

УДК 633.72:631.521

UDC 633.72:631.521

DOI 10.30679/2219-5335-2020-4-64-210-218

DOI 10.30679/2219-5335-2020-4-64-210-218

**ПРОТОКОЛ
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
РАСТЕНИЙ ЧАЯ
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)
IN VITRO**

**MULTIPLICATION
PROTOCOL
OF TEA PLANTS
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)
IN VITRO**

Гвасалия Майя Валериановна
канд. биол. наук
ст. научный сотрудник
отдела биотехнологии растений
e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

Gvasaliya Maya Valerianovna
Cand. Biol. Sci.
Senior Research Associate
of Biotechnology Plant Department
e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

*Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр
Российской академии наук»
Сочи, Россия*

*Federal Research
Centre the Subtropical
Scientific Centre
of the Russian Academy
of Sciences,
Sochi, Russia*

В настоящем исследовании приведены данные экспериментов, которые направлены на оптимизацию протокола по использованию разных комбинаций фитогормонов (6-БАП, ГК₃) на процесс умножения микропобегов чая в культуре *in vitro*. Субкультивирование проводилось с регулярными интервалами от четырёх до 16 недель (четыре субкультуры). При добавлении в питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга регулятора роста БАП было установлено, что на количество произведенных побегов значительное влияние оказывала его концентрация – 3 мг/л. При повышении дозы до 5 мг/л фиксировалось ингибирование размножения, вследствие пролиферации каллусной ткани. В серии опытов с комбинацией различных концентраций БАП и ГК₃ наблюдалось умножение микропобегов на всех вариантах, по сравнению с экспериментом, где присутствовал только один БАП. Лучший эффект от добавления ГК₃ по среднему количеству полученных микропобегов отмечен на четвертой субкультуре с концентрацией

In this study, we present the experimental data of optimizing the protocol for using different combinations of phytohormones (6-BAP, GA₃) to increase in tea microshoots *in vitro* culture. Subculturing was done in regular intervals from four to 16 weeks (four subcultures). It was found that adding growth regulator BAP to the nutrient medium, according to the prescription of Murashige-Skoog, the concentration of 3 mg/l had a significant effect the number of producing shoots. With an increase dose up to 5 mg/l, due of callus tissue proliferation, the inhibition of reproduction were recording. In the variants of experiments, with combination of different concentrations of BAP and GA₃, microshoots multiplication was observed, in comparison with the experiment when BAP was not presented. The best effect of the GA₃ addition in the average number of producing microshoots was demonstrated in the fourth subculture BAP

БАП 3 мг/л + ГК₃ 0,5-1 мг/л (7-7,4 шт/экспл.) При этом гибберелловая кислота способствовала не только увеличению количества адвентивных микропобегов, но и их пролиферации в высоту, что может быть использовано не только для дальнейшей мультипликации и сокращения переходного периода к ризогенезу. Уменьшение выхода микропобегов с одного экспланта, удлинение их меристемы, изменение морфологии, появление признаков фасциации связано с использованием более высоких концентраций БАП (5-7 мг/л). По выходу зеленой массы с одного экспланта наблюдался разброс в результатах между различными комбинациями регуляторов роста. Самый большой вес зелёной массы (385 мг) был получен на среде MS + 5 мг/л БАП + 1 мг/л ГК₃. Наличие БАП (7мг/л) + ГК₃ (0,5-1 мг/л) способствовало нарастанию каллуса, что явилось причиной снижения веса зелёной массы.

Ключевые слова: РАСТЕНИЕ ЧАЯ, ЭКСПЛАНТЫ, МИКРОПОБЕГИ, ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, ПРОТОКОЛ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ, РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ

in concentration of 3 mg/l + GA₃ 0,5 – 1 mg/l (7-7,4 qt./expl.) At the same time, gibberellic acid supported not only increasing in the quantity of adventitious microshoots, but also its proliferation in height, and it can be used for further multiplication, and shortening of rhizogenesis stage. A decrease in the microshoots quantity from one explant, lengthening of their meristem, morphology changing, and the appearance of fasciation symptoms are associated with the use of BAP higher concentrations (5-7 mg/l). On the green mass from one explant, there was a distinction in the results between different combinations of growth regulators. The largest green mass weight (385 mg), on nutrient medium of MS + 5 mg/l BAP + 1 mg/l GA₃ was obtained. The presence of BAP (7 mg/l) + GA₃ (0,5-1 mg/l) supported to callus growth, which was the reason for the green mass weight decrease.

Key words: TEA PLANTS, EXPLANTS, MICROSHOOTS, NUTRIENT MEDIUM, MULTIPLICATION PROTOCOL, PLANT GROWTH REGULATORS

Введение. Метод вегетативного размножения растений чая, разработанный советскими учеными, открыл большие перспективы в деле получения генетически однородного посадочного материала для создания сортовых промышленных чайных плантаций. Вегетативное размножение исключает возможность появления низкоурожайных форм и гибридов [1-3]. Однако у этого метода есть свои недостатки, связанные прежде всего с большими материальными затратами при строительстве специализированных камер, их оснащении туманообразующими установками, подготовкой почвы, накоплением и передачей инфекции.

Метод клонального микроразмножения чая в культуре *in vitro* устраняет многие из этих проблем, но самое главное –благодаря высокому коэффициенту размножения способствует не только сохранению генофонда, но и быстрому его размножению [4-8]. В настоящее время в зарубежных публикациях приводится описание самых разных протоколов микроразмножения, где в частности большое значение отводится особенностям генотипа [9-15].

Важно модифицировать существующие протоколы с учетом генетических особенностей растений чая, произрастающих в нашей зоне. Вместе с тем, необходимо разработать менее дорогостоящий протокол, с заменой или комбинацией используемых регуляторов роста, с возможностью сокращения основных этапов размножения, позволяющих снизить производственные затраты [16-18]. В этом исследовании взяты за основу комбинированные методики в целях создания эффективного и экономичного протокола микроразмножения растений чая сорта Колхида.

Объекты и методы исследований. Питательную среду готовили на основе прописи Мурасиге-Скуга (МС) с использованием стандартных солей [19], рН устанавливали на уровне 5,8 путем добавления КОН (1 н.) или HCL (1 н.). Объектами исследований служили микропобеги чая сорта Колхида, находящиеся в течение 9 лет на субкультивировании *in vitro*. Выращивали их в стеклянных сосудах при 65-70 % относительной влажности, температурном режиме 25 ± 2 °С, освещении люминесцентными лампами дневного света (OSRAM L 36 W/765), фотопериодом 16/8 час.

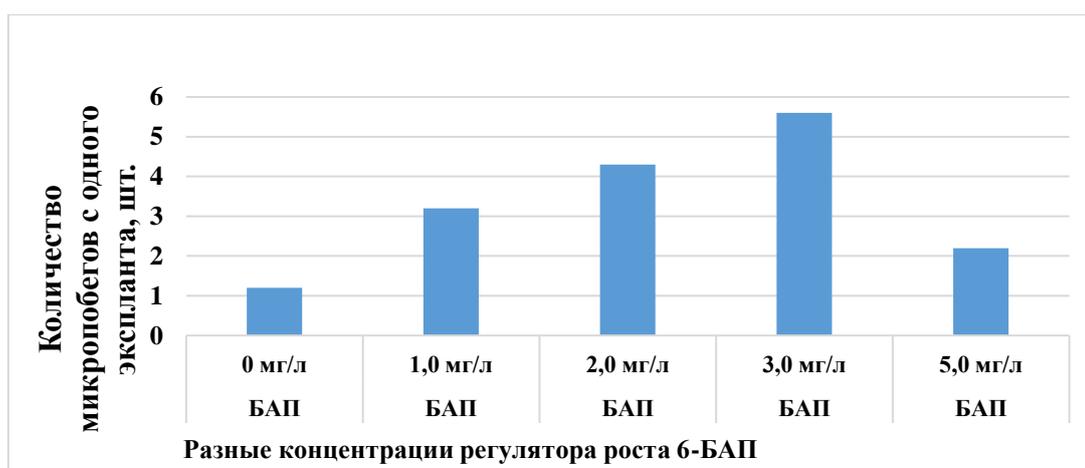
Каждые четыре недели проводилась пересадка микропобегов на новые питательные среды (4 субкультуры). В 1 серии опытов для размножения использовалась среда МС с добавлением БАП в концентрации 0 (контроль), 1, 2, 3, 5, мг/л (4 варианта, 4 повторности, 20 стеклянных сосудов в каждой). Во второй серии опытов: 8 вариантов, 4 повторности, 20 стеклянных сосудов в каждой.

Использовалась комбинация БАП с ГК₃ в следующих концентрациях:

Контроль	Вариант I	Вариант II	Вариант III
БАП –1 мг/л	БАП –3 мг/л	БАП –5мг/л	БАП –7 мг/л
ГК ₃ – 0,5 мг/л			
ГК ₃ – 1 мг/л			

Через 3-4 недели производился подсчет среднего количества микропобегов, индуцированных с 1 экспланта. В третьей серии экспериментов (8 вариантов, 4 повторности, 20 стеклянных сосудов в каждой) в стерильных условиях ламинар-бокса проводилось взвешивание в мг (на электронных весах) свежей массы микропобегов. Среднее количество побегов на эксплант для всех комбинаций БАП и ГК₃ в каждой субкультуре объединяли и использовали для сравнения среди субкультур посредством дисперсионного анализа. Результаты обработаны статистическими методами в приложении Microsoft Excel, при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Обсуждение результатов. При проведении опытов с добавлением в питательную среду регулятора роста БАП было установлено, что на количество произведенных побегов значительное влияние оказывала его концентрация (рис. 1).



НСР₀₅ – 0,7

Рис. 1. Влияние концентраций БАП в питательной среде МС на получение максимального количества микропобегов с одного экспланта

Наибольшее количество побегов с одного экспланта – в среднем 5,6 шт. было получено при добавлении БАП – 3 мг/л. Использование БАП в данной концентрации является необходимым условием для микроразмножения чайного растения (рис. 2).

На контроле умножения в побегообразовании не наблюдалось, был отмечен рост всего одного побега. В варианте с высокой концентрацией БАП – 5 мг/л пролиферация каллусной ткани ингибировала размножение.

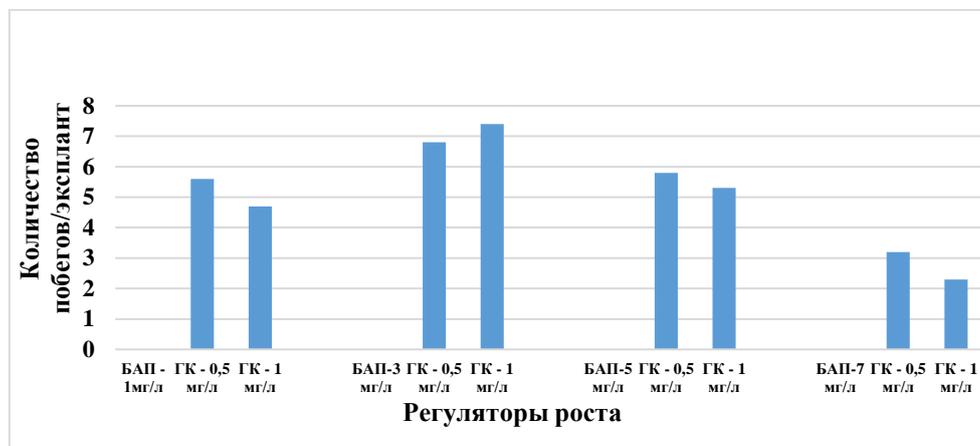


Рис. 2. Микроразмножение чайного растения при добавлении в питательную среду МС + 3 мг/л БАП

В эксперименте с добавлением в питательную среду МС различных концентраций БАП в комбинации с ГК₃ наблюдалось умножение микропобегов на всех вариантах, по сравнению с опытом, где присутствовал только один БАП (см. рис. 1).

Так, при наличии в среде только БАП (3 мг/л) коэффициент размножения составил в среднем 5,6 микропобегов/эксплант, в сочетании с ГК₃ количество микропобегов увеличилось до 6,8-7,4 шт./экспл. (рис. 3). Таким образом, положительный эффект от добавления ГК₃ по среднему количеству произведенных микропобегов отмечен на четвертой субкультуре на среде с концентрацией БАП 3 мг/л + ГК₃ – 0,5-1 мг/л (6,8-7,4 шт/экспл.). При этом гибберелловая кислота способствовала не только дополнительному увеличению количества адвентивных микропобегов, но и их пролиферации в высоту, что

может быть использовано для дальнейшего размножения во время субкультуры, а также сокращения переходного периода к ризогенезу (рис. 4).



НСР₀₅ – 0,8

Рис. 3. Влияние различных концентраций БАП в сочетании с ГКЗ (мг/л) на количество полученных микропобегов с одного экспланта (шт.)

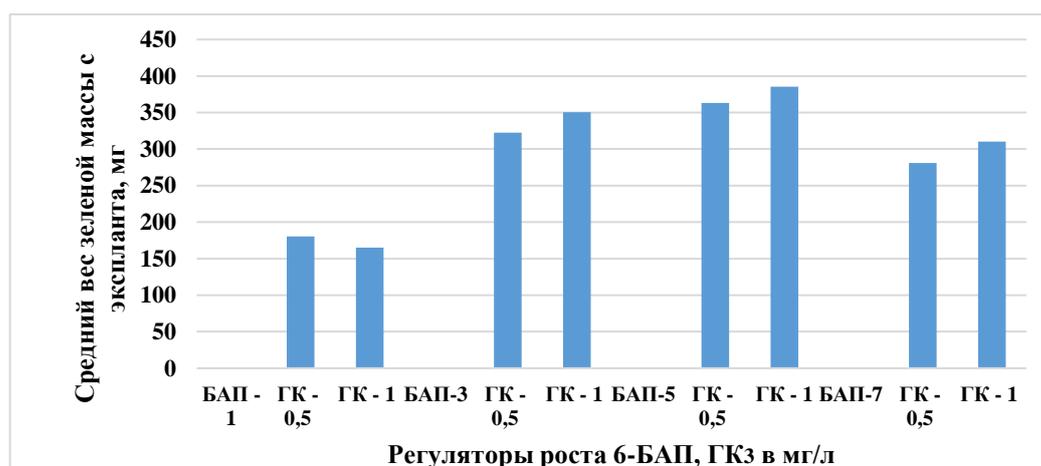


Рис. 4. Микроразмножение чая на питательной среде МС в комбинации с БАП –3 мг/л + ГКЗ – 1 мг/л

Уменьшение количества микропобегов, удлинение их меристемы, изменение морфологии, появление признаков фасциации связано с использованием более высоких концентраций БАП (5-7 мг/л).

Увеличение процесса пролиферации с гормонами роста было зафиксировано уже после 14 дней культивирования. Хотя наблюдались различия в ответе эксплантов на наличие регуляторов роста растений в более ранней субкультуре, результаты, представленные здесь, отражают их мультипликацию после четырех субкультур на основе производительности с одного побега, а не как совокупный выход после четырех субкультур.

Для подтверждения данных о количестве полученных микропобегов с одного экспланта были проведены исследования по изучению среднего веса их зеленой массы. По этой позиции результаты показали весьма значимые различия между различными комбинациями регуляторов роста. Самый большой вес, в расчете на один эксплант (385,3 мг), был получен на среде МС с добавлением 5 мг/л БАП в сочетании с 1 мг/л ГК₃ в четвертой субкультуре (рис. 5).



НСР₀₅ – 12,2

Рис. 5. Средний вес зелёной массы с одного экспланта на питательной среде с различными комбинациями регуляторов роста

Причем во 2 и 3 вариантах вес зелёной массы увеличивался с повышением концентрации БАП до 5 мг/л и ГК₃ до 1 мг/л. Это связано с увеличением количества микропобегов и их удлинением в высоту. Концентрация БАП 7 мг/л вызывала активный рост каллуса и ингибирование пролиферации микропобегов, что явилось причиной уменьшения их массы.

Заключение. В результате оптимизации протокола микроразмножения растений чая в культуре *in vitro*, с использованием разных комбинаций регуляторов роста, было установлено, что для максимального воспроизводства микропобегов чая (7,4 шт./эксплант) необходимо сочетание в питательной среде БАП и ГК₃ (3,0 мг/л – 1,0 мг/л соответственно).

Литература

1. Рындин А.В., Туов М.Т. Научное обеспечение чаеводства в России и приоритетные направления исследований для дальнейшего развития отрасли // Субтропическое и декоративное садоводство, 2010. Т. 43. № 1. – С. 6-10.
2. Рындин А.В. Выведение новых сортов чая – инновационное направление селекционного процесса // Садоводство и Виноградарство, 2007. № 3. С. 23-24.
3. Рындин А.В., Туов М.Т. Культивирование чая в субтропиках России // Наука Кубани, 2006. № 4. С. 28-32.
4. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. Барнаул: Алтайский ГУ, 2014. 250 с.
5. Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Садоводство и ягодоводство России: сб. науч. раб. ГНУ ВСТИСП. Т. XXVI. М., 2011. С. 3-10.
6. Гвасалия М.В. Сохранение уникальных сортов растений чая (*Camellia sinensis* L.) Kuntze) методами биотехнологии // Субтропическое и декоративное садоводство. 2016. Вып. 59. С. 100-106.
7. Гвасалия М.В. Клональное микроразмножение растений чая в культуре *in vitro* // Садоводство и виноградарство. 2013. № 4. С. 20-22.
8. Микроразмножение *in vitro* субтропических, декоративных культур и эндемиков Западного Кавказа: оригинальные и оптимизированные протоколы / Т.М. Коломиец [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 3. С. 49-58.
9. Agarwal B., Singh U., Banerjee M. In vitro clonal propagation of tea (*Camellia sinensis* L.) // Plant Cell Tissue and Organ Cult., 1992. – V. 30. – № 30. – P. 1-5.
10. Mondal T. K., Bhattacharya A., Sood A., Ahuja P.S. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using thidiazuron // Plant Growth Regulation, 1998. – V. 26. – № 1. – P. 57–61.
11. Jha T., Sen S. K. Micropropagation of an elite Darjeeling tea clone // Plant Cell Reports, 1992. – V. 11. – № 2. – P. 101-104.
12. Vieitez A. M., Vieitez M. L., Ballester A., Vieitez E. Micropropagation of *Camellia* spp. // Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer, 1992. – P. 361-387.
13. Mondal T. K. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis*) // Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. – 2003. – P. 671-720.
14. Mondal T. K., Bhattacharya A., Laxmikumaran M., Ahuja P. S. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004. – V. 76. – № 3. – P. 195-254.
15. Azadi Gonbad SR., Fatemi Chokami A. Effects of plant growth regulators on rooting of tea cuttings (*Camellia sinensis*) clone 100 Iran // Asian Journal of Chemistry, 2009. – V. 21. – № 4. – P. 3298-3300.
16. Sandal I., Bhattacharya A., Ahuja P. S. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001. – V. 65. – № 1. – P. 75-80.
17. Borchetia S. C., Das P. J., Handique, Das S. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.) // Scientia Horticulturae, 2009. – V. 120. – № 4. – P. 544-550.
18. Sun J., Lei P.D., Zhang Z. Z., et all. Shoot basal ends as novel explants for *in vitro* plantlet regeneration in an elite clone of tea // Horticultural Science and Biotechnology, 2012. – V. 87. – № 1. – P. 71-76. <http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2012.11512833>.
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962. – V. 15. – № 3. – P. 473-497.

References

1. Ryndin A.V., Tuov M.T. Nauchnoe obespechenie chaevodstva v Rossii i prioritetye napravleniya issledovaniy dlya dal'nejshego razvitiya otrasli // Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo, 2010. T. 43. № 1. – S. 6-10.
2. Ryndin A.V. Vyvedenie novyh sortov chaya – innovacionnoe napravlenie selekcionnogo processa // Sadovodstvo i Vinogradarstvo, 2007. № 3. S. 23-24.
3. Ryndin A.V., Tuov M.T. Kul'tivirovanie chaya v subtropikah Rossii // Nauka Kubani, 2006. № 4. S. 28-32.
4. Vechernina N.A., Tavartkiladze O.K. Metody biotekhnologii v selekcii, razmnozhenii i sohranении genofonda rastenij. Barnaul: Altajskij gos. Univeritet, 2014. 250 s.
5. Vysockij V.A. Biotekhnologicheskie priemy v sovremennom sadovodstve // Sadovodstvo i yagodovodstvo Rossii: sb. nauch. rab. GNU VSTISP. T. XXVI. M., 2011. S. 3-10.
6. Gvasaliya M.V. Sohranenie unikal'nyh sortov rastenij chaya (*Camellia sinensis* L.) Kuntze) metodami biotekhnologii // Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo. 2016. Vyp. 59. S. 100-106.
7. Gvasaliya M.V. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij chaya v kul'ture *in vitro* // Sadovodstvo i vinogradarstvo. 2013. № 4. S. 20-22.
8. Mikrorazmnozhenie *in vitro* subtropicheskikh, dekorativnyh kul'tur i endemikov Zapadnogo Kavkaza: original'nye i optimizirovannye protokoly / T.M. Kolomiec [i dr.] // Sel'sko-hozyajstvennaya biologiya. 2014. № 3. S. 49-58.
9. Agarwal B., Singh U., Banerjee M. *In vitro* clonal propagation of tea (*Camellia sinensis* L.) // Plant Cell Tissue and Organ Cult., 1992. – V. 30. – № 30. – P. 1-5.
10. Mondal T. K., Bhattacharya A., Sood A., Ahuja P.S. Micro-propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using thidiazuron // Plant Growth Regulation, 1998. – V. 26. – № 1. – P. 57–61.
11. Jha T., Sen S. K. Micropropagation of an elite Darjeeling tea clone // Plant Cell Reports, 1992. – V. 11. – № 2. – P. 101-104.
12. Vieitez A. M., Vieitez M. L., Ballester A., Vieitez E. Micropropagation of *Camellia* spp. // Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer, 1992. – P. 361-387.
13. Mondal T. K. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis*) // Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. – 2003. – P. 671-720.
14. Mondal T. K., Bhattacharya A., Laxmikumaran M., Ahuja P. S. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004. – V. 76. – № 3. – P. 195-254.
15. Azadi Gonbad SR., Fatemi Chokami A. Effects of plant growth regulators on rooting of tea cuttings (*Camellia sinensis*) clone 100 Iran // Asian Journal of Chemistry, 2009. – V. 21. – № 4. – P. 3298-3300.
16. Sandal I., Bhattacharya A., Ahuja P. S. An efficient liquid cul-ture system for tea shoot proliferation // Plant Cell, Tissue and Organ Cul-ture, 2001. – V. 65. – № 1. – P. 75-80.
17. Borchetia S. C., Das P. J., Handique, Das S. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.) // Scientia Horticulturae, 2009. – V. 120. – № 4. – P. 544-550.
18. Sun J., Lei P.D., Zhang Z. Z., et all. Shoot basal ends as novel explants for *in vitro* plantlet regeneration in an elite clone of tea // Horticultural Science and Biotechnology, 2012. – V. 87. – № 1. – P. 71-76. <http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2012.11512833>.
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962. – V. 15. – № 3. – P. 473-497.