

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

УДК 633.72+581.1:57

DOI: 10.24411/2072-0920-2020-10313

Гвасалия М.В.**ОТБОР НА ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ СОМАТИЧЕСКИХ КЛОНОВ
РАСТЕНИЙ ЧАЯ (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Гвасалия Майя Валериановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биотехнологии

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки (Федерального исследовательского центра субтропического научного центра РАН), Сочи, Россия

E-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

В статье представлены материалы исследований по отбору in vitro толерантных к засухе соматических клонов чая (Sc-4, Sc-15, Sc-27, Sc-33), полученных индукцией геммогенеза из каллусной ткани. Осмотический стресс был смоделирован путем добавления в питательную среду полиэтиленгликоля (PEG-30,0 г/л). Изменения физиологических параметров при водном дефиците изучали по показателям относительной электропроводности и стабильности клеточных мембран, с использованием кондуктометра ST300C. Добавление PEG в питательную среду вызывало повышение электропроводности у всех изученных соматических клонов чая, за исключением Sc-27, у которого этот показатель был ниже по сравнению с контролем.

Стабильность клеточных мембран у Sc-27 была выше по сравнению с контролем. Эти данные свидетельствуют о низком уровне повреждения растительных тканей. Проведенный ПЦР анализ показал, что ген дегидрин 2 (DHN2), который является одним из главных генетических маркеров ответа растений на засуху, экспрессировался существенно выше у соматического клона Sc-27. По всем изученным параметрам соматический клон чая Sc-27 предварительно может быть отобран как засухоустойчивый генотип и использован в дальнейшей селекционной программе.

Ключевые слова: соматические клоны чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), осмотический стресс, полиэтиленгликоль (PEG), относительная электропроводность, стабильность клеточных мембран, экспрессия генов, ген дегидрин 2 (DHN2).



Для цитирования: Гвасалия М.В. Отбор на засухоустойчивость соматических клонов растений чая (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE) в культуре *IN VITRO* // Новые технологии. 2020. Вып. 3(53). С. 117-124. DOI: 10.24411/2072-0920-2020-10313.

Gvasaliya M.V.

**SELECTION FOR DRY RESISTANCE OF SOMATIC CLONES OF TEA PLANTS
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE) IN *IN VITRO* CULTURE**

Gvasaliya Maya Valerianovna, Candidate of Biology, a senior researcher of the Department of Biotechnology

Federal State Budgetary Institution of Science (Federal Research Center of the Subtropical Scientific Center of the Russian Academy of Sciences), Sochi, Russia

E-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

The article presents research materials on the selection of in vitro drought tolerant somatic tea clones (Sc-4, Sc-15, Sc-27, Sc-33) obtained by induction of hemogenesis from callus tissue. Osmotic stress was modeled by adding polyethylene glycol (PEG-30.0 g/l) to the growth medium. Changes in physiological parameters during water deficiency were studied by the relative electrical conductivity and stability of cell membranes using a ST300C conductometer.

The addition of PEG to the nutrient medium caused an increase in electrical conductivity in all studied somatic tea clones, with the exception of Sc-27, in which this indicator was lower compared to the control one.

The stability of cell membranes in Sc-27 was higher compared to the control one. These data indicate a low level of damage to plant tissue. PCR analysis showed that the dehydrin 2 (DHN2) gene, one of the main genetic markers of drought response of plants, was expressed significantly higher in somaclone Sc-27. For all the parameters studied the Sc-27 somatic tea clone can be preliminarily selected as a drought tolerant genotype and can be used in a further breeding program.

Key words: *tea somaclones (Camellia sinensis (L.) Kuntze), osmotic stress, polyethylene glycol (PEG), relative conductivity, stability of cell membranes, gene expression, dehydrin 2 gene (DHN2).*

For citation: Gvasaliya M.V. Selection for dry resistance of somatic clones of tea plants (*Camellia Sinensis* L.) O. Kuntze) in *in vitro* culture // Novye Tehnologii (Majkop). 2020. Issue 3(53). P. 117-124. DOI: 10.24411/2072-0920-2020-10313.

Климатические изменения, связанные с глобальным потеплением, отрицательно влияют на устойчивость растений к абиотическим факторам окружающей среды. Влажные субтропики России отличаются неблагоприятным режимом влагообеспеченности и основным лимитирующим фактором здесь для возделывания культуры чая являются частые и продолжительные летние засухи [1, 2]. При дефиците влаги прекращается рост флешей, наблюдается массовое образование глухих непродуктивных побегов, активизируются генеративные процессы. Все это приводит

к сокращению сборов чайного листа и наступлению летнего периода покоя, что, в конечном счете, отрицательно сказывается на урожайности и качестве сырья. При наличии высокого адаптивного потенциала сорта, фазу летнего покоя, который обычно наблюдается в июне, можно свести к минимуму и снизить его последствия [3, 4, 5].

Использование биотехнологических подходов в селекции чая позволит повысить эффективность исследований при создании новых засухоустойчивых генотипов. В этом смысле, перспективным методом является клеточная селекция, которая направлена на отбор в культуре *in vitro* генотипов чая, с заранее заданными признаками [6, 7, 8, 9, 10].

Для моделирования действия осмотического стресса *in vitro* в питательную среду обычно вводится определенный селективный фактор, который представлен осмотически активными веществами, понижающими водный потенциал: маннитом, полиэтиленгликолем (*PEG*), абсцизовой кислотой (АБК), аналогами пролина [11, 12, 13, 14]. В нашей работе в результате скрининга будут получены новые генотипы растений, которые послужат ценным исходным материалом для дальнейших селекционных исследований.

Методы исследований

В качестве объектов исследований были выбраны соматические клоны растений чая (Sc-4, Sc-15, Sc-27, Sc-33), которые в течение 9 лет находились на субкультивировании *in vitro* и были получены индукцией геммогенеза из каллусной ткани. Манипуляции с пересадкой проводились в асептических условиях в ламинар-боксах. Базовой питательной средой служила модифицированная минеральная основа по прописи Мурасиге – Скуга (МС), с добавлением регуляторов роста: 6 – БАП – 3 мг/л + ГК₃ – 1,0 мл/л + мезоинозит – 100 мг/л. Культивировались соматоклоны в фитостатной, при соблюдении: фотопериода 16/8 час., температуры 25±1,0°C, влажности – 70 %, освещенности 4000-5000 Лк (лампы OSRAM L 36 W/765).

В целях отбора соматоклонов чая по признаку устойчивости к водному дефициту в питательные среды был добавлен полиэтиленгликоль (*PEG*, с молекулярной массой 6000 – 30 г/л). Изучали относительную электропроводность и стабильность клеточных мембран с использованием кондуктометра.

Электропроводность измеряли портативным кондуктометром ST300C, датчик STCON3, с поверкой (Ohaus).

Проводили 4 замера показаний через 0, 60, 120 минут после погружения листьев, а также после кипячения растительной пробы в течение 60 минут. Относительную электропроводность раствора рассчитывали по формуле: $REC = L1/L2 \cdot 100\%$, где L1 – электропроводность через 0 мин, L2 – электропроводность в остывшем растворе после кипячения на водяной бане, в течение 1 часа при 100°C.

Лабораторные исследования проводили в 3-х аналитических повторностях. Выделение РНК из свежих листьев проводили с использованием наборов реагентов Лира (Биолабмикс, Новосибирск). Качество РНК оценивали методом электрофореза в 1 % агарозном геле, концентрацию РНК определяли на приборе BioDrop μ Lite (Serva). РНК разводили и обрабатывали ДНКазой. Для подтверждения отсутствия примесей геномной ДНК применяли метод qRT-PCR. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов M-MuLV-RN (Биолабмикс, Новосибирск). Количественный анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени осуществляли на приборе LightCycler96 (Roche). ПЦР смесь готовили на основе наборов реагентов БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2 $\times$), объем смеси 12,5 мкл, в которую входило по 0,5 мкл каждого праймера.

В исследовании использовали ген дегидрин 2 – *DHN2* (главного генетического маркера ответа растений на засуху). Последовательность праймеров – F: CTTATGGCACCGGCACTAC; R: TTCCTCCTCCCTCCTTGAC. В качестве референсного гена служил *Actin* с последовательностью праймеров – F: CCATCACCAGAATCCAAGAC; R: GAACCCGAAGGCGAATAGG.

Были созданы стандартные условия для проведения ПЦР анализа: температура отжига праймеров 40°C, 35 циклов амплификации, анализ экспрессии проводили в трех биологических повторностях, данные обрабатывали с помощью программного обеспечения LightCycler96. Относительный уровень экспрессии гена рассчитывали по алгоритму: $2^{-\Delta\Delta Cq}$, где: $\Delta\Delta Cq = (Cq_{\text{gene of interest}} - Cq_{\text{internal control}})_{\text{treatment}} - (Cq_{\text{gene of interest}} - Cq_{\text{internal control}})_{\text{control}}$

Результаты исследований

Проведенные исследования показали, что при изучении физиологических параметров соматклонов чая, наиболее доступным и информативным является кондуктометрический метод, который может быть применен для отбора засухоустойчивых генотипов в культуре *in vitro*.

Использовалась селективная среда с полиэтиленгликолем (*PEG*) в концентрации (30 г/л). При добавлении *PEG* в питательную среду был индуцирован осмотический стресс, который регистрировался по повышению электропроводности тканей. Из четырех исследуемых соматклонов у Sc-27 добавление *PEG* не приводило к увеличению электропроводности тканей листа по сравнению с контролем.

Стабильность клеточных мембран также у Sc-27 с *PEG* была выше по сравнению с контролем. У всех остальных соматклонов в варианте с *PEG* происходило увеличение электропроводности и снижение стабильности клеточных мембран, что свидетельствует о повреждении тканей, которое было вызвано действием осмотического стресса (рис. 1-2).

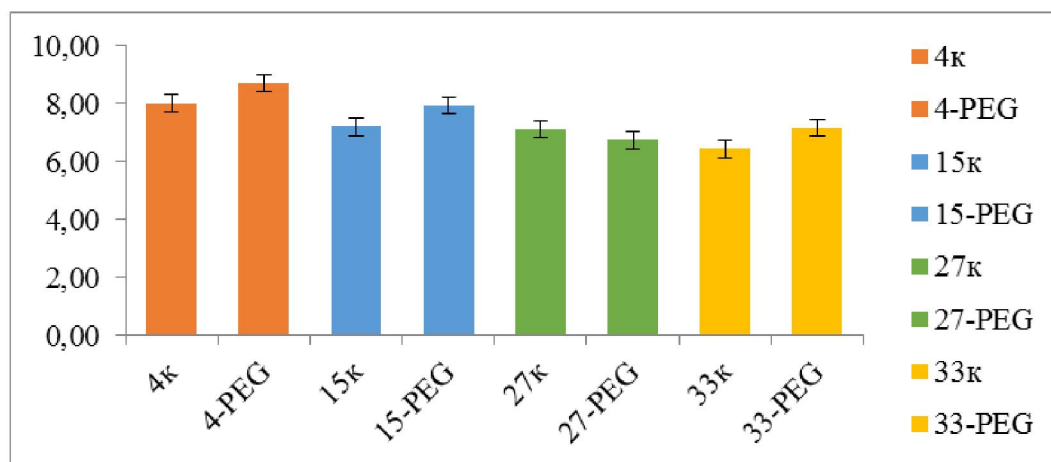


Рис. 1. Относительная электропроводность листьев соматклонов чая (Sc-4, 15, 27, 33) при индукции осмотического стресса (с PEG) в сравнении с контролем (без PEG).

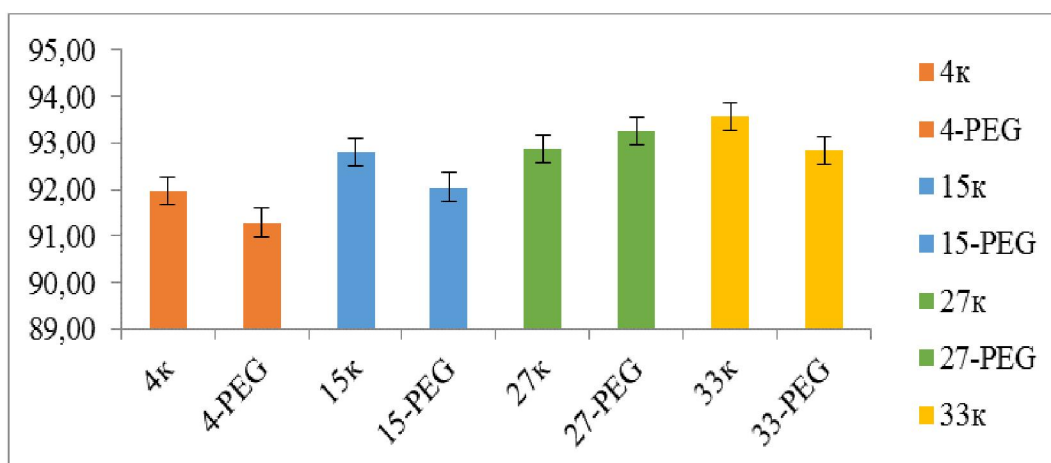


Рис. 2. Стабильность клеточных мембран листьев соматклонов чая (Sc-4, 15, 27, 33) при индукции осмотического стресса (с PEG) в сравнении с контролем (без PEG).

Проведенный ПЦР анализ показал, что при водном дефиците, вызванном добавлением PEG в питательную среду, ген дегидрин 2 (*DHN2*), который является одним из главных генетических маркеров ответа растений на засуху, экспрессировался существенно выше у соматклона Sc-27 (рис. 3).

Полученные показатели согласуются с данными по электропроводности тканей и стабильности клеточных мембран. Таким образом, можно предположить, что соматклон Sc-27 (рис. 4) отличается высокой адаптивностью к водному дефициту, однако это требует дополнительного изучения и работа в этом направлении продолжается.

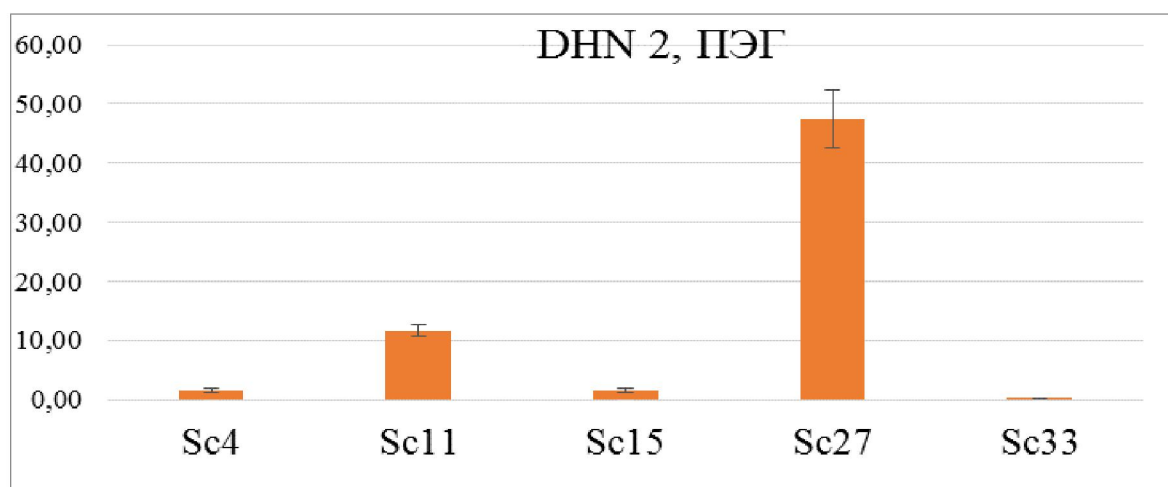
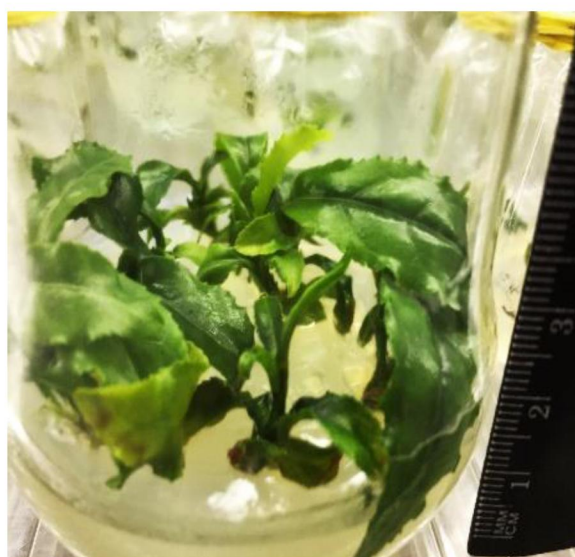


Рис. 3. Анализ уровня экспрессии гена дегидрин 2 у соматклонов чая (Sc-4, 15, 27, 33) при водном дефиците, вызванном добавлением PEG



А



В

Рис. 4. Соматический клон чая Sc-27

(А – в культуре *in vitro*; В – адаптированный к условиям *ex vitro*)

Проведенные исследования позволили установить, что при индукции осмотического стресса путем добавления PEG в питательную среду, у соматклона Sc-27 не происходило увеличения электропроводности тканей листа по сравнению с контролем, а значит и не было повреждения тканей. Среди изученных соматклонов, только Sc-27 в большей степени продемонстрировал стабильность клеточных мембран при водном дефиците. Проведенный ПЦР анализ показал, что ген дегидрин 2 (DHN2) экспрессировался существенно выше у соматклона Sc-27, что может характеризовать его как более засухоустойчивый генотип.

Литература:

1. Рындин А.В., Туов М.Т. Культивирование чая в субтропиках России // Наука Кубани. 2006. №4. С. 28-32.
2. Туов М.Т. Биология, селекция и современный сортимент чая в России // Субтропическое и декоративное садоводство. 2012. №46. С. 114-122.
3. Туов М.Т. Селекция, интродукция и сортоизучение чая в субтропиках России // Субтропические культуры. 2010. №1-4. С. 38-42.
4. Туов М.Т., Рындин А.В. Итоги изучения перспективных гибридов чая в субтропиках Российской Федерации // Субтропическое и декоративное садоводство. 2011. №44. С.101-109.
5. 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, 2015. 159 с.
6. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
7. Karunatne Seetha, Sunil Santha, Kovoov A. An *in vitro* assay for drought tolerant coconut ger plasmid // Euphytica. 1991. №53(1). P. 25-30.
8. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Биотехнологические приемы получения форм шалфея, устойчивых к осмотическому стрессу *in vitro* // Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2013. №8. С. 93-100.
9. Кунах В.А. Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сборник тезисов X международной конференции. Казань, 2013. 47 с.
10. Тимофеева О.А. Биотехнологические подходы к созданию новых форм растений: учебное пособие. Казань, 2006. С. 46-48.
11. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) / Matheka J.M. [et al] // Biotechnology. 2008. №7(4). P. 641-650.
12. Dobranszki J., Iszaly-Toth J., Hudak I. Effect of osmotic stress on *in vitro* shoot culture of peas (*Pisum sativum*) / Tabori K.M. [et al] // Acta. Hort. (ISHS). 2009. №812. P. 231-236.
13. Влияние стрессов на генетическую изменчивость культивируемых тканей растений / Долгих Ю.И. [и др.] // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сборник тезисов X международной конференции. Казань, 2013. 64 с.
14. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress / Rai M.K. [et al] // Environ. Exp. Bot. 2011. №71. P. 89-98.

Literature:

1. Ryndin A.V., Tuov M.T. The cultivation of tea in the subtropics of Russia // Science of the Kuban. 2006. No. 4. P. 28-32.
2. Tuov M.T. Biology, selection and modern assortment of tea in Russia // Subtropical and ornamental gardening. 2012. No. 46. P. 114-122.
3. Tuov M.T. Selection, introduction and variety study of tea in the subtropics of Russia // Subtropical cultures. 2010. No. 1-4. P. 38-42.
4. Tuov M.T., Ryndin A.V. Results of the study of promising tea hybrids in the subtropics of the Russian Federation // Subtropical and ornamental gardening. 2011. No. 44. P.101-109.
5. Gvasaliya M.V. Spontaneous and induced varieties and forms of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) in the moist subtropics of Russia and Abkhazia, prospects for their propagation and preservation *in vitro* culture: dis. ... Cand. of Biology. Krasnodar, 2015. 159 p.
6. Ignatova S.A. Cell technologies in crop production, genetics and breeding of cultivated plants: tasks, opportunities, development of *in vitro* systems. Odessa: Astropint, 2011. 224 p.
7. Karunatne Seetha, Sunil Santha, Kovoov A. An in vitro assay for drought tolerant coconut ger plasmids // Euphytica. 1991. No. 53(1). R. 25-30.
8. Egorova N.A., Stavtseva I.V. Biotechnological methods for obtaining forms of sage resistant to osmotic stress *in vitro* // Ecosystems, their optimization and protection. 2013. No. 8. P. 93-100.
9. Kunakh V.A. *In vitro* evolution of cell populations: features, mechanisms, driving forces, and consequences // *In vitro* plant cell Biology and Biotechnology: abstract of the Xth International Conference. Kazan, 2013. 47 p.
10. Timofeeva O.A. Biotechnological approaches to the creation of new forms of plants: a training manual. Kazan, 2006. P. 46-48.
11. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) / Matheka J.M. [et al] // Biotechnology. 2008. No. 7 (4). P. 641-650.
12. Dobranszki J., Iszaly-Toth J., Hudak I. Effect of osmotic stress on *in vitro* shoot culture of peas (*Pisum sativum*) / Tabori K.M. [et al] // Acta. Hort. (ISHS). 2009. No. 812. P. 231-236.
13. The effect of stress on the genetic variation of cultivated plant tissues / Dolgikh Yu.I. [et al.] // Biology of *in vitro* plant cells and biotechnology: collection of abstracts of the X international conference. Kazan, 2013. 64 p.
14. Developing stress tolerant plants through in vitro selection - An overview of the recent progress / Rai M.K. [et al] // Environ. Exp. Bot. 2011. No. 71. P. 89-98.