

Гвасалия М.В., Самарина Л.С.

**МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КАРИОТИПА ВЫДЕЛЕННЫХ *INVITRO* СОМАКЛОНОВ ЧАЯ
(*CAMELLIASINENSIS* (L.) O. KUNTZE)**

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

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и
субтропических культур», Россия

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

Самарина Лидия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и
субтропических культур», Россия

E-mail: samarinalidia@gmail.com

*Методом проточной цитометрии (на приборе цитометр, фирмы Beckman Coulter) проведено изучение генетической изменчивости кариотипа у выделенных in vitro 15 соматических клонов растений чая. Соматклоны были получены путем индукции геммогенеза из каллусной культуры микропобегов чая, находящихся в течение 8 лет в пересадочной культуре in vitro. Базовой питательной средой для культивирования соматических клонов служила модифицированная минеральная основа по прописи Мурасиге и Скуга (МС), с добавлением регуляторов роста: 6 – БАП – 2,5 мл + НУК – 0,2 мл + ГК – 1,0 мл + мезоинозит – 100 мг. Изменения кариотипа фиксировались по анализу размера генома. В качестве внешнего стандарта использовали генотип чая сорта Колхида $2n = 30$ и внешний стандарт *Allium* *sepa* $2n = 18$ (32,07 пг ДНК). В результате исследований была выявлена изменчивость по размеру генома у трех из 15 соматклонов чая. У соматклонов ($S_c - 11$; $S_c - 27$; $S_c - 33$) размер генома составил 7,26-8,70 пг (пикограмм) ДНК в сравнении с контрольным генотипом – диплоидным сортом Колхида, у которого размер генома составил 5,08 пг ДНК. Наличие соматклональной изменчивости у выделенных по фенотипическим признакам соматклонов ($S_c - 11$; $S_c - 27$; $S_c - 33$) подтвердилось на уровне кариотипа.*

Ключевые слова: *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, метод проточной цитометрии, соматклональная изменчивость in vitro, соматклоны чая, кариотип, размер генома.

Для цитирования: Гвасалия М.В., Самарина Л.С. Метод проточной цитометрии для определения кариотипа выделенных *INVITRO* соматклонов чая (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE) // Новые технологии. 2019. Вып. 3(49). С. 156-163. DOI: 10.24411/2072-0920-2019-10314.

Gvasaliya M.V., Samarina L.S.

**FLOW CYTOMETRY METHOD FOR DETERMINING
THE KARYOTYPE OF TEA SOMATIC CLONES ISOLATED
IN VITRO (CAMELLIA SINENSIS (L.) O. KUNTZE)**

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

FSBSI “All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops”, Russia

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

Samarina Lidia Sergeevna, Candidate of Biology, a senior researcher

FSBSI “All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops”, Russia

E-mail: samarinalidia@gmail.com

The method of flow cytometry (on Beckman Coulter company cytometer) has been used to study the genetic variation of the karyotype in 15 somatic clones of tea plants isolated in vitro. Somatic clones have been obtained by inducing gemmogenesis from a callus culture of tea micro sprouts, which have been in vitro root-to-seed for 8 years. The Murashige and Skoog modified mineral base (MS) with an addition of growth regulators of 6 – BAP – 2,5 ml + NAA – 0,2 ml + HA – 1,0 ml + mesoinositol – 100 mg have been the basic nutrient medium for cultivating somatic clones. Changes in the karyotype have been recorded by analysis of the genome size. The Colchis tea genotype of $2n = 30$ and the Allium cepa $2n = 18$ monitor sample (32,07 pg DNA) have been used as external standards. As a result of the studies, genome size variability has been detected in 3 of the 15 tea somatic clones. In somatic clones (Sc – 11; Sc – 27; Sc – 33) the genome size is 7,26-8,70 pg (picograms) of DNA compared with the control genotype of the diploid Colchis variety, whose genome size is 5.08 pg of DNA. The presence of somaclonal variability in somatic clones isolated by phenotypic traits (Sc – 11; Sc – 27; Sc – 33) has been confirmed at the karyotype level.

Keywords: *Camellia sinensis (L.) O. Kuntze, flow cytometry method, somaclonal variation in vitro, tea somatic clones, karyotype, genome size.*

For citation: Gvasaliya M.V., Samarina L.S. Flow cytometry method for determining the karyotype of tea somatic clones isolated *in vitro* (CAMELLIA SINENSIS (L.) O. KUNTZE) // Novye tehnologii (Majkop). 2019. Iss. 3(49). P. 156-163. (In Russ., English abstract). DOI: 10.24411/2072-0920-2019-10314.

Интенсификация отрасли чаеводства ставит перед учеными новые задачи, среди которых главной является улучшение качества отечественного чая и повышение его конкурентной способности. Не менее важная задача – реконструкция и перезакладка старых чайных насаждений, возраст которых насчитывает более 60-70 лет. В связи с этим, на освободившихся после корчевки площадях будет необходима закладка чайных плантаций новыми, элитными сортами, отличающимися не только высокой продуктивностью и биохимическими показателями сырья, но и устойчивостью к засухе и низким температурам, позволяющим выращивать культуру чая в более северных районах Краснодарского края. Для

достижения этой цели в нашем распоряжении имеются все необходимые высокотехнологичные методы, которые позволяют не только ускорить, но и повысить эффективность селекционных исследований. Методы биотехнологии располагают новым уникальным инструментом расширения генетической variability – соматической изменчивостью, основанную на культивировании растительных клеток в условиях *in vitro* [1, 2, 3].

При культивировании соматических клеток в искусственных условиях *in vitro*, благодаря процессам соматической изменчивости и Вавиловского закона о гомологических рядах наследственной изменчивости, в растениях может быть восстановлен весь скрытый генетический полиморфизм, который присущ данному виду.

Изменчивость *in vitro* это уникальный механизм не только для создания новых сортов, но и для сохранения генетического разнообразия, утраченного в процессе эволюции растений [4, 5]. Частота возникновения соматической изменчивости в культуре ткани в разы выше частоты мутаций, возникших в результате спонтанного мутагенеза. В настоящее время, гибридизация и индуцированный мутагенез уже не отвечает растущим потребностям практической селекции. Следует отметить, что даже при использовании высоких доз физических и химических мутагенов происходит подавление экспрессии большинства генов. Например, при изолировании клетки из целого организма и её переноса в искусственные условия культивирования *in vitro*, практически полностью устраняется влияние тканевых и организменных регуляторных систем, которые обеспечивают стабильность генома. Таким образом, не перенося в питательную среду сильных мутагенов, а только переведя клетки в состояние культуры *in vitro*, можно получить широкий спектр изменчивости на генетическом уровне [5, 6, 7].

Использование в селекции соматической изменчивости *in vitro* способствует получению в короткие сроки, нового высокопродуктивного сорта, причем с заранее заданными характеристиками. Например, в одном генотипе чайного растения можно соединить такие ценные для него признаки, как высокое содержание танина и экстрактивных веществ, урожайность, морозо- и засухоустойчивость. Для того, чтобы подтвердить факт возникновения соматических вариантов, необходимо изучить их по фенотипу, провести цитологические и молекулярно-генетические исследования (с использованием метода проточной цитометрии изучить кариотип по размеру генома, использовать молекулярные маркеры и т.д. [8, 9].

Методы исследований

Объектами исследований служили 15 соматических клонов, которые были получены в результате геммогенеза из базального каллуса растений чая. Соматические клоны культивировались *in vitro* в течение длительного времени (8 лет) с периодическим пассированием на новые питательные среды. Основной питательной средой служила модифицированная минеральная основа по прописи Мурасиге – Скуга (МС), с добавлением следующих концентраций регуляторов роста: 6 – БАП – 2,5 мл + НУК – 0,2 мл + ГК – 1,0 мл + мезоинозит – 100 мг. Все работы по культивированию микрополюсов чая проводились в условиях строгой стерильности, в специально отведенном помещении, в

ламинар-боксах. Соблюдался фотопериод – 16/8 час., температура $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$, влажность – 70 %, освещенность 4000-5000 лк.

Для определения кариотипа, выделенных по фенотипическим отличиям соматклонов чая, применяли метод проточной цитометрии с использованием прибора цитометра Beckman Coulter. В качестве внешнего стандарта использовали генотип чая сорта Колхида $2n = 30$ и внешний стандарт *Allium* сера $2n = 18$ (32,07 пг ДНК). Изменения кариотипа фиксировались по анализу размера генома. Для этого 160 мг свежих листьев чая помещали в 800 мкл холодного буфера, измельчали лезвием в кашицу в чашке Петри. Состав буфера для экстракции ядер WPB (Loureiro et al., 2007): 0,2 М Tris HCl, 4 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mM EDTA $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$, 86 mM NaCl, 10 mM метабисульфит Na, 1,5% Triton X-100, 2% PVP-10, pH 7,5. Суспензию ядер фильтровали с помощью мембран Sartorius (Германия), размером по 40 мкм. Иодид пропидия 30 мкг/мл был взят в качестве красителя (с предобработкой РНКазой мкг/мл), время окрашивания 40 минут.

Результаты исследований

Изменения на уровне кариотипа изучались методом проточной цитометрии по результатам анализа размера генома соматклонов чая. Метод проточной цитометрии основан на степени дисперсии света лазерного луча, которая дает представление о размерах клетки. При проведении этого метода используют внешние стандарты таких культур как лук, редис, пшеницу. В нашем случае был выбран лук *Allium* сера $2n = 18$ (3,2 пг ДНК) (рис. 1).

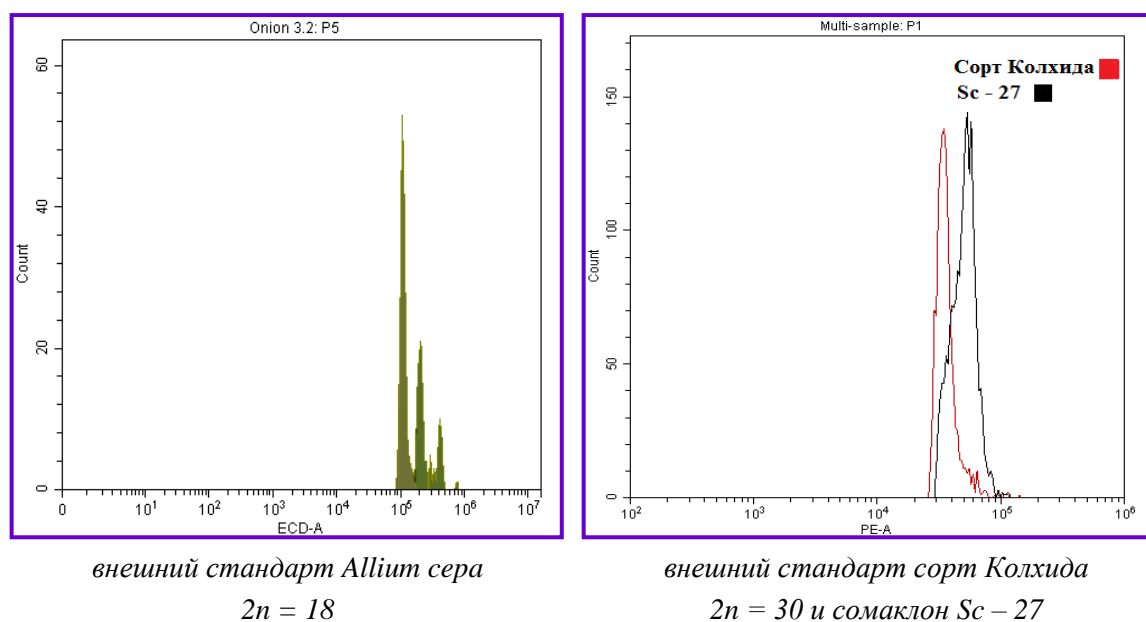


Рис. 1. Диаграмма проточной цитометрии

Размер генома измеряется в пикограммах (это 10^{-12} г). Зная размер генома лука и его диплоидный набор хромосом, мы провели калибровку цитометра, и настроили его на работу. Далее по пропорции и формуле вычислили размер генома Колхиды, который составил 5,08 пг, прогнали образцы через цитометр, получили пики, по которым в дальнейшем проводили сравнение соматклонов.

Из 15 выделенных соматклонов, исследования были проведены на 3-х, которые имели самое яркое фенотипическое отличие от исходного генотипа (рис. 2).

Предварительные результаты исследований показали, что все три соматклона показали отличие как между собой, так и по сравнению с сортом Колхида (рис. 3).

Так размер их геномов составил 7,26 – 8,0 – 8,70 пг ДНК, что больше на 2,2 – 2,9 – 3,6 пг по сравнению с диплоидным сортом Колхида, размер генома которого составил 5,08 пг ДНК.



S_c – 11



S_c – 27



Sc - 33

Рис. 2. Соматклоны чая: Sc - 11; Sc - 27; Sc - 33

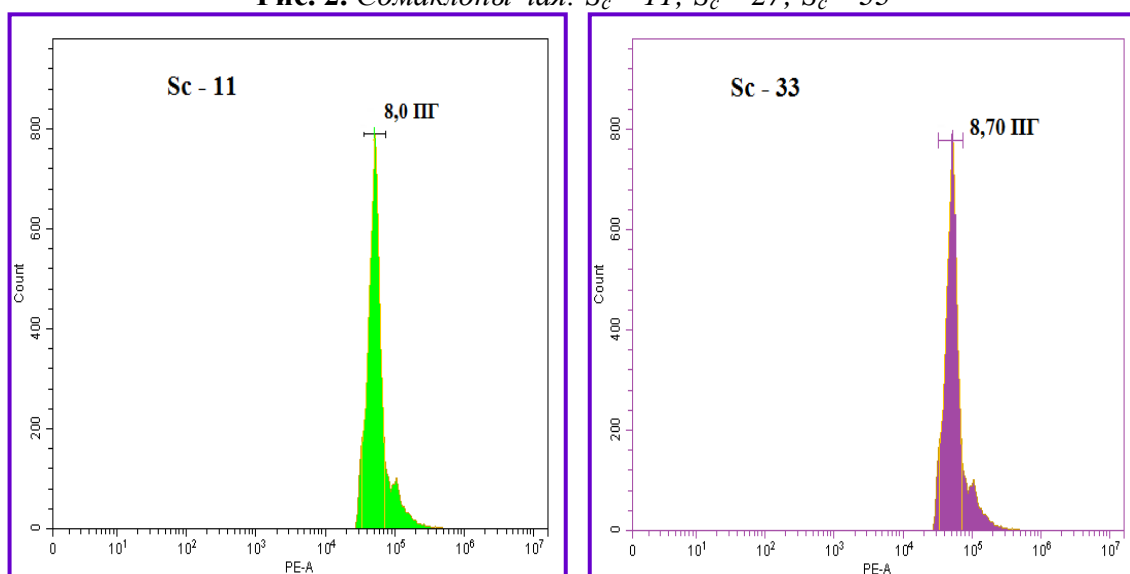


Рис. 3. Диаграмма проточной цитометрии соматклонов чая:
Sc - 11 (8,0 пг ДНК) и Sc - 33 (8,7 пг ДНК)

Таким образом, метод проточной цитометрии подтвердил наличие соматклональной изменчивости как на уровне фенотипа, так и на уровне кариотипа по размеру генома у 3-х из 15 выделенных соматклонов чая.

Литература:

1. Гвасалия М.В. Биотехнологические приёмы в селекции чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: материалы XII Международной конференции (6-10 июня 2016 г., Ялта). М.: РУДН, 2016. С. 308-311.
2. Гвасалия М.В. Сохранение уникальных сортов растений чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) методами биотехнологии // Субтропическое и декоративное садоводство. 2016. Вып. 59. С. 100-106.
3. Соматклональная вариабельность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn / Баер Г.Я. [и др.] // Цитология и генетика. 2007. №4. С. 9-14.

4. Кунах В.А. Эволюция клеточных популяций *invitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия // Биология клеток растений *invitro* и биотехнология: сборник тезисов X Международной конференции (Казань, 14-18 октября). Казань, 2013. С. 47.

5. Долгих Ю.И. Соматоклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2005. 45 с.

6. Леонова Н.С. Изменчивость в культуре картофеля (*Solanum tuberosum* (L.) *invitro* и возможности её использования в селекции и семеноводстве: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Улан-Удэ, 2010. 32 с.

7. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. Минск: БГУ, 2007. 102 с.

8. 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.

9. 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.

Literature:

1. Gvasaliya M.V. Biotechnological techniques in tea selection of (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) // New and non-traditional plants and prospects for their use: materials of the XII International Conference (June 6-10, 2016, Yalta). M.: RUDN, 2016. P. 308-311.

2. Gvasalia M.V. Preservation of unique tea varieties (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) using biotechnological methods // Subtropical and ornamental Gardening. 2016. Issue. 59. P. 100-106.

3. Somaclonal variability as a source for creating new varieties of *Eleusine coracana* (L.) Gaertn finger millet / Bayer G.Ya. [et al.] // Cytology and Genetics. 2007. No. 4. P. 9-14.

4. Kunakh V.A. *Invitro* cell population evolution: features, mechanisms, driving forces and consequences // *Invitro* plant cell Biology and Biotechnology: collection of abstracts of X International Conference (Kazan, October 14-18). Kazan, 2013. P. 47.

5. Dolgikh Yu.I. Somaclonal variability of plants and the possibility of its practical use (on the example of corn): abstr. of diss. ... Dr. of Biology. M., 2005. 45 p.

6. Leonova N.S. Variability in potato cultivation (*Solanum tuberosum* (L.) *in vitro* and the possibility of its use in Breeding and Seed production: abstract of diss. ... Dr. of Biology. Ulan-Ude, 2010. 32 p.

7. Ditchenko T.I. Culture of cells, tissues and organs of plants. Minsk: BSU, 2007. 102 p.

8. 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.

9. 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.