На правах рукописи

Смирнова Елизавета Валерьевна

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ОЦЕНКЕ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ

Специальность: 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Краснодар
2018

Диссертационная работа выполнена в ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина», а также в отделе селекции и семеноводства ячменя ФГБНУ «НЦЗ имени П. П. Лукьяненко» и селекционно-семеноводческой фирме ООО «Агростандарт».

Научный руководитель доктор сельскохозяйственных наук, профессор **Репко Наталья Валентиновна**

Официальные оппоненты: **Казакова Алия Сабировна,** доктор биологических наук, профессор кафедры «Агрономии и селекции сельскохозяйственных культур» АЧИИ ФГБОУ ВО Донской ГАУ

Зеленский Алексей Григорьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела селекции ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса»

Ведущая организация – ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный Научный Аграрный Центр»

Защита состоится « 11» декабря 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006.026.01 при ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» по адресу: 350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, 3, тел.: (8612) 294-198, 294-149.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВНИИ Риса и на сайте ВАК РФ http://vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан « » ноября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 006.026.01,
кандидат биологических наук С. С. Чижикова

Актуальность темы. Озимый ячмень – одна из основных зернофуражных культур, возделываемых в Российской Федерации.

В современной селекции, при создании новых перспективных сортов, селекционер должен вести направленную работу по всему спектру хозяйственно-ценных признаков, поскольку конечная урожайность напрямую зависит от степени адаптивности культуры к биотическим и абиотическим факторам среды.

К основным причинам гибели озимых культур в осенне-зимний период относят в равной степени неблагоприятные факторы среды и недостаточную зимостойкость растений. Одним из важнейших адаптивных признаков для озимого ячменя является морозостойкость – главный компонент успешной перезимовки растений. Методы традиционной селекции в настоящее время являются основными при определении морозоустойчивости исходного материала озимого ячменя. Однако они имеют некоторые недостатки: трудоемкость, времязатратность, зависимость от сложившихся погодно-климатических условий в конкретные годы исследований (В. М. Шевцов, 2008; Е. Г. Филиппов, 2003; Н. В. Серкин, 2014).

Значительного прогресса в усовершенствовании методов селекции можно достичь, выявив надежные способы обнаружения узловых моментов в ряде элементарных процессов, формирующих хозяйственно-ценные признаки, и подобрав простые, дешевые маркеры для массового скрининга исходного и селекционного материала (В. К. Плотников, 2016).

Цель и задачи исследований. Цель работы – разработка новых методов оценки морозоустойчивости озимого ячменя с применением биологических и молекулярных маркеров для ускорения селекционного процесса, повышения его эффективности и снижения трудозатрат. Поставленная цель достигалась посредством решения следующих задач:

- разработать и оптимизировать метод использования биологических маркеров в оценке морозоустойчивости озимого ячменя;
- провести скрининг изучаемых образцов на наличие/отсутствие генов отвечающих за морозоустойчивость озимого ячменя и определить структурное положение выявленных генов;
- оценить зимостойкость сортов и образцов посредством применения лабораторных и полевых методов традиционной селекции;
- выявить корреляционную зависимость между результатами оценки морозоустойчивости традиционными и вновь созданными и усовершенствованными методами;
- определить генотипы озимого ячменя с повышенными значениями устойчивости к кислой среде почвенного раствора;
- дать хозяйственно-биологическую характеристику сортам озимого ячменя, переданным на ГСИ.

Научная новизна работы. Впервые проведена работа по использованию Трилона Б в качестве биологического маркера при оценке исходного и селекционного материала озимого ячменя на морозостойкость.

С помощью метода молекулярного маркирования определены сорта и линии, имеющие в своем генотипе гены морозоустойчивости cbf 2, cbf 16 и cor 14b. Получены результаты структурного анализа генов изучаемых образцов

Определена корреляционная взаимосвязь между результатами морозоустойчивости форм озимого ячменя селекции НЦЗ им. П. П. Лукьяненко и их толерантностью к кислой среде почвенного раствора. Выявлены и отобраны лучшие устойчивые образцы для дальнейшего селекционного изучения.

В соавторстве созданы и переданы на Государственное сортоиспытание три сорта озимого ячменя: Юрий, Мадар, Версаль.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены экспериментальные данные, подтверждающие актуальность использования биологических маркеров в качестве методов оценки исходного и селекционного материала озимого ячменя на морозостойкость. Проведено генотипирование изучаемых коллекционных образцов. Получен патент на способ оценки морозоустойчивости озимого ячменя. Переданы на Государственное сортоиспытание три сорта озимого ячменя.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Использование биологических и молекулярных маркеров в оценке морозоустойчивости озимого ячменя.
2. Результаты лабораторно-полевых методов оценки морозоустойчивости озимого ячменя.
3. Хозяйственно-биологическая характеристика сортов, переданных на государственное сортоиспытание.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов, рекомендаций. Вся экспериментальная работа подтверждается достаточным объемом и результатами исследований, личным участием автора в получении экспериментальных данных. Представленные результаты были получены в ходе лабораторных и полевых исследований, обработаны различными методами биометрической статистики с использованием компьютерных программ. По результатам исследований сделаны выводы и даны рекомендации.

Апробация работы. Основные положения работы докладывались, обсуждались и получили одобрение специалистов на заседаниях кафедры генетики, селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений Кубанского государственного аграрного университета им. И. Т. Трубилина в 2014 – 2018 гг. (г. Краснодар); на IX Всероссийской научно–практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение агропромышленного комплекса», 2015 г. (г. Краснодар); на методических советах НЦЗ имени П. П. Лукьяненко в 2016 – 2017 гг. (г. Краснодар); на конкурсе научных разработок по приоритетным направлениям развития агропромышленного комплекса среди молодых ученых, 2016 г. (г. Краснодар); на X Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120–летию И. С. Косенко, 2016 г. (г. Краснодар); на III международной научно–практической конференции «Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве», Зональный НИИСХ Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого, 2017 г. (г. Киров).

Публикации результатов исследований. Основные положения и результаты диссертационной работы опубликованы в 15 научных статьях, в том числе 10 статей – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов, предложений селекционной практике и производству, списка литературы. Работа изложена на 117 страницах текста в компьютерном исполнении, включает 34 таблицы, 20 рисунков. Список используемой литературы включает 183 источника, в том числе 22 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОЗИМЫЙ ЯЧМЕНЬ – ВОСТРЕБОВАННОСТЬ В ПРОИЗВОДСТВЕ, НАПРАВЛЕНИЯ И МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В главе представлен анализ российских и зарубежных литературных источников по народнохозяйственному значению, распространению и биологическим особенностям озимого ячменя. Проведено изучение методов оценки морозоустойчивости озимого ячменя, основных направлений селекции и методов создания новых сортов.

2. УСЛОВИЯ, МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были выполнены в 2015-2017 гг. на базе Центра Искусственного климата и опытного поля учхоза «Кубань» Кубанского государственного аграрного университета им. И. Т. Трубилина, а также в отделе селекции и семеноводства ячменя ФГБНУ «НЦЗ имени П. П. Лукьяненко» и селекционно-семеноводческой фирме ООО «Агростандарт».

Учебно-опытное хозяйство «Кубань» и НЦЗ им. П. П. Лукьяненко находятся на территории Прикубанского округа города Краснодара.

Почвы представлены черноземом выщелоченным сверхмощным легкоглинистым со средней мощностью гумусового горизонта 147 см.

Центральная зона Краснодарского края по температурному режиму и увлажнению характеризуется умеренно–континентальным, умеренно – влажным и теплым климатом.

При проведении наших исследований в качестве исходного материала использовались сорта и селекционные линии селекции КубГАУ имени И. Т. Трубилина, НЦЗ имени П. П. Лукьяненко, ВНИИЗК имени И. Г. Калиненко. Кроме того, для изучения нами привлекались образцы мировой коллекции ВИР, отечественных селекционных учреждений и зарубежных центров.

Полевые опыты закладывались согласно методике Госкомиссии по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур (1985).

Фенологические наблюдения, учёт урожайности сортов и линий, определение значений структурных признаков осуществляли на основании «Методики государственного испытания полевых культур» (1985), и в соответствии с Методическими указаниями ВИР (1974, 1980), Методическими указаниями по

изучению мировой коллекции ячменя и овса (1981), Международным классификатором СЭВ (1983).

В течение вегетации озимого ячменя фиксировали даты наступления основных фаз роста и развития по методике А. И. Руденко (1950).

Оценку морозостойкости изучаемых образов проводили с помощью модифицированного метода разработанного академиком В. М. Шевцовым. Для этих целей использовали морозильную камеру EKSI, в качестве контроля использовали сорта Самсон и Ларец.

Дополнительно на базе НЦЗ имени П. П. Лукьяненко оценивали зимостойкость сортов и образцов на бетонных стеллажах (П. П. Лукьяненко, 1990).

Для оценки морозоустойчивости сортов озимого ячменя использовали метод определения гигроскопичности зрелого зерна, разработанный В. К. Плотниковым.

Количественное определение содержания углеводов в узлах кущения сортообразцов озимого ячменя проводили в лабораторных условиях согласно методическим указаниям Г. Г. Филипцовой и И. И. Смолич (2004).

Выделение ДНК из этиолированных проростков осуществляли ЦТАБ–методом (Muhammad A. Lodhi, 1994). При этом использовали экстракционный буфер: 20 мМ соль EDTA и 100 мМ Tris-HCl, HCl, 1,4 М NaCl, 2,0% (к общему объему) CTAB (цетилтриметиламониум бромид), 0,2% В-меркаптоэтанол; 3М Na Acetate; 4М NaCl; Хлороформ:спирт 24:1; 5 М NaCl; 2-изопропанол; ТЕ-буфер: 10 мМ Tris-HCl и 1 мМ EDTA, pH 8.0.

ПЦР проводили по следующим параметрам: 94°С– 5 минут начальная денатурация; затем 40 циклов: 94 °С денатурация 30 секудн; 50 °С– отжиг праймеров, 30 секунд; 72 °С– элонгация, 1 минута; 72 °С– финальная элонгация, 10 минут.

Для анализа генетического разнообразия использовали 9 маркеров: iPBS 2228; iPBS 2230; iPBS 2237; iPBS 2415; iPBS 2373; iPBS 2074; ISSR 7; ISSR 8 и ISSR 12. Для оценки исследуемого материала на наличие/отсутствие генов морозоустойчивости были разработаны и использованы маркеры cbf 2; cbf 16 и cor 14b.

Статистическая обработка данных проводилась путём расчетов в Microsoft Excel, а также при помощи программного пакета статистического анализа Statistica Plus 4.0 с применением методик дисперсионного, пошагового множественного регрессионного анализов, планирования эксперимента.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ГЕНОТИПОВ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ НА ЗИМОМОРОЗОССТОЙКОСТЬ

3.1 Использование биологических и молекулярных маркеров в оценке исходного материала озимого ячменя

3.1.1 Оптимизация метода оценки морозоустойчивости озимого ячменя по гигроскопичности зрелого зерна

Путем введения в широкую селекционную практику простых и дешевых методов выявления искомого ценного признака на ранних этапах селекции

можно значительно упростить процесс создания нового сорта и сократить требуемые для этого сроки. Такими простыми методами могут послужить биологические маркеры (В. К. Плотников, 2016).

Взяв за основу метод определения морозоустойчивости озимого ячменя по гигроскопичности зрелого зерна, разработанный доктором биологических наук В. К. Плотниковым, мы провели ряд экспериментов по его усовершенствованию и оптимизации.

Изначально в данном методе для оценки изучаемого материала на морозоустойчивость измельченный шрот зерна экстрагировали буферным раствором содержащим 0,5 М Трис-HCl, pH 8,5; 0,05 М $MgCl_2$; 0,25 М сахарозы. После центрифугирования шрота по объему надосадочной жидкости судили о гигроскопичности и степени морозоустойчивости изучаемого сортообразца.

Исследования, проведённые нами на формах с разной степенью морозоустойчивости показали, что растворы солей 3% NaCl или 50 мМ $MgCl_2$ практически не позволяют оценить разницу в гигроскопичности, то есть этот метод имеет разрешающую способность до 60 %.

После проведения ряда экспериментов было установлено, что метод может быть существенно упрощён за счет удаления из экстрагирующего буфера химического реактива «Трис» и, соответственно, отсутствия необходимости процедуры приготовления буферного раствора с определённым значением кислотности. Опытным путем нами было доказано, что оптимальным условием оценки гигроскопичности зрелого зерна ячменя является применение в исследованиях раствора, содержащего 7% сахара и 50 мМ $MgCl_2$.

Проведенные исследования показали, что экстрагирующий раствор, содержащий 3% NaCl не оказывает никакого влияния на гигроскопичность зерна ячменя, значения всех вариантов были равнозначными, как и в варианте с раствором 50 мМ $MgCl_2$. При использовании 7% сахар, 100 мМ $MgCl_2$ и варианта с 7% сахар различия по сортам наблюдались, но были слишком малы. Использование же опытного раствора, содержащего 7% сахара и 50 мМ $MgCl_2$, позволяло достоверно различать исходный материал по степени морозоустойчивости. Так, уровень гигроскопичности морозоустойчивого стандартного сорта Кондрат в наших исследованиях составил 4,1 мл, а линии Хуторок/КА-3, не отличающейся морозоустойчивостью – 4,9 мл.

Таблица 1 – Гигроскопичности зрелого зерна сортов озимого ячменя, мл

Сорта	Гигроскопичность, мл		Морозостойкость, % (-12°С)
	2013 г.	2014 г.	
Добрыня - 3	3,05	3,42	70,1
Самсон, ст.	3,33	3,85	79,1
Кондрат	3,60	3,90	67,5
Гордей	3,87	4,03	61,9
Кубагро - 1	4,06	4,08	51,0
Агродеум	4,20	4,10	52,1
Кубагро - 3	4,33	4,42	29,8
$НСР_{05}$	1,32	1,05	2,69

Используя оптимизированный метод, была проведена оценка морозоустойчивости сортов озимого ячменя. Данные таблицы 1 свидетельствуют об актуальности применения данного метода при оценке исходного материала озимого ячменя на морозостойкость (таблица 1).

Гигроскопичность изучаемых сортов уменьшалась прямопропорционально снижению их морозоустойчивости. Так, разница в гигроскопичности между стандартным морозостойким сортом Самсон (3,59 мл) и слабоморозостойким сортом Кубагро-3 (4,37 мл) составила 121 %.

Экспериментальные данные свидетельствуют об актуальности применения усовершенствованного метода при оценке исходного материала озимого ячменя на морозостойкость, особенно на ранних этапах селекции. Этот метод прост в исполнении, не требует значительных временных затрат, и для его реализации нужно небольшое количество семенного материала.

3.1.2 Использование Трилона Б в качестве биологического маркера морозоустойчивости сортов озимого ячменя

Основным свойством Трилона Б или динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты является ее способность образовывать устойчивые водорастворимые комплексы с ионами щелочноземельных металлов в широком диапазоне pH (от 2 до 13,5) при температурах до 100 ^{o}C. Будучи связанными с ЭДТА-Na_2, ионы металлов остаются в растворе, но показывают уменьшенную реакцию. В биохимии нуклеиновых кислот динатривая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА-Na_2) обычно используют для связывания катионов магния *in vitro*. Несомненный интерес представляла экспериментальная проверка действия Трилона Б *in vivo* - на прорастание семян сортов озимого ячменя, различающихся по степени морозоустойчивости (В. К. Плотников, 2016).

Проведенный нами ряд экспериментов позволил определить, что Трилон Б в концентрации $1,6\times10^{-2}$ М/л оказывает ингибирующее действие на прорастание семян озимого ячменя. При температуре 28°C прорастает только от 1 до 7 % семян, в то время как на дистиллированной воде – до 30 %. Особенное действие Трилон Б оказывает на корни, при этой концентрации на 3-и сутки они достигали лишь 2–3 мм. В то время как в воде их длина в среднем составляла 5,8 см. При снижении концентрации Трилона Б до $1,6\times10^{-6}$ М/л процесс прорастания семян не ингибировался и данные по опыту были идентичны контролю с дистиллированной водой.

Опытным путем мы установили, что оптимальной является концентрация $1,6\times10^{-3}$М/л, которая подавляет рост колеоптелей и корней проростков озимого ячменя в среднем на 24%. В дальнейшем мы провели сравнительные исследования трёх концентраций Трилона Б: $1,6\times10^{-3}$М/л, $2,4\times10^{-3}$М/л и $3,2\times10^{-3}$М/л.

В процессе оптимизации метода нами изучалось влияние различных концентраций Трилона Б на прорастание семян озимого ячменя, контрастных по морозостойкости сортов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о незначительном подавлении роста корневой системы. При

этом интенсивность этого роста на сортах озимого ячменя снижается в соответствии со степенью их морозостойкости: чем менее морозоустойчив сорт, тем значительнее подавление роста корней при проращивании семян на растворе Трилона Б.

В таблице 2 представлены данные по изучению влияния различных концентраций Трилона Б на рост этиолированных проростков сортов озимого ячменя, контрастных по морозостойкости. Здесь мы наблюдаем подавление роста корневой системы, согласованное со степенью морозостойкости сортов, однако подавление не значительное.

Таблица 2 – Влияние концентрации Трилона Б на длину корней (см) этиолированных проростков сортов озимого ячменя, 2016 г.

Сорт, по мере снижения морозоустойчивости	Длина корня, см		
	Контроль (H_2O)	Трилон Б в концентрации $1,6 \times 10^{-3}$М	Трилон Б в концентрации $2,4 \times 10^{-3}$М
Добрыня - 3	4,77	4,62	3,60
Ларец	5,20	4,04	2,70
Кондрат	4,77	3,98	3,10
Гордей	5,37	4,31	3,39
Кубагро - 1	3,87	3,50	2,83
Кубагро - 3	4,21	2,74	2,74
Агродеум	4,71	2,83	1,91
$НСР_{05}$	0,67		

При концентрации Трилона Б $1,6 \times 10^{-3}$М максимальное подавление роста корней в группе физиологически морозоустойчивых сортов (Добрыня-3, Ларец и Кондрат) составило 23 %, а разница в подавлении роста между сортами различной морозоустойчивости варьировала от 9 до 30 %. При концентрации $2,4 \times 10^{-3}$М максимальное подавление роста корней (48 %) наблюдалось на зимостойком сорте Ларец. В то время как разница между исследуемыми сортами варьировала от 23 до 34 %. Для подтверждения достоверности опыта, различия в росте на данных концентрациях, в сравнении с контролем, были очень малы.

На рисунке 1 представлены данные аналогичного эксперимента, но с использованием большей концентрации Трилона Б ($3,2 \times 10^{-3}$М/л). Полученные результаты свидетельствуют о резком подавлении роста корневой системы в сравнении с контролем относительно степени морозоустойчивости сортов.

Так, длина корня морозоустойчивых сортов Добрыня-3, Кондрат и Самсон при проращивании их на Трилоне Б в концентрации $3,2 \times 10^{-3}$М подавлялась в меньшей степени и составила 2,29 см, 2,24 см и 1,74 см соответственно. Длина корня зимостойкого, но не устойчивого к морозу сорта Ларец составила 0,99 см, подавление роста относительно контроля было на уровне 83 %. В целом по сортам наблюдалось возрастающее подавление роста корней по мере снижения морозоустойчивости сортов: от 18 % (у сорта Добрыня-3) до 76 % (у сорта Агродеум).

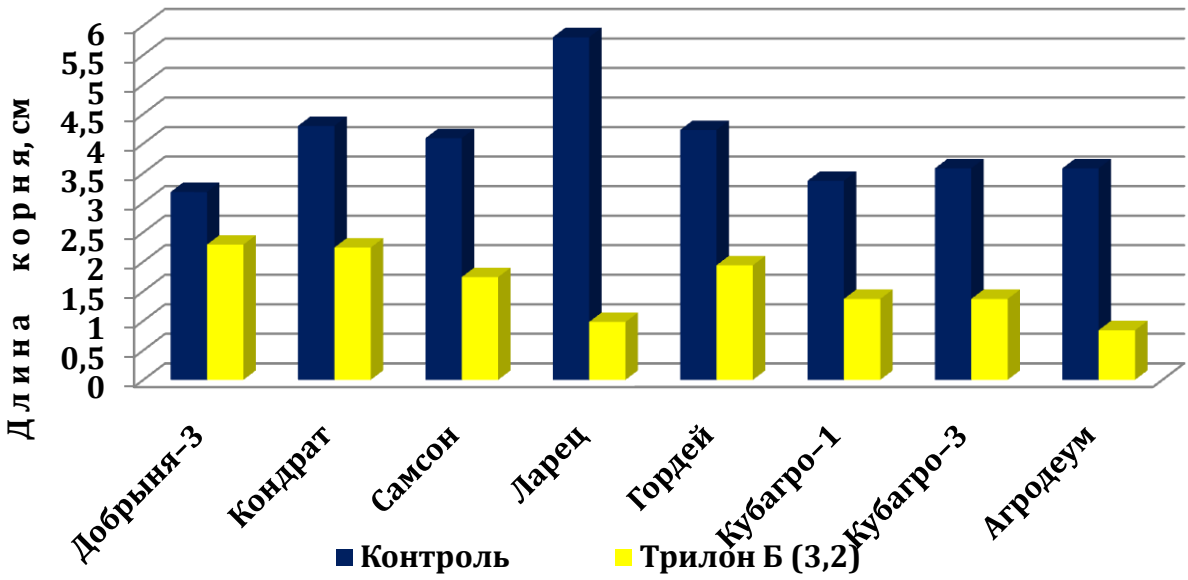

Рисунок 1 - Влияние Трилона Б в концентрации 3,2× 10^{-3}М на рост этиолированных проростков озимого ячменя, 2016 г.

Для подтверждения достоверности полученных результатов была определена корреляционная зависимость экспериментальных данных с применением Трилона Б, в различных концентрациях, с данными прямого промораживания. Коэффициент корреляции оценки морозоустойчивости сортов озимого ячменя с использованием Трилона Б с результатами проморозки свидетельствует о достоверности полученных результатов и возможности применения данного метода для массовой оценки морозоустойчивости исходного и селекционного материала озимого ячменя (рисунок 2).

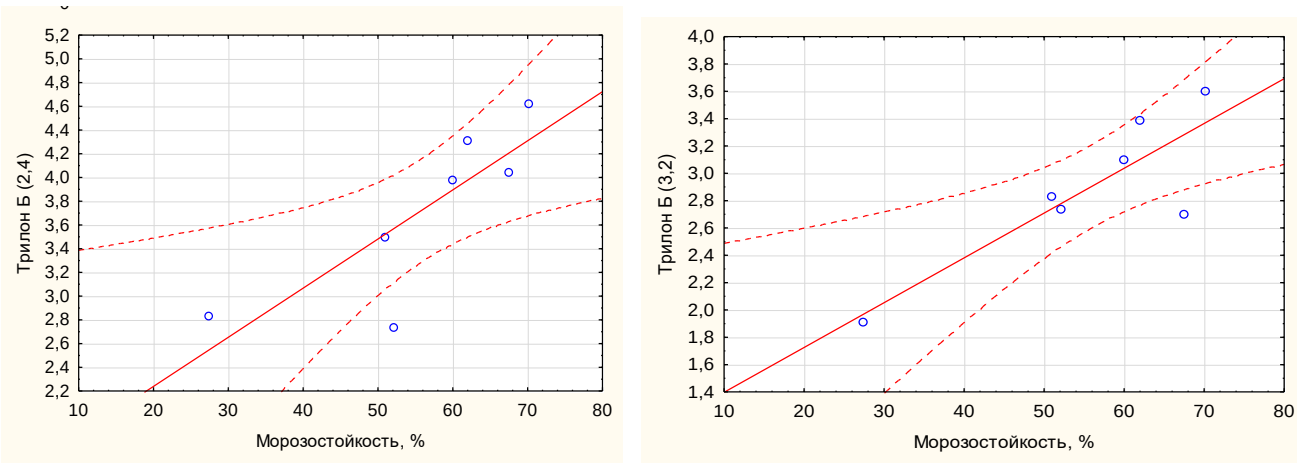

Рисунок 2 – Корреляционная взаимосвязь морозоустойчивости и действия Трилона Б в концентрациях 2,4× 10^{-3}М и 3,2× 10^{-3}М, 2016 г.

Корреляционная зависимость морозоустойчивости и действия Трилона Б возрастала прямо пропорционально увеличению используемой концентрации этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Так, при концентрации 1,6× 10^{-3} М коэффициент корреляции составил r = 0,61. С увеличением концентрации Трилона Б до 2,4× 10^{-3}М увеличилась и корреляционная взаимосвязь r = 0,82 (рисунок 2). Максимального своего значения коэффициент достиг при концентрации 3,2× 10^{-3}М r = 0,85 (рисунок 3).

Таким образом, анализ интенсивности роста корневой системы этиолированных проростков озимого ячменя, обработанных раствором Трилона Б в концентрации 3,2×10^{-3} М/л является оптимальным, простым и эффективным приёмом оценки морозоустойчивости исходного материала озимого ячменя. Применение данного метода особенно актуально на ранних этапах селекционного процесса при наличии небольшого количества гибридных семян.

Результатом проделанной в этом направлении работы является получение Патента «Способ оценки морозоустойчивости озимого ячменя» в соавторстве (Патент № 2463833).

3.1.3 Использование молекулярных маркеров в оценке морозоустойчивости озимого ячменя

Использование молекулярных маркеров становится неотъемлемой частью современной селекции.

Для изучения коллекционных образцов озимого ячменя на наличие/отсутствие генов морозоустойчивости нами были разработаны и использованы маркеры на гены cbf 2, cbf 16 и cor 14b, отвечающие за толерантность к отрицательным температурам. Нуклеотидная последовательность маркеров была разработана на основе расшифрованного генома американского сорта озимого ячменя Маха, информация по которому находится в открытом доступе в базе NCBI (Национальный центр биотехнической информации США).

Для исследования нами были выбраны сорта и сортообразцы различных селекционных учреждений: НЦЗ имени П. П. Лукьяненко, КубГАУ имени И. Т. Трубилина, ФГБНУ «АНЦ «Донской», ООО «Агростандарт».

На рисунках 3 – 5 приведены электрофореграммы изучаемого селекционного материала.

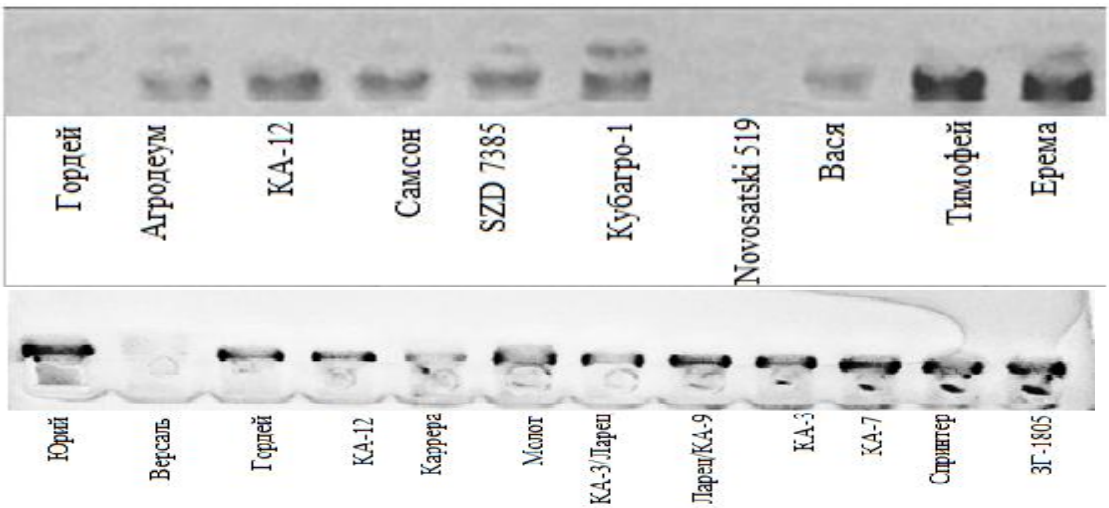

Рисунок 3 – Электрофореграммы амплификации с геном cbf 2

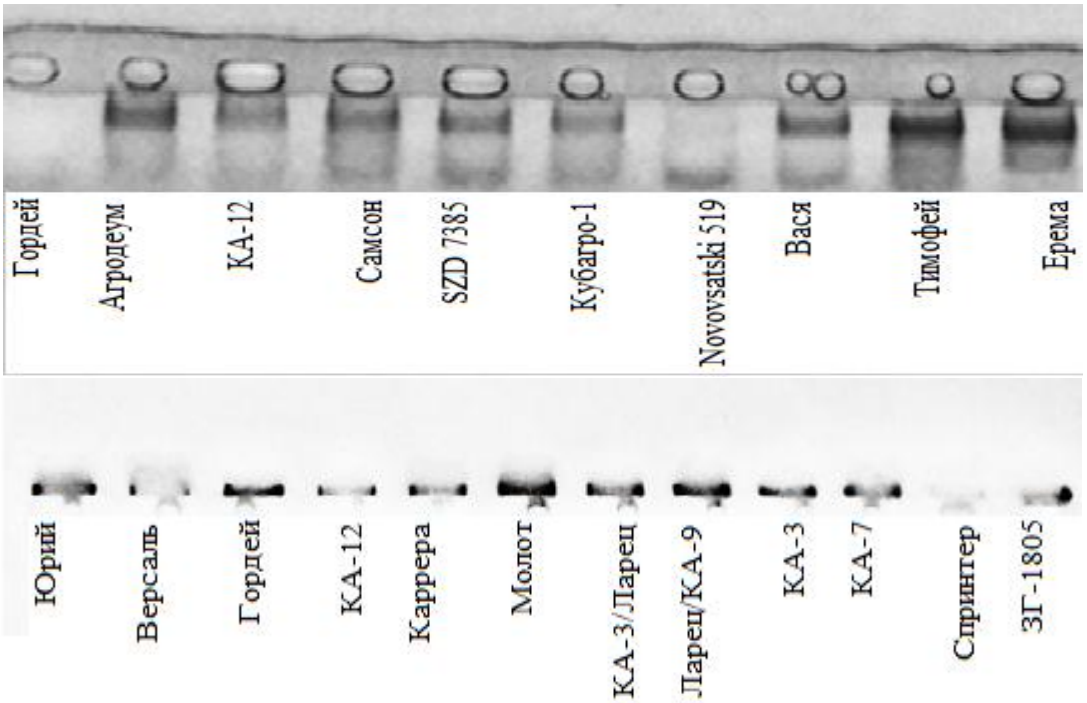

Рисунок 4 – Электрофореграммы амплификации с геном cbf 16

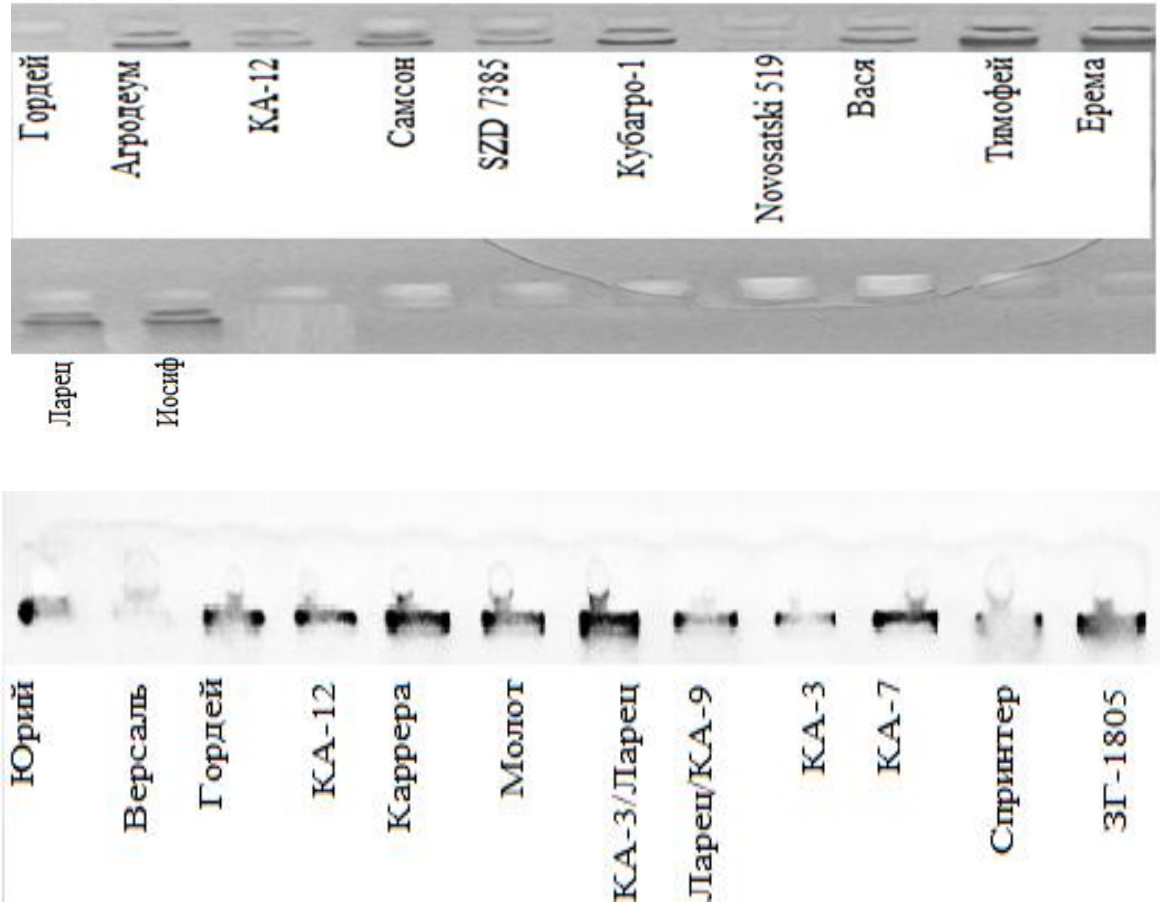

Рисунок 5 – Электрофореграммы амплификации с геном cor 14b

Как видно из электрофореграмм (рисунок 3 - 5), на сортах Гордей, Ларец и

Иосиф в первом эксперименте не наблюдалось проявления бендов по генам семейства cbf .

Известно, что сорт Ларец не обладает физиологической морозостойкостью. Высокая зимостойкость его обусловлена способностью глубоко закладывать узел кущения. Природа механизмов морозоустойчивости сортов селекции НЦЗ имени П. П. Лукьяненко, Гордей и Иосиф не изучена и, вполне вероятно, что в данных генотипах за исследуемый признак отвечают другие гены (ведь, как известно полигенный признак морозоустойчивости контролируется свыше, чем 35 генами). Проявление бендов при амплификации с ДНК сорта сербской селекции Novosatski 519 было слабым, либо отсутствовало. Этот сорт, по нашим данным относится к группе с низкой морозоустойчивостью.

Нами было решено провести повторный анализ сорта Гордей. Поскольку данный сорт является морозостойким и часто применяется в качестве стандарта при испытании селекционных линий, и отсутствие бендов генов морозоустойчивости было на наш взгляд нетипичным. Таким образом, при повторной амплификации наблюдалось достоверное проявление бендов на данном сорте по всем изучаемым генам. Слабое проявление бендов наблюдалось на сортах Версаль (гены cbf 2, cor 14b) и Спринтер (ген cbf 16).

Необходимо отметить, что для полноценного законченного анализа коллекции важным аспектом является изучение величины экспрессии генов морозоустойчивости при скрещивании перспективных сортов и линий, что непременно войдет в задачи наших дальнейших научных работ в этом направлении.

Опираясь на проведенные нами исследования можно сделать вывод о том, что использование метода молекулярного маркирования позволяет проводить глобальный скрининг селекционного материала в сжатые сроки, осуществлять браковку на ранних этапах или наоборот, не допустить потери селекционно ценного материала, а также подтверждать фенологические наблюдения.

3.1.4 Структурно–генетический анализ биологического разнообразия озимого ячменя с использованием iPBS и ISSR маркеров

Изучение генетического разнообразия является важным аспектом современной селекции. На сегодняшний день одними из наиболее эффективных подходов изучения генетического разнообразия культурной флоры являются методы анализа полиморфизма первичной структуры ДНК с использованием молекулярных маркеров.

В нашей работе для оценки генетического разнообразия мы использовали 7 маркеров: iPBS 2228; iPBS 2230; iPBS 2237; iPBS 2415; iPBS 2373; iPBS 2074 и ISSR 12.

Анализ данных электрофореграмм был проведен с помощью программы GelPro 3.1, для осуществления статистической обработки ДНК-бендов данные были преобразованы в бинарный вид.

В результате проведенных исследований было установлено, что количество ДНК-бендов, сгенерированных на отдельный генотип варьировало от 49 до 75. Выявлено 121 категория аллелей, различающихся по длине амплифициро-

ванных фрагментов.

Наименьшее количество бендов на генотип (от 4 до 8) сгенерировал маркер ISSR 12, а наибольшее – маркер iPBS 2415 (от 8 до 18).

Изучаемые генотипы были разделены на 4 популяции, согласно их принадлежности: коллекция КубГАУ имени И. Т. Трубилина, коллекция НЦЗ имени П. П. Лукьяненко, сорта селекции АНЦ «Донской», сорта зарубежной селекции.

Наглядным и информативным методом определения степени родства генетического материала является построение кластерного древа, четко разделяющего изучаемый материал на отдельные кластеры (группы).

Для кластеризации сортов озимого ячменя нами использовался метод UPGMA в программе MEGA7. Как видно из рисунка 6, дендрограмма разделилась на три больших кластера (включившие в себя меньшие кластеры), в которые вошли 22 сортообразца отечественной и зарубежной селекции (рисунок 6).

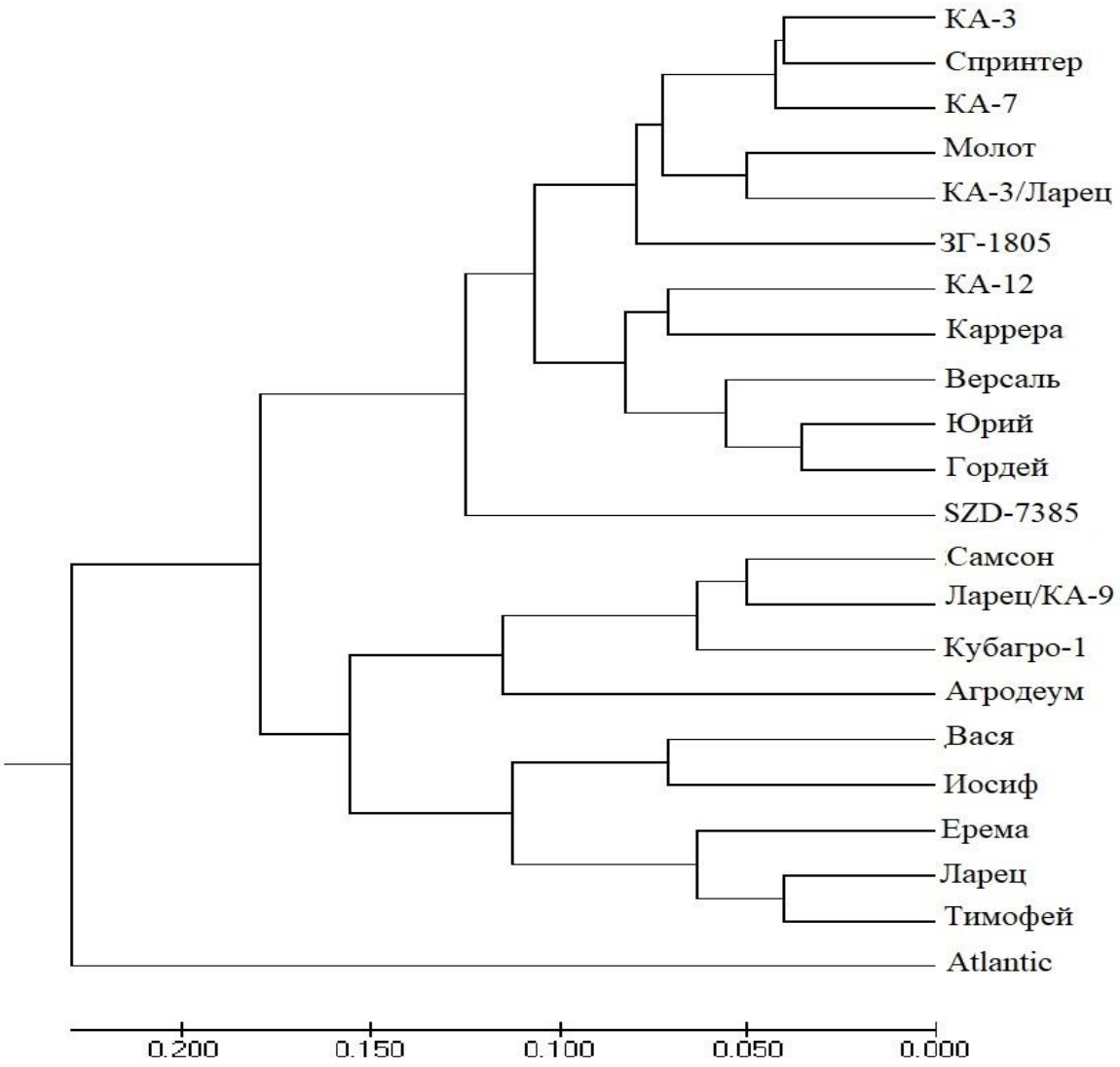

Рисунок 6 – Дендрограмма кластерного анализа сортов ячменя методом UPGMA в программе MEGA7, 2018 г.

Близкими по генетической структуре вполне логично оказались морозоустойчивые сорта Зерноградской селекции: Тимофей, Ларец и Ерема.

Отдельным кластером выделился американский сорт Atlantic, а так же немецкий сорт SZD-7385, что объясняется эколого-географическим происхождением данных форм.

Сорта озимого ячменя селекции НЦЗ имени П. П. Лукьяненко и КубГАУ имени И. Т. Трубилина имеют близкородственную генетическую структуру, что объясняется обменом селекционного материала между данными учреждениями и возможным включением в программу скрещиваний близкородственных форм. В кластере с сортами селекции НЦЗ имени П. П. Лукьяненко расположились сорта селекции ООО «Агростандарт», Версаль и Каррера. Линия зерноградской селекции ЗГ-1805 локализована на кластерограмме между линиями коллекции КубГАУ, что объясняется использованием последних в качестве исходного материала в ее создании.

Применение структурно-генетического анализа исходного материала озимого ячменя является современным молекулярным методом оценки, с помощью которого селекционер может грамотно подбирать пары для скрещиваний по принципу эколого-географической отдаленности.

3.2. Лабораторно–полевые методы оценки морозоустойчивости озимого ячменя

3.2.1 Оценка морозоустойчивости изучаемых сортообразцов озимого ячменя методом прямого промораживания

В настоящее время наиболее достоверным и общепринятым методом оценки селекционного материала на морозостойкость, остается способ прямого промораживания.

В результате изучения морозоустойчивости исходного материала озимого ячменя нами был выделен ценный сортовой и линейный материал коллекции КубГАУ имени И. Т. Трубилина и НЦЗ имени П. П. Лукьяненко. Оценку сортообразцов проводили при различных отрицательных температурах, для выявления критических значений для каждой формы.

Таблица 3– Морозостойкость (%) сортообразцов озимого ячменя (ЦИК, КубГАУ, 2015-2018 гг.)

Сорт/линия	Морозостойкость,%		
	–11°С	–12°С	–13°С
Самсон, ст.	82,4	79,1	62,8
Кубагро–1	55,4	51,0	47,3
Кубагро–3	54,9	52,1	43,8
КА–12	42,0	29,8	20,3
ЗГ-1805	78,4	54,4	30,6
Садко/Скарпиа	80,5	65,5	59,7
$НСР_{05}$	1,36	2,69	1,43

Промораживание изучаемого материала на –13 °С позволило выявить наиболее морозоустойчивые образцы. Лучшей оказалась линия Садко/Скарпиа с

59,7 % выживших растений. Данная линия близка к стандарту по морозоустойчивости и по интенсивности ее потери при понижении температуры. Также хорошие результаты показали сорта Кубагро – 1 и Кубагро – 3 (таблица 3).

В ходе изучения сортов и линий селекции НЦЗ имени П. П. Лукьяненко так же было установлено наличие ценного исходного высокоморозоустоичивого материала. Среди них не только известные сорта, уверенно занимающие значительные посевные площади – Добрыня-3 и Гордей, но и новые перспективные генотипы, которые только проходят государственное сортоиспытание – Вася и Юрий. Морозостойкость этих сортов при критической температуре –13 ^{o}С составила 53,3 и 53,7 % соответственно (таблица 4).

Таблица 4 – Морозостойкость (%) сортообразцов озимого ячменя (НЦЗ им. П. П. Лукьяненко, 2016-2018 гг.)

Сорт/линия	Морозостойкость,%		
	–11°С	–12°С	–13°С
Михайло, ст.	86,4	73,8	60,4
Добрыня–3	76,5	70,1	51,3
Ларец	78,3	67,4	53,6
Гордей	72,8	61,9	50,2
Юрий	73,7	65,3	53,7
Вася	70,1	57,8	53,3
Спринтер	56,1	48,3	43,3
Серп	73,2	65,7	50,3
Иосиф	68,3	54,1	48,7
$НСР_{05}$	1,98	1,91	2,38

Таким образом, методом прямого промораживания нам удалось выделить ценный исходный материал обладающий высокой морозостойкостью это: линии Садко/Скарпиа, сорта Кубагро – 1, Добрыня-3, Ларец, Гордей, Вася и Юрий. Выделенные образцы мы используем для дальнейшей селекционной работы с целью создания форм с высокой морозоустойчивостью.

3.2.2 Оценка исходного материала озимого ячменя на зимостойкость в бетонных стеллажах

При посеве исходного материала озимого ячменя в бетонные стеллажи можно провести комплексное и разностороннее его изучение. Для детального изучения корневой системы нами был проведен посев селекционного материала в бетонные стеллажи на базе НЦЗ им. П. П. Лукьяненко.

В результате оценки образцов выделены перспективные, формирующие комплекс положительных признаков. Среди изученных форм глубоким залеганием узла кущения обладали: Спринтер, 397-4//Зимур/Алекс и 419–1. К формам, развивающим мощную корневую систему были отнесены: Cartel/Лазарь, Молот и ГК-1918 (таблица 5).

Изучая интенсивность кущения, было выявлено что большее количество стеблей отмечалось в образцах: Спринтер, VA01H-125/Arturio, Cartel/Лазарь, Секрет/Достойный и Молот.

В целом, такие формы как Спринтер, Cartel/Лазарь, Молот характеризуются хорошо развитой корневой системой, при этом они закладывают узел кущения вблизи зерновки и формируют до 2,92 стеблей в фазу кущения перед уходом в зиму.

Таблица 5 – Результаты оценки сортообразцов озимого ячменя перед уходом в зиму, (посев на стеллажах НЦЗ им. П. П. Лукьяненко, 2016-2017 гг.)

Сорт/линия	Глубина залегания узла кущения, см	Мощность развития к/с*, балл	Количество стеблей (кущение), шт.
Спринтер-ст.	4,59	6,00	2,80
415-1	4,23	5,28	1,83
VA01H-125/Arturio	4,24	6,39	2,26
397-4//Зимур/Алекс	4,40	6,21	1,86
Cartel/Лазарь	4,30	7,85	2,92
Секрет/Достойный	4,20	6,31	2,52
Молот	4,31	7,44	2,44
102М/397-4	4,23	5,53	1,47
Кариока/Достойный	4,24	6,33	1,60
ГК-1918	4,09	7,48	1,97
ГК-1918	4,31	6,38	1,93
84339 DH/Кондрат	4,32	6,79	1,79
ГК-1918	4,28	7,00	1,73
ГК-1918	4,09	6,33	1,63
419-1	4,52	5,77	1,39
$НСР_{05}$	1,44	0,85	0,54

*-корневой системы

Выделенные образцы являются ценным исходным материалом, и будут в дальнейшем нами использоваться в селекционных программах.

3.2.3 Определение содержания сахаров в узле кущения сортов и линий озимого ячменя

Определение содержания сахаров является одним из общепринятых лабораторных методов косвенной оценки морозоустойчивости озимых культур. В нашем опыте мы определяли общее количество восстанавливающих сахаров, сумму моно- и олигосахаров и сложные сахара (сахарозу).

По результатам наших исследований были выделены сорта и линии с высоким содержанием сахаров в узле кущения к моменту начала весеннего отрастания, что свидетельствует об их потенциально высокой морозоустойчивости (таблица 6).

По результатам наших исследований в образцах озимого ячменя было от 44 до 78 % моно– и олигосахаров в узле кущения. Наибольшим их ко-

личеством выделились сорта Вася, Юрий, Серп, Лазарь и линии Artirio/Михайло М, 415-1, Heidi/Гордей и Платон/Carolla.

Кроме этого была выявлена закономерность, что формы накапливающие в целом от 37 до 50 % восстанавливающих сахаров, имеют в своем химическом составе до 70 – 77 % моно– и олигосахаров.

Таблица 6 – Количественное содержание сахаров (%) в узле кущения сортов и линий озимого ячменя (НЦЗ им. П. П. Лукьяненко, 2016-2017 гг.)

Сорт/линия	Восстанавливающие сахара, %	Σ моно- и олигосахаров, %	Сахароза, %
Кондрат, ст.	41,90	65,10	22,04
Вася	37,80	**75,40**	**35,72**
Юрий	45,20	**77,80**	**30,97**
Artirio/Михайло М	**51,10**	**72,80**	20,60
415-1	45,70	**72,50**	25,46
Heidi/Гордей	46,10	**72,10**	24,70
Серп	42,40	**71,00**	27,17
Лазарь	45,70	**70,80**	23,80
Платон/Carolla	**51,20**	**70,40**	18,20
Cartel/Лазарь	**56,20**	67,30	10,50
397–6/Циклон	**52,10**	69,20	1620
Тома	**51,10**	68,00	10,00
$НСР_{05}$	9,6	8,4	11,3

Для выявления зависимости изучаемого признака с данными прямой проморозки растений, мы провели математические расчеты, по результатам которых выявили среднюю положительную корреляционная связь r = 0,49 между содержанием сахаров в узле кущения и морозостойкостью озимого ячменя.

Таким образом, наличие сахаров в узле кущения растений озимого ячменя является, хоть и косвенным, но достоверным методом оценки зимостойкости данной культуры.

3.2.4 Изучение устойчивости генотипов озимого ячменя к повышенной кислотности почвы

В результате внесения значительных доз минеральных удобрений наблюдается изменение концентрации почвенного раствора в сторону его подкисления. Из всех злаковых растений, ячмень обладает наибольшей устойчивостью к щелочной среде. Вместе с тем он наименее вынослив в условиях подкисленных и кислых почв. Поэтому, селекция озимого ячменя на устойчивость к кислой среде приобретает в последние годы особую актуальность.

По литературным данным, устойчивость сортов озимого ячменя к кислой среде находится в положительной корреляционной зависимости с морозостойкостью (Т. Е. Кузнецова, Н. В. Серкин, С. А. Левштанов, 2017).

Опираясь на актуальность исследований в этом направлении, мы

провели ряд экспериментов по изучению устойчивости сортов и линий озимого ячменя к повышенной кислотности почвы.

На растениях, пророщенных в растворах со значением pH 3,5 и 7,0 (контроль) проводили замеры длины корней, подсчитывали их количество, рассчитывали ИДК (индекс длины корня) для каждого образца и давали оценку мощности развития корневой системы по 9-бальной шкале.

Из 48 изучаемых образцов в 13 отмечался ИДК выше единицы, что свидетельствует об их толерантности к кислой среде (таблица 7).

Таблица 7 – Изучение устойчивости сортообразцов озимого ячменя к повышенному уровню кислотности почвы (2016-2017 гг.)

Сорт, линия	Всхожесть, %		Длина корней		ИДК*	Количество корней, шт.		Мощ-ность раз-вития к/с, %**
	pH 7,0	pH 3,5	pH 7,0	pH 3,5		pH 7,0	pH 3,5	
Спринтер, ст.	100	98	4,79	4,95	1,03	5,50	5,25	95,45
311/320//84339ДН	90	50	5,69	5,85	1,03	7,00	5,75	82,14
Рубеж/Самсон М	100	90	5,67	5,72	1,01	4,88	4,38	89,75
389-2/Пар. 1633	100	100	3,80	4,58	1,21	5,38	4,63	86,06
397-5/Михайло	88	94	5,16	6,33	1,23	6,15	6,15	100,00
Дали	100	100	4,37	4,60	1,05	6,38	5,88	92,16
Платон М	90	98	3,89	4,61	1,19	4,29	4,50	104,90
Дали Л	94	100	3,51	4,50	1,28	4,43	4,15	93,68
Стратег	97	100	6,58	6,88	1,05	5,30	5,20	98,11
391-7	88	92	5,13	5,72	1,12	4,50	4,80	106,67
Иосиф	92	96	4,59	6,25	1,36	4,70	5,00	106,38
Cartel/Самсон	86	94	6,34	6,53	1,03	5,10	6,20	121,57
Лазарь/Циндарелла	90	94	5,51	5,60	1,02	5,50	5,80	105,45

*- индекс длины корней

** - мощность развития к/с (корневой системы) - отклонение количества корней опытного варианта (pH 3,5) от количества корней контрольного варианта (pH 7,0)

Как видно из таблицы 7, в 10 из 13 образцах толерантность проявилась уже на этапе подсчета всхожести семян. Выявлены образцы, которые в кислой среде не только не снизили проростаемость, но и незначительно увеличили её. Так у линий 397-5/Михайло, Платон М, Дали Л, 391-7, Cartel/Самсон, Лазарь/Циндарелла, сортов Стратег и Иосиф всхожесть при pH 3,5 превысила аналогичные значения при pH 7.

Анализ длины корней опытных образцов показал, что все они в кислой среде сформировали более длинные корни, превышение от дистиллированной воды составило от 0,09 см у линии Лазарь/Циндарелла до 1,17 см у 397-5/Михайло.

Значение индекса длины корня более высоким было в сорте Иосиф, незначительно ему уступили линии 389-2/Паралелум 1633, 397-5/Михайло и Дали Л.

Подсчет числа корней образовавшихся на опытных растениях выявил,

что наибольшее их количество было в образцах при прорастании в дистиллированной воде, и только в линиях 391-7, Cartel/Самсон, Лазарь/Циндарелла и сорте Иосиф наблюдалось их превышение в кислой pH. В связи с этим, и значение мощности развития корневой системы образца Cartel/Самсон был наиболее высокий и составляет 121,57 %.

Все выделенные селекционные образцы и сорта, несомненно, являются ценным исходным материалам при селекции на увеличение толерантности новых форм к стрессовой ситуации при прорастании.

Таким образом, проведя многочисленные исследования и эксперименты, нами выделены новые селекционно-ценные формы обладающие комплексом положительных признаков и свойств. Выявленные образцы послужили исходным материал в селекционных программах.

4. ХОЗЯЙСТВЕННО–БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОРТОВ, ПЕРЕДАННЫХ НА ГСИ

Практическим результатом работы соискателя явились создание и передача на Государственное сортоиспытание трех сортов озимого ячменя: Юрий, Мадар и Версаль.

Сорт Юрий относится к группе среднеспелых сортов, имеет упругую, прочную соломину. Высокая урожайность сорта Юрий по предшественнику кукуруза свидетельствует о хорошей его устойчивости к корневым гнилям. Так, его урожайность за три года по предшественнику кукуруза составила 103,3 ц/га. В среднем за годы испытания (2015-2017 гг.) урожайность сорта Юрий была выше стандартных районированных сортов Михайло, Кондрат и Гордей на 8,4-14,5 ц/га. Максимальная прибавка урожайности к стандарту Михайло в 30,7 ц/га отмечалась по предшественнику подсолнечник.

Сорт Юрий передан на государственное сортоиспытание в 2017 году и рекомендуется для возделывания в Северо-Кавказском регионе.

Сорт Мадар по устойчивости к полеганию значительно превосходит Самсон. Содержание белка в зерне 9,6–10,8 %. Сорт обладает высокой продуктивностью, особенно по пропашным предшественникам. Так, по подсолнечнику в 2016 году сорт Мадар сформировал урожайность 118,7 ц/га. По результатам конкурсного сортоиспытания он превысил высокопродуктивный, устойчивый к полеганию сорт Рубеж в среднем за три года (2015-2017 гг.) на 2,5 ц/га, а стандарт Самсон – на 9,3 ц/га.

Сорт Мадар передан на государственное сортоиспытание в 2017 году и рекомендуется для внедрения в республиках Северного Кавказа, в Краснодарском и Ставропольском краях.

Сорт **Версаль** относится к группе среднеспелых сортов. Выколашивается на 1 день раньше стандарта. Высота растения 85-100 см. Сорт зернофуражного направления. Содержание белка в зерне 11,0-12,1 %. Средняя урожайность сорта Версаль за три года испытания (2015-2017 гг.) составила 87,2

ц/га, что позволило получить прибавку по отношению к стандартному сорту Кондрат 4,4 ц/га.

Сорт Версаль передан на государственное сортоиспытание в 2017 году и рекомендуется для испытания в республиках Северного Кавказа, в Краснодарском и Ставропольском краях и республики Крым.

5. ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ НОВЫХ СОРТОВ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ

Экономическая эффективность показывает полезный конечный эффект от применения производства и живого труда. В сельском хозяйстве - это получение максимального количества продукции с единицы площади при наименьших затратах.

Расчёт экономической эффективности показал, что возделывание новых сортов наиболее экономически результативно для хозяйств (таблица 8).

Таблица 8 – Экономическая эффективность возделывания новых сортов озимого ячменя

Показатель	Сорт			
	Кондрат, ст	Юрий	Мадар	Версаль
Урожайность зерна, т/га	7,69	8,6	7,72	8,2
Прибавка урожайности, т с 1 га	-	0,91	0,03	0,51
Цена реализации 1 т, руб.	8000	8000	8000	8000
Стоимость продукции 1 га, руб.	61520	68800	61760	65600
Производственные затраты на 1 га, руб.	27921	29455	28245	28898
Себестоимость 1 т, руб.	3631	3425	3659	3524
Чистый доход с 1 га, руб.	33599	39345	33515	36702
Рентабельность, %	120	134	119	127

При цене реализации, в условиях 2018 года, 8000 рублей за тонну, стоимость продукции по сортам составила 61760 – 68800 рублей. В наших опытах наиболее низкие показатели себестоимости были у сорта Юрий - 3425 рублей на 1 тонну зерна. Наибольший чистый доход получен по сорту Юрий - 39345./га, что на 5746 руб./га выше, чем у стандарта. Сорт Версаль превысил Кондрат на 3103 руб./га.

Расчеты рентабельности выявили преимущество сортов Юрий и Версаль. Новый сорт Мадар показал рентабельность на уровне стандарта. В целом же все изучаемые сорта озимого ячменя оказались экономически эффективны. Их рентабельность была довольно высокой и варьировала от 119 до 134 %, что соответствует высокому показателю рентабельности зерновых колосовых культур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Оптимизирован метод оценки морозоустойчивости озимого ячменя по гигроскопичности зрелого зерна. Определено, что оптимальным условием эффективной оценки гигроскопичности является применение в исследованиях раствора, содержащего 7% сахара и 50 мМ $MgCl_2$.

2. Установлено, что анализ интенсивности роста корневой системы этиолированных проростков озимого ячменя, обработанных раствором Трилона Б в концентрации $3{,}2\times10^{-3}$ М/л является оптимальным, простым и эффективным приёмом оценки морозоустойчивости сортов озимого ячменя. Получен Патент «Способ оценки морозоустойчивости озимого ячменя» в соавторстве (Патент № 2463833, 2018 год).

3. Показана эффективность применения метода молекулярного маркирования и структурно-генетического анализа в целях проведения глобального скрининга селекционного материала в сжатые сроки, возможности производить браковку на ранних этапах селекции, а так же эффективного подбора пар для скрещивания.

4. В результате определения количественного содержания сахаров в узле кущения выделены перспективные линии: Arturio/Михайло М, 415–1, Heidi/Гордей, Платон/Carola; и сорта: Вася, Юрий, Серп и Лазарь.

5. При изучении сортообразцов на устойчивость к повышенной кислотности почвы выделены 13 толерантных к стрессовому фактору линий и сортов: Спринтер; 311/320//84339ДН; Рубеж/Самсон М; 389-2/Пар. 1633; 397-5/Михайло; Дали; Платон М; Дали Л; Стратег; 391-7; Иосиф; Cartel/Самсон и Лазарь/Циндарелла.

6. В процессе оценки селекционного материала, высеянного в бетонные стеллажи, для дальнейшей работы были выделены перспективные сортообразцы, формирующие узел кущении вблизи от зерна (Спринтер, 397-4//Зимур/Алекс, 419–1), а так же формы, развивающие мощную корневую систему (Cartel/Лазарь, Молот и ГК-1918) и интенсивность кущения (Спринтер, VA01H-125/Arturio, Cartel/Лазарь, Секрет/Достойный и Молот).

7. При промораживании образцов исходного материала озимого ячменя образцов, были выделены перспективные формы для дальнейшей селекции: линия Садко/Скарпиа; сорта Добрыня-3, Ларец, Гордей, Вася и Юрий.

8. Созданы и переданы на Государственное сортоиспытание три сорта озимого ячменя: Юрий, Мадар и Версаль.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При оценке исходного и селекционного материала озимого ячменя на морозоустойчивость рекомендуется применять новый запатентованный метод оценки, для реализации которого используется Трилон Б.

Для скринига исходного материала озимого ячменя на выявление генов морозоустойчивости рекомендуется использовать молекулярные маркеры на указанные гены: cbf2, cbf 12 и cor 14b.

Рекомендуется включать в программы скрещиваний сорта и линии, обладающие ценными признаками при селекции на морозоустойчивость: Спринтер, 397-4//Зимур/Алекс, 419–1, Cartel/Лазарь, Молот и ГК-1918, Спринтер, VA01H-125/Arturio, Cartel/Лазарь, Секрет/Достойный, Молот (НЦЗ им. П. П. Лукьяненко); КА–12 (КубГАУ).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Репко, Н. В. Посевные площади и урожайность озимого ячменя в основных регионах возделывания / Н. В. Репко, **Е. В. Смирнова**, А. С. Коблянский //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. Краснодар: – 2015. – № 112. – С. 1645-1655 .
2. Репко Н. В. Состояние производства ячменя в Российской Федерации / Н. В. Репко, К. В. Подоляк, **Е. В. Смирнова**, И. О. Макарова // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. Краснодар: – 2015. – № 106. – С. 1071-1082.
3. Репко Н. В. Статистические исследования мирового производства зерна ячменя / Н. В. Репко, К. В. Подоляк, **Е. В. Смирнова**, Ю. В. Острожная // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. Краснодар: – 2015. – № 106. – С. 1062-1070.
4. Репко Н. В. Ретроспективный анализ сортов ячменя, созданных на юге России / Н. В. Репко, **Е. В. Смирнова**, К. В. Сухинина, А. С. Коблянский // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. Краснодар: – 2016. – № 123. – С. 347-356.
5. Плотников В. К. Сортоспецифичность действия Трилона Б на прорастание семян озимого ячменя / В. К. Плотников, **Е. В. Смирнова**, Н. В. Репко, А. А. Салфетников // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. Краснодар: – 2016.– № 120. – С. 706-729.
6. Данилова А. В. Устойчивость перспективных сортов и линий озимого ячменя к возбудителю карликовой ржавчины / А. В. Данилова, Г. В. Волкова, Ю. В. Шумилов, А. А. Салфетников, Н. В. Репко, Е. С. Бойко, Л. В. Назаренко, **Е. В. Смирнова**, А. С. Ерешко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. Краснодар: – 2016. – № 117. – С. 201-215.
7. **Смирнова Е. В.** Оптимизация метода оценки морозоустойчивости сортов озимого ячменя по гигроскопичности зрелого зерна / Е. В. Смирнова, Н. В. Репко, А. А. Салфетников, В. К. Плотников // Труды Кубанского государственного аграрного университета. Краснодар: –2016. – № 62.– С. 112-116.

8. Репко Н. В. Устойчивость к мучнистой росе озимого ячменя местной селекции на Кубани / Н.В. Репко, Е. С. Бойко, Л. В. Назаренко, И. О. Макарова, **Е. В. Смирнова** // Защита и карантин растений. Краснодар: –2016.–№ 11.–С. 24-26.

9. Репко Н. В. Резистентность коллекционных форм озимого ячменя к мучнистой росе / Н. В. Репко, А. С. Ерешко, Е. В. Смирнова, А. С. Коблянский, И. О. Макарова // Защита и карантин растений. Краснодар: – 2017. – № 5. – С. 42-43.

10. **Смирнова Е. В.** Влияние повышенной концентрации ионов водорода на рост растений, зимостойкость и урожайность озимого ячменя / Е. В. Смирнова // Труды Кубанского государственного аграрного университета. Краснодар: –2018. – № 1.– С. 114-118.

Авторские свидетельства и патенты

11. **Смирнова Е. В.** Способ оценки морозоустойчивости озимого ячменя / Е. В. Смирнова, В. К. Плотников, Н. В. Репко, А. А. Салфетников, Е. С. Бойко // Патент на изобретение RUS 2643833 19.12.2016

Публикации в других изданиях

12. Репко Н. В. Морозостойкость коллекционных сортов озимого ячменя / Н. В. Репко, **Е. В. Смирнова** // Сб. науч. статей по материалам научно–практической конференции Кубанского отделения ВОГиС. Краснодар: – 2015. – С. 36-37.

13. Салфетников А. А. Центр искусственного климата как ускоритель селекционного процесса / А. А. Салфетников, Н. В. Репко, Е. С. Бойко, **Е. В. Смирнова** // Сб. науч. статей по материалам 71-й научно–практической конференции преподавателей по итогам НИР за 2015 год. Краснодар: – 2016. – № 11.– С. 33-34.

14. **Смирнова Е. В.** Создание зимоморозостойкого исходного материала озимого ячменя в условиях Центральной зоны Краснодарского края / Е. В. Смирнова, Т. Е. Кузнецова, С. А. Левштанов, Н. В. Серкин, А. П. Левштанов // Сб. Методы и техологии в селекции растений и растениеводстве Материалы III международной научно–практической конференции. Киров: – 2017. – С. 156-160.

15. **Смирнова Е. В.** Изучение коллекции ярового ячменя на засухоустойчивость / Е. В. Смирнова, Т. Е. Кузнецова, С. А. Левштанов, Н. В. Серкин, А. П. Левштанов // Сб. Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве Материалы III международной научно–практической конференции. Киров: – 2017. – С. 160-163.

16. **Смирнова Е. В.** Использование Трилона Б в качестве биологического маркера при оценке морозоустойчивости озимого ячменя / Е. В. Смирнова, В. К. Плотников, Н. В. Репко // Сб. науч. статей по материалам X Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120-летию И. С. Косенко. Краснодар: – 2017. – С. 110-111.