

ОТБОР И НАСЛЕДОВАНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ У БЫСТРОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ *BRASSICA RAPA L.*

Игнатов А.Н. – доктор биологических наук
Пивоваров В.Ф. – доктор с.-х. наук, академик РАСХН
Тареева М.М. – кандидат с.-х. наук
Мухортов В.Ю. – аспирант*

*ГНУ «Всероссийский НИИ селекции и семеноводства
овощных культур» Россельхозакадемии
143080, Россия, Московская область,
п. ВНИИССОК, тел.+7(495)780-91-78
E-mail: vniissok@mail.ru*

** Центр «Биоинженерия» РАН
117312, Россия, Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.1
Тел.: +7(499)135-73-19, факс: +7(499)135- 05-71
E-mail: ignatov@biengi.ac.ru; an.ignatov@gmail.com*



Рост растений и получение высокоурожайной продукции во многих районах земли ограничивается биотическими и абиотическими стрессовыми факторами. Водный стресс может приводить к повышению содержания растворимых веществ, обладающих высоким осмотическим потенциалом. Адаптация растений к условиям высокого осмотического давления при недостатке воды в почве может происходить двумя путями: естественной адаптацией растений к новым изменяющимся условиям или же путем изменения генотипов популяции при селекции. Разработку ускоренного теста на засухоустойчивость проводили путем изучения влияния высокого осмотического давления, создаваемого раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 8000 Да в разных концентрациях на прорастающие семена быстрорастущего генотипа Brassica rapa L.

Ключевые слова: осмотический стресс, адаптация, полиэтиленгликоль, прорастание семян, устойчивость

Рост растений и получение высокоурожайной продукции во многих районах земли ограничивается биотическими и абиотическими стрессовыми факторами. Основными абиотическими факторами являются недостаток воды, повышенная засоленность почвы, высокие или низкие температуры, воздействие тяжелых металлов и др. (Basra Amarjit S., Basra Ranjit K., 1997). В работах Wang W., B. Vinocur и A. Altman (2003) отмечается, что по-

тери в урожайности культурных растений в результате воздействия абиотических факторов могут составить до 30% в ближайшие 25 лет и до 50% к 2050 году.

Изучение механизмов устойчивости растений к стрессам внешней среды, в том числе и к водному дефициту, является одной из задач многих разделов науки о растениях – генетики, физиологии, биохимии и селекции. В условиях водного дефицита в метаболизме растений происходят

серьезные изменения, которые касаются как концентрации отдельных соединений, так и степени участия в метаболизме отдельных ферментных систем. Согласно литературным данным (Gill et al., 2001; Jang, Sheen, 1997; Yordanov et al., 2000) стресс может приводить к повышению содержания растворимых веществ, обладающих высоким осмотическим потенциалом, как противовеса осмотическому давлению концентрированного почвенного раствора.



Как указывают Basra Amarjit S. и Basra Ranjit K. (1997), адаптация растений к условиям высокого осмотического давления при недостатке воды в почве может происходить двумя путями: естественной адаптацией растений к новым изменяющимся условиям или же путем изменения при селекции генотипов, составляющих популяцию, что занимает гораздо меньше времени.

Работы по изучению регулирования растениями осмотического давления проводились на примере ячменя (Singh et al., 1972; Blum, 1986), пшеницы (Morghana, 1977, 1984; Morgan и Condon, 1986; Johnson et al., 1984), сорго и проса (Blum, Sullivan, 1986); хлопка (Timpa et al., 1986); подсолнечника (Pelah, Shoseyov, Altman, 1997); плевела и овсяницы (Thomas и Evans, 1989).

Влияние осмотического давления на культуру *Brassica rapa* L. изучено недостаточно или практически отсутствует в литературе.

Brassica rapa L. представляет широкий спектр культурных растений, включающий овощные (репа, брокколи, пекинская, китайская капуста и другие виды азиатских листовых и спаржевых форм), кормовые (турнепс) и масличные (сурепица, сарсон, тория) культуры. Широкое распространение *Brassica rapa* L. в зоне недостаточного увлажнения требует создания сортов и гибридов, обладающих толерантностью к повышенному осмотическому давлению воды, содержащейся в почве.

Разработку ускоренного теста на засухоустойчивость проводили путем изучения влияния высокого осмотического давления, создаваемо-

го раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 8000 Да в разных концентрациях на прорастающие семена быстрорастущего генотипа *Brassica rapa* L. CrGCl (RcBrl), отбора устойчивых генотипов Si (Selected), последующей проверки полученного потомства на наследование данного признака в поколении S_2 и расщепляющихся популяциях, полученных от скрещивания отобранных растений Si (Selected) и исходной формы P (Parent) в корнеобитаемой среде на генотип (устойчивость к дефициту влаги).

Материалы и методы

В результате исследований Pelah, Shoseyov и Altman (1997), установлено, что недостаток воды для растений на ранних стадиях развития является одним из наиболее лимитирующих факторов для роста первичной корневой системы и побегов. В связи с этим эксперименты проводили на ранней стадии развития побегов.

Семена образца CrGCl (RcBrl) были предоставлены Кооперативом по генетике крестоцветных (Crucifers Genetics Cooperative, Wisconsin, USA). Данные растения отличаются цветением после образования третьего настоящего листа, а полный цикл развития от семени до семени составляет около 40-45 суток при оптимальных условиях выращивания (Williams, Hill, 1982). В опытах использовали семена одной репродукции, полученные после 4-х поколений размножения потомства единичного самосовместимого растения. Семена обрабатывали 4% водным раствором перхлората натрия и после 12-часовой инкубации в воде проращивали на стерильном 2% водном растворе агары при температуре 25°C. Для создания высокого осмотического давления к среде добавляли от 10 до 20% ПЭГ-8000 (Handa et al., 1983). Для первоначальной оценки в каждой серии опыта в варианте использовали 3 повторности по 20

семян в каждой. Через 2, 5 и 10 суток после начала инкубации оценивали длину первичного корешка и подсемядольного колена (побега).

Для второй серии эксперимента использовали 240 семян исходной популяции с целью отбора устойчивых генотипов. Отобранные при концентрации 15% ПЭГ проростки с на-

Три отобранных растения были использованы для получения семян поколения S² после принудительного опыления в бутонах пыльцой с растения исходного образца Р-поколения ВС (back cross). Потомство толерантных к ПЭГ растений (30 шт.) оценивали по морфологическим признакам (высота и масса рас-

Результаты и обсуждение

В результате оценки растений исходной популяции при различных концентрациях ПЭГ-8000 были выявлены статистически значимые различия между двумя вариантами (10 и 15%) и контролем (табл. 1). В варианте с 20% ПЭГ прорастания семян не отмечали. Влияние ПЭГ

1. Динамика прорастания семян образца CrGCl (RcBrI) на средах с ПЭГ-8000

Вариант	Средняя длина корня /проростка (см)			Группа, отличная от других с 95% достоверностью*
	через 3 суток	через 5 суток	через 10 суток	
Контроль (водный раствор агара)	0,5/0	3,7/2,5	8.5/5.5	A
ПЭГ 10%	0/0	3,0/2,1	7/4,0	B
ПЭГ 15%	0/0	1,1/2,0	2,1/3,5	C
ПЭГ 20%	0/0	0/0	0/0	D
НСР95	0,03/0	0,8/0,5	1,3/1,1	

ибольшей длиной первичного корешка были пересажены в почву и далее выращивались в климатической камере при температуре 24/18°C и 16-часовом световом дне. В таких условиях размножение растения от семени до семени занимало около 60 суток, но продуктивность растений была выше, чем при рекомендованной методике выращивания (Williams, Hill, 1982).

тения, число настоящих листьев, масса корня) в фазе начала цветения в сравнении с растениями исходной популяции. Статистическую обработку данных, полученных на основании 4 серий опыта, проводили по схеме многофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Дункана с помощью программного пакета STATISTICA 6.0 (STATSOFT, USA)

проявлялось в существенном замедлении роста как первичного корешка, так и подсемядольного колена проростка.

Среди проростков, полученных из семян, размещенных на 15% ПЭГ-8000, были отобраны пять с длиной корешка от 3 до 5 см (при средней длине через 5 суток 1,2 см из 240 проростков). Два растения погибли на ранней стадии развития, а три

2. Распределение длин первичного корня у растений исходной популяции (P) и потомства трех отобранных растений первого поколения после самоопыления (S₂), и обратного скрещивания (BC) при проращивании с 15% ПЭГ на 5-е сутки после посева

Популяция	Число растений с длиной первичного корня, см				Средняя длина, см	Число семян, шт.	% кР	Группа отличная от других с 95% достоверностью*
	0	<1	1-3	3-5*				
P	56	89	90	5	1,2	240	100	A
S₂/1	0	29	32	22	2,02	85	168	B
S₂/2	0	31	41	19	2,08	91	173	B
S₂/3	0	12	34	45	2,86	92	238	B
BC₁	14	22	25	0	1,18	61	98	A
BC₂	61	20	22	0	1,1	58	92	A
BC₃	11	15	20	0	1,19	46	99	A

3. Морфологические признаки растений, отобранных по признаку устойчивости к 15% ПЭГ-8000, в сравнении с родительской популяцией

Популяция	Морфологические признаки растений в фазе цветения (среднее ± ст. отклонение)				Масса корня от массы растения, %
	Высота растения, см	Масса растения, г	Число листьев	Масса корня, г	
P	16,3±5,8	10,0±4,5	4,4±2,0	5,1±2,3	51,0
S2/1	21,4±3,3	15,6±2,5	5,7±1,6	9,2±2,9*	58,9
S2/2	20,5±4,7	16,6±4,3*	5,9±2,6	10,4±5,0*	63,4
S2/3	29,1±6,8	18,9±3,6*	6,5±2,0*	12,1±3,8*	64,0

дали семена от самоопыления и были скрещены с отобранным родительским растением, потомство которого было восприимчиво к ПЭГ.

Проведенная оценка потомства растений, относительно устойчивых к ПЭГ-8000 в концентрации 15% показала существенное увеличение средней длины первичного корешка (табл. 2). При этом семена, полученные от обратного скрещивания устойчивых растений с восприимчивым родителем, не отличались от исходной популяции при проращивании в тех же условиях.

При оценке морфологических признаков исходных и потомства отобранных растений (табл. 3) было выявлено существенное увеличение

высоты, массы и числа листьев, образовавшихся к началу цветения. Примечательно, что у потомства всех трех растений было увеличено соотношение массы корня к общей массе растения (с 51% до 58-64%).

Увеличение устойчивости к осмотическому стрессу в потомстве отобранных растений и отсутствие повышенной устойчивости в популяции от обратного скрещивания соответствует с наибольшей вероятностью рецессивному контролю признака. Таким образом, данная устойчивость присутствует в популяции растений с частотой около 2% (5 растений из 240). Увеличение роста, массы растений и, особенно, массы корня указывают на повышенный

синтез ауксинов, что вызывает усиленный рост корневой системы, и стимулирует всасывающую активность корня, но может замедлять развитие надземной части растения и наступление фаз онтогенеза.

Результаты исследований свидетельствуют о пригодности метода отбора на устойчивость к повышенному осмотическому давлению на стадии прорастания семян у *Brassica rapa* L. Данный признак достоверно коррелирует с засухоустойчивостью растений (Handa et al., 1983). При этом полученные растения имели и большую высоту, и массу, что коррелирует с общей урожайностью как у овощных, так и у кормовых культур.

Литература

- Gill P.K., Sharma A.D., Singh P., Bhullar S.S. Effect of various abiotic stresses on the growth, soluble sugars and water relations of sorghum seedlings grown in light and darkness // *Bulg. J. Plant Physiol.* – 2001. – Vol.27. – №1/2. – P. 72-84.
- Handa A.K., Bressan R.A., Handa S. et al. Clonal variation for tolerance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured tomato cells // *Plant Physiol.* – 1983. – Vol.72. – P. 645-653.
- Jang J.C., Sheen J. Sugar sensing in higher plants // *Trends Plant Sci.* – 1997. – Vol.2. – №2. – P. 208-213.
- Yordanov I., Velikova V., Tsonev T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance // *Photosynthetica.* – 2000. – Vol.38, №1. – P. 171-186.
- Williams P.H., Hill C.B. Rapid-cycling population of *Brassica* and *Raphanus* species for genetic studies. // *Eucarpia Cruciferae Newsletter*. (Scottish Crop Research Institute). -1982. -B.7. -C.24-25.
- Wang W., B. Vinocur, A. Altman. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. - 2003. – *Plant* 218: 1-14.
- Altman A. From plant tissue culture to biotechnology: scientific revolutions, abiotic stress tolerance, and forestry. // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* . – 2003. – 39:75-84.
- Pelah D., O. Shoseyov, A. Altman. Drought tolerance: a molecular perspective. /In A. Altman and M. Ziv, eds. *Horticultural Biotechnology: In Vitro Culture and Breeding*. // *Acta Horticulturae.* – 1997.-447. – P. 439-445.

- S. Lee, E. J. Lee, E. J. Yang, J. E. Lee, A. R. Park, W. H. Song, O. K. Park. Proteomic Identification of Annexins, Calcium-Dependent Membrane Binding Proteins That Mediate Osmotic Stress and Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. // *PLANT CELL*.- June 1, 2004.- 16(6).-P. 1378 – 1391.
- G. Frandsen, F. Miller-Uri, M. Nielsen, J. Mundy, and K. Skriver Novel Plant Ca-binding Protein Expressed in Response to Abscisic Acid and Osmotic Stress. // *J. Biol. Chem.*- January 5, 1996.- 271(1).- P. 343-348.
- Basra Amarjit S., Basra Ranjit K. Mechanisms of environmental stress resistance in plants. / 1997, OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam. The Netherlands, Harwood Academic Publishers.
- A. Blum, Jingxian Zhang, H.T. Nguyen. Consistent differences among wheat cultivars in osmotic adjustment and their relationship to plant production. // *Field Crops Research*.- December, 1999.-Volume 64.- Issue 3.- P.287-291.
- J. M. Morgan. Growth and yield of wheat lines with differing osmoregulative capacity at high soil water deficit in seasons of varying evaporative demand. // *Field Crops Research*, March, 1995.-Volume 40.- Issue 3.- P.-143-152.
- Judy D. Timpa, John J. Burke, Jerry E. Quisenberry and Charles W. Wendt. Effects of Water Stress on the Organic Acid and Carbohydrate Compositions of Cotton Plants. // *Plant Physiology*.- 1986.-82. – P.724-728.
- Evans T.A., W.G. Pill. Emergence and seedling growth from osmotically primed or pregerminated seeds of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). // *Journal of Horticultural Science*.- 1989.-64.-P.275 282.