-7-308-08274-7.
12. Chen L., Yao M.Z., Zhao L.P., Wang X.C. Recent research progresses on molecular biology of tea plant (*Camellia sinensis*). In: Teixeira do Silva JA (eds.) // Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and topical issues. – London: Global Science Books, 2006. – № 4. – P. 426-437. – ISSN 1749-0294.
13. Chen L., Zhao L.P., Ma C.L., Zhang Y.L., Liu Z, Qiao X.Y., Yao M.Z., Wang X.C. Recent progress in the molecular biology of tea (*Camellia sinensis*) based on the expressed sequence tag strategy // Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2009. – Vol. 84. – № 5. – P. 476-485. – ISSN 1462-0316.
14. Hou Y.J., He Q., Li P.W., Liang G.L., Peng P., Deng M. Genetic diversity of tea camellias germplasm by ISSR molecular marker // Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2007. – Vol. 20. – № 3. – P.462-465. – ISSN 1001-4829.
15. Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M. and Sadh R.K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement // Biotechnology, 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 54. – doi: 10.1007/s13205-016-0389-7.

16. Lidiia Samarina, Maya Gvasaliya, Natalia Koninskaya, Ruslan Rakhmangulov, Aleksander Efremov, Natalia Kiseleyva, Alexey Ryndin, Magda-Viola Hanke. A comparison of genetic stability in tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) plantlets derived callus wits plantlets from longterm *in vitro* propagation // Plant cell, tissue and organ culture. – 2019. – Vol. 138. – № 3. – P. 467-474. – doi: 10.1007/s11240-019-01642-2.
17. Samarina L., Matskiv A., Simonyan T., Koninskaya N., Malyarovskaya V., Gvasaliya M., Malyukova L., Tsaturyan G., Mytdyeva A., Martinez-Montero M.E., Choudhary R., Ryndin A. Biochemical and genetic responces of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) microplants under mannitol-induced osmotic stress *in vitro* // Plants. – 2020. – № 9. – P. 1795. – doi: 103390/plants9121795.
18. Thomas J, Vijayan D., Joshi S.D., Lopez S.J. and Kumar R.R. Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats // Journal of Biotechnology, 2006. – Vol. 123. – № 2. – P. 149-154. – doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.11.005.
19. Zhou J., Cheng H., Wang L.Y. The optimization research on tissue culture and rapid propagation of *Camellia sinensis* // Journal of Tea Science. – 2005. – Vol. 25. – № 3. – P. 172-176. – ISSN 2395-3772.

**MORPHOGENESIS PECULIARITIES  
OF LONG-TERM CULTIVATED IN VITRO TEA MICROSHOOTS  
(CAMELLIA SINENSIS (L.) KUNTZE)**

**Gvasaliya M. V.**

*Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre  
of the Russian Academy of Sciences,  
Sochi, Russia, e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru*

In order to maintain tea microshoots in the stage of proliferative activity, the previously used micropropagation protocol was optimized. A necessary condition for the growth of adventive tea microshoots is the presence in the MS nutrient medium of 2 main growth regulators – BAP 3 mg/l + GA<sub>3</sub> 0,5–1 mg/l, providing 7–7,4 pcs. from one explant. Gibberellic acid promotes not only an increase in the number of adventive microshoots and their tillering, but also works to increase morphogenic potential. It was found out that an increase of BAP to 5–7 mg/l led to growth inhibition due to the proliferation of callus tissue. In addition, elongation of internodes, appearance of leaves with defects in morphology and their rolling were observed. At the same time, according to the yield of green mass from one explant, the largest weight – 385 mg was obtained on MS medium + 5 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub>. An increase of BAP to 7 mg/L + GA<sub>3</sub> (0,5–1 mg/L) caused callusogenesis and a decrease of green mass.

**Key words:** tea plant, *in vitro* tea transplant, microshoots, nutrient medium, micropropagation protocol, plant growth regulators.