

Раздел 2

**СЕЛЕКЦИЯ, СЕМЕНОВОДСТВО,  
И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

УДК 633.72.58.085

doi: 10.31360/2225-3068-2023-85-118-131

**ОСМОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС,  
ВЫЗВАННЫЙ МАННИТОМ И ЕГО ВЛИЯНИЕ  
НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ  
ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОПОБЕГОВ ЧАЯ  
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) *IN VITRO***

**Гвасалия М.В.**

Федеральный исследовательский центр  
«Субтропический научный центр Российской академии наук»,  
г. Сочи, Россия, e-mail: [m.v.gvasaliya@mail.ru](mailto:m.v.gvasaliya@mail.ru)

Гвасалия М.В. [orcid.org/0000-0001-7394-4377](https://orcid.org/0000-0001-7394-4377)

Осмотический стресс, вызываемый засухой, является основным лимитирующим фактором при возделывании культуры чая. При дефиците влаги наблюдается рост непродуктивных побегов, с остановившейся в росте апикальной меристемой. Растение чая переходит в стадию покоя, при которой наблюдается массовое образование генеративных органов, что приводит к снижению урожайности и качества сырья. Этот период длится от 20, в отдельных случаях до 30 дней. Перед селекционерами стоит задача – всесторонне изучить механизмы реагирования растений чая на дефицит влаги и выявить надёжные маркеры для оценки толерантных к засухе генотипов. В этой связи, целенаправленная индукция осмотического стресса *in vitro* является эффективным инструментом для изучения этих процессов и поможет выявить физиологические и биохимические реакции растительных тканей на стрессовый фактор. В наших исследованиях растительным материалом служили микропобеги чая лучшего районированного сорта ‘Колхида’, которые в течение 2-х лет вегетативно размножались в культуре *in vitro*. Для изучения изменений, вызванных стрессом на биохимическом и физиологическом уровнях, применялась селективная среда, где в качестве осмотического агента был выбран маннит в концентрации 200–300 ммоль. В результате исследований было выявлено, что содержание в питательной среде 200 ммоль маннита способствовало накоплению в листовом аппарате микропобегов чая пролина, треонина, эпигаллокатехина и эпигаллокатехин галлата. В тоже время указанная концентрация маннита приводила к дефициту содержания влаги в листьях и значительному изменению проницаемости клеточных мембран, а также вызывала повышение

относительной электропроводности тканей. В образцах листьев чая наблюдалось снижение кофеина, хлорофиллов и альфа-аланина. Установлено, что при индуцировании стресса, вызванного маннитом, происходит накопление в листьях чая пролина, треонина, эпигаллокатехина и эпигаллокатехин галлата, что может служить маркерами для выделения засухоустойчивых генотипов чая.

**Ключевые слова:** *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, микропобеги чая *in vitro*, осмотический стресс, маннит, пролин, селективные среды, физиологические и биохимические показатели.

**Введение.** Повышенные температуры и дефицит влаги являются основными негативными факторами, снижающими урожайность чайных плантаций во влажных субтропиках Черноморского побережья Кавказа [1, 3]. Их воздействие приводит к снижению водного потенциала растительных тканей и вызывает осмотический стресс, который сопровождается окислительным повреждением мембран и образованием активных форм кислорода (АФК). Растения выработали механизмы, позволяющие уменьшить окислительное повреждение тканей за счёт активации антиоксидантных ферментов и накопления осмолитов, которые эффективно поглощают АФК [29]. Осмотический стресс вызывает изменения, которые происходят на морфологическом, физиологическом, биохимическом, молекулярном уровнях и приводит к ингибированию роста и развития растений. Многочисленные гены вовлечены в ответную реакцию растений на осмотический стресс, которая начинается с восприятия сигналов, их передачи и экспрессии определённых генов. Все эти действия приводят к метаболическим изменениям и устойчивости к стрессу [26].

Смоделировать и изучить осмотический стресс в полевых условиях, применительно для многолетних древесных культур довольно сложно [7, 9, 26]. Поэтому искусственное вызывание осмотического стресса *in vitro* является альтернативным инструментом для изучения этих процессов и поможет выявить физиологические и биохимические реакции растительных тканей на стрессовый фактор. Индуцирование осмостресса в культуре *in vitro* достигается путём добавления в питательную среду различных химических низкомолекулярных органических соединений, называемых осмолитами [26]. Самыми известными из них и широко применяемыми являются полиэтиленгликоль (ПЭГ), маннит, сорбит и хлорид натрия [9, 15, 19, 25, 27]. Маннит, сорбит и хлорид натрия способны проникать в ткани листьев и побегов, тогда как ПЭГ не способен проходить через апопластический барьер клеток и осмотический стресс

в его присутствии менее выражен [9]. Содержание маннита в концентрации 50–200 ммоль в питательной среде, приводит к дефициту воды, затрудняет её поступление в ткани растений и вызывает осмотический стресс [11]. Вместе с тем наблюдается снижение морфогенного потенциала растений, замедление их роста и развития, что может служить положительным фактором для увеличения субкультивационного периода в культуре *in vitro* [7, 21].

Следует отметить, что достаточно много исследований по использованию маннита в целях индукции осмотического стресса *in vitro* проводится на травянистых видах растений [16]. В то же время информации относительно древесных культур, включая растения чая, совершенно недостаточно. В связи с тем, что чайные плантации нашего региона особенно чувствительны к дефициту влаги, необходимо выработать стратегию по выведению сортов нового поколения, отличающихся не только урожайностью, но и устойчивостью к абиотическим факторам среды. Всё это станет возможным только благодаря более глубокому пониманию ключевых процессов, происходящих в растениях при стрессовых условиях [28].

В настоящее время выявлено множество биохимических, физиологических и генетических маркеров ответа растений чая на осмотический стресс. Среди них различные сахара, пролин и другие осмолиты, которые увеличивают вязкость цитоплазмы и предотвращают повреждение мембран, вызванное АФК. Проведённые в последнее время транскриптомные исследования помогли выявить экспрессируемые гены и возможные маркеры стрессоустойчивости у чайных растений [12]. Многие гены метаболизма сахара также были индуцированы в ответ на осмотический стресс у растений чая [30]. Использование методов культивирования тканей *in vitro* могут стать инструментом для подтверждения выявленных генетических маркеров у чайных растений.

**Цель исследований** – изучить влияние осмотического стресса, вызванного разными концентрациями маннита, на физиологические и биохимические параметры микропобегов чая в культуре *in vitro*.

**Объекты и методы исследований.** Использовался растительный материал – сорт чая ‘Колхида’, находящийся в коллекции отдела биотехнологии ФИЦ СНЦ РАН. Эксплантами служили микропобеги высотой 2,0–3,0 см, с 3–5-тью развитыми листьями. Микропобеги выращивали на питательной среде MS [23] с добавлением: бензиламинопурина (БАП – 3 мг/л), нафтилуксусной кислоты (НУК – 1 мг/л), гибберелловой кислоты (ГК<sub>3</sub> 1 мг/л), сахарозы (30 г/л), агары (8 г/л). Кислотность питательной среды pH 5,7.

Экспериментальная среда была такой же, но с добавлением 200–300 ммоль маннита. Микропобеги культивировали в течение 2 месяцев перед отбором проб в стеклянных сосудах по 3 в каждом, объёмом 150 мл, 20 мл питательной среды. Выращивание проводилось в фитостатной комнате при температуре 22–25 °С (режим освещения: 16 час – свет и 8 час – темнота). Экспериментальная обработка данных проводилась в течение 2 лет. Для физиологических и биохимических исследований использовались листья, собранные с микропобегов чая.

Лабораторные анализы выполнены на базе ФГБУН НИИ сельского хозяйства Крыма (г. Симферополь) Относительную электропроводность (REC) измеряли с помощью портативного прибора ST300C (Ohaus) для оценки утечки электролита, указывающей на повреждение тканей листьев. Образцы листьев общей массой 300 мг погружали в 150 мл деионизированной воды при температуре 20–22 °С. Измерение электропроводности проводилось сразу после погружения листьев (L1) и через два часа (L2). Относительная электропроводность была рассчитана по формуле:

$$\text{REC в \%} = \frac{L1}{L2} \times 100 \quad [5].$$

Содержание влаги в листьях оценивали по уменьшению содержания воды в тканях листьев под действием маннита: взвешивали 1 г смешанной пробы свежих листьев, высушивали при 105 °С в течение пяти часов и снова взвешивали. Содержание влаги в листьях рассчитывали по формуле в %:

$$\frac{FW - DW}{FW} \times 100,$$

где: FW – масса свежих листьев,

DW – сухая масса.

Для определения содержания хлорофилла и каротиноидов (мг/г массы свежих листьев) применяли метод спектрофотометрии. Для этого 170 мг листьев гомогенизировали, помещали в коническую колбу и экстрагировали в 25 мл этанола (95 %), использовали магнитную мешалку, при 700 об./мин. в течение 15 мин. при температуре (20 ± 2 °С). Надосадочную жидкость отделяли путём декантации, объединяли и фильтровали через фильтровальную бумагу. Определение хлорофилла *a* (Chl-*a*), хлорофилла *b* (Chl-*b*) и общего количества каротиноидов (Ca) проводили с использованием спектрофотометра РА-5400vi (Россия) при различных длинах волн (665, 649 и 440,5 нм для Chl-*a*, Chl-*b* и Ca соответственно). Все определения были выполнены в пяти биологических и трёх технических повторностях (n = 60). Концентрации хлорофилла (*a-b*) и общего количества каротиноидов (мг/мл) были рассчитаны по формуле Смита и Бенитеза [4].

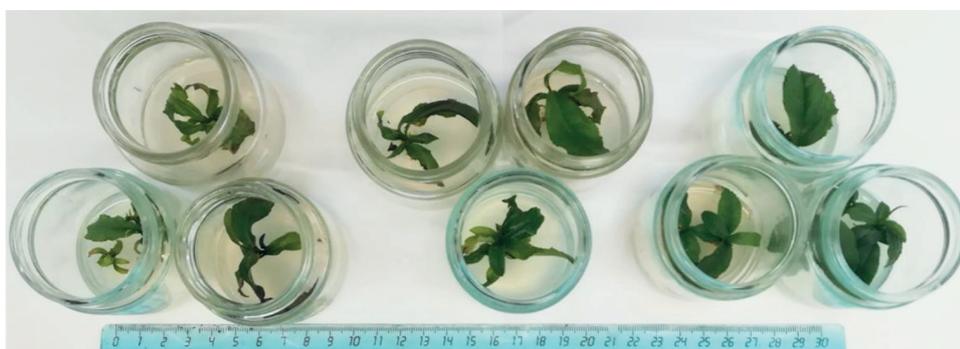
Содержание аминокислот (треонина, пролина, альфа-аланина) (мг/г массы свежих листьев) оценивали спектрофотометрическим методом с помощью прибора Капель-105М (Россия). Свежие чайные листья (300 мг) измельчали и экстрагировали с помощью 10 мл 75%-ного этанола – 10 мин., смесь центрифугировали при 12 000 об./мин и 4 °С – 15 мин. Надосадочную жидкость собирали для проведения дериватизации: экстракт чая (180 мкл) смешивали: 100 мкл раствора динитрофторбензола (10 мг/мл –1, вес/объём), 100 мкл  $\text{NaHCO}_3$  pH = 9,0 и 20 мкл  $\text{H}_2\text{O}$  в пробирке, ёмкостью 1,5 мл. Смесь помещали на водяную баню при температуре 60 °С на 60 мин в условия темноты. При комнатной температуре в пробирку добавляли 400 мкл  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , взбалтывали и выдерживали в темноте в течение 15 мин. Смеси фильтровали через фильтр Millipak, толщиной 0,22 мкм перед анализом методом капиллярного электрофореза [2]. Анализ проведён в 3-х биологических и 3-х технических повторностях (n = 60).

Содержание кофеина и катехина (мг/г массы свежих листьев) оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием протокола экстракции этанолом: 300 мг свежих листьев измельчали в 10 мл 80%-ного этанола и инкубировали на водяной бане в течение 15 мин при 60 °С, обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин и охлаждали. Остаток экстрагировали дважды и фильтровали через нейлоновый фильтр с миллипорами 0,45 мкм. ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Milichrom (EcoNova, Новосибирск, Россия). Градиентная система состояла из смеси ацетонитрила и 20 ммоль  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Скорость потока составляла 1 мл/мин. В колонку вводили экстракт чая (10 мкл). Исходный состав подвижной фазы, состоящий из 7%-ного растворителя А (100%-ный ацетонитрил) и 93%-ного растворителя В (20 мкл  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), выдерживали в течение 7 мин. Затем растворитель А линейно увеличивали до 10 % через 20 мин, 15 % – через 25 мин, 20 % – через 30 мин и 25 % – через 45–70 мин. Затем программирование продолжалось в изократическом режиме: 40%-ный А – при 70,1–75,0 мин и 7%-ный А – при 75,1–90,1 мин. Этот анализ проведён в трёх биологических и трёх технических повторностях (n = 90).

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения XLSTAT (Addinsoft, Нью-Йорк, США). Для оценки данных и подтверждения достоверных различий (на уровне  $p < 0,05$ ) использован метод Фишера и t-критерий Стьюдента. Анализы были повторены дважды с тремя-пятью биологическими и тремя техническими повторностями.

**Результаты и их обсуждение.** Для противостояния дефициту влаги растения выработали множество адаптивных механизмов, включая её эффективное использование, осморегуляцию и защиту клеточного аппарата. Для индукции среднего и сильного осмотического стресса в культуре *in vitro* и изучения реакции на него растений чая, была выбрана питательная среда с добавлением маннита в концентрации 200 и 300 ммоль.

Добавление 200 ммоль маннита в питательную среду не привело к некрозу тканей и изменениям в росте и развитии микропобегов чая. При увеличении концентрации до 300 ммоль маннита, произошло частичное высыхание листьев и ингибирование их роста (рис. 1).



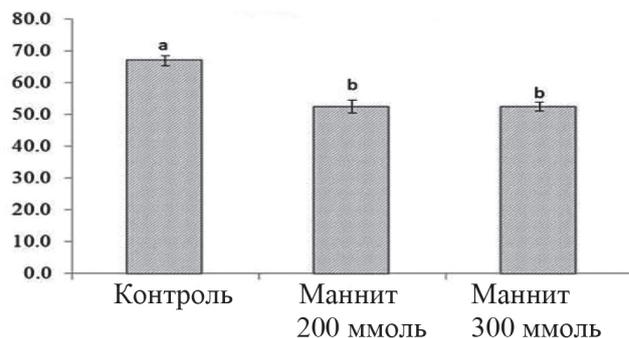
**Рис. 1.** Микропобеги чая в питательной среде с содержанием маннита в концентрации 200–300 ммоль  
**Fig. 1.** Micro-shoots of tea in a nutrient medium with a mannitol content in a concentration of 200–300 mmol

Под действием маннита в листьях чая наблюдалось значительное снижение влажности листьев – с 66,9 % на контрольном варианте до 52,4 % – на опытных вариантах. Указанные концентрации маннита (200 и 300 ммоль) показали практически сходное снижение влажности листьев (рис. 2).

Содержание маннита в питательной среде также вызвало значительное повышение относительной электропроводности листьев чая. При концентрации 300 ммоль маннита электропроводность достигла 34,3 %, в то время как на контроле этот показатель составил 10,1 % (рис. 3).

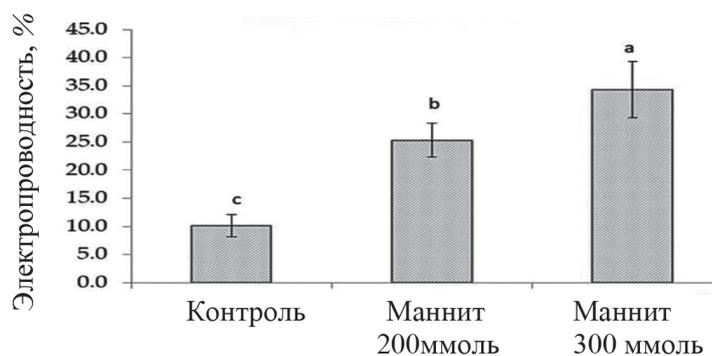
Известно, что снижение содержания хлорофилла и каротиноидов является важным показателем действия осмотического стресса [9] и может быть надёжным маркером толерантности различных генотипов чая в условиях дефицита воды.

При применении 200 ммоль маннита наблюдалось значительное снижение содержания в листьях хлорофилла *a* и *b* (рис. 4).

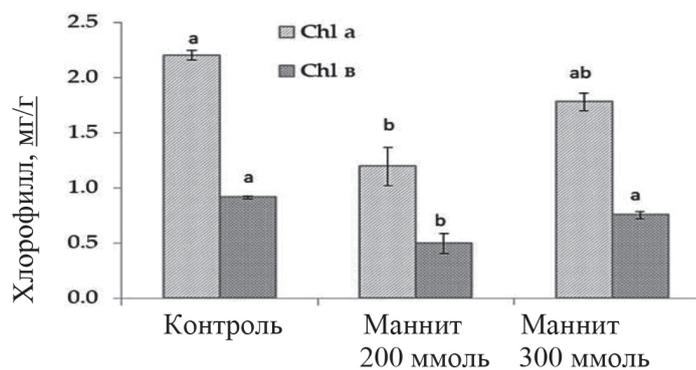


**Рис. 2.** Содержание влаги в листьях чая, %  
**Fig. 2.** Moisture content in tea leaves, %

*Примечание:* \* – здесь и далее – столбики представляют собой стандартные отклонения, малыми буквами (a, b, c) указана степень различия между средними значениями при  $p < 0,05$  ( $n = 60-90$ )



**Рис. 3.** Относительная электропроводность тканей листа, %  
**Fig. 3.** Relative electrical conductivity of leaf tissues, %



**Рис. 4.** Содержание хлорофиллов а и b (мг/г массы свежих листьев)  
**Fig. 4.** The content of chlorophylls a and b (mg/g weight of fresh leaves)

Содержание хлорофилла-*a* было снижено в 1,8 раза при обработке маннитом 200 ммоль. Аналогичная тенденция к его снижению наблюдалась и для хлорофилла-*b*. Однако изменения по содержанию хлорофилла-*a* были на грани статистической достоверности. При добавлении маннита 300 ммоль, существенной разницы с контролем в уровне хлорофилла-*b* обнаружено не было. Маннит также не оказал существенного влияния на содержание в листьях каротиноидов (рис. 5).

Наши результаты согласуются с некоторыми другими результатами, полученными в условиях осмостресса на других растениях. Вместе с тем, в большинстве опубликованных исследований показано снижение содержания пигментов под действием осмотического стресса [9]. Есть мнение, что при оценке содержания хлорофилла имелись свои недостатки. В частности, наличие большого количества растительной биомассы, различий в количестве воды в тканях (эффекте растворения водой), разбавления определённых метаболитов и других питательных веществ. Особенно это касается сравнения полностью увлажнённых и частично высушенных тканей листа, как в нашем случае.

Из литературных источников известно, что свободные аминокислоты способны накапливаться в условиях засухи и в основном служат механизмом для регулирования осмотического давления в тканях растений [14]. Поэтому в наших исследованиях мы проследили реакцию на стресс у таких метаболитов как пролин, треонин,  $\alpha$ -аланин, кофеин, катехиновой группы, включая эпигаллокатехин и эпигаллокатехин галлат.

Пролин является незаменимым соединением в исследованиях, связанных с осмотическим стрессом, и мы наблюдали его накопление в листьях чая, что согласуется с другими аналогичными исследованиями [8]. В частности, при добавлении маннита содержание пролина увеличилось в 1,7 раза по сравнению с контролем. Разница между двумя вариантами маннита была незначительной (рис. 6).

Наряду с другими свободными аминокислотами, важную роль в устойчивости растений к абиотическому стрессу играет треонин [24]. В нашем опыте содержание треонина значительно увеличилось в 3–4 раза, при добавлении маннита 200 ммоль и маннита 300 ммоль, соответственно, по сравнению с контролем (рис. 7).

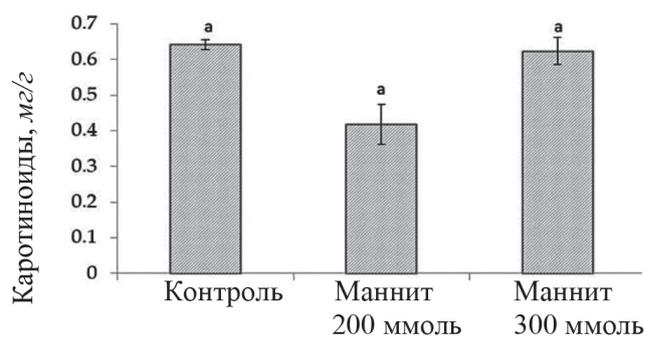


Рис. 5. Содержание каротиноидов (мг/г массы свежих листьев)  
Fig. 5. Carotenoid content (mg/g of fresh leaf mass)

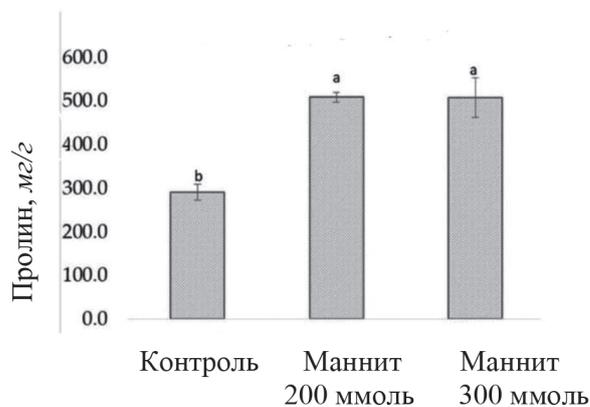


Рис. 6. Содержание пролина (мг/г массы свежих листьев)  
Fig. 6. Proline content (mg/g of fresh leaf mass)

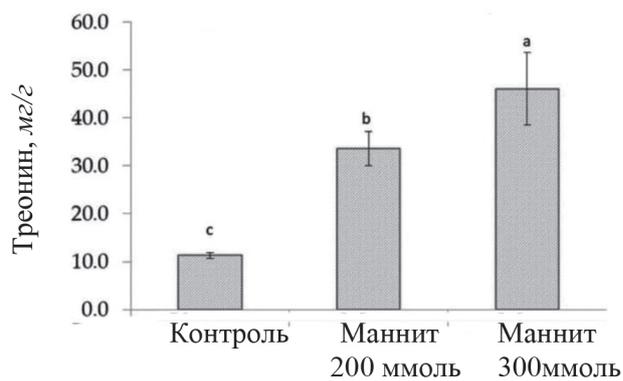


Рис. 7. Содержание треонина (мг/г массы свежих листьев)  
Fig. 7. Threonine content (mg/g mass of fresh leaves)

Наши результаты согласуются с другими исследованиями, где показано накопление треонина в ответ на осмотический стресс у таких растений, как рис [18], пшеница [22] и арабидопсис. Например, только у исключительно толерантных к засухе генотипов кунжута наблюдалось накопление треонина. В связи с этим треонин можно использовать в качестве одного из маркеров засухоустойчивости [14].

В опыте по определению содержания  $\alpha$ -аланина под действием маннита наблюдалось его снижение в листьях чая по сравнению с контролем (рис. 8).

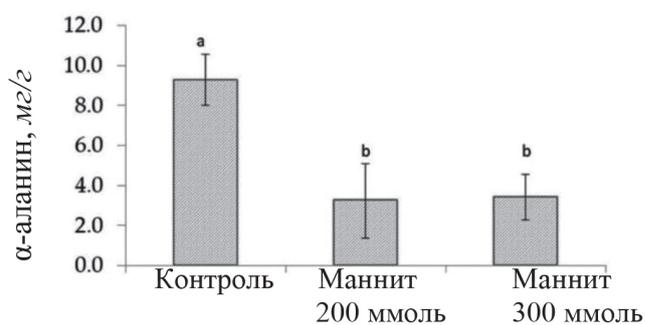
Снижение содержания  $\alpha$ -аланина объясняется тем, что его синтез тканеспецифичен, например, у арабидопсиса уровень  $\alpha$ -аланина при стрессе от засухи повышался исключительно в цветках, а не в листьях [18]. В отличие от некоторых метаболитов (пролина, бетаина), известных своей природной сигнальной или защитной ролью при абиотических стрессах,  $\alpha$ -аланин может не играть протекторной роли, как другие осмолиты. Вместе с тем, при некоторых абиотических стрессах  $\alpha$ -аланин способен выполнять функции хранилища углерода [10].

Другой блок исследований был отведён анализу биохимических показателей качества листьев. Наличие маннита – 300 ммоль в питательной среде приводило к снижению содержания кофеина (рис. 9).

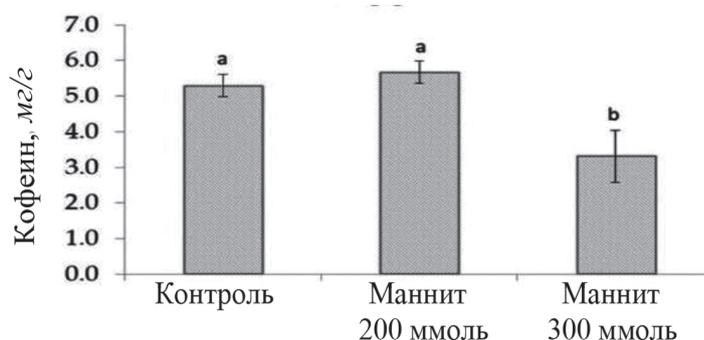
В то же время под действием маннита наблюдалось значительное повышение уровня катехинов – эпигаллокатехина и эпигаллокатехин галлата (рис. 10).

Присутствие маннита – 200 ммоль и маннита – 300 ммоль вызывало повышение содержания эпигаллокатехина в листьях в 3,3 и 2,1 раза, соответственно по сравнению с контролем. Больше всего эпигаллокатехин галлата наблюдалось при концентрации маннита – 200 ммоль, что больше в 1,5 раза по сравнению с контролем. Содержание других катехинов существенно не отличалось от контроля. Таким образом надо отметить, что максимальное накопление эпигаллокатехина и эпигаллокатехин галлата в листьях чая фиксировалось при добавлении в питательную среду 200 ммоль маннита.

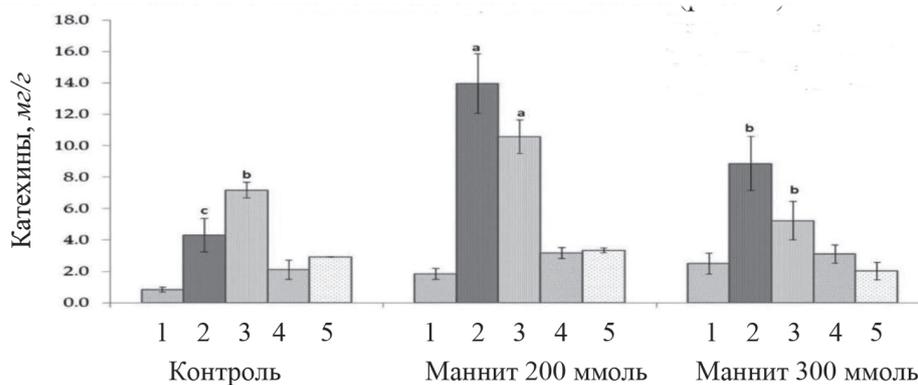
Проведённые нами исследования подтверждаются данными других учёных (Hernández et al. 2004), которые показали, что концентрации эпигаллокатехин галлата и эпикатехин галлата увеличивались во время засухи у растения ладанника (*Cistus clusii*), достигая пиковых значений после 30-дневного стресса [13]. Аналогично проводимые работы по чаю показали, что содержание эпигаллокатехин галлата и эпикатехин галлата в листьях чая имело тенденцию к снижению в первые 2 дня засухи, и увеличению к 5 дню [6]. Многие учёные, работающие в этом направлении сообщают, что в условиях осмотического стресса в листьях чая происходит активный биосинтез фенольных соединений. Данные, полученные на других растениях, подтверждают факт накопления некоторых полифенольных соединений при дефиците воды и их защитной роли от осмотического стресса [20].



**Рис. 8.** Содержание  $\alpha$ -аланина (мг/г массы свежих листьев)  
**Fig. 8.**  $\alpha$ -alanine content (mg/g of fresh leaf mass)



**Рис. 9.** Содержание кофеина (мг/г массы свежих листьев)  
**Fig. 9.** Caffeine content (mg/g of fresh leaf weight)



**Рис. 10.** Содержание катехинов (мг/г массы свежих листьев):  
 1. Галлокатехин; 2. Эпигаллокатехин; 3. Эпигаллокатехин галлат;  
 4. Эпикатехин; 5. Эпикатехин галлат

**Fig. 10.** Catechin content (mg/g of fresh leaf mass):  
 1. Gallocatechin; 2. Epigallocatechin; 3. Epigallocatechin gallate;  
 4. Epicatechin; 5. Epicatechin gallate

**Выводы.** Подводя итоги можно заключить, что выбранные концентрации маннита (200–300 ммоль) в питательных средах способствуют снижению влажности листьев и повышению электропроводности. В ответ на присутствие маннита в питательной среде происходило накопление осмолитов – пролина, треонина, эпигаллокатехина и эпигаллокатехин галлата, которые могут быть использованы в качестве маркеров при отборе засухоустойчивых генотипов чая.

Публикация подготовлена в рамках реализации  
ГЗ ФИЦ СЦ РАН № FGWR-2021-0008

#### Список литературы/References

1. Белоус О.Г. Биологические особенности культуры чая в условиях влажных субтропиков России: дис...докт. биол. наук. Краснодар: КУБ ГАУ. 2009, 261. [Belous O.G. Biological features of tea culture in the conditions of the humid subtropics of Russia: dis... doct. biol. Sciences. Krasnodar: KUB GAU. 2009, 261. (In Rus)].
2. Брыкалов А.В., Якуб Ю.Ф., Шанаева Е.А., Белик Э.В., Грядских Д.А. Применение капиллярного электрофореза и газовой хроматографии для исследования биологически активных соединений: монография. Краснодар. 2019, 120. [Brykalov A.V., Yakub Yu.F., Shanaeva E.A., Belik E.V., Gryadskikh D.A. Application of capillary electrophoresis and gas chromatography for the study of biologically active compounds: monograph. Krasnodar. 2019, 120. (In Rus)]. ISBN: 5-94343-048-2.
3. Гвасалия М.В. Спонтанные и индуцированные сорта и формы чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) во влажных субтропиках России и Абхазии, перспективы их размножения и сохранения в культуре *in vitro*: дис. канд. биол. наук. Краснодар: КУБ ГАУ. 2015, 159. [Gvasalia M.V. Spontaneous and induced varieties and forms of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) in the humid subtropics of Russia and Abkhazia, prospects for their reproduction and preservation in culture *in vitro*: dis. cand. biol. Sciences. Krasnodar: KUB GAU. 2015, 159. (In Rus)].
4. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зелёных листьев. Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука. 1971; 154-170. [Shlyk A.A. Determination of chlorophylls and carotenoids in green leaf extracts. Biochemical methods in plant physiology. M.: Science. 1971; 154-170. (In Rus)].
5. Bajji M., Kinet J.-M., Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.* 2002; 36 : 61-70. DOI: 10.1023/A:1014732714549.
6. Balan B., Tkalec M., Rogic T., Šimac M., Štefanić P.P., Rončević S., Svedružić L.P., Krsnik-Rasol M. Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro* grown cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2013; 49 : 421-432. DOI: 10.1007/s11627-013-9523-y.
7. Claeys H., Landeghem S.V., Dubois M., Maleux K., Inzé D. What is stress? Dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. *Plant Physiol.* 2014; 165 : 519-527. DOI: 10.1104/pp.113.234641.
8. Dar M.I., Naikoo M.I., Rehman F., Naushin F., Khan F.A. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In *osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies*. New Delhi, India. Springer. 2016; 155-166. DOI: 10.1007/978-81-322-2616-1\_9.
9. Darko E., Végh B., Khalil R., Marček T., Szalai G., Pál M., Janda T. Metabolic responses of wheat seedlings to osmotic stress induced by various osmolytes under iso-osmotic condi-

- tions. PLoS ONE. 2019; 14 : 151-226. DOI: 10.1371/journal.pone.0226151.
10. Diab H., Limami A.M. Reconfiguration of N metabolism upon hypoxia stress and recovery: roles of alanine aminotransferase (AlaAT) and glutamate dehydrogenase (GDH). Plants. 2016; 5 : 25 p. DOI: 10.3390/plants5020025.
11. El-Bahr M.K., Abd EL-Hamid A., Matter M.A., Shaltout A., Bekheet S.A., El-Ashry A.A. In vitro conservation of embryogenic cultures of date palm using osmotic mediated growth agents. J. Genet. Eng. Biotechnol. 2016; 14 : 363-370. DOI: 10.1016/j.jgeb.2016.08.004.
12. Fleta-Soriano E., Munné-Bosch S. Stress memory and the inevitable effects of drought: A physiological perspective. Front. Plant Science. 2016; 7 : 143. DOI: 10.3389/fpls.2016.00143.
13. Hernández I., Alegre L., Munné-Bosch S. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. Tree Physiol. 2004; 24 : 1303-1311.
14. Hildebrandt T.M. Synthesis versus degradation: Directions of amino acid metabolism during Arabidopsis abiotic stress response. Plant Mol. Biol. 2018; 98 : 121-135. DOI: 10.1007/s11103-018-0767-0.
15. Huang G.T., Ma S.L., Bai L.P., Zhang, L., Ma H., Jia P., Liu J., Zhong M., Guo Z.-F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Mol. Biol. Rep. 2011; 2 : 969-987. DOI: 10.1007/s11033-011-0823-1.
16. Ikeda T., Fujime Y., Terabayashi S., Date S. Water status of garlic callus under various salt and osmotic stress conditions. Hort Science. 2014; 37 : 404-405. DOI: 10.21273/HORTSCI.37.2.404.
17. Jewell M.C., Campbell B.C., Godwin I.D. Transgenic plants for abiotic stress resistance. In Transgenic Crop Plants. Kole C., Michler C.H., Abbott A.G., Hall T.C. Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, Germany. 2010; 2 : 67-132. DOI: 10.1007/978-3-642-04812-8\_2.
18. Joshi V., Joung J.G., Fei Z., Jander G. Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: Accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. Amino Acids. 2010; 39 : 933-947. DOI: 10.1007/s00726-010-0505-7.
19. Kulpa D., Gawlik A., Matuszak-Slamani R., Włodarczyk M., Bejger R., Sienkiewicz M., Gołe biowska D., Semeniuk A. The effect of mannitol and sorbitol on soybean *in vitro* development. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin. Agric. Aliment. Pisc. Zootech. 2018; 341 : 41-48.
20. Langat C., Gathaara M.H., Cheruiyot R. Comparative response of catechin levels in drought tolerant and drought susceptible tea clones (*Camellia sinensis*) (L) O. Kuntze) under different moisture regimes. Afr. J. Plant Sci. 2015; 9 : 334-338. DOI: 10.5897/AJPS2015.1282.
21. Lopez-Puc G. An effective in vitro slow growth protocol for conservation of the orchid *Epidendrum chlorocorymbos* Schltr. Trop. Subtrop. Agroecosyst. 2013; 16 : 61-68.
22. Michaletti A., Naghavi M.R., Toorchi M., Zolla L., Rinalducci S. Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. Sci. Rep. 2018; 8(1) : 5710. DOI: 10.1038/s41598-018-24012-y.
23. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962; 15 : 473-497.
24. Muthuramalingam P., Krishnan S.R., Pandian S., Mareeswaran N., Aruni W., Pandian S.K., Ramesh M. Global analysis of threonine metabolism genes unravel key players in rice to improve the abiotic stress tolerance. Sci. Rep. 2018; 8 : 9270. DOI: 10.1038/s41598-018-27703-8.
25. Nikonorova N., Van den Broeck L., Zhu S., Van de Cotte B., Dubois M., Gevaert K., Inzé D., De Smet I. Early mannitol-triggered changes in the Arabidopsis leaf (phospho) proteome reveal growth regulators. Exp. Bot. 2018; 69 : 4591-4607. DOI: 10.1101/264259.
26. Pérez-Clemente R.M., Gómez-Cadenas A. *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. In Recent Advances in Plant In Vitro Culture. Leva A., Rinaldi L., Eds. Rijeka, Croatia. IntechOpen. 2012; 91-108. DOI: 10.5772/50671.
27. Roy R., Agrawal V., Gupta S.C. Mannitol, polyethylene glycol and NaCl induced polypeptide changes during *in vitro* culture of three tomato cultivars. Biol. Plant. 2011; 55 : 591-595. DOI: 10.1007/s10535-011-0132-5.

28. Turkozu D., Sanlier N. L-theanine, unique amino acid of tea, and its metabolism, health effects, and safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015; 57(8) : 1681-1687.
29. Upadhyaya H., Sahoo L., Panda S.K. Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants. In *Molecular Stress Physiology of Plants*. Rout G., Das A., Eds. New Delhi, India. Springer. 2013. DOI: 10.1007/978-81-322-0807-5\_7.
30. Yue C., Cao H.L., Wang L., Zhou Y.H.; Huang Y. Effects of CA on sugar metabolism and sugar-related gene expression in tea plant during the winter season. *Plant Mol. Biol.* 2015; 88 : 591-608. DOI: 10.1007/s11103-015-0345-7.

**OSMOTIC STRESS CAUSED BY MANNITOL AND ITS EFFECT  
ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS  
OF TEA (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE)  
MICRO-SHOOTS *IN VITRO***

**Gvasaliya M.V.**

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

Drought-induced osmotic stress is a major limiting factor in tea cultivation. With a moisture deficit, the growth of unproductive shoots is observing, with the apical meristem stopped in growth. The tea plant enters the dormant stage, during which mass formation of generative organs is observing, which leads to a decrease in yield and quality of raw materials. This period lasts from 20, in some cases up to 30 days. Breeders are facing with the task of comprehensively studying the mechanisms of response of tea plants to moisture deficiency and identifying reliable markers for assessing drought-tolerant genotypes. In this regard, targeted induction of osmotic stress *in vitro* is an effective tool for studying these processes and will help to reveal the physiological and biochemical reactions of plant tissues to a stress factor. In our studies, microshoots of tea of the best-zoned variety 'Kolhida' served as plant material, which vegetatively propagated in culture *in vitro* for 2 years. To study the changes caused in them by stress at the biochemical and physiological levels, a selective medium was used, where mannitol was used as an osmotic agent at a concentration of 200–300 mM. It was found that the content of 200 mM mannitol in the nutrient medium contributed to the accumulation of proline, threonine, epigallocatechin and epigallocatechin gallate in the leaf apparatus of tea microshoots. At the same time, the indicated concentration of mannitol led to a deficiency in the moisture content in the leaves and a significant change in the permeability of cell membranes, and also caused an increase in the relative electrical conductivity of tissues. Decreases in caffeine, chlorophylls, and alpha-alanine were observed in the leaves. It has been established that the increased content of threonine, proline, epigallocatechin and epigallocatechin gallate in tea leaves in response to the presence of mannitol in the nutrient medium can serve as markers for the isolation of drought-resistant tea genotypes.

**Key words:** *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, tea microshoots *in vitro*, osmotic stress, mannitol, proline, selective media, physiological and biochemical parameters.