

УДК 633.72:575.155

ББК 42.8:28.087

Г-25

Гвасалия Майя Валериановна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологии, физиологии и биохимии растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»; 354002, Россия, Краснодарский край, г. Сочи, ул. Яна Фабрициуса, 2/28; e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОМАТИЧЕСКИХ КЛОНОВ
ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ МИКРОПОБЕГОВ ЧАЯ
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*
(рецензирована)**

*Проведено изучение морфометрических показателей соматических клонов, индуцированных из каллусной культуры микропобегов местной популяции чая. В условиях длительного (7-летнего) культивирования *in vitro*, при наличии дополнительной мутационной нагрузки, в виде экзогенных регуляторов роста и др. факторов, соматическая изменчивость возрастает и ей подвержены практически все основные морфологические признаки микропобегов чая. Отобрано 15 соматических клонов чая, которые превзошли исходный контрольный фенотип (местную популяцию) по комплексу морфологических признаков и могут быть вовлечены в селекционный процесс.*

Ключевые слова: *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, изменчивость *in vitro*, соматические клоны, каллусная культура, морфометрические показатели.

Gvasalia Maya Valerianovna, Candidate of Biology, a researcher of the Laboratory of Biotechnology, Plant Physiology and Biochemistry of the Federal State Budgetary Institution "All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops"; 354002, Russia, the Krasnodar Territory, Sochi, 2/28 Jan Fabricius str.; e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

**VARIABILITY OF SOMATIC CLONES INDUCED FROM TEA
MICROSPROUTS CALLUS TISSUE (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE) IN
VITRO CULTURE
(reviewed)**

*Morphometric parameters of somatic clones induced from the callus culture of the local tea population microshoots have been studied. Under conditions of long-term (7 years) cultivation *in vitro*, with additional mutational load, in the form of exogenous growth regulators and other factors, somaclonal variability increases and almost all the main morphological features of tea microshoots are affected. 15 tea somaclones have been selected, which exceeded the initial control phenotype (local population) by a complex of morphological characters and may be involved in the selection process.*

Keywords: *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, variability *in vitro*, somatic clones, callus culture, morphometric parameters.

В процессе длительного культивирования тканей и органов растений в культуре *in vitro*, возникают мутации соматических клеток [1, 2]. Мутагенную активность вызывают

различные эндогенные и экзогенные факторы: стресс при изолировании эксплантов, длительность содержания растительных тканей в нетипичных для него условиях *in vitro*, условия и режимы культивирования, наличие в питательной среде регуляторов роста, антибиотиков, минеральных солей, углеродного питания, а также тип исходного экспланта, его видовая принадлежность и генотип [3]. Из литературных данных известно, что изменчивость растений в культуре *in vitro* может достигать 20 %, а если в качестве экспланта используется ось соцветия, соматические мутации могут составить – 50 % [4].

Соматические мутации или соматическая изменчивость может быть результатом, как модификационной изменчивости, которая проявляется на фенотипическом уровне, так и точечных и хромосомных aberrаций, происходящих в ядерном, пластидном и митохондриальном геномах [5].

Большая роль в проявлении соматической изменчивости принадлежит генотипу растения. Если взять чайное растение, то в естественных условиях произрастания *in vivo* ему свойственна высокая степень пластичности и склонность к мутированию [6]. В условиях искусственного культивирования *in vitro* эта изменчивость значительно возрастает.

Для увеличения частоты и спектра мутаций в селекционном процессе широко используется каллусная культура. Каллус – это популяция соматических клеток, представляющих собой сложную, гетерогенную ткань, отличающуюся нестабильностью генома, которая в процессе культивирования *in vitro* способна к образованию клеток различной ploидности, хромосомным aberrациям и генными мутациям [7, 8, 9]. Каллусная ткань, при культивировании *in vitro*, проявляет такое уникальное свойство, как тотипотентность путем индукции геммогенеза, проходит различные стадии роста и деградации. В результате индукции геммогенеза из каллуса можно получить новые соматические варианты, отличающиеся не только по фенотипу, но и генотипу [10, 11, 12]. Следует отметить, что, несмотря на то, что соматическая изменчивость служит богатым источником вариативности для создания новых сортов и форм чая, в то же время она является серьезной помехой для содержания депонированной коллекции, когда необходимо сохранить ценные генотипы в неизменном виде [13].

Учитывая нестабильность генома каллусной ткани в процессе культивирования *in vitro*, была поставлена цель – изучить соматические клоны чая, полученные путем индукции геммогенеза из каллусной культуры микропобегов чая по основным морфологическим признакам, а также провести отбор лучших образцов.

Объекты и методы исследований

Исследования проводились в лаборатории биотехнологии растений, все операции, требующие соблюдения условий стерильности – в ламинар-боксах. Использовались общепринятые приемы по работе с изолированными тканями и органами растений. Объекты исследований – соматические клоны, полученные путем индукции геммогенеза из каллусной ткани, изолированной от базальной части микропобегов чая, которые находились в пересадочной культуре *in vitro* на протяжении 7 лет. За этот длительный период, растительные образцы подвергались воздействию различных групп токсичных стерилизующих агентов, стрессовым высоким и низким температурам, многократно пассировались на питательной среде с высокими концентрациями антибиотиков, БАП, гибберелловой кислоты, ИМК, ИУК, НУК и др. регуляторов роста, что в конечном счете не

могло не сказаться на стабильности их фенотипа и появлении форм с измененными морфологическими признаками. Соматические клоны культивировались в условиях фотопериода 16/8 час. свет/темнота, температуре $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$, влажности – 70 %, освещенности 4000-5000 лк. (с люминесцентными лампами OSRAM L 36 W/765). Базовой питательной средой служила минеральная основа по прописи Мурасиге и Скуга (МС) в сочетании с различными экзогенными регуляторами роста: 6 – БАП – 2,0; гибберелловая кислота – 1,0; НУК – 0,2; мезоинозит 100 мг/л. Проведено их изучение по основным морфометрическим показателям, согласно признакам изменчивости чайного растения по методике Бахтадзе [14, 15]. В эксперименте участвовало 15 соматклонов чая, в 3-х повторностях, по 2 образца в каждой. В качестве контроля были выбраны микропобеги исходного фенотипа – местной популяции, которые культивировались на той же среде МС. Математическая обработка полученных данных проводилась по Доспехову [16].

Результаты исследований

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что соматклональной изменчивости *in vitro* подвержены такие морфологические признаки, как высота микропобегов, количество на нем листьев, размер, окраска, форма, поверхность и кончик листа. Практически все соматклоны превосходят исходный контрольный фенотип (местную популяцию) по комплексу признаков. Так, если у местной популяции чая высота микропобега составила 0,8 см, то у выделенных соматклонов эта величина варьировала от 1,4 см у ($S_c - 3$) до 4,9 см у ($S_c - 27$), средний прирост был больше на 0,6 – 4,1 см.

Установлено различие по количеству листьев на микропобеге. У исходного фенотипа этот показатель составил 3,3 шт., у соматклонов он был от 4,3 шт. ($S_c - 4$) до 15 шт. ($S_c - 27$), т.е. на 1 – 11 листьев больше по сравнению с контролем. Все соматклоны показали отличие в сравнении с контролем по размеру листа, а это был один из основных признаков, по которому проводился отбор, поскольку мы имеем дело с листосборной культурой, и размер листа напрямую связан с урожайностью (табл. 1).

Разница в длине листа составила от 3,4 см ($S_c - 3$) до 4,9 см ($S_c - 33$). По сравнению с контролем длина листа у соматклонов была больше на 0,2-1,7 см. По этой позиции, на общем фоне заметно преимущество соматклонов: $S_c - 5$; $S_c - 11$; $S_c - 15$; $S_c - 23$; $S_c - 27$; $S_c - 33$; $S_c - 82$.

У изученных соматклонов присутствовали практически все известные варьирующие формы листа: от ланцетной, широколанцетной, до удлинненно-овальной и овальной (рис. 1). Ланцетная и широколанцетная форма листа свойственна северным – японским и китайским разновидностям чая, удлинненно-овальная и овальная – южным китайско-ассамским. Наблюдалась изменчивость по окраске листа – от зеленой до светлозеленой. Зеленая окраска свойственна китайской разновидности чая, светло-зеленая китайско-ассамской. По признаку – кончик листа, отмечены соматклоны с длинным – острым и коротким – тупым кончиком. Короткий тупой – типичная форма для китайской разновидности, длинный – острый для индийской.

Таблица 1. Морфометрические показатели соматклонов чая в культуре *in vitro*

Продолжительность культивирования – 6 месяцев. Среда Мурасиге – Скуга +6 – БАП – 2,0; гибберелловая кислота – 1,0; НУК – 0,2; мезоинозит 100 мг/л									
Соматклоны №№	Высота микро побега, см	Кол-во листьев шт.	Длина листа, см	Ширина листа, см	Форма листа	Окраска листа	Кончик листа	Поверхность листа	
1 S _c – 3	1,4±0,1	5,2±0,2	3,4±0,2	1,0±0,2	ланцетная	светло-зеленая	длинный, острый	ровная	
2 S _c – 4	1,5±0,2	4,3±0,1	3,6±0,2	1,5±0,2	удлиненно-овальная	светло-зеленая	короткий, тупой	пузырчатая	
3 S _c – 5	3,5±0,2	6,5±0,4	4,4±0,3	1,7±0,2	удлиненно-овальная	светло-зеленая	длинный, острый	пузырчатая	
4 S _c – 6	2,6±0,2	6,7±0,2	3,6±0,3	2,4±0,2	округлая	зеленая	короткий тупой	пузырчатая	
5 S _c – 11	4,8±0,3	4,3±0,5	4,7±0,3	2,4±0,2	удлиненно-овальная	зеленая	длинный, острый	пузырчатая	
6 S _c – 15	4,3±0,3	6,0 ±0,5	4,5±0,3	2,3± 0,3	удлиненно-овальная	зеленая	короткий тупой	пузырчатая	
7 S _c – 23	4,5±0,1	5,5±0,4	4,3±0,3	1,8±0,3	широко ланцетная	зеленая	длинный, острый	пузырчатая	
8 S _c – 26	3,3±0,2	6,0±0,3	4,2±0,2	2,4±0,2	удлиненно-овальная	светло-зеленая	длинный, острый	пузырчатая	
9 S _c – 27	4,9±0,3	15±0,4	4,8±0,1	2,5±0,3	удлиненно-овальная	зеленая	длинный, острый	пузырчатая	
10 S _c – 28	3,5±0,3	6,6±0,2	3,9±0,1	1,6±0,2	широко ланцетная	зеленая	длинный, острый	ровная	
11 S _c – 31	1,5±0,3	4,2±0,2	3,2±0,2	1,3±0,1	широко ланцетная	зеленая	длинный, острый	ровная	
12 S _c – 33	4,6±0,4	6,8±0,2	4,9±0,1	2,6±0,3	удлиненно-овальная	зеленая	длинный, острый	пузырчатая	
13 S _c – 76	3,1±0,3	4,0±0,2	3,8±0,3	1,6±0,3	удлиненно-овальная	светло-зеленая	короткий тупой	ровная	
14 S _c – 82	4,0±0,5	13,0±0,2	4,1±0,3	1,5±0,3	широко ланцетная	светло-зеленая	длинный, острый	пузырчатая	
15 S _c – 85	1,5±0,2	3,6±0,3	3,6±0,3	1,5±0,2	удлиненно-овальная	зеленая	короткий, тупой	пузырчатая	
Контроль местная популяция	0,8±0,2	3,3±0,2	3,2±0,2	1,0±0,2	широко ланцетная	зеленая	длинный, острый	ровная	



Рис. 1. Варьирующие признаки формы листа у соматклонов чая



S_c – 11



S_c – 5



S_c – 27



S_c – 33



S_c – 82



Исходный фенотип – местная популяция чая контроль

Рис. 2. Выделенные соматические клоны чая

Отличались соматклоны и по поверхности листа, у одних она была гладкой, у других пузырчатой. Пузырчатость листа вызвана неравномерным ростом основных жилок и мезофилла листа. Чем сильнее разрастается мезофилл, тем сильнее пузырчатость и нежнее лист. Этот признак является положительным, он коррелирует с высокими биохимическими показателями, и он свойственен 11-ти выделенным соматклонам чая. Все

они размножены микрочеренкованием *in vitro* и находятся в пересадочной культуре, часть из них культивируется на питательной среде для укоренения (рис. 2).

В заключение следует отметить, что длительность культивирования *in vitro* (7-лет), экзогенная мутационная нагрузка, в виде регуляторов роста и др. факторов, приводит к соматональной изменчивости микропобегов чая. Выделено 15 соматоклонов чая, все они могут быть вовлечены в селекционный процесс, но особый интерес представляют: S_c – 5; S_c – 11; S_c – 15; S_c – 23; S_c – 27; S_c – 33; S_c – 82. Планируется проверить выделенные соматоклоны чая на предмет соматональной изменчивости с помощью молекулярно-генетических методов исследования (в частности метода проточной цитометрии).

Литература:

1. Долгих Ю.И., Шамина З.Б. Современные представления о причинах и механизмах соматональной изменчивости // Молекулярные механизмы генетических процессов. Москва: Наука, 1991. С. 123-127.
2. Долгих Ю.И. Соматональная изменчивость растений и возможности ее практического использования: автореф. дис. ... д-ра. биолог. наук. Москва, 2005. 45 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Москва: ФБК-Пресс, 1999. 160 с.
4. Проявление соматональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений / Лебедев В.Г. [и др.] // Известия ТСХА. 2012. Вып. 1. С. 135-163.
5. Вечканов Е.М., Сорокина И.А. Основы клеточной инженерии. Ростов-на-Дону, 2012. 136 с.
6. 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. биолог. наук. Краснодар, 2015. 159 с.
7. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений. Казань, 2012. С. 3-11.
8. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. and Appl. Genet. 1981. №4. P. 197-214.
9. Morrison R., Whitaker R., Evans D. Somaclonal variation: its genetic basis and prospects for crop improvement // Opportunities Phytochem. Plant Biotechnol. 1988. P. 1-18.
10. Тимофеева И.В. Биотехнология растений. Павлодар, 2009. С. 6-9.
11. Barwale U.B., Widholm J.M. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean // Plant Cell Rep. 1987. №5. P. 36-368.
12. Кунах В.А. О возможности приложения закона гомологических рядов наследственной изменчивости Н.И. Вавилова к клеточным популяциям *in vitro* // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: сборник статистической международной научной конференции. Минск, 2014. С. 152-154.
13. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей / Сорокина И.К. [и др.]. Саратов, 2002.
14. Бахтадзе К.Е. Биология, селекция и семеноводство чайного растения. Москва: Пищепромиздат, 1948. 280 с.
15. Бахтадзе К.Е. Биологические основы культуры чая. Тбилиси: Мецниереба, 1971. 359 с.

16. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.

Literature:

1. Dolgikh Yu.I., Shamina Z.B. *Modern ideas about the causes and mechanisms of somaclonal variation // Molecular mechanisms of genetic processes. Moscow: Science, 1991. P. 123-127.*

2. Dolgikh Yu.I. *Somaclonal variability of plants and the possibility of its practical use: abstr. dis. ... Dr. of Biology. Moscow, 2005. 45 p.*

3. Butenko R.G. *Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnologies on their basis. Moscow: FBK- Press, 1999. 160 p.*

4. *Manifestation of somaclonal variability in micro-propagated and transgenic plants / V.G. Lebedev. [et al.] // Proceedings of the TAA. 2012. Vol. 1. P. 135-163.*

5. Vechkanov E.M., Sorokina I.A. *Basics of cell engineering. Rostov-on-Don, 2012. 136 p.*

6. Gvasalia M.V. *Spontaneous and induced varieties and forms of tea (Camellia sinensis (L.) Kuntze) in humid subtropics of Russia and Abkhazia, the prospects for their reproduction and preservation in vitro culture: dis. ... Cand. of Biology. Krasnodar, 2015. 159 p.*

7. Timofeeva O.A., Rumyantseva N.I. *Cell culture and plant tissue. Kazan, 2012. P. 3-11.*

8. Larkin P.J., Scowcroft W.R. *Somaclonal variation of the plant for plant improvement // Theor. and Appl. Genet. 1981. No. 4. P. 197-214.*

9. Morrison R., Whitaker R., Evans D. *Somaclonal variation // Opportunities Phytochem. Plant Biotechnol. 1988. P. 1-18.*

10. Timofeeva I.V. *Plant biotechnology. Pavlodar, 2009. P. 6-9.*

11. Barwale U.B., Widholm J.M. *Somaclonal variation in plants regenerated from soybean // Plant Cell Rep. 1987. No. 5. P. 36-368.*

12. Kunakh V.A. *On the possibility of applying the law of homologous series of N.I. Vavilov's hereditary variability to in vitro cell populations // Biotechnological techniques in biodiversity conservation and plant breeding: a compilation of the statistical international scientific conference. Minsk, 2014. P. 152-154.*

13. *Basics of plant biotechnology. Culture of plant cells and tissues / Sorokina I.K. [and etc.]. Saratov, 2002.*

14. Bakhtadze K.E. *Biology, selection and seed production of tea plants. Moscow: Pishepromizdat, 1948. 280 p.*

15. Bakhtadze K.E. *Biological basis of tea culture. Tbilisi: Metsniereba, 1971. 359 p.*

16. Dospikhov B.A. *Field experience. Moscow: Agropromizdat, 1985. 351 p.*