

Раздел 4.

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 633.72:631.52

doi:10.31360/2225-3068-2022-81-92-98

**КАЛЛУСНАЯ ТКАНЬ,
КАК ИСТОЧНИК ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
РАСТЕНИЙ ЧАЯ (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE)
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Гвасалия М.В.

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

Для изучения генетического разнообразия соматклонов чая, индуцированных из каллусной ткани, а также длительно культивируемых *in vitro*, были использованы 11 SSR- и 4 ISSR-праймеры. Ранее они были опробированы при генотипировании природных популяций чая *in vivo* и подтвердили свою эффективность. Амплификацию фрагментов полногеномной ДНК проводили методом ПЦР. Все SSR-праймеры показали отсутствие рецессивных аллелей – низкий уровень гетерозиготности у всех образцов и, как следствие, невысокий уровень полиморфизма праймеров, находящийся в пределах от 0 до 54 %. Наибольший полиморфизм отмечен у праймеров L_{40} , L_{57} , L_{07} и L_{20} и составил 54, 36, 36 и 34 %, соответственно. Амплифицированные SSR-фрагменты отличались размером в пределах 10 пар нуклеотидов, гетерозигот в популяции детектировано не было. Мультилокусные ISSR-праймеры показали более высокий уровень полиморфизма, который составил 40–52 %. Все соматклоны, включённые в эксперимент, разделились на три кластера, было выявлено наличие генетических различий с коэффициентом отличий 0,05–0,1. Установлено, что в индуцированных из каллусной ткани растениях чая генетическая изменчивость, предположительно, носит точковый характер. Наибольшая изменчивость из всей группы обнаружена у образца № 16. Коллекция растений чая *in vitro* регулярно пополняется новыми соматическими клонами, которые индуцируются из каллусной ткани. На первом этапе они отбираются по фенотипическим признакам, в частности, по морфометрическим показателям, а затем изучаются на молекулярно-генетическом уровне (с привлечением ПЦР-анализа, метода цитометрии).

Ключевые слова: чай, соматические клоны, каллусная ткань, SSR- и ISSR-праймеры, полиморфизм, генетическая изменчивость *in vitro*.

За последние годы процесс микроразмножения растений чая в культуре *in vitro* отработан довольно успешно [1, 2, 5], благодаря чему, в условиях лаборатории появилась возможность в ускоренном режиме проводить селекционные исследования [16, 17]. В короткие сроки

с высоким коэффициентом размножения можно получить большое количество растительного материала, включая ценный морфогенный каллус [3], который образуется у базальной части микропобега чая. Изолируя его и помещая в определённые условия культивирования, можно индуцировать геммогенез [4] и проводить отбор новых соматических клонов чая с изменёнными фенотипическими и генетическими признаками [6, 7]. Изменчивость растений чая *in vitro*, полученных через каллусную культуру, связана с самой природой каллуса, его гетерогенной структурой и происходящими в нём перестройками (абберациями) хромосом, приводящими к изменению ploидности клеток. Особый интерес представляют растения, у которых мутации затронули геномный аппарат, они послужат для селекционных целей и пополнения генофонда чая в культуре ткани [9, 13]. Как правило, изменения на уровне генома затрагивают ядерную, хлоропластную, митохондриальную ДНК и вызывают крупные и мелкие перестройки хромосом, а также точковые мутации, которые приводят к нарушению порядка нуклеотидных связей в пределах одного гена [14, 15, 18].

Коллекция растений чая *in vitro* регулярно пополняется новыми соматическими клонами, которые индуцируются из каллусной ткани. На первом этапе они отбираются по фенотипическим признакам, в частности по морфометрическим показателям, а затем изучаются на молекулярно-генетическом уровне (ПЦР-анализ, цитометрия).

Цель исследований – изучить генетическую изменчивость соматических клонов чая, полученных из каллусной ткани, с привлечением ISSR- и SSR-праймеров.

Объекты и методы исследований. Соматические клоны чая находятся в пересадочной культуре *in vitro* на протяжении длительного времени (11 лет). В фитостатной строго соблюдается режим культивирования: влажность – 70 %, температура 25 ± 2 °C, освещённость 3 000 люкс (лампы OSRAM L 36 W/765), фотопериод 16/8 час. Базовая питательная среда – Мурасиге-Скуга (МС), модифицированная фитогормонами: 6БАП-3 мг/л и гибберелловой кислотой ГК₃-1 мг/л. Кислотность среды pH = 5,6–5,8. В блоке исследований по изучению генетического разнообразия соматических клонов чая, использовали микропобеги чая, полученные путём органогенеза из каллуса. Полногеномную ДНК выделяли из листьев и каллусов методом ЦТАБ [10]. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом на приборе BioDrop μ Lite, качество ДНК оценивали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Амплификацию фрагментов ДНК проводили методом ПЦР, с использованием 4 ISSR-и 11 SSR-маркеров. Объём реакционной смеси 25 мкл, из которых 12,5 мкл 2-кратный ПЦР буфер (Биолабмикс), содержащий Taq-ДНК – полимераза горячего старта. ПЦР-смесь для ISSR-анализа

содержала 0,7 мкл праймера (10 мкмоль), 3 мкл ДНК (концентрации 100 нг/мкл) и воду; ПЦР-смесь для SSR-анализа содержала по 0,5 мкл праймера F и R, 1 мкл ДНК (концентрации 100 нг/мкл) и воду. Амплификацию проводили на приборах LightCycler 96 (Roche) и MiniAmp (Termo Fisher Scientific). Программа амплификации для ISSR-праймеров: преинкубация 5 мин при 94 °С, денатурация 30 сек при 94 °С, отжиг 40 циклов по 20 сек при 52 °С и элонгация по 2 мин при 72 °С, с последующей финальной элонгацией 4 мин при 72 °С. Программа амплификации для SSR-праймеров: преинкубация 5 мин при 94 °С, денатурация 30 сек при 94 °С, отжиг 40 циклов по 15 сек при 60 °С и элонгация 30 сек при 72 °С, с последующей финальной элонгацией 4 мин при 72 °С. Продукты ПЦР визуализировали в 2%-ном агарозном геле с $1 \times$ TAE буфером при напряжении 90 V и анализировали с использованием геледокументирующей системы BlueCube 300L (Serva).

Анализ эффективности праймеров проводили методами, описанными в публикации [8]. Генетические дистанции определяли с использованием пакета Darwin ver.6,0 [19], дендрограмма была построена методом Neighbor joining [11]. Для модификации дендрограммы использовали программу Dendroscope ver. 3.6.3 [12].

Результаты и их обсуждение. Для изучения генетического разнообразия соматклонов чая были привлечены 11 SSR- и 4 ISSR-праймеры. Следует отметить, что все праймеры были опробированы при генотипировании природных популяций чая *in vivo* и подтвердили свою эффективность. Отмечен высокий уровень изученных праймеров.

В результате проведённых исследований на соматклонах чая у 7 SSR-праймеров отмечена достаточно низкая эффективность, которая фиксировалась на уровне от $L_{05} - 0\%$ до $L_{67} - 29\%$. Вместе с тем на общем фоне высоким полиморфизмом отличились 4 SSR-праймеры: $L_{40} - 54\%$; $L_{57} - 36\%$; $L_{07} - 36\%$; $L_{20} - 34\%$ (рис. 1).

Амплифицированные SSR-фрагменты отличались размером в пределах 10 пар нуклеотидов, гетерозигот в популяции детектировано не было.

Показатели мультилокусных ISSR-праймеров оказались более убедительными, у них отмечен сравнительно высокий уровень полиморфизма, который составил: $ISSR_9 - 40\%$; $ISSR_8 - 52\%$. Высокий полиморфизм говорит о наличии большого генетического разнообразия в изучаемой популяции растений чая и наоборот.

Выявленный полиморфизм амплифицированных фрагментов ДНК, позволил нам установить также наличие генетических дистанций между изучаемыми соматклонами и каллусами, из которых они были получены. Коэффициент отличий был сравнительно низкий и составил 0,05–0,1. Как видно на рисунке 2, включённые в эксперимент соматклоны, разделились в дендрограмме на три основные кластера (рис. 2).

<p>SSR L05 – PIC 0 % F: GGGGATGTAGATTGGTATG R: CACCTTTAGTTAGGCGGAAT</p>	<p>SSR L07 – PIC 36 % F: TGTGGTTGGTCAAAAAGTAAG R: GGACCTTCTCTACTACCCAA</p>
<p>SSR L20 – PIC 34 % F: GCTCCATAACAACCACCACT R: ATCACCACCATTCTATACCC</p>	<p>SSR L34 – PIC 16 % F: TGCTGCCTAGAAATGGACGG R: CAAATGCGAGACACCCTGCTTA</p>
<p>SSR L40 – PIC 54 % F: TCCCTGTGCTGATACCTCTA R: TGTGATGTTGGCAGTTCTAT</p>	<p>SSR L52 – PIC 16 % F: ATCATAGCAGACCAACGACT R: ACTGAAATCAGGCCAAAATC</p>
<p>SSR L57 – PIC 36 % F: AAAGAGGCATCCATGAAAAAC R: ACCAAAAACAGAGGGACAAA</p>	<p>SSR L60 – PIC 10 % F: TTGCTCTCTCTTCCCTCCACC R: AGTCTCATTTCCTTCCCAGT</p>
<p>SSR L63 – PIC 16 % F: GTGAAAGGAATGTGTAGTGG R: GAGGTGGTAGTTGTGTGGGT</p>	<p>SSR L67 – PIC 29 % F: AATGCTAAGAAGAAGTGGGG R: GTGAAGGAAAAGGTAACGGC</p>
<p>SSR L70 – PIC 16 % F: TTACCGATCACAGGGGAAAA R: ACCATTGGGGATAGAAGGAG</p>	
<p>ISSR3 – PIC 45 % CTCTCTCTCTCTCTT</p>	<p>ISSR8 – PIC 52 % GGAGAGGAGAGGAGA</p>
<p>ISSR9 – PIC 40 % ACACACACACACACACC</p>	<p>ISSR10 – PIC 42 % TGTGTGTGTGTGTGG</p>

Рис. 1. Последовательность SSR- и ISSR-праймеров и уровень полиморфизма для анализа соматклонов чая *in vitro*

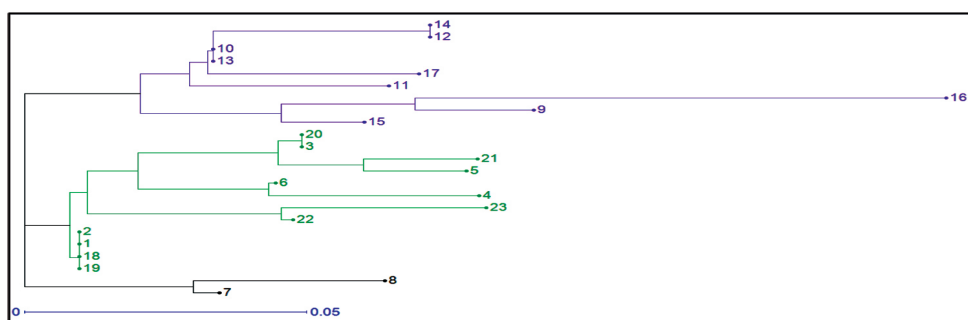


Рис. 2. Дендрограмма генетических дистанций соматклонов чая, полученных из каллусной культуры *in vitro*

Некоторые образцы оказались идентичными друг другу: 14 и 12; 10 и 13; 1, 2, 18 и 19, 20 и 3 – с нулевыми генетическими дистанциями между ними. Наибольшая изменчивость из всей группы обнаружена у образца под номером 16.

Несмотря на то, что у остальной группы растений генетические расстояния были сравнительно небольшими, тем не менее нестабильность на генном уровне у них присутствовала.

Следует отметить, что набор ДНК-маркеров не всегда может выявить генетические изменения, например, точковые мутации, так как невозможно отследить всю последовательность генома [20–22].

Выводы. Проведённые исследования показали, что в индуцированных из каллусной ткани растениях чая генетическая изменчивость предположительно носит точковый характер. Установлена эффективность мультилокусных ISSR-праймеров, с уровнем полиморфизма 45–52 %. Несмотря на средний уровень полиморфизма амплифицированных фрагментов, было выявлено наличие генетических различий между соматоклонами и каллусами, из которых они были получены, наибольшая изменчивость отмечена у образца № 16.

*Публикация подготовлена в рамках реализации
ГЗ ФИЦ СЦ РАН № FGRW-2022-0005*

Список литературы

1. Гвасалия М.В. Клональное микроразмножение растений чая (*Thea sinensis* L.) в культуре *in vitro* // Садоводство и виноградарство. – 2013. – № 4. – С. 20-22. – ISSN 0235-2591.
2. Гвасалия М.В. Соматоклональная вариабельность *in vitro* – источник для создания новых сортов растений // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2018. – Вып. 66. – С. 113-119. – <http://doi.org/10.31360/2225-3068-2018-66>.
3. Катасонова А.А. Морфогенетические очаги в каллусной культуре *in vitro* зародышей пшеницы // Современные микроскопические исследования в биологии и медицине. – М.: Лабора, 2006. – С. 28-29. – ISBN 5-9900478-5-1.
4. Катасонова А.А. Индукция органогенеза в каллусной культуре яровой мягкой пшеницы *in vitro* // Тез. докл. XIII междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». – М., 2006. – С. 110-111. – ISBN 5-317-01589-8.
5. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Гвасалия М.В., Самарина Л.С., Соколов Р.Н. Микроразмножение *in vitro* субтропических, декоративных культур и эндемиков Западного Кавказа: оригинальные и оптимизированные протоколы // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 3. – С. 49-58. – ISSN 0131-6397.
6. Кунах В.А. Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сбор. тез. X междунар. конф., 14-18 октября Казань. – Казань, 2013. – С. 47-49. – ISBN 978-5-93962-626-2.
7. Рындин А.В. Выведение новых сортов чая – инновационное направление селекционного процесса // Садоводство и виноградарство. – 2007. – № 3. – С. 23-24. – ISSN 0235-2591.

8. Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – Вып. 5. – С. 571-578. – <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.571rus>.
9. 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.
10. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – Vol. 12. – P. 13-15.
11. Gascuel O., Steel M. Neighbor-Joining Revealed // Molecular Biology and Evolution. – Vol. 23(11). – P. 1997-2000. – <http://doi.org/10.1093/molbev/msl072>.
12. Huson D., Richter D., Rausch C., DeZulian T. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees // BMC Bioinformatics. – 2007. – Vol. 8. – P. 460. – <http://doi.org/10.1186/1471-2105-8-460>.
13. Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M. and Sath R.K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement // Biotechnology. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 54. – <http://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>.
14. Kumar P.S., Mathur V.L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 2004. – Vol. 78. – P. 267-271. – ISSN 0167-6857.
15. Mishiba K.I., Tawada K.I., Mii M. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* (L.) // *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. – Plant. – 2006. – Vol. 42. – P. 83-88. – ISSN 1054-5476.
16. Mondal T.K. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis*) // Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. – 2003. – P. 671-720.
17. Mondal T.K., Bhattacharya A., Laxmikumaran M., Ahuja P. S. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – Vol. 76. – № 3. – P. 195-254.
18. Nontaswatsri C., Fukai S. Regenerative callus of Dianthus ‘Telstar Scarlet’ showing mixoploidy produce diploid plants // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 2005. – Vol. 83. – P. 351-355. – <http://doi.org/10.1007/s11240-005-6621-5>.
19. Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. DARwin software. [Electronic Resources]. – Access mode: <http://darwin.cirad.fr/darwin>. (accessed: 10.05.2021)
20. Razaq M., Heikrujam M., Chetri S.K., Agrawal V. *In vitro* clonal propagation and genetic fidelity of the regenerants of *Spilanthes calva* DC, using RAPD- and ISSR-marker // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2013. – № 19. – Vol. 2. – P. 251-260. – <http://doi.org/10.1007/s12298-012-0152-4>.
21. Roy S.C., Chakraborty B.N. Genetic diversity and relationships among tea (*Camellia sinensis* Kuntze) cultivars revealed by RAPD- and ISSR-based fingerprinting // Indian J. Biotechnol. – 2009. – № 8. – P. 370-376.
22. Thomas J., Vijayan D., Joshi S.D., Joseph S.J., Kumar R.R. Genetic integrity of somaclonal variants in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] as revealed by inter simple sequence repeats // J. Biotechnol. – 2006. – № 123. – Vol. 2. – P. 149-152.

CALLUS TISSUE AS A GENETIC DIVERSITY SOURCE OF TEA PLANTS (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) *IN VITRO*

Gvasaliya M.V.

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

11 SSR- and 4 ISSR-primers were used to study the genetic diversity of tea somaclones induced from callus tissue, as well as cultured *in vitro* for a long time. Previously, they had been tested during genotyping of natural tea populations *in vivo* and confirmed their effectiveness. Amplification of genome-wide DNA fragments was performed by PCR method. All SSR-primers showed the absence of recessive alleles – a low level of heterozygosity in all samples, and as a result, a low level of polymorphism of primers ranging from 0 to 54 %. The greatest polymorphism was observed in primers L₄₀, L₅₇, L₀₇ and L₂₀ and amounted to 54, 36, 36 and 34%, respectively. Amplified SSR-fragments differed in size within 10 nucleotide pairs, no heterozygotes were detected in the population. Multilocus ISSR-primers showed a higher level of polymorphism, which amounted to 40–52 %. All somaclones included in the experiment were divided into three clusters, the presence of genetic differences with a coefficient of difference (0.05–0.1) was revealed. It was found that in tea plants induced from callus tissue, genetic variability is presumably of a point nature. The greatest variability of the whole group was found in sample No. 16. The collection of *in vitro* tea plants is regularly updated with new somatic clones that are induced from callus tissue. At the first stage, they are selected according to phenotypic characteristics, in particular morphometric indicators, and then studied at the molecular genetic level (with the involvement of PCR-analysis, cytometry method).

Key words: tea, somatic clones, callus tissue, SSR- and ISSR-primers, polymorphism, genetic variability, *in vitro*.

УДК 581.143.6

doi:10.31360/2225-3068-2022-81-98-106

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ДЛИТЕЛЬНОСТЬ
ДЕПОНИРОВАНИЯ *IN VITRO* ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА
CAMPANULA SCLEROPHYLLA KOLAK.**

Маляровская В.И., Шуркина Е.С.

*Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр Российской академии наук»,
г. Сочи, Россия, e-mail: malyarovskaya@yandex.ru*

Решение мировой проблемы сохранения биоразнообразия растений невозможно без поиска новых подходов. Дополнением к существующим традиционным методам сохранения биоразнообразия *ex situ* всё чаще применяются современные биотехнологические инструменты, обеспечивающие возможность устойчивого управления генетическими ресурсами. Одним из направлений сохранения биоразнообразия является создание генобанка *in vitro*, в виде