

Г.Я. БАЕР¹, А.И. ЕМЕЦ¹,
Н.А. СТАДНИЧУК², Д.Б. РАХМЕТОВ², Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины

03143 Киев, ул. Академика Заболотного, 148

² Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины
01014 Киев, ул. Тимирязевская, 1

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ВАРИАбельНОСТЬ КАК ИСТОЧНИК ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ СОРТОВ ПАЛЬЧАТОГО ПРОСА *ELEUSINE* *CORACANA* (L.) GAERTN.



Представлены данные по отбору и характеристике соматоклонных вариантов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn., полученных в результате регенерации растений из каллусной культуры. Среди протестированных генетически стабильных линий наибольший интерес представлял соматоклонный вариант SE-7, обладающий рядом таких важных хозяйственно ценных признаков, как более высокая урожайность семян и зеленой биомассы, быстрое прорастание семян при пониженных температурах, сокращение длительности основных фаз развития. Анализ полученных данных показывает, что соматоклонная вариабельность может служить источником получения исходного материала для отбора новых линий с последующим созданием сортов пальчатого проса.

© Г.Я. БАЕР, А.И. ЕМЕЦ, Н.А. СТАДНИЧУК, Д.Б. РАХМЕТОВ,
Я.Б. БЛЮМ, 2007

Введение. Соматоклонная вариабельность возникает в процессе культивирования изолированных тканей и органов в условиях *in vitro*, а также может обнаруживаться в растениях-регенерантах [1]. Основными причинами появления соматоклонной вариабельности является генетическая гетерогенность клеток исходного экспланта, а также генетическая и эпигенетическая изменчивость, которая возникает в процессе культивирования *in vitro* [1, 2]. На частоту соматоклонной изменчивости влияют много факторов, в том числе генотип исходного экспланта [3], условия и продолжительность культивирования [4, 5].

Соматоклонная изменчивость является источником полезных генетических вариаций и при селективном отборе позволяет отобрать в культуре *in vitro* растительный материал, обладающий определенными хозяйственно ценными признаками, например, с повышенной продуктивностью либо устойчивостью к различным патогенам или абиотическим факторам. Так, на сегодняшний день среди злаковых, включая пшеницу и сорго, были отобраны ценные с точки зрения сельскохозяйственного производства соматоклоны: линии с высокой урожайностью [3, 6–8], повышенным содержанием белка [9, 10] и масла [8], более ранней созреваемостью [6], повышенной устойчивостью к заболеваниям [6]. К настоящему моменту доказано, что соматоклонные варианты могут существовать как генетически стабильные формы и передавать по наследству определенные признаки [1, 3, 5]. Исходя из вышеизложенного, соматоклонную изменчивость можно рассматривать как эффективный инструмент для селекционеров, поскольку объединение методов культивирования *in vitro* с классическими методами селекции значительно ускоряет процесс создания новых сортов растений.

Среди злаковых культур особый интерес для селекционеров представляет пальчатое просо (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) – перспективная зерновая и фуражная культура, в том числе и для Украины [11]. Для повышения уровня разнообразия исходного материала пальчатого проса ранее предпринималась попытка использования химического мутагена (этилметансульфоната, ЭМС) и гамма-радиации для индукции соматоклонной вариабельности у этого вида [12]. В результате было достигнуто увеличение кустистости у полученных линий, однако

использование упомянутых мутагенов, особенно ЭМС, приводило к заметному снижению показателей регенерации растений [12]. Поэтому целью настоящей работы было получение спонтанных соматоклональных вариантов растений пальчатого проса в культуре *in vitro*, изучение особенностей их роста и развития, проведение сравнительного цитогенетического анализа, оценка их фенотипических характеристик с последующим отбором наиболее высокопродуктивных линий.

Материалы и методы. В качестве исходного материала в работе были использованы семена *E. coracana* сорта Тропиканка, созданного ранее в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины [13]. Введение в культуру *in vitro* и регенерацию растений проводили согласно методике, разработанной и описанной нами ранее [11]. Регенерировавшие растения с зачатками корней пересаживали сначала в стерильный перлит, пропитанный жидкой безгормональной средой Мурасиге-Скуга [14], для первичной акклиматизации, а затем переносили в теплицу.

Соматоклональные варианты выращивали в теплице с июня по август до созревания семян. На следующий год семена, собранные с растений-регенерантов после самоопыления, высевали в почву для изучения биометрических характеристик соматоклонов в полевых условиях.

Для определения температурного режима прорастания семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре +15, 20 и 25 °С. Эффективность прорастания оценивали как отношение количества проросших семян к общему количеству высеванных семян, умноженное на 100 %.

Полевые исследования проводили в 2001–2005 гг. в Национальном ботаническом саду. Фенологические наблюдения за онтогенезом осуществляли согласно методике Бейдемана [15]. Для определения биометрических показателей использовали методы Зайцева [16] и Доспехова [17], для изучения семенной продуктивности – методики Работнова [18] и Вайнагия [19].

Для проведения цитогенетического анализа брали кончики корней четырехдневных проростков, выращенных в термостате при +25 °С. Для приготовления давленных препаратов корни выдерживали на ледяной бане (16–18 ч) при +4 °С, затем материал фиксировали в смеси ледяной уксусной кислоты и 96%-ного этилового спирта (1 : 3) на протяжении 18 ч при +4 °С и красили раствором 1%-ного орсеина в 45%-ной уксусной кислоте. При подсчете хромосом проводили анализ как исходной формы, так и отобранных соматоклонов.

Результаты исследования и их обсуждение. Среди общего количества растений *E. coracana*, регенерировавших из каллуса, для дальнейшего сравнительного морфогенетического анализа было отобрано 30 линий. Наиболее интересными из них оказались три соматоклональных варианта, которые демонстрировали в культуре высокую скорость развития побегов и корнеобразования. При исследовании онтогенеза у отобранных соматоклонов было установлено, что растения способны нормально развиваться и в полевых условиях. Несмотря на то, что поколение R₀ значительно отставало в росте и развитии (табл. 1) в сравнении с исходной формой, что возможно является следствием прохождения стадий дедифферен-

Таблица 1
Биометрическая характеристика регенерированных соматоклональных вариантов R₀ пальчатого проса

Линия <i>E. coracana</i>	Высота растений, см	Количество, шт.			Длина колоска, см	Количество семян, шт.		Масса семян, мг, в одном колоске
		соцветий на рас- тении	колосьев в одном соцветии	простых колосков в одном колосе		в одном колосе	в одном колоске	
SE-1	35,2 ± 2,1	1	3	25,0 ± 1,0	3,2–3,3	84 ± 7	2–3	1,7 ± 0,35
SE-4	29,1 ± 1,2	1	6	27,5 ± 1,5	3,8–4,2	94 ± 14	2–3	2,2 ± 0,11
SE-7	32,3 ± 1,4	1	6	36,5 ± 1,5	4,5–5,5	180 ± 19	3–4	7,0 ± 0,35
Контроль	100 ± 5,5	5	5–7	31,5 ± 1,5	4,5–5,0	175 ± 13	5–6	18,3 ± 0,1

циации—дифференциации клеток в культуре *in vitro*, растения формировали жизнеспособные семена. Отрицательное влияние культивирования *in vitro* на параметры роста регенерированных растений описано ранее и другими авторами [20, 21].

Среди самоопыленного потомства соматоклонов (R_1) не было отмечено форм с явно выраженными аномалиями развития, хотя они отличались по высоте, количеству колосков, наземной массе и срокам созревания. В табл. 2 представлена биометрическая характеристика растений трех соматоклонов в сравнении с исходной формой. Из данных, представленных в табл. 2, видно что соматоклоны отстают по высоте растений, однако по размерам листьев (ширине и длине) они сопоставимы или сходны с контрольным вариантом. Хотя высота растений у варианта SE-4 значительно ниже, его наземная масса незначительно отличалась от аналогичного показателя у контрольной формы. В отличие от исходных растений у соматоклонов наблюдалось формирование генеративных побегов второго порядка (табл. 2), что



Рис. 1. Экспериментальное поле с соматоклонным вариантом SE-7 в фазе колошения

обеспечивает растениям более высокую степень кустистости. Наличие низкорослых форм зерновых растений является преимуществом для климатических условий Украины, поскольку такие линии более устойчивы к полеганию, что в свою очередь значительно сокращает по-

Таблица 2

Биометрическая характеристика соматоклонов *E. coracana*

Линия <i>E. coracana</i>	Высота растений, см	Количество генеративных побегов		Размеры листьев, см		Наземная масса, г
		I порядка	II порядка	Длина	Ширина	
SE-1	68,5 ± 5,4	2	2	29,0 ± 1,7	0,9 ± 0,1	81,2 ± 5,4
SE-4	57,6 ± 5,3	3	1–2	27,5 ± 1,3	0,9 ± 0,1	92,5 ± 2,5
SE-7	60,4 ± 8,8	5	1	27,5 ± 1,5	0,9 ± 0,1	87,5 ± 2,5
Контроль	100 ± 5,5	3	–	30,0 ± 2,1	1,0 ± 0,1	95,7 ± 5,1

Таблица 3

Семенная продуктивность соматоклонов *E. coracana*

Линия <i>E. coracana</i>	Количество, шт.				Масса семян, г	
	соцветий на одном растении	колосьев в одном соцветии	простых колосков в одном колосе	семян в одном колосе	в одном колосе	1000 шт.
SE-1	4	5–6	36 ± 3	210 ± 18	0,53 ± 0,03	2,62 ± 0,31
SE-4	5	4–7	28 ± 2	168 ± 14	0,44 ± 0,03	2,65 ± 0,27
SE-7	5	4–7	34 ± 2	235 ± 16	0,63 ± 0,01	2,70 ± 0,53
Контроль	5	5–7	30 ± 3	175 ± 13	0,55 ± 0,04	3,20 ± 0,39

тери при сборе урожая. Поскольку у всех соматоклонов наблюдалось формирование генеративных побегов второго порядка, а количество простых колосков и семян в одном колосе, по крайней мере у SE-1 и SE-7, намного превышало показатели у исходной линии, они оказались более продуктивными по количеству семян. Например, у варианта SE-7 (рис. 1) формировалось от 220 до 250 семян в одном колосе, что значительно превышало соответствующие значения у исходной формы, где количество семян в среднем составляло 175 ± 13 шт. (табл. 3). По семенной продуктивности можно выделить два соматоклональных варианта SE-1 и SE-7, которые значительно превышают по этому показателю исходный сорт Тропиканка, хотя по количеству и массе семян соматоклон SE-7 является наиболее продуктивным с точки зрения урожайности.

Интересные результаты были получены при сравнении температурных режимов всхожести семян соматоклональных вариантов. Для этого проводили сравнительный анализ семенной всхожести на 2-е и 4-е сутки при температурах +15, 20 и 25 °С (табл. 4). Так, при температуре +15 °С уже на второй день наблюдали прорастание семян у соматоклонов SE-1 ($50,5 \pm 1,5$ %) и SE-7 ($62,5 \pm 3,1$ %), тогда как у исходного образца и соматоклона SE-4 наблюдали появление только единичных начинающих прорастать семян. На четвертый день показатель всхожести семян значительно возрастал: у соматоклонов он достигал уровня 86–99 %, тогда как у *E. coracana* всходило в среднем 74 % семян. При повышении температуры до +20 °С всхожесть семян на второй день значительно возрастала у всех иссле-

дуемых образцов, однако если сравнивать процент прорастания семян исходной линии с вариантами SE-1 и SE-7, то этот показатель был почти в два раза меньше по сравнению с аналогичными показателями упомянутых соматоклонов. Практически все жизнеспособные семена исходной линии пальчатого проса и трех ее соматоклональных вариантов всходили на второй день при температуре +25 °С. Таким образом, среди соматоклонов более высокую всхожесть при более низкой температуре демонстрировал вариант SE-7.

Ранее также было показано использование соматоклональной вариабельности для отбора холодоустойчивых форм риса [22]. Аналогичные примеры селекции соматоклонов, способных прорасти при более низких температурах, известны и среди двудольных растений. Так, например, среди соматоклональных вариантов были отобраны холодоустойчивые линии дыни, демонстрирующие дополнительно еще и более высокую урожайность по сравнению с исходной линией [23]. Было высказано предположение, что стимулирование прорастания семян при более низких температурах по сравнению с исходной линией и повышение урожайности может быть связано с увеличением концентрации эндогенного гиббереллина у соматоклонов [23].

Нами также была проведена оценка продолжительности основных фаз развития (появление первых всходов, сроки колошения и созревания семян) у соматоклональных вариантов *E. coracana* в полевых условиях (табл. 5). Так, у растений соматоклона SE-7 наблюдали сокращение продолжительности основных фаз развития, а именно: период от появления

Таблица 4

Оценка скорости прорастания семян при разных температурных режимах

Температура, °С	Продолжительность, дни	Проросшие семена линий <i>E. coracana</i> , %			
		SE-1	SE-4	SE-7	Контроль
15	2	$50,5 \pm 1,5$	—	$62,5 \pm 3,1$	—
15	4	$97,9 \pm 1,2$	$88,5 \pm 2,1$	$97,1 \pm 1,4$	$74,2 \pm 2,2$
20	2	$94,5 \pm 1,1$	$25,1 \pm 2,6$	$72,5 \pm 2,5$	$44,7 \pm 2,1$
20	4	$98,2 \pm 1,0$	$93,5 \pm 1,2$	$97,5 \pm 0,7$	$89,5 \pm 1,2$
25	2	$98,9 \pm 0,5$	$96,3 \pm 0,8$	$98,0 \pm 0,6$	$95,3 \pm 1,4$
25	4	$98,9 \pm 0,5$	$96,3 \pm 0,8$	$98,0 \pm 0,6$	$95,3 \pm 1,4$

всходов до сбора урожая был короче на 10–20 дней в сравнении с исходным вариантом (рис. 1). И хотя соматональный вариант SE-1 характеризовался более высокой семенной продуктивностью и относительной холодоустойчивостью по сравнению с контролем, скорость развития у этого варианта была самой продолжительной, и для полного созревания семян этой линии необходимо было до 135 дней. На сегодняшний день также существуют данные о получении ранних форм растений с помощью соматональной вариабельности. Так, путем скрининга недавно были отобраны линии пшеницы, которые характеризовались более ранней созреваемостью и в то же время были более устойчивы к условиям окружающей среды без потери при этом урожайности [6].

Сокращение периода вегетации для пальчатого проса является ценным сельскохозяйственным признаком, поскольку это дает возможность получить за сезон первый урожай зерновой массы и второй урожай зеленого корма для животных. Как представлено в характеристике исходного сорта Тропиканка, в ранние фазы развития биомассу пальчатого проса можно использовать как высококачественный корм для сельскохозяйственных животных [13].

При проведении цитогенетического анализа было установлено, что соматоналы не отличались по количеству и морфологии хромосом от исходной формы (рис. 2). Геном пальчатого проса (*E. coracana*) состоит из $2n = 36$ мета- и субметацентрических хромосом [24]. Аналогичное количество хромосом наблюдали и в соматических клетках всех трех соматональных вариантов. Никаких дополнительных

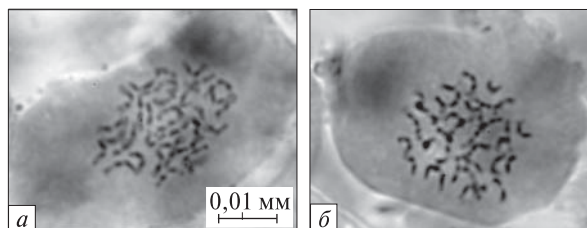


Рис. 2. Хромосомный набор: а – *E. coracana* ($2n = 36$); б – соматональный вариант SE-7 ($2n = 36$)

хромосом либо других изменений отмечено не было, что свидетельствует о генетической стабильности отобранных линий.

Как уже отмечалось, у регенерирующих растений в процессе культивирования *in vitro* может возникать большое количество генотипических и фенотипических вариаций. Такие явления находятся под пристальным изучением исследователей, о чем свидетельствует тот факт, что соматональную вариабельность по-прежнему широко используют для получения новых сортов растений [3, 6–10, 20, 25]. В нашей работе также представлены данные по отбору и характеристике наиболее интересных соматональных вариантов, обладавших рядом таких важных хозяйственно ценных признаков, как более высокая урожайность семян, быстрое прорастание семян при более низких температурах, сокращение длительности основных фаз развития. Среди соматоналов следует выделить вариант SE-7, который объединяет в себе раннеспелые растения с высокой продуктивностью семян и зеленой биомассы, хорошей всхожестью семян при более низких температурах. Указанный соматонал планируется нами выделить как отдельный новый зерновой сорт пальчатого проса.

Таким образом, представленные результаты демонстрируют, что соматональная вариабельность служит важным источником получения нового исходного материала для селекции хозяйственно ценных признаков, таких как повышенная урожайность семян и всхожесть при более низких температурах; при этом полученные растения сохраняют фертильность и генетическую стабильность в последующих поколениях. Актуальной на сегодняшний день для исследователей также остается проблема поиска «маркерных» признаков

Таблица 5
Продолжительность основных фаз развития у соматоналов *E. coracana* (2002–2005 гг.)

Линия <i>E. coracana</i>	Появление первых всходов	От всхо- дов до колошения	От колоше- ния до созревания семян	От всхо- дов до созрева- ния семян
SE-1	10–12	95–100	30–35	125–135
SE-4	9–10	80–90	22–26	102–116
SE-7	9–10	80–85	20–25	100–110
Контроль	8–10	85–92	25–28	110–120

у соматоклональных вариантов, по которым можно было бы вести более целенаправленный и более быстрый отбор новых линий растений с интересующими характеристиками в условиях *in vitro*.

SUMMARY. Data on selection and characterizing of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. somaclonal variants regenerated from callus culture are presented and described. Among the tested genetically stable lines the somaclonal variant SE-7 was the most interesting due to its acquired important agricultural traits, such as a higher seed and biomass yield, rapid seed germination at lower temperatures, shortening of the main plant development stages. Data analysis shows that somaclonal variability can be a source to obtain initial material for further selection of new finger millet varieties.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
2. Kaepfer S.M., Kaepfer H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // *Plant. Mol. Biol.* — 2000. — **43**. — P. 179–188.
3. Mohmand A.S., Nabors M.W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes // *Plant Cell Rep.* — 1990. — **8**. — P. 558–560.
4. Martínez C.P., Victoria F.C., Amezcúta M.C., Tulandé E., Lema G., Zeilgler R. S. Comparison of rice lines derived through anther culture and the pedigree method in relation to blast (*Pyricularia grisea* sacc.) resistance // *Theor. Appl. Genet.* — 1996. — **92**. — P. 583–590.
5. Rakocz-Trojanowska M. The effect of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits // *Cell Mol. Biol.* — 2002. — **7**. — P. 1111–1120.
6. Arun B., Joshi A.K., Chand R., Singh B.D. Wheat somaclonal variants showing earliness, improved spot blotch resistance and higher yield // *Euphytica.* — 2003. — **132**. — P. 235–241.
7. Maralappanavar M.S., Kuruvinashetti M.S., Harti C.C. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. // *Euphytica.* — 2000. — **115**. — P. 173–180.
8. Patnaik J., Sahoo S., Debata B.K. Somaclonal variation in cell suspension culture-derived regenerants of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* // *Plant Breed.* — 1999. — **118**. — P. 351–354.
9. Carver B.F., Jonson B.B. Partitioning of variation derived from tissue culture of winter wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1989. — **78**. — P. 405–410.
10. Ryan S. A., Larkin P. J., Ellison F. W. Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1987. — **74**. — P. 77–82.
11. Емец А.И., Баер Г.Я., Климкина Л.А., Стадничук Н.А., Абрамов А.А., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и регенерация растений дагуссы *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. сорта Тропиканка // *Физиология и биохимия культур. растений.* — 2003. — **35**, № 2. — С. 1–8.
12. Pius J., George L., Eapen S., Rao P.S. Evaluation of somaclonal and mutagen induced variation in finger millet // *Plant Breed.* — 1994. — **112**. — P. 239–243.
13. Стадничук Н.О. Интродукция *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. на уровне сорта в Лесостепи Украины // *Биологическое разнообразие. Интродукция растений.* — С.-Петербург, 2003. — С. 257–259.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol Plant.* — 1962. — **15**. — P. 473–497.
15. Бейдеман И.Н. Методика фенологических наблюдений при геоботанических исследованиях. — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. — 131 с.
16. Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. — М.: Наука, 1973. — 256 с.
17. Доспехов Б.А. Основы методики полевого опыта. — М.: Просвещение, 1967. — 176 с.
18. Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // *Тр. БИН АН СССР. Сер. 3. Геоботаника.* — 1950. — Вып. 6. — С. 14–24.
19. Вайнагий И.В. О методике изучения семенной продуктивности растений // *Бот. журн.* — 1974. — **59**, № 6. — С. 826–831.
20. Bulk R.W. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding — a review // *Euphytica.* — 1991. — **56**. — P. 269–285.
21. Lee M.L., Geadelmann J.L., Phillips R.L. Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue cultures of maize // *Theor. Appl. Genet.* — 1988. — **75**. — P. 841–849.
22. Bertin P., Kinet J.M., Bouharmont J. Heritable chilling tolerance improvement in rice through somaclonal variation and cell line selection // *Aust. J. Bot.* — 1995. — **44**. — P. 91–105.
23. Ezura H., Amadi H., Kikuta I., Kubota M., Oosawa K. Selection of somaclonal variants with low temperature germinability in melon (*Cucumis melo* L.) // *Plant Cell Rep.* — 1995. — **14**. — P. 684–688.
24. Mehra K.L. Consideration of the African origin of *Eleusine coracana* (L.) Gaertn // *Curr. Sci.* — 1963. — **32**. — P. 300–301.
25. Larkin P., Scowcroft W.R. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell culture for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.* — 1981. — **60**. — P. 197–214.

Поступила 17.09.06