

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO КАК ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ПАЛЬЧАТОГО ПРОСА ELEUSINE CORACANA (L.) GAERTN

Г.Я. Баер¹, Д.Б. Рахметов², Н.А. Стадничук², А.И. Емец¹, Я.Б. Блюм¹

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН

²Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины

Представлены данные по использованию культуры *in vitro* для получения соматклональных вариантов пальчатого проса (*Eleusine indica*), которые могут быть рассмотрены в качестве исходного селекционного материала для последующего отбора новых сортов данного злака. Среди исследованных вариантов были выделены три наиболее перспективных линии. Установлено, что линия SE-1 обладает высоким содержанием белка, безазотистых экстрактивных веществ, сухого вещества, при наименьшем количестве клетчатки, соматклон SE-4 характеризуется как биоэнергетическая культура благодаря повышенному содержанию сахара. Линия SE-7 интересна для селекционеров, поскольку обладает повышенной урожайностью семян и зеленой массы, ускоренным прохождением основных фаз развития. Полученные результаты исследований позволяют рассматривать соматклональную изменчивость как инструмент для создания новых сортов.

Eleusine coracana (L.) Gaertn., соматклональная изменчивость, селекция, продуктивность растений

В настоящее время в ходе создания новых сортов сельскохозяйственных растений все шире применяются биотехнологические приемы. Способность растений к соматклональной изменчивости в процессе образования каллусной ткани и ее культивирования в условиях *in vitro* достаточно эффективно используется в селекции как метод получения новых генотипов. Полученные разными исследователями результаты свидетельствуют о том, что соматклональная изменчивость может проявляться в изменении продолжительности вегетационного периода растений, урожайности и других важных агрономических

признаках, определяющих потенциал той или иной селекционной программы (Arun, 2003; Bulk, 1991; Corver, 1989; Maralappanavar, 2000; Mohmand, 1990; Patnaik, 1999; Ryan, 1987). Поэтому отбор соматоклональных вариантов в условиях *in vitro* с последующей их идентификацией, включением в селекционный процесс и оценкой улучшения их полезных признаков в условиях *in vivo* позволяет получать новые сорта с более высоким агрономическим потенциалом.

Существует достаточно большое количество работ, направленных на селекцию новых сортов злаков, в ходе которых была использована соматоклональная изменчивость в качестве источника новых признаков. Например, ранее уже были получены соматоклональные варианты пшеницы, отличающиеся высокой урожайностью (Arun et al., 2003; Mohmand & Nabros, 1990), повышенной устойчивостью к заболеваниям и более ранними сроками созревания (Arun et al., 2003). Соматоклональная вариабельность использовалась как биотехнологический инструмент при получении новых линий риса (Bertin et al., 1995), сорго (Maralappanavar et al., 2000), а также других представителей злаковых (Patnaik et al., 1999). Ранее нами было описано получение генетически стабильных соматоклональных вариантов пальчатого проса (*Eluesine coracana* (L.) Gaertn.) с последующей селекцией линий с ценными хозяйственными признаками (Баер и др, 2007).

Среди нетрадиционных для Украины злаковых культур пальчатое просо заслуживает особого внимания, поскольку является не только источником высококачественного по составу зерна, но и перспективной кормовой культурой. Этот традиционный для стран Африки и части стран Юго-Восточной Азии злак давно является объектом селекционных программ. Поэтому индукция соматоклональной вариабельности, в равной степени как и мутагенеза, путем обработки каллусной культуры химическими мутагенами (этилметансульфонат) и гамма-радиацией уже использовались для повышения разнообразия исходного материала пальчатого проса (Pius et al., 1994). Благодаря этому методу было достигнуто увеличение кустистости у полученных линий, однако использование данных мутагенов, особенно ЭМС, приводило к заметному снижению показателей регенерации растений (Pius et al., 1994).

Для полученных нами в культуре *in vitro* спонтанных соматоклональных вариантов растений пальчатого проса был проведен цитогенетический анализ, а также анализ их фенотипических характеристик с последующим отбором наиболее высокопродуктивных линий (Баер и др., 2007). Из всех полученных путем регенерации соматоклональных вариантов было отобрано три наиболее перспективные для дальнейших исследований линии. Результаты изучения онтогенеза отобранных

сомаклональных вариантов позволили убедиться в том, что все линии были способны нормально развиваться и в полевых условиях. Как показали результаты цитогенетического анализа, исследуемые соматклоны не отличались от исходной формы по количеству и морфологии хромосом, что свидетельствует об их генетической стабильности. При проведении полевых исследований у соматклонов наблюдали формирование генеративных побегов второго порядка, что обеспечивает растениям более высокую степень кустистости (Баер и др., 2007). В конечном итоге нами были получены более низкорослые формы пальчатого проса, что является преимуществом для климатических условий Украины, поскольку их повышенная устойчивость к полеганию может в свою очередь значительно сократить потери при сборе урожая.

Поскольку для обоих вариантов характерным был более высокий прирост массы и повышенная семенная продуктивность, нами было решено произвести оценку полученных линий пальчатого проса как потенциальных альтернативных растительных источников для производства биоэтанола. Поэтому целью данной работы было проведение анализа биохимических показателей отобранных соматклональных вариантов пальчатого проса как для предварительной оценки их пищевых характеристик, так и для оценки их пригодности для получения этанола.

В работе использовали исходную линию пальчатого проса *E. coracana* сорта Тропиканка (Стадничук и др., 2003) (рис. 1) и полученные на его основе соматклональные варианты SE-1, SE-4 и SE-7 (Баер и др., 2007). Биохимическую оценку семян и надземной массы проводили согласно стандартных методик (Крищенко, 1983; Починков, 1976; Разумов, 1986).

Проведенные исследования подтвердили, что по семенной продуктивности среди отобранных линий явно выделялись два соматклональных варианта SE-1 и SE-7 (рис. 1), значительно превосходящие по этому показателю исходный сорт Тропиканка. При этом необходимо отметить, что с точки зрения урожайности наиболее многообещающей оказалась линия SE-7, ибо она была наиболее продуктивной по количеству и массе семян. Было также установлено, что вариант SE-7 характеризуется более высоким показателем всхожести при низких температурах по сравнению с контролем. Для этого варианта также характерным является сокращение продолжительности основных фаз развития. В частности, вегетационный период у данного соматклона (от появления всходов до сбора урожая) был на 10-20 дней короче по сравнению с исходным вариантом. Этот показатель следует расценивать как ценный сельскохозяйственный признак, поскольку такое сокращение периода вегетации дает возможность получить в течение сезона два

урожая пальчатого проса: первый – в виде урожая зерновой массы и второй – в виде урожая зеленого корма (Баер и др., 2007).



Рисунок 1. Полевые испытания соматоклональных вариантов *E.coracana*

Поскольку представленные ранее результаты демонстрируют, что соматоклональная вариабельность позволяет получить новый исходный материал пальчатого проса с ценными хозяйственными признаками, было важно провести исследования состава семян и наземной массы соматоклонов, что и было осуществлено в ходе исследований основных биохимических характеристик отобранных линий. Основываясь на сравнении биохимического состава надземной массы (табл. 1) и семян (табл. 2) легко убедиться, что по количеству питательных веществ полученные соматоклональные варианты превосходят исходную линию. По содержанию сухого вещества немного отставал вариант SE-4, тогда как между остальными линиями и контролем существенной разницы не было отмечено. Однако было установлено, что содержание липидов в варианте SE-4 значительно превышает другие варианты и контроль. При наименьшем содержании клетчатки линия SE-1 превосходила по количеству белка, аскорбиновой кислоты в надземной массе как контроль, так и остальные линии. Следует отметить, что по содержанию белка, аскорбиновой кислоты, каротина и общего сахара, все соматоклональные варианты превосходили контроль.

Таблица 1.

Основные показатели биохимического состава надземной массы соматоклональных вариантов и исходной линии пальчатого проса (начало фазы колошения)

Вариант	Сухое вещество, %	Липиды, %	Клетчатка, %	Белок, %	Аскорбиновая кислота, мг %	Каротин, мг %	БЭВ, %	Зола, %	Общий сахар, %
Контроль	28,82	2,81	36,49	4,88	280,15	1,73	49,37	6,45	5,38
SE-1	29,08	1,85	34,00	7,47	736,03	2,68	53,92	4,76	6,16
SE-4	21,69	4,01	39,32	6,84	373,44	4,10	42,02	7,81	13,51
SE-7	27,45	1,99	38,40	5,40	321,95	2,92	50,61	3,61	7,91

Содержание безазотистых экстрактивных веществ (БЭВ), которые включают крахмал, сахара, гемицеллюлозу и пектины, было достаточно высоким для всех образцов. Показано, что по количеству золы соматоклональный вариант SE-4 также превосходит остальные варианты, тогда как в линии SE-7 содержание золы было в два раза ниже по сравнению с контролем. При определении содержания сахара было обнаружено, что у контрольных растений этот показатель был значительно ниже, чем у полученных соматоклональных вариантов. Например, в случае варианта SE-4 данный показатель был в два раза выше, чем у контрольных растений. По содержанию сухого вещества не было обнаружено существенной разницы в семенах из различных вариантов, однако по количеству липидов значительно выделялся соматоклональный вариант SE-4. Его семена содержали в два раза больше липидов, чем контрольные семена. По количеству белка в семенах почти не было отмечено различий между линиями SE-1 и SE-4, а у соматоклонального варианта SE-7 содержание белка было наименьшим.

Таблица 2.

Основные показатели биохимического состава семян соматоклональных вариантов и исходной линии пальчатого проса

Вариант	Сухое вещество, %	Липиды, %	Клетчатка, %	Белок, %	Каротин, мг %	БЭВ, %	Зола, %	Общий сахар, %
Контроль	90,27	0,63	2,9	10,3	0,7	83,1	2,84	1,6
SE-1	90,94	0,89	3,5	8,7	0,9	83,8	2,99	2,0
SE-4	91,03	1,44	2,9	8,6	0,5	84,4	2,58	2,0
SE-7	91,02	0,84	2,7	6,9	1,0	87,0	2,9	2,1

Несмотря на то, что в зеленой массе линии SE-4 отмечено более высокое содержание каротина, в ее семенах этот показатель оказался вдвое ниже, чем у других соматоклональных вариантов. В семенах соматоклональных вариантов, как и в их зеленой массе, содержание сахара превышало таковое контрольного сорта. Данные проведенного биохимического анализа позволяют сделать вывод, что благодаря повышенному содержанию сахара полученные соматоклональные варианты могут представлять интерес как источники биоэтанола. Предварительный коммерческий расчет позволил оценить выход спирта с 1 т условного крахмала у соматоклонов пальчатого проса, который составляет 64,96 дал. Этот показатель является достаточно высоким и может быть сравним с таковым для кукурузы (<http://www.zavkom.com>).

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение, что полученные соматоклональные варианты пальчатого проса могут иметь важное значение для сельского хозяйства не только в силу проявления более высоких, по сравнению с родительской формой, продуктивностью. Линия SE-7 представляет интерес для дальнейшего использования в селекционном процессе, поскольку обладает рядом ценных качеств, таких как более высокая урожайность семян и зеленой массы при коротком вегетационном периоде. Данный соматоклональный вариант планируется выделить в качестве отдельного нового зернового сорта пальчатого проса. В то же время высокое содержание белка, БЭВ, сухого вещества при наименьшем количестве клетчатки дает возможность рекомендовать соматоклональный вариант SE-1 в качестве фуражной культуры, а вариант SE-4 может рассматриваться как перспективная альтернативная биоэнергетическая культура благодаря повышенному содержанию сахара, что является крайне важным с точки зрения использования новых источников получения биоэтанола.

Работа выполнена при частичной поддержке проекта № 6/П-19-07(2007-2009 гг.) целевой комплексной программы НАН Украины «Биомасса как сырье для биотоплива».

Библиографический список

1. *Бейдеман И. Н.* Методика фенологических наблюдений при геоботанических исследованиях. – М. Л.: Изд. АН СССР, 1954. – 131 с.
2. *Баер Г.Я., Емец А.И., Стадничук Н.А., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б.* Соматоклональная вариабельность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. // Цитология и генетика.- 2007.-Т.41, N 4.-С. 9-14.
3. *Вайнагий И.В.* О методике изучения семенной продуктивности растений // Бот. журн. – 59, № 6. – С. 826-831.

4. Доспехов Б. А. Основы методики полевого опыта//М.: Просвещение, 1967. – 176 с.
5. 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 // Физиол. биохим. культ. растений.-2003. – Т.35, № 2. – С. 1-8.
6. Зайцев Г. Н. Методика биометрических расчетов. – М.: Наука, 1973. – 256 с.
7. Крищенко В.П. Методы оценки качества растительной продукции. – М.: Колос, 1983. – 192с.
8. Починок Х.М. Методы биохимического анализа растений. – К.: Наук. думка, 1976. – 334с.
9. Работнов Т. А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Тр. БИН АН СССР. Сер. 3, Геоботаника. – 1950. – Вып. 6. – С. 14-204.
10. Разумов В.А. Справочник лаборанта-химика по анализу кормов. – М.: Россельхозиздат, 1986. – 304с.
11. 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.
12. Bertin P., Kinet J.-M., Bouharmont J. Heritable chilling tolerance improvement in rice throu somaclonal variation and cell line selection // Aust. J. Bot. – 1995. – 44. – P. 91-105.
13. 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.
14. Carver B.F., Jonson B.B. Partitioning of variation derived from tissue culture of winter wheat // Theor. Appl. Genet. – 1989. – 78. – P. 405-410.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant.- 1962. – 15. – P. 437-497.
19. 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.

20. Pius J., Eapen S., George L., Rao P.S. Evaluation of somaclonal and mutagen induced variation in finger millet // Plant Breed. – 1994. – 112. – P. 239-243.
21. 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.
22. http://www.zavkom.com/index.php?option=lurm&sec=alco&task=view&catid=94&id=117&fld=usr_hits

Наведені дані по використанню культури *in vitro* для отримання соматоклональних варіантів пальчастого проса (*Eleusine indica*), що можуть бути використані як вихідний матеріал для послідувочої селекції нових сортів. Виділено три найбільш перспективні лінії. Встановлено, що лінія SE-1 має високий вміст білка, без азотистих екстрактивних речовин, сухої речовини, при найменшій кількості клітковини, самокклон SE-4 характеризується як біоенергетична культура завдяки підвищеному вмісту цукру. Лінія SE-7 цікава для селекціонерів завдяки підвищеній урожайності насіння і зеленої маси та прискореним проходженням основних фаз розвитку. Соматоклональна мінливість може бути інструментом для створення нових сортів.

The data on the use of the culture *in vitro* in order to get somaclonal variants of *Eleusine indica*, which can be considered as the original material for a consequent selection of new cultivars of the crop, are presented. It is stated that the line- SE-1 has high protein content, non-nitrous extractive matters, dry matter at the least amount of fibre somaclone SE-4 is characterized as bioenergetic culture due to an increased sugar content. The line- SE-7 is of a great interest to breeders as it possesses an increased seed yielding ability and green mass, an accelerated passing of main vegetation phases. Somaclonal variability can become a tool for the creation of new cultivars.