

УДК 633.72+581.1:57

Гвасалия Майя Валериановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки (Федерального исследовательского центра субтропического научного центра РАН)

**СЕЛЕКЦИЯ НА ВЫДЕЛЕНИЕ
ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ ГЕНОТИПОВ ЧАЯ (*CAMELLIA SINENSIS* (L.)
O. KUNTZE)
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Для моделирования осмотического стресса в питательную среду добавляют вещества, которые вызывают водный дефицит у культивируемых *in vitro* растений [1-4]. В нашем случае, при отборе *in vitro* толерантных к засухе соматических клонов чая использовался полиэтиленгликоль (PEG – 30,0 г/л, молекулярная масса 6000). Применение биотехнологических подходов в селекции чая позволит повысить эффективность исследований при создании новых засухоустойчивых сортов[5-7].

Объектами исследований служили соматические клоны 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. 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. Изменения физиологических параметров при водном дефиците изучали по показателям относительной электропроводности и стабильности клеточных мембран, с использованием кондуктометра ST300С, датчик STCON3, с поверкой (Ohaus). Относительную электропроводность раствора рассчитывали по формуле: $REC = L1/L2 * 100\%$. Качество РНК оценивали методом электрофореза в 1 % агарозном геле, концентрацию РНК определяли на приборе BioDrop μ Lite

(Serva). Для количественного анализа экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени использовали прибор LightCycler 96 (Roche). 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. Относительный уровень экспрессии гена рассчитывали по алгоритму: $2^{-\Delta\Delta Cq}$, где: $\Delta\Delta Cq = (Cq_{gene\ of\ interest} - Cq_{internal\ control})_{treatment} - (Cq_{gene\ of\ interest} - Cq_{internal\ control})_{control}$

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 (рис.1 – 2).

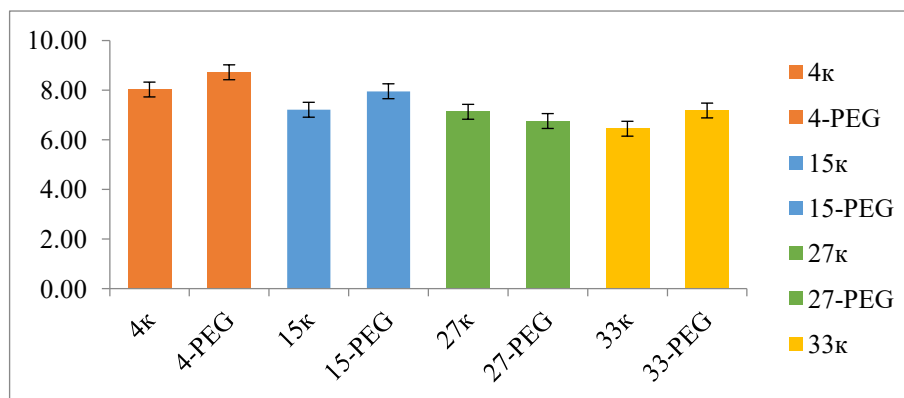


Рис. 1. Относительная электропроводность листьев соматических клонов чая (Sc-4, 15, 27, 33) при индукции осмотического стресса (с PEG) в сравнении с контролем (без PEG).

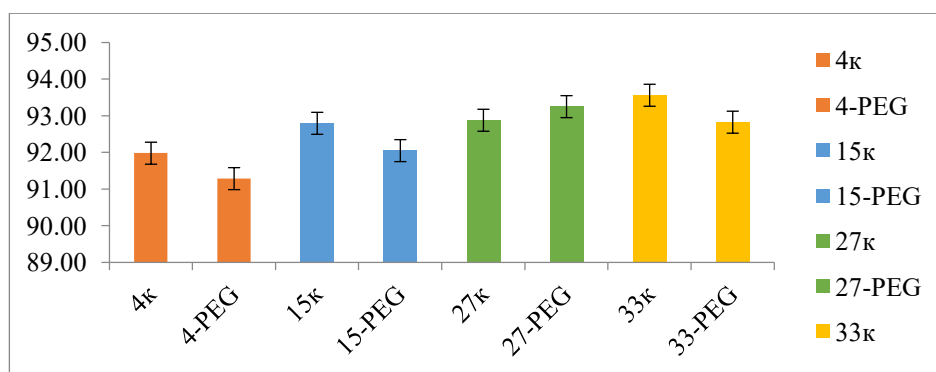


Рис. 2. Стабильность клеточных мембран листьев соматклонов чая (Sc-4, 15, 27, 33) при индукции осмотического стресса (с PEG) в сравнении с контролем (без PEG).

Проведенный ПЦР анализ показал, что ген дегидрин 2 (DHN2), который является одним из главных генетических маркеров ответа растений на засуху, экспрессировался существенно выше у соматклона Sc-27 (рис.3).

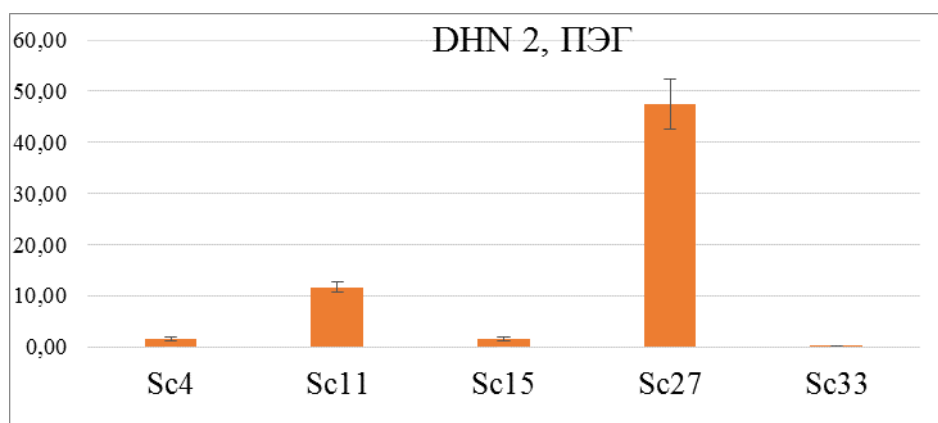
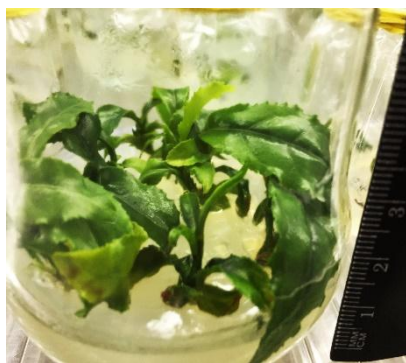


Рис. 3. Анализ уровня экспрессии гена дегидрин 2 у соматклонов чая (Sc-4, 15, 27, 33) при водном дефиците, вызванном добавлением PEG

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



А



В

Рис. 4. Соматический клон чая Sc-27 (А – в культуре *in vitro*; В – адаптированный к условиям *ex vitro*)

Таким образом, 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. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. – Одесса: Изд-во Астропринт, 2011. – 224 с.
2. Karunatne Seetha, Sunil Santha, Kovoov A. An *in vitro* assay for drought tolerant coconut ger plasmii // Euphytica. – 1991. № 53(1). – P.25-30.
3. 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.
4. Кунах В.А. Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сбор. тез. X междунар. конф. Казань. – 2013. – 47 с.

5. Matheka J. M., Magiri E., Rasha A. O., Machuka J. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) // *Biotechnology*. – 2008. – №7 (4). – P.641-650.
6. Tabori K. M., Dobranszki J., Iszaly-Toth J., Hudak I. Effect of osmotic stress on *in vitro* shoot culture of peas (*Pisum sativum*) // *Acta. Hort. (ISHS)*. – 2009. – № 812. – P. 231-236.
7. 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 // *Environ. Exp. Bot.* – 2011. – №71. –P. 89-98.