

Глава 3.

**БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**

УДК 633.72:631.52

doi: 10.31360/2225-3068-2021-77-111-119

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФЕНОТИПА  
И ГЕНОТИПА СОМАТИЧЕСКИХ КЛОНОВ ЧАЯ  
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

**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*

Отечественными учёными подробно изучены положительные и отрицательные признаки листа, которые напрямую коррелируют с урожайностью и биохимическими показателями. Существует большой спектр морфологических признаков, по которым рекомендуется проводить отбор ценных для селекции форм чая. Проведённые исследования позволили выявить изменчивость *in vitro* на уровне фенотипа у соматических клонов чая, полученных через каллусную культуру. Мутации затронули основные морфологические характеристики листа: его размер, форму, поверхность и окраску. Практически все соматклоны отличались как между собой, так и по сравнению с исходным фенотипом – местной популяцией. По комплексу положительных признаков выделено 6 перспективных форм, которые можно использовать в различных селекционных программах. Методом проточной цитометрии (цитометр, Beckman Coulter) проведён анализ размера генома у выделенных по фенотипу соматклонов чая ( $S_c-11$ ;  $S_c-27$ ;  $S_c-33$ ) и подтверждена их изменчивость на генетическом уровне.

**Ключевые слова:** (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), соматические клоны, фенотип, морфологические признаки, генетическая изменчивость *in vitro*, размер генома.

Вид – *Camellia sinensis* (L.) Kuntze является сложной таксономической единицей, которой свойственна высокая частота изменчивости, вследствие естественного процесса гибридизации и спонтанного мутагенеза. В результате в природе появляются растения, геномный комплекс которых насыщен множеством признаков, присущих китайской, ассамской и японской разновидностям чая. Особенно часто мутации затрагивают морфологические характеристики листа: его форму, кончик, размер, окраску, поверхность и т. д. Советскими учёными

подробно изучены положительные и отрицательные признаки листа, которые напрямую коррелируют с биохимическими показателями, урожайностью и морозостойкостью растений чая. Существует большой спектр морфологических признаков, по которым рекомендуется проводить отбор ценных для селекции форм [1, 4, 5, 7]. Это, прежде всего, размер листа (длина и ширина). В естественных условиях произрастания растений чая предпочтение отдаётся формам определённой длины листа (не менее 13 см) и ширины (не менее 6 см). В культуре *in vitro* проводится визуальный отбор крупнолистных растений. Размер листа напрямую связан с пузырчатостью, которая обусловлена неравномерным ростом мезофилла и основных жилок. Это ценный признак, пузырчатые листья тонкие, нежные и дают качественное сырьё с высокими органолептическими и биохимическими показателями. Большая вариабельность наблюдается по форме листовой пластинки. Встречаются растения с округлыми, овальными, удлинённо-овальными, яйцевидными, обратнойяйцевидными, широколанцетными, ланцетными листьями. Предпочтение при отборе отдаётся практически всем формам, за исключением ланцетной, которая свойственна японской мелколистной разновидности чая. Края листовой пластинки бывают волнистые и ровные. Листовая пластинка чая имеет изогнутость, как по ширине (к верхней поверхности), так и по длине (к нижней поверхности). Она должна быть широко развёрнутой и отогнута к нижней поверхности (тип *curvata*), отрицательный признак – сложенность вдоль главной жилки (тип *rigida*). При отборе следует уделить внимание длине кончика листа. Для китайской разновидности характерен короткий тупой, слегка раздвоенный (1–10 мм). Для индийской – длинный и острый (10–24 мм). Положительным признаком является длинный заострённый кончик листа. У растений чая отмечается 24 вида окраски листа: зелёная, светло-зелёная, тёмно-зелёная, светло-желтовато-зелёная, тёмно-желтовато-зелёная, светло-шоколадная, тёмно-шоколадная, красновато-коричневая, розовато-коричневая, светло-коричневая, тёмно-коричневая, и разные оттенки антоциановой. По данным академика К. Е. Бахтадзе [1] светло-зелёный цвет принадлежит чувствительным к морозам южным индийским разновидностям, зелёный и тёмно-зелёный – морозостойким китайским и японским северным формам чая, антоциановая исключительно морозостойким формам. Вместе с тем, исследования И. Г. Керкадзе показали [4], что антоциан присутствует не только у северных, но практически у всех разновидностей чая. Произрастая в более северных регионах, молодые побеги чая в ответ на понижение температуры начинают активно продуцировать пигмент

антоциан, который распределяется по верхней палисадной паренхиме листа, частично проникает и в губчатую ткань. Если в состав антоциана входят глюкоза и антоцианиды с присоединением щелочного вещества, то антоциан синий или фиолетовый, если кислого – антоциан красный. В зависимости от реакций, какие антоциан претерпевает в клеточном соке с солями, кислотами и дубильными веществами, появляется та или иная окраска листьев чая. Следует отметить, что антоциановые листья дают высокое по органолептической и биохимической оценке сырьё, меньше подвержены действию низких температур и грибковой инфекции.

Аналогичные процессы, связанные с изменчивостью фенотипа у растений чая, протекают и при выращивании его в культуре *in vitro*. Установлено, что искусственно созданные условия культивирования *in vitro*, длительность, дополнительная мутационная нагрузка, в виде экзогенных регуляторов роста, а также генотип экспланта, оказывают значительное влияние на стабильность генома [6]. Особенно высокой мутационной изменчивостью отличаются растения, выращенные из каллусной ткани. Индуцировав из каллуса геммогенез можно получить новые формы чая с расширенным спектром изменчивости не только на фенотипическом, но и генетическом уровнях.

Многие вопросы, связанные с возникновением мутационной изменчивости *in vitro* до конца не изучены, однако методы их обнаружения остаются традиционными – это исследования на фенотипическом, клеточном и генетическом уровнях [8, 9]. Поэтому целью данной работы явилось выявление изменчивости фенотипа у выделенных *in vitro* соматических клонов чая и её подтверждение на генетическом уровне.

**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  $25 \pm 2$  °С, освещённость 3 000 люкс (лампы OSRAM L 36 W/765), фотопериод 16/8 час. В качестве базовой выбрана питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга (МС) [19], которая дополнена фитогормонами роста: 6БАП–3 мг/л и гибберелловой кислотой ГК<sub>3</sub>–1 мг/л. Кислотность среды рН = 5,6–5,8. Отбор перспективных форм проводился по признакам изменчивости растений чая согласно методикам И. Г. Керкадзе и К. Е. Бахтадзе [1, 4]. В серии опытов 3 повторности по 2 образца в каждой. Контроль – исходный фенотип местная популяция. Продолжительность субкультивирования 12 месяцев. Математическая обработка данных по Доспехову [3].

Генетические исследования по определению размера генома проводили методом проточной цитометрии (Beckman Coulter). Использовались

внешние стандарты: *Allium cepa*  $2n = 16$  (32,07 пг ДНК) и сорт 'Колхида'  $2n = 30$  (5,8 пг). Чайный лист (160 г) измельчался в жидкую суспензию и фиксировался в 800 мкл холодного буфера. Для экстракции ядер WPB [16]: применялся следующий состав буферной смеси: 0,2 М Tris HCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2,5 mM EDTA Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 86 mM NaCl, 10 mM метабисульфит Na, 1,5 % Triton X-100, 2 % PVP-10, pH 7,5. Фильтрация суспензии ядер проводилась через мембраны (40 мкм) Sartorius. Окрашивание 40 мин. иодидом пропидия – 30 мкг/мл (предобработка РНКазой мкг/мл).

**Результаты и обсуждение.** В пересадочной культуре *in vitro* в селекционной программе участвуют более 17 соматических клонов чая. Получены они были индукцией геммогенеза от базального каллуса микропобегов чая местной популяции. В течение 5 лет проводится их клональное микроразмножение и изучается изменчивость на фенотипическом уровне. Изменение фенотипа связано с явлением соматической изменчивости, которая является следствием длительного депонирования *in vitro*, действием высоких концентраций регуляторов роста, генотипом и т. д. [10, 11]. В результате скрининга было отобрано 6 соматических клонов, представляющих наибольший интерес с точки зрения фенотипических особенностей. Согласно признакам изменчивости растений чая, были отобраны соматические клоны с изменёнными морфологическими признаками листа: по размеру, форме, окраске, кончику, цвету, поверхности, а также по высоте микропобега и количеству листьев с одного экспланта. Преимущественно отбирались соматические клоны, с длиной листа не менее 4 см, формой – овальной, удлинённо-овальной и широколанцетной (рис. 1).

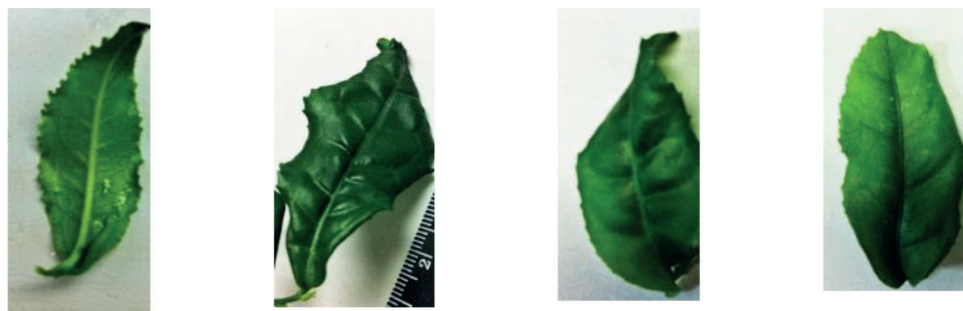
Все представленные в опыте соматические клоны характеризовались активным ростом, их высота была не ниже 4,0 см, и варьировала от 4,7 см (S<sub>c</sub>-23) до 5,3 см (S<sub>c</sub>-27). У контрольного фенотипа этот показатель составил 3,2 см. В таблице 1 представлены морфометрические показатели 6 перспективных соматических клонов чая.

Минимальное количество листьев, выросших на одном побеге у соматических клонов было не менее 9,6 шт. (S<sub>c</sub>-23), а максимальное – 10,3 шт. (S<sub>c</sub>-27). Самые крупные, по размеру листья отмечены у соматического клона чая S<sub>c</sub>-27 (5,1 × 3,2 см). Практически все соматические клоны имели положительные признаки: крупные по длине листья от 4,5 до 5,1 см, пузырчатую поверхность, длинный кончик, светло-зелёную и зелёную окраски. Вместе с тем, на общем фоне по всем показателям заметно выделяется соматический клон чая S<sub>c</sub>-27. (рис. 2).

Таблица 1

**Показатели изменчивости фенотипа  
перспективных соматклонов чая в культуре *in vitro*,  
2018–2021 гг.**

Соматклоны №№	Высота, см	Колво листьев, шт.	Длина листа, см	Ширина листа, см	Форма листа	Окраска листа	Кончик листа	Поверхность листа
1 S <sub>c</sub> -11	5,2 ± 0,4	10,0 ± 0,3	4,9 ± 0,5	2,9 ± 0,2	удлинённо овальная	зелёная	длинный острый	пузырчатая
2 S <sub>c</sub> -15	4,9 ± 0,3	9,8 ± 0,2	4,5 ± 0,3	2,5 ± 0,3	удлинённо овальная	зелёная	длинный острый	пузырчатая
3 S <sub>c</sub> -23	4,7 ± 0,3	9,6 ± 0,4	4,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3	широко ланцетная	зелёная	длинный, острый	пузырчатая
4 S <sub>c</sub> -26	4,8 ± 0,2	9,7 ± 0,3	5,0 ± 0,2	3,5 ± 0,2	овальная	светло зелёная	длинный, острый	пузырчатая
5 S <sub>c</sub> -27	5,3 ± 0,3	10,3 ± 0,2	5,1 ± 0,2	3,2 ± 0,3	удлинённо овальная	зелёная	длинный, острый	пузырчатая
6 S <sub>c</sub> -33	5,0 ± 0,4	10,2 ± 0,1	5,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3	удлинённо овальная	зелёная	длинный, острый	пузырчатая
Контроль местная популяция	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2	широко ланцетная	зелёная	длинный, острый	ровная



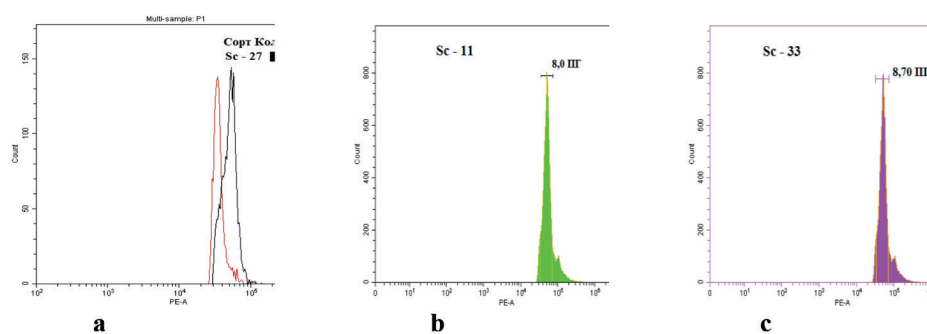
**Рис. 1.**

Изменчивость соматклонов чая по форме листа в культуре *in vitro*



**Рис. 2.**

Соматклон чая Sc-27 в культуре *in vitro* и адаптированный к условиям *ex vitro*



**Рис. 3.**

Диаграммы проточной цитометрии соматклонов чая:  
**a** – Сорт ‘Колхида’ (контроль – 5,08 пг) и Sc-27 (7,26 пг);  
**b** – Sc-11 (8,0 пг); **c** – Sc-33 (8,7 пг)

Изменчивость изученных соматонов главным образом связана с тем, что они были получены через каллусную ткань, которая имеет сложную гетерогенную структуру. Её геном при культивировании *in vitro* претерпевает значительные изменения, в его кариотипе появляются клетки различной ploидности [1]. Мутации вызваны дополнительной нагрузкой в виде дисбаланса состава питательной среды, повышенной концентрацией фитогормонов, окислительными процессами в клетке, высоким содержанием свободных радикалов. Все эти факторы вызывают гипо- и гиперметилирование ДНК, приводящее к хромосомным aberrациям и изменению ploидности [15, 17, 18, 20, 21]. Регуляторы роста, в частности 2,4-D, НУК и БАП также способствуют возникновению генетической изменчивости *in vitro* [22–25]. Индуцировав из каллуса геммогенез, можно получить новые формы растений [12–14]. Например, у растений табака получены через каллусную культуру соматоны, устойчивые к вирусу табачной мозаики, а у сахарного тростника – новый высокоурожайный сорт [2].

Для подтверждения изменчивости соматических клонов чая не только на фенотипическом, но и генетическом уровнях были проведены исследования по изучению размера их генома. Применительно к культуре чая был отработан метод проточной цитометрии. Контролем служил генотип чая  $2n = 30$  сорта ‘Колхида’ (5,08 пг ДНК). В эксперименте участвовали 3 соматоны, с ярко выраженными селекционными отличиями от исходного фенотипа. Установлено, что длительное культивирование *in vitro* (11 лет) сказалось на изменчивости не только их фенотипа, но и генотипа (рис. 3).

Анализ размера генома соматонов выявил мутации на уровне кариотипа. Наблюдалось изменение ploидности по сравнению с контролем. Размер генома у исследованных соматонов составил 7,26 пг ( $S_c-27$ ); 8,0 пг ( $S_c-11$ ); 8,70 пг ( $S_c-33$ ) ДНК, по сравнению с сортом ‘Колхида’ – 5,08 пг ДНК. Полученные данные свидетельствуют о наличии анеуплоидии. На диаграмме проточной цитометрии основной пик, показывающий размер генома смещён вправо по сравнению с контрольным сортом ‘Колхида’.

**Заключение.** Чайное растение характеризуется высокой фенотипической изменчивостью, как в природных условиях произрастания, так и в культуре *in vitro*. Анализ размера генома методом проточной цитометрии подтвердил генетическую изменчивость у наиболее выраженных по фенотипу соматонов чая:  $S_c-11$  (8,0 пг);  $S_c-27$  (7,26 пг);  $S_c-33$  (8,7 пг) ДНК, тогда как у контроля этот показатель составил 5,08 пг ДНК. Все изученные соматоны представляют интерес по комплексу ценных признаков и задействованы в различных селекционных программах.

Публикация подготовлена в рамках реализации  
ГЗ ФИЦ СЦ РАН № 0492-2021-0005

**Библиографический список**

1. Бахтадзе К.Е. Биологические основы культуры чая. – Тбилиси: Мецниереба, 1971. – 359 с.
2. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с. – ISBN 985-485-574-0.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М., Агропромиздат. – 1985. – 351 с.
4. Керкадзе И.Г. Некоторые вопросы генетики чая. Сообщение II. Отбор форм чая с генетическими маркерами и их селекционное значение // Субтропические культуры. – 1980. – № 2. – С. 36-45. – ISSN 0207-9224.
5. Керкадзе И.Г. Теория и практика спонтанного и индуцированного мутагенеза субтропических культур: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1987. – 51 с.
6. Кунах В.А. Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сб. тез. X междунар. конф. – Казань, 14-18 октября. – Казань: Центр инновационных технологий, 2013. – С. 47. – 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. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Guo W., Wu R., Zhang Y., Liu X., Wang H., Gong L., Zhang Z., Liu B. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. // Plant Cell Rep. – 2007. – № 26. – P. 1297-1307. – doi: 10.1007/s00299-007-0320-0.
12. Jiang H., Lee T.J., et al. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture // PLoS Biol. – 2008. – 6(12). – P. 2880-2895. – doi: 10.1371/journal.pbio.0060302.
13. 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.
14. Kshirsagara P., Jaykumar R., Suraj J.C., Mansingraj D.U., Ghansham S.N., Nikhil B.D. Gaikwada B. Highly efficient *in vitro* regeneration, establishment of callus and cell suspension cultures and RAPD analysis of regenerants of *Swertia lawii* Burkill // Biotechnology Reports. – 2015. – № 6. – P. 79-84. – doi: 10.1016/j.btre.2015.03.003.
15. 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.
16. Loureiro J., Rodriguez E, Dolezel J, Santos C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species // Annals of Botany. – 2007. – Vol. 100. – № 4. – P. 875-88. – doi: 10.1093/AOB/MCM152.
17. 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.



18. Mondal T.K., Chand P. Detection of genetic variation among micropropagated tea (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze) by RAPD analysis. *In Vitro Cell. & Dev Biol. // Plant.* – 2002. – Vol. 38. – № 3. – P. 296-299. – doi: 10.1079/IVP2001280.
19. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – № 4. – P. 473-479.
20. 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. – ISSN 0167-6857.
21. Rival A., Ilbert P., Labeyrie A., Torres E. at all Variations in genomic DNA methylation during the longterm in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures // *Plant Cell Reports.* – 2013. – Vol. 32. – № 3. – P. 359-368. – doi: 10.1007/s00299-012-1369-y.
22. Sato M., Hosokawa M., Doi M. Somaclonal variation is induced de novo via the tissue culture process: a study quantifying mutated cells in *Saintpaulia* // *PLoS ONE.* – 2011. – 6(8):e23541. – doi: 10.1371/journal.pone.0023541.
23. Smulders M., de Klerk G. Epigenetics in plant tissue culture // *Plant Growth Regul.* – 2011. – № 63. – P. 137-146. – doi: 10.1007/s10725-010-9531-4.
24. Sun S., Zhong J., Li S., Wang X. Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind.) // *Bot. Stud.* – 2013. – № 54(1)36. – doi: 10.1186/1999-3110-54-36.
25. Tanurdzic M., Vaughn M.W., 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.

**PHENOTYPE AND GENOTYPE VARIABILITY  
OF TEA (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE)  
SOMATIC CLONES *IN VITRO***

**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*

Russian scientists have studied in detail the positive and negative signs of the leaf, which directly correlate with the yield and biochemical parameters. There is a wide range of morphological features, according to which it is recommended to select valuable forms of tea for breeding. The conducted studies revealed *in vitro* variability at the phenotype level in somatic tea clones obtained through callus culture. The mutations affected the main morphological characteristics of the leaf: its size, shape, surface, and colour. Almost all somaclones differed both among themselves and from with the original phenotype – the local population. According to the complex of positive signs, 6 promising forms were recorded, which can be used in various breeding programs. Flow cytometry (Beckman Coulter cytometer) was used to analyze the genome size of tea somaclones ( $S_c-11$ ;  $S_c-27$ ;  $S_c-33$ ) isolated by phenotype, and their variability was confirmed at the genetic level.

**Key words:** (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), somatic clones, phenotype, morphological characteristics, genetic variability *in vitro*, genome size.