

**ИНФОРМАТИВНОСТЬ
БИОХИМИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ
ПРИ ИНДУКЦИИ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА ЧАЯ
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) *IN VITRO***

**Самарина Л. С.¹, Гвасалия М. В.¹, Маляровская В. И.¹, Малюкова Л. С.¹,
Рахмангулов Р. С.¹, Конинская Н. Г.¹, Астанин А. И.²**

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,
г. Сочи, Россия

² Закрытое акционерное общество Институт хроматографии «ЭкоНова»,
г. Новосибирск, Россия

e-mail: q1111w2006@yandex.ru

В полевых условиях на растение оказывают влияние множество факторов, поэтому не представляется возможным выявить механизмы ответа на отдельный абиотический стрессовый фактор. Моделирование стрессовых условий *in vitro* – метод, который может позволить более глубоко понять физиологию и биохимию растений под воздействием отдельных стрессовых факторов. В данной работе индуцировали засуху добавлением в питательную среду 200 и 300 Ммоль маннита и засоление – добавлением 2 и 4 г/л хлорида натрия. Через два месяца после посадки микропобегов чая определяли содержание катехинов и кофеина методом ВЭЖХ. Полученные данные показали, что засуха и засоление по-разному влияют на содержание катехинов и кофеина в листьях. Наибольшее содержание катехинов и кофеина отмечалось в варианте с добавлением 4 мг/л хлорида натрия, при этом различия были существенно выше, чем в контроле (среда без осмотиков). Отмечено, что в вариантах со средней и слабой осмотической нагрузкой содержание кофеина и катехинов выше, чем в контроле, однако при усилении засухи (вариант с 300 Ммоль маннита) содержание катехинов и кофеина снижается. Возможной причиной повышения концентрации катехинов и кофеина при среднем осмотическом стрессе в свежем листе является снижение водного потенциала тканей, повышение содержания сухого вещества при снижении содержания воды, однако для подтверждения этого предположения необходимо проведение дальнейших экспериментов.

Ключевые слова: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *in vitro*, осмотический стресс, катехины, маннит, питательная среда.

Засуха, засоление, экстремальные температуры – главные факторы, лимитирующие рост и урожайность большинства сельскохозяйственных культур в мире [1, 2, 6, 9]. Негативный эффект этих факторов обусловлен в первую очередь тем, что все они вызывают снижение осмотического потенциала клеток (водный дефицит), поэтому индуцируют схожие метаболические изменения в клетке [8].

В отличие от моногенного характера устойчивости к большинству биотических стрессов, устойчивость к абиотическим стрессам, как правило, носит полигенный характер, поэтому её сложно изучать в полевых условиях [10]. К тому же, в полевых условиях на растение оказывают влияние множество факторов, поэтому не представляется возможным выявить механизмы ответа на отдельные абиотические стрессовые факторы. Моделирование стрессовых условий *in vitro* – метод, который может позволить более глубоко понять физиологию и биохимию растений под воздействием отдельных стрессовых факторов [9].

Описанными в литературе биохимическими маркерами ответа на осмотический стресс у чая является повышение содержания сахаров, пролина и других осмолитов, которые повышают вязкость цитоплазмы и препятствуют потере воды клеткой [7]. Также изучалось влияние засухи в полевых условиях на биохимический состав и качество чая [5, 11]. Этими авторами было показано, что эффектом засухи является снижение катехинов, кофеина и некоторых аминокислот в листе чая. Однако в условиях моделирования осмотического стресса изменение содержания показателей качества листа чая (катехинов и кофеина) не изучались. В связи с этим, цель наших исследований – выявить влияние засоления и засухи *in vitro* на содержание катехинов и кофеина в свежем листе чая.

Объекты и методы. Растительным материалом для проведения исследования являлись растения чая местной популяции размноженные в культуре *in vitro* на питательной среде MS с добавлением регуляторов роста БАП 6 мг/л, НУК 1 мг/л, ГК 2 мг/л [3, 4].

Микропобеги без корневой системы помещали на опытные варианты питательной среды для индукции солевого стресса и засухи (табл. 1). Базовой средой для этих экспериментов была 1/2 MS без добавления цитокининов и ауксинов. Контроль – среда без добавления осмотиков. Экспланты культивировали в течение двух месяцев на опытных питательных средах после чего анализировали биохимические параметры.

Анализ биохимических показателей проводили методом ВЭЖХ на приборе Милихром (ЭкоНова, Новосибирск). Пробоподготовку осуществляли по следующему протоколу: 20 мг листьев растирали в 1 мл 70%-ного этанола, инкубировали 30 минут при 70 °С, центрифугировали 10 минут при 13 000 об./мин. Затем надосадочную жидкость фильтровали через мембрану с размером пор 40 мкм. После чего проводили измерения. Все анализы проведены в трёх повторностях, статистическая обработка проводилась методом однофакторного дисперсионного анализа.

Варианты питательных сред для индукции осмотического стресса

Вариант	Осмотические вещества
1	Маннит 200 Ммоль
2	Маннит 300 Ммоль
3	NaCl 2 г/л
4	NaCl 4 г/л
5	Контроль

Результаты и их обсуждение. Добавление маннита в питательную среду в концентрации 200 и 300 Ммоль вызывало видимые повреждения микропобегов чая: пожелтение и частичное усыхание листьев наблюдалось в варианте 1, более серьёзные повреждения, усыхание целых растений наблюдалось в варианте 2 (рис. 1). Таким образом, используемые в этом опыте концентрации маннита индуцировали сильный осмотический стресс. При индукции засоления, используемые концентрации NaCl в питательной среде не приводили ни к гибели растений, ни к усыханию листьев, поэтому полагаем, что эти варианты питательных сред индуцировали слабый или средней силы осмотический стресс.

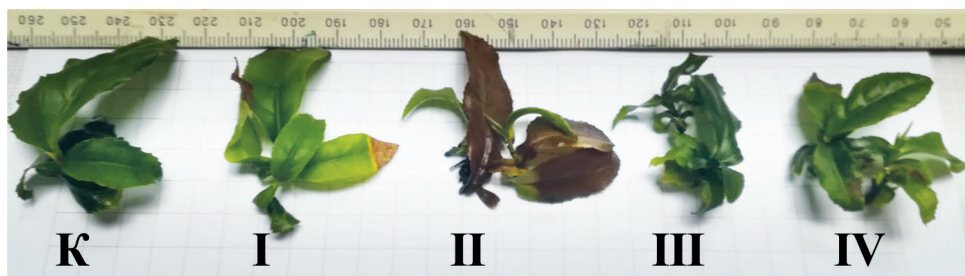


Рис. 1. Влияние варианта питательной среды на рост микропобегов чая *in vitro*:

- К – контроль – без осмотиков;
- I – Маннит 200 Ммоль;
- II – Маннит 300 Ммоль;
- III – NaCl 2 г/л;
- IV – NaCl 4 г/л

В ответ на осмотический стресс на биохимическом уровне происходили изменения катехинов и кофеина в тканях свежего листа чая (рис. 2).

В противоположность нашим ожиданиям и некоторым литературным источникам, в вариантах 1 и 4 содержание катехинов и кофеина

оказалось выше, чем в контроле. Так, наибольшее содержание галлокатехина отмечено в варианте 4 – NaCl 4 г/л, и составило 3,25 мг/г в сравнении с контролем 0,83 мг/г. Существенное повышение концентрации эпигаллокатехина также отмечалось в вариантах 1, 2 и 4, в последнем варианте разница с контролем была также максимальной 24,35 мг/г в сравнении с 4,3 мг/г, соответственно. Содержание эпигаллокатехин галлата в вариантах 1 и 4 также было выше, чем в контроле и составило 10,58 и 11,18 мг/г соответственно, а в контроле – 7,17 мг/г. Однако во 2-ом и в 3-ем вариантах среды содержание эпигаллокатехин галлата было ниже контрольного значения. Содержание эпикатехина в варианте 4 было максимальным и составило 4,04 мг/г в сравнении с контролем 2,1 мг/г. В других вариантах различия незначительны. Содержание эпикатехин галлата в вариантах 1 и 4 не различалось с контролем, но в вариантах 2 и 3 было существенно ниже контрольного уровня.

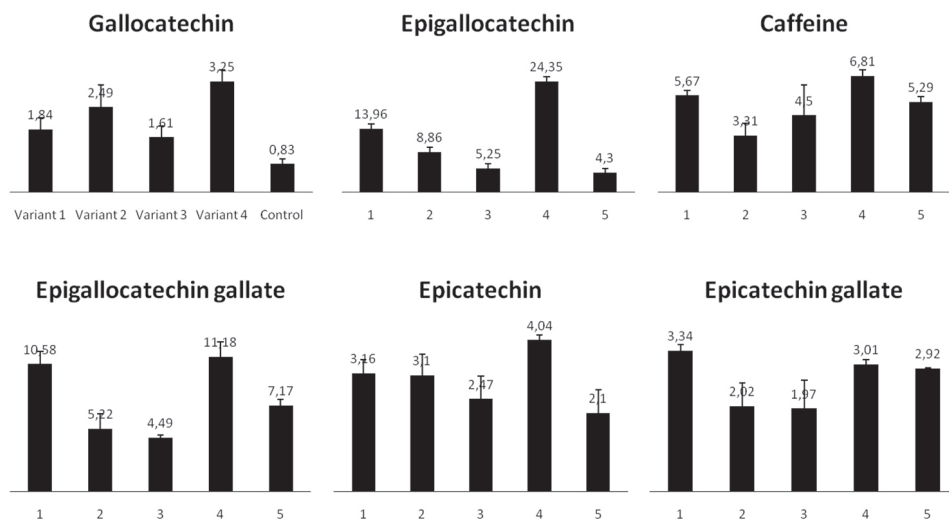


Рис. 2. Влияние варианта питательной среды на биохимические показатели мг/г свежего листа микропобегов чая *in vitro*:
1 – Маннит 200 Ммоль; 2 – Маннит 300 Ммоль; 3 – NaCl 2 г/л;
4 – NaCl 4 г/л; 5 – контроль – без осмотиков

Наибольшее содержание кофеина отмечено в вариантах 1 (5,67 мг/г) и 4 (6,81 мг/г) в сравнении с контролем – 5,29 мг/г. В варианте 3 различия с контролем незначительны, в варианте 2 содержание кофеина меньше чем в контроле.

Таким образом, нами не было выявлено единой по всем показателям линейной зависимости между разными катехинами в ответ на индуцированный осмотический стресс. Отмечено, что в вариантах 1 и 4 содержание кофеина и катехинов существенно выше, чем в контроле.

Однако наблюдалась разная реакция растений на солевой стресс и на засуху: наибольшее содержание кофеина и всех катехинов отмечено при индукции солевого стресса в варианте 4, с повышенной концентрацией хлорида натрия. При индукции засухи более высокие показатели катехинов и кофеина отмечались в варианте 1, с пониженной концентрацией маннита в питательной среде.

Заключение. Полученные экспериментальные данные показывают, что катехины и кофеин при определении в свежем листе могут быть индикаторами ответа на осмотический стресс, при этом, засуха и засоление по-разному влияют на содержание этих веществ. Сопоставляя биохимические данные с визуальным состоянием растений (рис. 1), можно отметить, что в вариантах со средней и слабой осмотической нагрузкой содержание кофеина и катехинов выше, чем в контроле, однако при усилении засухи и некротических изменениях содержание катехинов и кофеина снижается. Возможной причиной повышения концентрации катехинов и кофеина в свежем листе является снижение водного потенциала тканей, повышение содержания сухого вещества при снижении содержания воды, однако для подтверждения этого предположения необходимо проведение дальнейших экспериментов.

*Исследования проводятся при поддержке
гранта РНФ Проект № 18-76-10001*

Библиографический список

1. Белоус О.Г. Адаптивность растений чая (*Thea sinensis* L.) и возможность её регуляции // В книге: Растение и стресс: тезисы докладов Всероссийского симпозиума. – 2010. – С. 59-60.
2. Белоус О.Г., Притула З.В. Диагностика адаптивности растений чая // Биоресурсы, биотехнологии, экологически безопасное развитие Агропромышленного комплекса: сб. науч. тр. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2007. – № 40. – С. 189-196.
3. 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.
4. Гвасалия М.В. Некоторые вопросы клонального микроразмножения чая (*Camellia sinensis* L.) // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2012. – № 46. – С. 133-137. – ISSN: 2225-3068.
5. Платонова Н.Б., Белоус О.Г. Влияние абиотических стрессоров влажных субтропиков России на содержание антиоксидантов в Краснодарском чае // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2018. – № 13. – С. 202-206. – ISBN: 978-5-209-08756-4.
6. Рындин А.В., Белоус О.Г., Маляровская В.И., Притула З.В., Абилюфазова Ю.С., Кожевникова А.М. Использование физиолого-биохимических методов для выявления механизмов адаптации субтропических, южных плодовых и декоративных культур в условиях субтропиков России // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 3. – С. 40-48. – doi: 10.15389/agrobiology.2014.3.40rus
7. Fleta-Soriano E, Munné-Bosch S Stress Memory and the Inevitable Effects of Drought: A Physiological Perspective // Front. Plant Sci. – 2016. – Vol. 7. – P. 143. – doi: 10.3389/fpls.2016.00143

8. Jewell M.C., Campbell B.C, Godwin I.D. Transgenic plants for abiotic stress resistance. // In: Transgenic Crop Plants. / C. Kole et al. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg – 2010. – P. 67-132.
9. 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 // Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. – 2012. – P. 91-108. – <http://dx.doi.org/10.5772/50671>
10. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress // Environmental and Experimental Botany. – 2011. – Vol. 71. – P. 89-98.
11. Wang W., Xin H., Wang M., Ma Q., Wang L., Kaleri N.A., Wang Y. and Li X. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of drought-stress-induced decreases in *Camellia sinensis* leaf quality // Front Plant Sci. – 2016. – № 7. – P. 385. – doi: 10.3389/fpls.2016.00385.

**INFORMATIVENESS OF BIOCHEMICAL INDICATORS
UNDER THE INDUCTION OF OSMOTIC STRESS FOR TEA
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) *IN VITRO***

**Samarina L. S.¹, Gvasaliya M. V.¹, Malyarovskaya V. I.¹, Maluykova L. S.¹,
Rakhmangulov R. S.¹, Koninskaya N. G.¹, Astanin A. I.²**

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution
“Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops”,
c. Sochi, Russia

² Closed Joint Stock Company Institute of Chromatography “EcoNova”,
c. Novosibirsk, Russia

e-mail: q1111w2006@yandex.ru

In the field conditions plant is influenced by many factors, so it is difficult to identify the mechanisms of response to individual abiotic stress factor. Induction of stress conditions *in vitro* is a method that allows a deeper understanding of the physiology and biochemistry of plants under the influence of individual stress factor. In the current work drought was induced by adding 200 and 300 Mmol of mannitol to the nutrient medium and salinity was induced by adding 2 and 4 g/l of sodium chloride. The content of catechins and caffeine was determined by HPLC two months later after planting tea microshoots. The data obtained showed that drought and salinity have a different effect on catechins and caffeine content. The highest catechins and caffeine content was observed in the variant with the addition of 4 mg/l of sodium chloride, while the differences were significantly higher comparing to the control (medium without osmotics). The results showed that the content of caffeine and catechins is higher in the variants with moderate and weak osmotic load, than in the control; however, severe drought (variant with 300 Mmol of mannitol) decreased the content of catechins and caffeine. A possible reason for the increase in the concentration of catechins and caffeine under the medium osmotic load is a decrease of the water potential in the fresh leaf, an increase in the dry matter content along with a decrease in the water content, but further experiments are needed to confirm this assumption.

Key words: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *in vitro*, osmotic stress, catechins, mannitol, nutrient medium.