

**КУЛЬТУРА ЧАЯ
В ДЕПОНИРОВАННОЙ *IN VITRO*-КОЛЛЕКЦИИ
ВНИИЦСК**

Гвасалия М. В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,
г. Сочи, Россия, e-mail: subplod@mail.ru*

ВНИИЦСК является единственным в России держателем коллекции *in vitro*-культуры чая. На депонировании микропобеги чая находятся в 2 режимах культивирования: в пересадочной культуре – на питательной среде М – С + 6 – БАП – 2,0 + НУК – 0,2 + ГК – 1,5 мл + мезоинозит – 100 мг/л; и на среднесрочном хранении, с приостановкой роста (в течение 12 месяцев), в условиях холодильной камеры, на ½ безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга, при температуре + 8 °С, освещённости 800 лк, световом режиме 16/8 ч. Выращенные в условиях лаборатории микрорастения чая служат исходным материалом для микроразмножения, обмена генофондом, а также для селекционных исследований.

Ключевые слова: биотехнология чая, депонирование, пересадочная культура чая *in vitro*, генофонд.

Последние два десятилетия биологическое разнообразие видов на нашей планете стремительно снижается, происходит истощение природных ресурсов. Разнообразие – это основа эволюции жизненных форм. При исчезновении даже одного вида растений, безвозвратно теряется ценный генетический ресурс, который может быть использован в селекционных программах при создании новых высокотехнологичных сортов [1, 4, 8, 10].

Современные методы биотехнологии позволяют сохранить в условиях *in vitro* уникальный генофонд как культурных растений, так и их диких сородичей, поскольку последние являются важным источником генов устойчивости к болезням и вредителям, а также стрессам засухи и морозостойкости [9, 11, 12].

Весь этот богатый, депонированный генофонд можно использовать в целях притока и поиска новых генов, отвечающих за те или иные хозяйственно-ценные признаки. Сформированная *in vitro*-коллекция, оздоровленная от вирусной и грибковой инфекции с успехом может быть использована для сотрудничества и международного обмена генетическими ресурсами [2, 3, 6].

ФГБНУ ВНИИЦиСК является единственным в России научным учреждением, где на депонировании, в пересадочной культуре *in vitro*, на протяжении 8 лет содержится коллекция растений чая сорта 'Колхида' и местной популяции (представленной китайской, китайско-ассамской разновидностями чая). Коллекция насчитывает более тысячи образцов, благодаря высокому уровню мультипликации она постоянно пополняется [4, 5].

Следует отметить, что как в природных, так и в искусственных условиях культивирования *in vitro*, растения чая отличаются высокой степенью изменчивости и могут служить дополнительным источником генетического разнообразия при создании новых форм и сортов чая. В настоящее время мы располагаем достаточным количеством стерильного растительного материала, чтобы проводить исследования по чаю в разных селекционных направлениях, в том числе и на молекулярно-генетическом уровне (рис. 1).

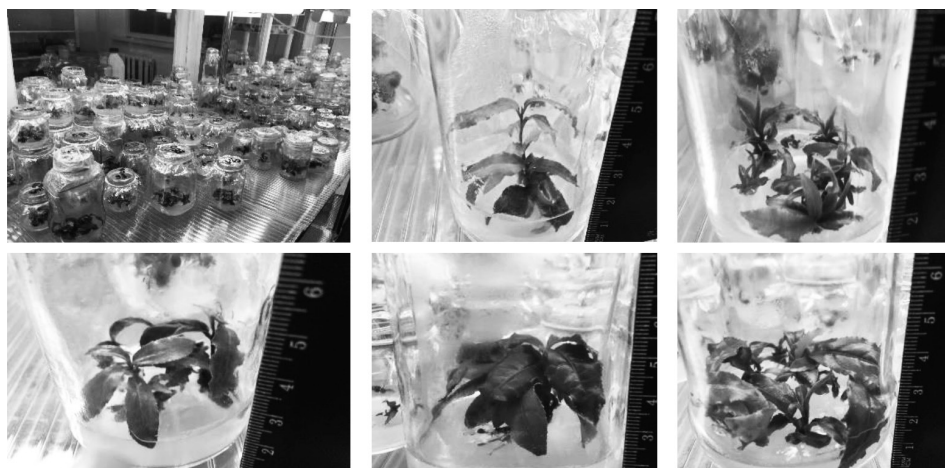


Рис. 1. Микрорастения чая в пересадочной культуре *in vitro*

В основе поддержания коллекции лежит периодическое клональное микроразмножение и субкультивирование микропобегов чая на свежие питательные среды. При создании коллекции чая *in vitro* мы опирались на результаты экспериментов, полученных при изучении морфогенетического потенциала и регенерационной способности культивируемых тканей растений чая. Это позволило использовать более эффективную модель регенерации.

При введении в стерильную культуру *in vitro* предпочтение было отдано эксплантам апекса и пазушных почек. Апикальная меристема как нельзя лучше подходит для этих целей, поскольку ей свойственен активный морфогенный потенциал, повышенный иммунитет к эндо- и экзофитной инфекции, что гарантирует высокий выход стерильных эксплантов.

На протяжении всего периода субкультивирования, а это 8 лет, интенсивность пролиферации микропобегов чая остаётся на высоком уровне. Было замечено, что за счёт вторичных процессов регенерации, их морфогенный потенциал значительно расширился. Правильный подбор регуляторов роста, их концентрации и периодическое чередование в питательной среде, способствует сохранению коллекции без видимых признаков онтогенетического старения.

Продолжительность стадии собственно микроразмножения зависит от регенерационного потенциала размножаемого растения, поэтому для растений с высокой способностью к регенерации, к которым и относится чай, эта стадия может длиться годами, что подтверждено нашими исследованиями – 8 лет культивирования *in vitro* в состоянии активного роста, без уменьшения регенерационной способности.

Для изучения влияния регуляторов роста на коэффициент размножения микропобегов чая были апробированы питательные среды по прописи Мурасиге-Скуга, с разным качественным и количественным содержанием экзогенных регуляторов роста (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние регуляторов роста
на рост и развитие микропобегов чая сорта 'Колхида' в
пересадочной культуре *in vitro* на базовой питательной среде М-С**

	МС + разные варианты экзогенных регуляторов роста, мл-мг/л	Высота микропобега, см	Количество микропобегов, шт./экс.	Количество листьев на микропобеге, шт./экс
1	6-БАП-2,0; аденин – 0,5; ТДЗ – 1,5	2,6 ±0,3	3,5 ±0,5	5,2 ±0,2
2	6 – БАП –2,5; НУК – 0,5; ИУК – 0,5	3,5 ±0,2	4,2 ±0,1	6,3 ±0,4
3	6 – БАП –1,0; НУК-0,25; триптофан 250	1,8 ±0,2	2,1 ±1,4	4,3 ±1,2
4	6 – БАП – 3,0; ИМК – 0,2	3,2 ±1,4	4,0 ±0,3	5,4 ±0,7
5	6 – БАП – 2,5; ГК – 1,0; ТДЗ – 4,0	4,6 ±0,6	6,2 ±0,1	7,8 ±0,2
6	6 – БАП – 2,0; НУК – 0,2; ГК – 1,5; мезоинозит – 100	5,8 ±0,8	7,8 ±0,5	10,6 ±0,3
	контроль МС без гормонов	1,4 ±0,2	2,0 ±0,2	2,5 ±1,5

Оптимальной для пересадочной культуры *in vitro* оказалась среда МС + 6 – БАП – 2,0 мг/л + НУК – 0,2 мг/л + ГК – 1,5 мл/л + мезоинозит – 100 мг/л. На среде с таким содержанием фитогормонов наблюдался высокий морфогенный потенциал с коэффициентом размножения, который оценивался по количеству отделённых микрочеренков.

Надо отметить, что эффективность микроразмножения была достигнута, главным образом, путём индукции адвентивного побегообразования, в котором гибберелловая кислота сыграла главную роль. Так от одного микропобега, высотой 5,0 см, было получено до 7 микропобегов, от которых можно получить соответственно 16 микрочеренков с пазушными почками.

Помимо длительного сохранения растений чая в пересадочной культуре *in vitro*, в целях экономии энергозатрат и расхода средств на реактивы, можно часть коллекции хранить в состоянии замедленного роста, сократив период между субкультивированиями, в условиях освещённых холодильных камер, при пониженных положительных температурах. При необходимости, в любое время, можно провести их массовое размножение, поместив в типичные условия культивирования *in vitro*.

Максимальный срок хранения для микропобегов чая – 12 месяцев был отмечен на уменьшенной вдвое по основному минеральному составу питательной среде М – С в условиях холодильной камеры, при плюсовой температуре + 8 °С, освещённости 800 лк, световом режиме 16/8 ч (табл. 2). Выбор температуры определялся тем, что культура чая относится к субтропическим растениям, и температуры (+2 ...+3 °С) будут отрицательно сказываться на их депонировании *in vitro*.

Таблица 2

**Влияние режима культивирования
и питательной среды на продолжительность депонирования
микропобегов чая сорта ‘Колхида’
в культуре *in vitro***

	Режимы культивирования	Питательная среда	Продолжительность депонирования, месяц
1	800 лк.; + 6 °С; 16/8 ч	½ Мурасиге-Скуга	12
2	2 000 лк.; + 10 °С; 16/8 ч	½ Мурасиге-Скуга	4
3	5 000 лк.; 15 °С; 16/8 ч	½ Мурасиге-Скуга	1,5
	5 000 лк.; 20 °С; 16/8 ч <i>контроль</i>	Мурасиге-Скуга	1

При первом варианте наблюдалось практически полное ингибирование пролиферации, кстати, как и микробиальной флоры, которая довольно часто возникает в процессе культивирования *in vitro*. Остальные режимы оказались малоэффективными для депонирования.

Таким образом, развивается новая междисциплинарная наука – биотехнология сохранения растений, которая дополняет существующие традиционные методы сохранения биологического разнообразия. Для поддержания микропобегов чая в пересадочной культуре *in vitro* оптимальной является питательная среда М – С + 6 – БАП – 2,0 + НУК – 0,2 + ГК – 1,5 мл + мезоинозит – 100 мг/л. Для среднесрочного депонирования коллекции рекомендуется содержать её на ½ питательной среде М – С, в условиях холодильной камеры, при температуре + 8 °С, освещённости 800 лк, световом режиме 16/8 ч, полностью исключив регуляторы роста. Депонированная коллекция микропобегов чая, может быть использована в различных направлениях (рис. 2).



Рис. 2. Использование депонированной коллекции *in vitro*-микропобегов чая в различных направлениях селекции

Библиографический список

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: учебник – СПб.: СПб. университет, 2002. – 232 с. – ISBN 5-288-02606-8.
2. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Алтайский гос.универ. – 2004. – 205 с. – ISBN 5-7904-0389-1.
3. Высоцкий В.А. Биотехнологические приёмы в современном садоводстве // Садоводство и ягодоводство России. – 2011. – Т. XXVI. – С. 3-10. – ISSN 2073-4948.
4. Гвасалия М.В. Сохранение уникальных сортов растений чая (*Camellia sinensis* L.) Kuntze) методами биотехнологии // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2016. – Вып. 59. – С. 100-106. – ISSN 2225-3068.
5. Гвасалия М.В. Соматональная вариабельность *in vitro* – источник для создания новых сортов растений // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2018. – Вып. 66. – С. 113-119. – doi: 10.31360/2225-3068-2018-66-113-120.
6. Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Гвасалия М.В., Самарина Л.С., Соколов Р.Н. Микроразмножение *in vitro* субтропических, декоративных культур и эндемиков Западного Кавказа: оригинальные и оптимизированные протоколы // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 3. – С. 49-58. – ISSN 0131-6397.
7. Куликов И.М., Высоцкий В.А., Шипунова А.А. Биотехнологические приёмы в садоводстве: экономические аспекты // Садоводство и виноградарство. – 2005. – № 5. – С. 24-28. – ISSN 0235-2591.
8. Мурасева Д.С. Размножение и сохранение *in vitro* редких и эндемичных видов рода *Fritillaria* L.: дис. ...канд. биол. наук. – Новосибирск, 2016. – 149 с.
9. Миронова О.Ю. Разработка и совершенствование технологий клонального микро-размножения декоративно-цветочных культур: дис. ... к.б.н. – М., 2004. – 141 с.
10. Плаксина Т.В., Пищева Г.Н. Биотехнология в селекции, размножении и сохранении растений // Бюллетень Ботанического Сада-института ДВО РАН. – 2014. – Вып. 12. – С. 22-29. – eISSN 2222-5579.
11. Рындин А.В., Туов М.Т. Научное обеспечение чаеводства в России и приоритетные направления исследований для дальнейшего развития отрасли // Субтропическое и южное садоводство России: мат. и докл. регионал. науч-практ. семинара «Научные основы возделывания чая в субтропической зоне Краснодарского края», Сочи, 16-17 июня 2010 г. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2010. – Вып. 43. – Т. I. – С. 6-10. – ISBN 978-5-904533-07-6
12. Engelman F., Engels J. Technologies and strategies for ex situ conservation // Managing Plant genetic Diversity. – Rome, 2002. – P. 89-104.

**TEA CULTURE IN DEPOSIT
IN VITRO-COLLECTION OF THE RUSSIAN RESEARCH
INSTITUTE OF FLORICULTURE AND SUBTROPICAL CROPS**

Gvasaliya M. V.

*Federal State Budgetary Scientific Institution
“Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops”,
c. Sochi, Russia, e-mail: subplod@mail.ru*

Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops is the only in Russia holder of tea culture collection *in vitro*. At the deposit tea plant microshoots are in 2 cultivation modes: in transplantation culture – on nutrient medium Murashige and Skoog (MS) + 6 – benzylaminopurine (BAP) – 2.0 + naphthylacetic

acid – 0.2 + gibberellic acid (GA) – 1.5 ml + mesoinosit – 100 mg/l; and in medium-term storage, with a suspension of growth (for 12 months), in the conditions of the refrigerating chamber, at ½ of the nonhormonal nutrient medium MS, at a temperature of + 8 °C, illumination of 800 lux, light mode 16/8 h. Grown in laboratory conditions tea microplants serve as the source material for micro-multiplication, exchange of the gene pool, and breeding studies.

Key words: tea biotechnology, deposition, *in-vitro* transplantation of tea, gene pool.