

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ РАЗРАБОТКИ АЛГОРИТМА ОТБОРА ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ ФОРМ КУКУРУЗЫ

<sup>1</sup>Ротарь Е.А., <sup>1</sup>Ротарь А.И., <sup>2</sup>Комарова Г.Е.,  
<sup>1</sup>Боунегру С.Н., <sup>1</sup>Фратя С.П.

<sup>1</sup>Институт растениеводства «Порумбень»,  
<sup>2</sup>Государственный Аграрный Университет Молдовы

**Key words:** *algorithm, drought resistance, physiological dryness of seeds, water regime, lines, hybrids, corn.*

Как свидетельствуют данные агроэкологических исследований, проводимых в Республике Молдова, за последние два десятилетия вероятность нарастания частоты засушливых периодов вегетации для указанного региона возрастает до 25-50%, что становится серьезным препятствием для успешного получения стабильных высоких урожаев культуры *Zea mays* L.[1]. Логическим условием преодоления отрицательного влияния неблагоприятных факторов среды (наряду с общим подъемом агротехнических приемов) является создание и внедрение в производство высокопродуктивных и адаптивных к засухе гибридов кукурузы. Соответственно, становится все более актуальной активизация использования в процессе селекции

кукурузы на устойчивость к засухе научных достижений в области прикладной физиологии и биохимии сельскохозяйственных культур [2,3].

В связи с этим в Институте Растениеводства «Порумбень» с 2015 года реализуется институциональный проект, главная цель которого состоит в создании алгоритма отбора засухоустойчивых генотипов кукурузы на основе проведения их физиолого-биохимической диагностики в условиях Республики Молдова для ускорения целенаправленного создания на их базе засухоустойчивых гибридов кукурузы [9].

Для создания методологической базы разрабатываемого алгоритма на первом этапе исследовательских работ было необходимо провести комплексные исследования в следующей последовательности:

- подбор экспериментальной выборки линий кукурузы, выделенных селекционерами по признаку толерантности к засухе из коллекции исходного материала *Zea mays L.* Института растениеводства «Порумбень»;

- анализ целесообразности использования метода электрофореза белков с целью экспресс-идентификация биологически чистых генотипов для их последующей физиолого-биохимической диагностики на устойчивость к засухе;

- проверка эффективности физиологических методов по отбору линий кукурузы с высоким потенциалом устойчивости к засухе в соответствии с агробиологической последовательностью смены стрессовых факторов:

- а) фактора весенней почвенной засухи в период набухания и прорастания семян;

- в) факторов почвенной и атмосферной засухи в период цветения и в период молочно-восковой спелости зерна кукурузы;

- обобщение методологических принципов разработки алгоритма отбора засухоустойчивых линий кукурузы.

### **Материалы и методы**

В связи с тем, что основные исследовательские работы селекционеров ИР «Порумбень» по созданию засухоустойчивых линий и гибридов кукурузы проводятся в лаборатории селекции кукурузы для Южных Зон, с целью реализации первого этапа эксперимента 21015 года были использованы селекционные формы

кукурузы именно этой лаборатории: 82 линии ( и семьи), 80 экспериментальных и 50 конкурсных гибридов.\*

В работе использованы данные метеорологической станции Бэлцаты района Криулень за 2014-2015 гг, а также следующие методы:

метод электрофореза зеина[4];

определение всхожести и энергии прорастания семян кукурузы – по актуализированным в Республике Молдова стандартам [5,6];

определение засухоустойчивости растений путем проращивания семян на растворах сахарозы [10];

определение водоудерживающей способности листа в лабораторных условиях завядания [7];

определение коэффициента стабильности толщины листа на приборе Тургоромер-1 в лабораторных условиях завядания [8];

программы Microsoft Word, Microsoft Office, Excell 2003 для статистической обработки данных.

### **Результаты и обсуждения**

Из имеющегося набора методов по оценке биологической чистоты и генетической типичности используемого для физиологической диагностики материала был выбран метод электрофореза запасных белков эндосперма кукурузы, гарантирующий точность идентификации генотипов по белковым маркерам за короткие сроки анализа (4-5 дней эксперимента). Анализ полученного линейного материала продемонстрировал диапазон варьирования биологической типичности от 91 до 100%, в то время как степень гибридности изученных экспериментальных гибридных комбинаций и представленных конкурсных гибридов характеризовалась пределами колебаний от 95 до 100%.

Полученные результаты позволили сформулировать первый методологический принцип для разработки алгоритма отбора засухоустойчивых форм кукурузы, а именно: требование включения в

---

*\*Авторы выражают глубокую признательность заведующему лаборатории селекции кукурузы для Южных Зон д-р.с-х наук В.Матичук и д-р.с-х наук Г.Притула за предоставленный материал.*

процесс физиологической диагностики толерантности к засухе только тех генотипов кукурузы, которые характеризуются 100% типичностью по белковым профилям зеина.

Это требование ни в коей мере не ставит под сомнение вероятность потери ценных по обсуждаемому показателю генотипов. Невыравненные формы должны быть возвращены селекционеру для доведения интересующего генотипа до 100% типичности.

В соответствии с третьей задачей проведенной работы вся обсуждаемая выборка была протестирована на толерантность к засухе.

В качестве фактора, моделирующего ситуацию весенней почвенной засухи в период набухания и прорастания семян, был выбран гипертонический раствор сахарозы (10 атм.), определяющий физиологическую сухость семян кукурузы. Как по энергии прорастания (3-й день прорастания), так и по стандартному показателю всхожести (7-й день прорастания), был отмечен широкий диапазон варьирования обсуждаемых величин: от 0% до 98% в гипертоническом растворе сахарозы и от 33 до 98% в контрольных вариантах с дистиллированной водой. Для удобства интерпретации с последующим использованием в промежуточном алгоритме отбора засухоустойчивых линий кукурузы был введен коэффициент устойчивости к физиологической сухости на стадии набухания и прорастания семян кукурузы ( $C_{rus}$ ):

$$C_{rus} = \frac{G_{10\ atm}}{G_{H_2O}},$$

где  $G_{10\ atm}$  - % всхожести на 3-ий или на 7-ой день прорастания в гипертоническом растворе сахарозы,

$G_{H_2O}$  - % всхожести на 3-ий или 7-ой день прорастания в воде (контрольный вариант).

На основе проведенного скрининга была составлена шкала баллов по оценке устойчивости изучаемых генотипов к физиологической сухости семян, т.е. показатель устойчивости к моделируемому фактору весенней почвенной засухи в период набухания и прорастания семян (табл.1).

Был констатирован широкий диапазон варьирования коэффициента устойчивости к физиологической сухости семян кукурузы на 3-й день (энергия прорастания) и на 7-й день прорастания (% всхожести): от

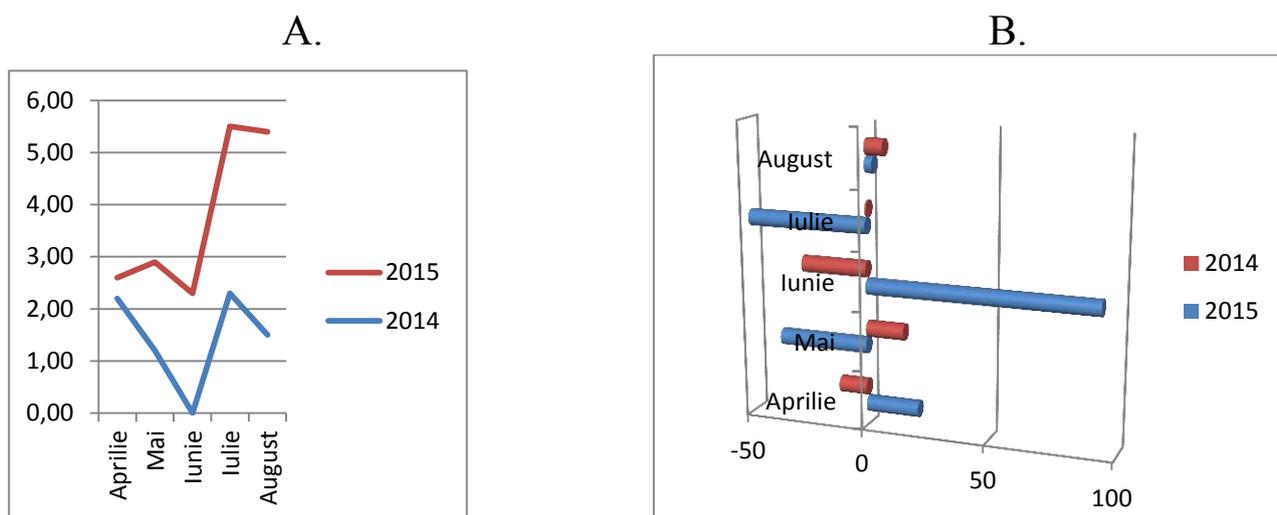
0,00 до 1,04 и от 0,00 до 1,05, соответственно, что свидетельствует о перспективе успешного отбора генотипов с высоким потенциалом толерантности к весенней почвенной засухе по указанному показателю.

**Таблица 1.** Распределение генотипов по группам устойчивости в соответствии с коэффициентом устойчивости к физиологической сухости семян кукурузы

Наименование показателя	Степень устойчивости				
	высоко устойчивый	устойчивый	средне устойчивый	слабо устойчивый	неустойчивый
$C_{rus}$	>0,9	0,8-0,9	0,71-0,8	0,61-0,7	<0,6
Баллы	5	4	3	2	1

Таким образом, в качестве второго методологического принципа для разработки алгоритма отбора засухоустойчивых форм кукурузы введено требование проведения оценки изучаемых генотипов по коэффициенту устойчивости к физиологической сухости семян кукурузы в период набухания и прорастания семян.

Наиболее важной частью реализации третьей задачи проведенной работы явился скрининг изученного материала по параметрам водного режима с целью проверки эффективности методов оценки степени устойчивости к комплексному стрессовому фактору - почвенной и атмосферной засухи - в критические для кукурузы периоды онтогенетического развития: фазу цветения и фазы молочно-восковой спелости. Традиционно оценка параметров водного режима листа (водоудерживающей способности и коэффициент стабильности толщины листа) проводится в лабораторных условиях на основе создания двухчасового стресса в форме завядания. В этом случае большую роль играет исходное физиологическое состояние растения, с которого отбирается проба листьев. Следовательно, значимость климатического фактора соответствующего сезона вегетации приобретает особую значимость для объективной оценки эффективности методов оценки водного режима листа изучаемого генотипа.



**Рис.1.** Динамика отклонений от средних многолетних показателей:  
 А – по средним температурам воздуха ( $t^{\circ}\text{C}$ );  
 В – по ежемесячной сумме атмосферных осадков (мм) характеризующей период вегетации кукурузы в 2014 и 2015 г.г. (метеорологическая станция Бэлцата, р-н Криулень).

Как свидетельствуют данные рис.1, сопоставление климатических характеристик сезона вегетации 2015 года в сравнении с 2014 годом позволяет констатировать, что полевые условия 2015 года определялись комплексом стрессовых факторов как по атмосферной, так и по почвенной засухе в критическую для онтогенеза кукурузы фазу цветения и их существенным последствием во вторую критическую фазу вегетационного развития кукурузы – фазу молочно-восковой спелости зерна.

Таким образом, благодаря засушливому сезону вегетации 2015 года, исходное физиологическое состояние каждого отобранного растительного образца, поступавшего в лабораторию, изначально характеризовалось активизированным индивидуальным потенциалом адаптивности к засухе, детерминированного особенностями конкретного генотипа. Соответственно, искусственное моделирование в лабораторных условиях засухи (двухчасовое завядание) позволило получить результаты по показателям водного режима листа кукурузы, наиболее приближенные к оценке влияния генотипа на уровень толерантности к засухе каждого изученного образца.

По каждой из изученных критических фаз онтогенеза, для соответствующего оцениваемого образца, цифровые показатели

водоудерживающей способности листа и коэффициента стабильности толщины листа распределяли по группам устойчивости и присваивали им соответствующую градацию, выраженную в баллах (табл.2). Установлено, что среди изученных 82 линий в засушливом 2015 году по показателям водного режима, коррелирующего с признаком высокой толерантности к засухе, была выделена лишь 1 линия кукурузы, 22 линии были включены в группу среднеустойчивых и 59 – в группу слабоустойчивых к засухе. Для экспериментальных комбинации и конкурсных гибридов, геном

**Таблица 2.** Распределение генотипов по группам устойчивости в соответствии с показателями водного режима листа кукурузы

Наименование показателя	Степень устойчивости к засухе			
	устойчивый	средне устойчивый	слабо устойчивый	неустойчивый
Водоудерживающая способность листа (% потери воды)	< 25.00	25.00 -29.99	30.00– 34.99	>35.00
Коэффициент стабильности толщины листа ( $T_1/T_2$ мкм)	0.80	0.70 – 0.79	0.60 – 0.69	<0.60
<b>Баллы</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

которых характеризуется гетеозиготным набором хромосом, в группу устойчивых к засухе было выделено 156 форм, в группу среднеустойчивых – 73 гетерозиготные формы, а в группу слабоустойчивых – 41 гибридная комбинация.

Таким образом, в качестве третьего методологического принципа, который целесообразно включить в алгоритм отбора засухоустойчивых форм кукурузы, рекомендуется использование комплекса показателей водного режима листа (величины водоудерживающей способности и коэффициента стабильности толщины листа), диагностируемого по двум критическим фазам онтогенетического развития кукурузы – фазы цветения и фазы молочно-восковой спелости зерна.

В то же время полученные результаты явились существенным аргументом необходимости расширения спектра физиолого-биохимических методов диагностики линий кукурузы на засухоустойчивость, помимо использования показателей водного режима листа.

Поэтому, в качестве четвертого методологического принципа для разработки алгоритма отбора засухоустойчивых форм кукурузы предложено проводить финальную оценку указанных форм путем вычисления среднего балла по всем фазам диагностики: период набухания и прорастания семян, фазу цветения, фаза молочно-восковой спелости зерна.

Оценка конечного среднего балла соответствует интерпретации, представленной в табл.3.

**Таблица 3.** Шкала баллов по итоговой физиолого-биохимической оценке изучаемых генотипов кукурузы на устойчивость к засухе

<b>Средний оценочный балл</b>	<b>Степень устойчивости к засухе</b>
5,0	высокоустойчивый
4,50 – 4,99	устойчивый
4,00 - 4,49	среднеустойчивый
3,00 - 3,99	слабоустойчивый
< 3,00	неустойчивый

На основе проведения итоговой оценки среди изученных генотипов кукурузы была отобрана для дальнейшего изучения выборка из 51 линий, характеризующихся контрастностью по степени толерантности к засухе.

### **Заключение**

Таким образом, предложены 4 ключевые методологические принципы физиолого-биохимической диагностики засухоустойчивых форм кукурузы:

включение в процесс физиологической диагностики толерантности к засухе только тех генотипов кукурузы, которые характеризуются 100%-ной типичностью по белковым профилям проламиновой фракции белка;

проведение оценки изучаемых генотипов по шкале баллов, определяющих их распределение в соответствии с коэффициентом устойчивости к физиологической сухости семян в период набухания и прорастания семян;

использование шкалы баллов, распределяющих изучаемые генотипы кукурузы по группам устойчивости к засухе по комплексу показателей водного режима листа (величины водоудерживающей способности и коэффициента стабильности толщины листа), диагностируемых по двум критическим фазам онтогенетического

развития кукурузы – фазы цветения и фазы молочно-восковой спелости зерна;

введение финальной оценки изучаемых генотипов кукурузы на устойчивость к засухе по шкале баллов, являющихся усредненным итоговым показателем физиологической диагностики по всем трём критическим для кукурузы фазам онтогенеза:

- а) период набухания и прорастания семян;
- б) фазу цветения;
- в) фазу молочно-восковой спелости зерна.

Учитывая специфический характер селекционного процесса по созданию высокогетерозисных гибридов кукурузы, сделано заключение о необходимости сконцентрировать экспериментальную задачу институционального проекта 2016 года на разработке промежуточного алгоритма *отбора засухоустойчивых линий* кукурузы с использованием предложенных 4-х методологических принципов физиолого-биохимической диагностики засухоустойчивых форм кукурузы и апробации планируемого алгоритма на 51-ой линии, отобранных из продиагностированных в 2015 году 82 линий, контрастных по степени устойчивости к засухе.

### Библиография

**Puțuntică A.**, The Climate Change Impact Analysis and their Tendencies in the Republic of Moldova. //The International Conference “Life Sciences in the Dialogue of Generations”. Abstract Book. Chișinău. 2016, p.133-134.

**Reyazul Rouf Mir**, Mainassara Zaman-Allah, Nese Sreenivasulu, Richard Trethowan, Rajeev K. Varshney. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. Theor. Appl. Genet. 2012. V. 125. P. 625–645.

**Rosenzweig C.**, Iglesias A. Potencial Impacts of Climate Change on World Food Supply, <http://sedac.ciesin.columbia.edu>; accessed August 9, 2006.

**Rotari A**, Comarova G., Guțanu C. Standard Moldovean SM 233:2003. Seminte de porumb. Determinarea purității biologice a liniilor consangvinizate și a gradului de hibridare la semințele hibridilor de porumb de prima generație prin metoda de electroforeză a proteinelor. ”Moldova-Standard”, Chișinău, 2003. 37c.

**STAS 5447-72.** Standarde de calitate cereale. Porumb pentru consum. Standart de Stat, <http://cereale.wikispaces.com/file/view/Standarde+de+calitate+cereale.pdf>, Institutul Român de standar-dizare, p.4.7, p.3.

**ГОСТ 3 52325-2005.** Семена сельскохозяйственных растений. Сортные и посевные качества. Москва. Стандартинформ.2005, 23с.

**Кушниренко М. и др.** Экспресс-методы диагностики жаро- и засухоустойчивости и сроков полива растений. Кишинев: Штиинца. 1986 – 37с.

**Ротарь А.И.** Эффективность научного сотрудничества Института Растениеводства «Порумбень» и агрономического факультета Государственного Аграрного Университета Молдов. Univ.Agrară de Stat din Moldova. Lucrări științifice, Vol. 39. Agronomie și Ecologie. Chișinău, 2013, p. 366-370.

**Ротарь Е.А., Ротарь А.И., Комарова Галина, Притула Г.** Перспективы развития прикладной физиологии и биохимии кукурузы для сельского хозяйства Республики Молдова. Culegere jubiliară. Institutul de Fitotehnie”Porumbeni” - 40 ani de activitate științifică, Pașcani. 2014, p.205-210.

**Удовенко Г.В.** Общие требования к методам и принципам диагностики устойчивости растений к стрессам. В сб.: Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям: Метод. Руководство. Л. 1988. 5-10с.

## **METHODOLOGICAL PRINCIPLES FOR SELECTION ALGORITHM ELABORATION OF CORN DROUGHT- RESISTANT FORMS**

*<sup>1</sup>Rotari E., <sup>1</sup> Rotari A., <sup>2</sup>Comarova G.,  
<sup>1</sup>Bounegru S., <sup>1</sup>Fratea S.,  
<sup>1</sup>Institute of Crop Production “Porumbeni”,  
<sup>2</sup>State Agrarian University of Moldova*

### **Abstract**

The article presents an experimental substantiation for the use of 4 key methodological principles of physiological and biochemical diagnostics of drought-resistant forms of maize. The conclusion is made about the necessary to develop an intermediate algorithm for selecting drought-resistant maize lines using the proposed 4 methodological principles on the 51 lines, selected from the tested 82 lines are contrasting by drought resistance degree.