

УДК 06.01.00:581.1:633.16:632.111

UDC 06.01.00:581.1:633.16:632.111

06.01.00 Агронмия

Agronomy

**ГИГРОСКОПИЧНОСТЬ ЗРЕЛОГО ЗЕРНА
КАК МАРКЁР МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ
ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ И ПОДСОЛНЕЧНИКА**

**HYGROSCOPICITY OF MATURE GRAIN AS
A MARKER OF WINTER BARLEY AND
SUNFLOWER FROST RESISTANCE**

Плотников Владимир Константинович
д.б.н., доцент
ID: 3971-2200
vkpbio21@mail.ru

Plotnikov Vladimir Konstantinovich
Dr.Sci.Biol., Associate Professor
ID: 3971-2200
vkpbio21@mail.ru

Салфетников Анатолий Алексеевич
д.с.-х.н., профессор
ID: 9677-3687
Salfetnikov39@mail.ru
*Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия*

Salfetnikov Anatoliy Alexeevich
Dr.Sci.Agr., Professor
ID: 9677-3687
Salfetnikov39@mail.ru
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Ненько Наталья Ивановна
д.с.-х.н., профессор
ID: 2257-0373
nenko.nataliya@yandex.ru
*Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение Северо-Кавказский Федеральный
научный центр садоводства, виноградарства,
виноделия, Краснодар, Россия*

Nenko Natalia Ivanovna
Dr.Sci.Agr., Professor
ID: 2257-0373
nenko.nataliya@yandex.ru
*Federal State Budgetary Scientific Institution North
Caucasian Federal scientific center for horticulture,
virculture, winemaking, Krasnodar, Russia*

В обзорной статье проводится сравнительный анализ морозоустойчивости сортов озимого ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) по результатам промораживания в холодильных камерах и по гигроскопичности зрелого зерна. На примере ряда сортов обеих культур показано, что чем выше морозоустойчивость сорта, тем меньший объём надосадочной жидкости может быть получен при экстракции шрота раствором, содержащим катионы магния. Предполагается, что повышенная гигроскопичность шрота зерна озимого ячменя и подсолнечника связана с относительно высоким содержанием в его зерне так называемого «водорастворимого крахмала» - полисахаридов β-глюканов. На ряде сортов подсолнечника изучена возможность регуляции степени гигроскопичности под влиянием калия (KNO₃), цинка (ZnSO₄) и гибберелловой кислоты (GA₃). Показано, что обработка раствором калия (в концентрации 50 ppm KNO₃) растений подсолнечника на стадии 4-х листьев приводит к значительному увеличению гигроскопичности зерна и морозоустойчивости растений, меньший эффект давала обработка цинком (30 ppm ZnSO₄) и ещё меньший эффект наблюдался при обработке растений гибберелловой кислотой (20 ppm). Обработка калием значительно интенсифицировала биосинтез свободного пролина, фенольных соединений и растворимых белков. При обработке цинком значительно возросло содержание углеводов в растениях подсолнечника.

In the review article we present a comparative analysis of frost resistance of varieties of winter barley and sunflower (*Helianthus annuus* L.) by the results of freezing in the refrigerating chambers and by the hygrosopicity of mature grain. On the example of a number of varieties of both cultures, it is shown that the higher the frost resistance of the variety, the smaller the volume of the supernatant can be obtained by extracting the press cake with a solution containing magnesium cations. It is assumed that increased hygrosopicity of winter barley and sunflower press cake is associated with a relatively high content of so - called "water-soluble starch" - β-glucan polysaccharides in its grain. The possibility of regulation of the degree of hygrosopicity under the influence of potassium (KNO₃), zinc (ZnSO₄) and gibberellic acid (GA₃) was studied on a number of sunflower varieties. It was shown that treatment with a solution of potassium (a concentration of 50 ppm KNO₃) of sunflower plants at the stage of 4 leaves leads to a significant increase in hygrosopicity of grain and hardness of plants, little effect was given treatment with zinc (30 ppm ZnSO₄) and a lesser effect was observed when treating plants gibberellovaja acid (20 ppm). Potassium treatment significantly intensified the biosynthesis of free Proline, phenolic compounds and soluble proteins. When processing zinc significantly increased the content of carbohydrates in sunflower plants. Hygrosopicity showed a significant correlation with the content of free Proline (R²=0.621), phenolic

Гигроскопичность показывала значительную корреляцию с содержанием свободного пролина ($R^2=0,621$), фенольных соединений ($R^2=0,907$), общих углеводов ($R^2=0,673$) и растворимых белков ($R^2=0,708$). Предполагается, что обработка растений калием и цинком играет ключевую роль в повышении гигроскопичности зерна. Результаты сравнительных исследований морозоустойчивости по степени выживания растений при промораживании в холодильных камерах и по степени гигроскопичности зрелого зерна показали, что эти два метода оценки морозоустойчивости дают весьма близкие данные. Вместе с тем, по простоте и низким экономическим затратам предлагаемый метод оценки морозоустойчивости во много раз превосходит метод прямого промораживания растений

Ключевые слова: ПОДСОЛНЕЧНИК, ЯЧМЕНЬ, МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТЬ, МАРКЁРЫ

Doi: 10.21515/1990-4665-145-012

compounds ($R^2=0.907$), total carbohydrates ($R^2=0.673$) and soluble proteins ($R^2=0.708$). It is assumed that the treatment of plants with potassium and zinc plays a key role in increasing the hygroscopicity of grain. The results of comparative studies of frost resistance on the degree of survival of plants during freezing in cold rooms and the degree of hygroscopicity of mature grain showed that these two methods of assessing frost resistance give very close data. At the same time, in terms of simplicity and low economic costs, the proposed method of assessing frost resistance is many times superior to the method of direct freezing of plants

Keywords: SUNFLOWER, BARLEY, FROST RESISTANCE, MARKERS

**"Простота и краткость
не просто свойства науки,
они составляют её сущность"
Ганс Селье [18]**

Введение

Возможности традиционной селекции сельскохозяйственных растений далеко не исчерпаны. Но в настоящее время в арсенале селекционеров растений преобладает использование морфологического фенотипа в качестве основы селекции. Это определяет очень ограниченный набор, как экспериментального материала, так и круга проблем, которые может решить селекционер. Значительного прогресса в усовершенствовании методов селекции можно было бы достичь в том случае, если бы удалось установить надёжные способы выявления узловых моментов в ряду элементарных процессов, формирующих хозяйственно-ценные признаки и найти простые, дешёвые маркёры для массового скрининга селекционного материала.

Принципиально новые перспективы для селекции появились с разработкой биохимических и молекулярных маркёров. ДНК-овые и белковые маркёры являются чрезвычайно эффективным инструментом

генетических исследований эукариот. Однако их статичность не позволяет количественно оценить важнейшие полигенные свойства организмов (стрессоустойчивость, реакцию на биологически активные вещества, циркадные ритмы и т.д.). Как познание электричества и развитие электротехники стало возможным только с появлением электродинамики, так и статичные молекулярные маркёры должны быть существенно дополнены молекулярно-кинетическими (биологическими) маркёрами, способными количественно оценить экспрессию основных регуляторных генов или дать интегральную характеристику всех экспрессирующихся генов определённого генотипа в конкретных условиях роста [14].

Одним из важнейших полигенных свойств сельскохозяйственных растений является их морозоустойчивость (основной компонент зимостойкости). От степени морозоустойчивости в значительной мере зависит урожай [16].

Оценка морозоустойчивости сортов – прямое промораживание растений в холодильных камерах и при полевых испытаниях – является наиболее трудоемким и дорогостоящим этапом селекции на зимостойчивость. Поэтому поиск относительно дешевых лабораторных методов адекватной оценки этого признака является весьма актуальным. Успех физиологических и генетических подходов к повышению холодоустойчивости сельскохозяйственных культур в настоящее время зависит от степени изученности молекулярной физиологии и генетики этого признака.

Исследования показали, что белоксинтезирующая система проростков пшеницы и ячменя озимых сортов дифференциально (сортоспецифично) реагирует на закаливающие температуры как на уровне трансляции полирибосом (однонаправлено пшеница и ячмень), так и на уровне стабильности суммарной мРНК или ген-специфической мРНК (разнонаправленно) [3, 5, 7, 8, 10, 12, 14].

Каждый из этих уровней определяет экономичность, точность и производительность разрабатываемых на их основе методов оценки морозоустойчивости в лабораторных условиях. Исследования на озимой пшенице привели к выводу о целесообразности исследования долгоживущей РНК зрелого зерна. На основании полученных данных установлено, что в зерне озимой пшеницы содержание магния в РНК и в золе, содержание нуклеиновых кислот (РНК и ДНК) и электрофоретические характеристики рРНК определяют (“преформируют”) особенности закалки и всего последующего онтогенеза растения, а, следовательно, и степень его морозоустойчивости [7, 8].

Однако для зерна ячменя всё это не характерно [3, 8, 9].

Вместе с тем, в процессе подобных фундаментальных исследований нередко выявляются совершенно неожиданные факты, дальнейшее изучение которых позволяет надеяться на разработку еще более простых, эффективных и дешевых методов прогнозирования, чем те, на которые изначально были ориентированы исследователи. В ходе экспериментов было замечено, что в равных условиях (соотношение навески и объема экстрагирующего буфера) экстракция шрота зрелого зерна озимой пшеницы и озимого ячменя происходила по-разному. Объем экстракта из ячменя был на 30–40% меньше, чем из пшеницы, т.е. шрот зрелого зерна озимого ячменя отличался большей гигроскопичностью. Но самое любопытное заключалось в том, что наблюдались сортовые различия между относительно высоко и слабо морозоустойчивыми сортами ячменя. Более морозоустойчивые сорта озимого ячменя отличались большей гигроскопичностью шрота, и эти различия достигали величины более 20% [9].

У сортов озимой мягкой пшеницы подобной выраженной закономерности не наблюдалось, что, вероятно, объясняется разными

молекулярными механизмами формирования морозоустойчивости растений пшеницы и ячменя [8, 11].

Есть основания считать, что растения озимой пшеницы используют активные молекулярные механизмы адаптации к холоду через усиление синтеза белка как следствие стабилизации мРНК путём увеличения её поли-(А)-хвоста, который в то же время является энхансером (усилителем) трансляции полирибосом. У растений озимого ячменя холод наоборот снижает степень полиаденилирования мРНК, но усиление синтеза белка возможно за счёт большего содержания катионов магния в рибосомной РНК, т.е. имеет место относительно пассивный, более древний молекулярный механизм морозоустойчивости [2, 3, 8].

Анализ научной литературы показал [9, 15], что повышенная гигроскопичность шрота зерна ячменя связана с относительно высоким содержанием в его зерне так называемого “водорастворимого крахмала” – полисахаридов β -(1,3;1,4)-D-глюканов. Они являются главным растворимым компонентом пищевых волокон зерновых культур. Это обобщенный термин, который служит для обозначения высокомолекулярных полимеров глюкозы, связанной β -(1→3)- и β -(1→4)-гликозидными связями.

Полисахариды β -глюканы формируют внутренний слой стенок эндосперма ячменя. По их содержанию ячмень и овес являются рекордсменами среди культурных зерновых злаков. Величина этого показателя качества зерна у пшеницы и ячменя составляет, соответственно, 0,6 и 4,2%, а в отделенном эндосперме – 0,3 и 4,1%. Этим, вероятно, и объясняется обнаруженное различие по гигроскопичности шрота зерна пшеницы и зерна ячменя.

В настоящей статье проводится сопоставление первых пионерских результатов исследования гигроскопичности зрелого зерна различных сортов озимого ячменя и подсолнечника в связи с их

морозоустойчивостью, а также обсуждается вероятная роль β -глюканов и других осмолитов в формировании этого полигенного признака сельскохозяйственных растений.

Биологические функции β -глюканов

У устойчивых к морозу растений имеются защитные механизмы, в основе которых лежат определенные физико-химические изменения. Морозоустойчивые растения обладают приспособлениями, уменьшающими обезвоживание клеток. При понижении температуры у таких растений отмечаются повышение содержания сахаров и других веществ, защищающих ткани (криопротекторы), это прежде всего гидрофильные белки, моно- и олигосахариды; снижение оводненности клеток; увеличение количества полярных липидов и снижение насыщенности их жирнокислотных остатков; увеличение количества защитных белков.

На степень морозоустойчивости растений большое влияние оказывают сахара, регуляторы роста и другие вещества, образующиеся в клетках. В зимующих растениях в цитоплазме накапливаются сахара, а содержание крахмала снижается. Влияние сахаров на повышение морозоустойчивости растений многосторонне. Накопление сахаров предохраняет от замерзания большой объем внутриклеточной воды, заметно уменьшает количество образующегося льда.

Сахара защищают белковые соединения от коагуляции при вымораживании; они образуют гидрофильные связи с белками цитоплазмы, предохраняя их от возможной денатурации, повышают осмотическое давление и снижают температуру замерзания цитозоля. В результате накопления сахаров содержание прочносвязанной воды увеличивается, а свободной уменьшается. Особое значение имеет защитное влияние сахаров на белки, сосредоточенные в поверхностных мембранах клетки. Сахара увеличивают водоудерживающую способность

коллоидов протоплазмы клеток; связанная с коллоидами вода в виде гидратных оболочек биополимеров при низких температурах не замерзает и не транспортируется, оставаясь в клетке.

Криопротекторами являются также молекулы гемицеллюлоз (ксиланы, арабиноксиланы), выделяемые цитоплазмой в клеточную стенку, обволакивающие растущие кристаллы льда, что предотвращает образование крупных кристаллов, повреждающих клетку. Так клетки защищаются как от внутриклеточного льда, так и от чрезмерного обезвоживания [11].

По-видимому, способность растений ячменя определенного генотипа (сорта) к синтезу и накоплению β -глюканов определяет их морозоустойчивость, так как повышенное содержание водорастворимого крахмала в цитоплазме клеток вегетирующего растения снижает температуру замерзания воды. Эти особенности растений отражаются на содержании β -глюканов в зрелом зерне [4, 9].

Целое зерно ячменя в среднем содержит 3–9% β -глюканов. Молекулы β -глюканов являются линейными гомополисахаридами, в состав которых входят остатки D-глюкопиранозы, связанные β -(1→4)-связями. Хотя большинство сегментов в этих блоках являются тримерами и тетрамерами, в полимерных цепях обычно присутствуют более длинные блоки. Различия в химическом строении и структуре β -глюканов включают отношение тримеров к тетрамерам, количество длинных целлюлозных олигомеров и отношение связей β -(1→4)/ β -(1→3).

Относительное количество трисахаридов в β -глюканах ячменя составляет 52–69%, тетрасахаридов – 25–33%, отношение трисахариды/тетрасахариды равно 1.8–3.5. Величина этого отношения определяется химической структурой β -глюканов зерновых. Для каждого вида злаков оно имеет свое значение.

Различия в отношении трисахариды/тетрасахариды обусловлены не только генотипом, но и зависят от внешних условий, складывающихся в период формирования и созревания семян зерновых злаков.

Молекулярная масса β -глюканов $31\text{--}2700 \times 10^3$. На различия в составе и молекулярной массе β -глюканов влияет ряд факторов, в том числе генотип (сорт) и условия внешней среды. Молекулярное строение и структурная организация β -глюканов зерна ячменя являются важными детерминантами их физических свойств, таких как растворимость в воде и вязкость (способность к гелеобразованию) [15].

Как следует из табл. 1, минимальное количество β -глюканов содержится в зерне кукурузы, максимальное – в зерне ячменя и в подсолнечном шроте.

Таблица 1. Содержание β -глюканов в зерне и кормах, %

Источник β-глюканов	Зерно [1]	Корма [17]
Кукуруза	0,1	0,0
Пшеница	0,7	1,3
Отруби пшеничные	-	4,3
Тритикале	1,5	1,7
Рожь	1,8	2,8
Овёс	2,5	-
Овёс без плёнки	-	5,0
Горох	-	3,3
Шрот соевый	-	3,8
Шрот подсолнечный	-	4,9
Ячмень	3,8	4,9

Интересно отметить возрастающий ряд по содержанию β -глюканов в зерне и соответственному возрастанию морозоустойчивости: пшеница (0,7) – тритикале (1,5) – рожь (1,8) (табл. 1). Этот ряд позволяет предположить, что β -глюканы вносят определённый вклад в формирование морозоустойчивости перечисленных злаков. В этом ряду также

закономерно повышается содержание РНК и ДНК, но соответственно снижается содержание катионов магния в зрелом зерне [12].

В гораздо большей мере это предположение обоснованно относится к формированию морозоустойчивости ячменя и подсолнечника, в то время как о морозоустойчивости кукурузы по этому показателю не может быть и речи.

Необходимо отметить, что повышенное содержание β -глюканов в зерне ячменя снижает два других его важных качества: кормовое и пивоваренное. Гельобразующие β -глюканы снижают переваримость и всасывание питательных веществ в результате образования вязкой среды в тонкой кишке, ухудшая тем самым контакты с ферментами. Т.е. антипитательный эффект заключается в том, что, во-первых, инкапсулированные стенками клеток крахмал и белок остаются недоступными для пищеварительных ферментов; во-вторых, под их действием изменяется вязкость химуса и снижается усвояемость питательных веществ [17].

В зерне ржи, тритикале, ячменя, овса содержится значительное количество β -глюканов, которые ухудшают рост поросят и цыплят (табл. 1). Для снижения неблагоприятного действия добавляют в корм ферментные препараты – β -глюканы, которые расщепляют β -глюканы до моносахаров и снижают их гельобразующее действие.

О положительных свойствах: водоудерживающая способность приводит к полезному действию в ограничении потребления корма супоросными матками из-за увеличения времени, которое они затрачивают на еду, и более длительной наполненности желудка пищей.

Вместе с тем β -глюканы несомненно полезны для здоровья человека. Они используются для стимуляции иммунной системы при лечении рака, инфекционных заболеваний, способствуют лечению диабета и сопутствующих сердечнососудистых заболеваний [17].

Морозоустойчивость озимого ячменя и гигроскопичность его зрелого зерна

Озимый ячмень отличается сравнительно низкой зимоустойчивостью по сравнению с другими озимыми колосовыми (озимой рожью, озимым тритикале, озимой пшеницей). Трудности селекции на зимоустойчивость определяются многими причинами; это сложный полигенный признак, включающий морозоустойчивость – главный компонент успешной перезимовки, глубину залегания узла кущения, устойчивость к “выпиранию” и к образованию ледяной корки. Показано, что зимоустойчивость растений зависит от генотипа, условий закалки, стадии развития [16, 23].

Разработка метода оценки морозоустойчивости по гигроскопичности зерна исходно была проведена «закрытым списком» на 17 сортах озимого ячменя (*Hordeum vulgare* L.) урожая 2010 года, отечественной и зарубежной селекции. Растения промораживали в холодильных камерах при критических температурах $-12...-14^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч [23]. Для оценки гигроскопичности зерно разрушали в мельнице-дробилке и полученный шрот экстрагировали буфером А: 0.5 М Трис-НСl, рН 8.5; 50 мМ MgCl_2 ; 0.25 М сахара в соотношении 3 : 9 (вес : объем). После центрифугирования (5 мин, 5000 об./мин) надосадочную жидкость сливали в мерный цилиндр. Объем полученной жидкости принимали за величину, обратно пропорциональную гигроскопичности зерна, т.е. чем больше объем надосадочной жидкости, тем ниже гигроскопичность зерна (мл^{-1}) [9].

Для получения статистически достоверных результатов гигроскопичность замеряли 8–12 раз. В дальнейших исследованиях количество замеров снизили до 4 раз.

При этом было установлено, что более морозоустойчивые сорта отличались большей гигроскопичностью шрота. Эти различия достигали

максимально величины до 27%. Были получены хорошие совпадения оценки морозоустойчивости по гигроскопичности зерна и по прямому промораживанию растений в камерах (табл. 2) [9].

Сопоставление результатов оценки степени морозостойкости по гигроскопичности шрота зрелого зерна ячменя и данных прямого промораживания проростков в морозильной камере “закрытым списком”, т.е. когда исследователи не знали реальной морозостойкости сортов в ходе анализа, показали хорошее совпадение показаний на уровне 80–90% (табл. 2).

Четыре сорта из 17 – Новатор, Державный, Романс и Amarena – по гигроскопичности занимали позиции, не совпадающие с данными, полученными при промораживании. Однако нет полной уверенности, что и метод промораживания дает 100% верный результат. Многолетний опыт показывает, что на результаты прямого промораживания оказывают влияние многие факторы внешней среды, в частности, дифференциально изменяющие степень закалки растений того или иного сорта. Таким образом, число ошибок можно поделить поровну между сравниваемыми методами.

Представленные в табл. 2 данные были запатентованы [10].

Однако в последующие годы процент совпадения снизился [22]. Анализ этой ситуации привёл к выводу, что семена озимого ячменя урожая 2010 года были сформированы в условиях сильной засухи этого года, что сказалось на их физиологическом состоянии. В первую очередь, вероятно, на синтезе в зерне β -глюканов. Семена последующих более благоприятных лет давали меньшие совпадения двух сравниваемых методов оценки морозоустойчивости.

Таблица 2. Сопоставление результатов диагностики морозоустойчивости сортов озимого ячменя по степени гигроскопичности шрота зрелого зерна и по степени выживания растений в ходе промораживания в морозильной камере (семена урожая 2010 года) [9]

<i>Порядок сортов по мере снижения гигроскопичности зерна</i>	<i>Количество надосадочной жидкости, % от исходного объёма экстрагирующего буфера</i>	<i>Количество выживших растений при прямом промораживании, % от общего количества</i>
Фараон	51	84
Белогорыч	51	79
Новатор	54	36
Державный	54	17
Романс	56	41
NB 03435	56	76
DAT 03940	58	20
Сармат	58	10
Voreal	58	14
Premuda	58	8
Хайлайт	60	6
Мерседес	60	7
Циндерелла	63	9
Auturio	63	4
Amarena	64	27
Carola	64	8
Lomerit	65	10

Эти выводы имеют самый предварительный характер и требуют доработки в плане внимательной унификации деталей метода (чистота зерна от сопутствующего мусора, техники центрифугирования, замера объёма надосадочной жидкости) и доказательств путём многолетних наблюдений и сопоставлений с данными полевых испытаний и прямого промораживания. Тем не менее, подобные сравнения, несомненно, перспективны в плане исследования колебаний морозоустойчивости

сортов в зависимости от условий формирования зерна при том условии, что разные сорта в один и тот же год выращиваются при одинаковом агрофоне [19].

Состав экстрагирующего буфера А исторически был направлен на ингибирование активности ферментов РНКаз для получения интактного препарата РНК [9]. Представлялось необходимым выяснить, какие компоненты экстрагирующего буфера А определяют эффективность оценки гигроскопичности шрота ячменя. В экспериментах было установлено, что использование Трис-буфера, либо сахарозы не имело принципиального значения для эффективной оценки гигроскопичности зерна. Важным оказалось лишь присутствие в дистиллированной воде $MgCl_2$ в концентрации 50 мМ.

Этот факт позволяет предположить, что при экстракции катионы магния обеспечивают связь β -глюканов с дебрисом, иначе часть водорастворимого крахмала перешла бы в надосадочную жидкость, что нарушило бы точность замера. Вполне можно предположить наличие в зерне “слоеного пирога”: дебрис + Mg^{2+} + β -глюканы + вода, определяющего возможность оценки содержания β -глюканов в шроте по их гигроскопичности. Однако эта гипотеза требует доказательств.

Изложенные результаты сравнительных исследований степени морозостойкости сортов озимого ячменя по степени выживания растений при промораживании в холодильных камерах и по степени гигроскопичности зрелого зерна показывают, что эти два метода оценки морозостойкости дают весьма близкие результаты. Вместе с тем, по простоте и низким экономическим затратам метод оценки морозоустойчивости по гигроскопичности зерна во много раз превосходит метод прямого промораживания растений.

Исходя из всего вышесказанного, дальнейшие исследования особенностей синтеза и накопления β -глюканов на молекулярном уровне

представляются весьма перспективными для установления природы морозоустойчивости озимого ячменя и совершенствования методов ее оценки в селекционно-значимых масштабах.

Однако разрешающая способность нового метода существенно не превышала таковую метода прямого промораживания ($НСР=0,05$ для различий по морозостойкости в 8-10%), а для эффективной селекции, по мнению академика В.М. Шевцова (1940-2012), желательны различия в 2 раза большие. Дальнейшие исследования показали возможность увеличить разрешающую способность этого лабораторного метода за счет дополнительного анализа содержания в зрелом зерне ячменя экстрактивного магния, которым особенно богаты среднеморозоустойчивые сорта. По содержанию общего магния в зерне сорта ячменя не различались, вот по содержанию водоекстрагируемого магния относительно высоко морозоустойчивости сорта превосходили слабоморозоустойчивые [6]. Но именно эти катионы магния входят в состав РНК белоксинтезирующего аппарата клетки.

Оценка в зерне количества экстрактивного магния позволяет подразделить сорта на три группы морозоустойчивости. Однако метод сопряжен с необходимостью разрушения зерна, навески параллельных проб шрота, его экстракцией дистиллированной водой (отделение от шрота центрифугированием или фильтрацией) и оценкой содержания магния в экстракте фотометрическим методом окрашивания титановым жёлтым. Для этого необходима мельница, весы, центрифуга или оборудование для фильтрации, спектрофотометр или колориметр.

Чтобы снизить стоимость и трудозатраты метода была проведена работа по изучению прорастания зерна озимого ячменя на растворе динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (Трилон Б), результаты которой показывают, что сложный замер количества экстрактивного магния можно заменить исследованием интенсивности

роста проростков семян, проращиваемых на растворе этого вещества, эффективно связывающего двухвалентные катионы (табл. 4 и 5) [13, 19-21].

Таблица 3. Изменение роста корней 3-х суточных проростков озимого ячменя под влиянием разных концентраций Трилона Б, при температуре 25°C [13]

Сорт, по мере снижения морозоустойчивости	Контроль, H ₂ O, соответственно для 1,6×10 ⁻³ М и 2,4×10 ⁻³ М		Концентрация Трилона Б	
	Корень, см		Корень, см, (% от контроля)	
			1,6×10 ⁻³ М	2,4×10 ⁻³ М
Добрыня-3	4,53	4,77	4,62 (100%)	3,60 (75%)
Ларец	5,00	5,20	4,04 (81%)	2,70 (52%)
Кондрат	5,19	4,77	3,98 (77%)	3,10 (65%)
Гордей	5,56	5,37	4,31 (78%)	3,39 (63%)
Кубагро 1	4,26	3,87	3,50 (82%)	2,83 (73%)
Кубагро 3	4,63	4,21	2,74 (73%)	2,74 (65%)
Агродеум	4,04	4,71	2,83 (70%)	1,91 (41%)
Кариока (Франция)	5,10	4,78	4,85 (95%)	3,02 (64%)
Хайди (Австрия)	5,10	4,73	4,09 (80%)	3,68 (79%)
SZD-7385 (Австрия)	3,79	4,97	4,48 (118%)	3,58 (72%)

Таблица 4. Изменение роста корней 3-х суточных проростков озимого ячменя под влиянием Трилона Б, концентрации 3,2×10⁻³М, температура 22°C [13]

Сорт, по мере снижения морозоустойчивости	Контроль, H ₂ O	Трилон Б
	Корень, см	Корень, см, (% от контроля)
Добрыня-3	3,18	2,29 (72%)
Кондрат	4,30	2,24 (52%)
Гордей	4,23	1,94 (46%)
Кубагро 1	3,37	1,37 (40%)
Кубагро 3	3,58	1,37 (38%)
Агродеум	3,58	0,84 (24%)
Кариока (Франция)	2,98	1,79 (60%)
Хайди (Австрия)	3,57	2,25 (63%)
SZD-7385 (Австрия)	3,29	1,82 (55%)

Однако, как видно из данных, представленных в таблицах 3 и 4, этот метод давал удовлетворительные результаты только на отечественных российских сортах, но не позволял корректно оценить морозоустойчивость

сортов озимого ячменя иностранного происхождения (Франция, Австрия) [13]. В то время как оценка морозоустойчивости по гигроскопичности зерна была успешна с сортами любого происхождения.

Вместе с тем, понятно, что для достижения удовлетворительного разрешающего эффекта метода оценки морозоустойчивости озимого ячменя по гигроскопичности зерна желательно или даже необходимо предварительно индуцировать у растений сортоспецифическое усиление синтеза β -глюканов.

Как это сделать? Возможно, ответ на этот вопрос имеется в работе пакистанских исследователей, использовавших метод оценки гигроскопичности зерна для оценки морозоустойчивости подсолнечника [24].

Морозоустойчивость подсолнечника и гигроскопичность его зрелого зерна

Как и озимый ячмень, подсолнечник (*Helianthus annuus* L. 2 n = 34) обладает слабой морозоустойчивостью. Содержание β -глюканов в зерне подсолнечника близко к таковому озимого ячменя (табл. 1). Оценка морозоустойчивости растений подсолнечника в морозильных камерах проводится также при -12°C [24].

Результаты исследований гигроскопичности зрелого зерна и морозоустойчивости растений 8-ми сортов подсолнечника представлены в табл. 5 в том порядке, в котором они даны в оригинальной статье [24]. Любопытно было выстроить сорта по 1) устойчивости растений к промораживанию в камере и 2) по гигроскопичности зрелого зерна.

Ряд по снижению морозоустойчивости выглядит следующим образом:

Rising Sun - SMH-0917 - HS-K6 - Hysun-33 - SMH-0939 - Ausigold-7 - US-444 - SMH-0907.

Ряд по возрастанию гигроскопичности зрелого зерна выглядит так:

HS-K6 - Rising Sun - SMH-0917 - SMH-0939 - Hysun-33 - - Ausigold-7 - US-444 - SMH-0907.

Вполне очевидно, что лидерами по морозоустойчивости являются три сорта: Rising Sun - SMH-0917 - HS-K6, они же составляют тройку сортов с самой высокой гигроскопичностью зрелого зерна: HS-K6 - Rising Sun - SMH-0917. Три сорта: Ausigold-7 - US-444 - SMH-0907 замыкают оба ряда. И в середине рядов находятся сорта: Hysun-33 - SMH-0939.

Морозоустойчивость растений обычно связывают с концентрацией в протоплазме клетки следующих осмолитов: свободного пролина, водорастворимых белков, углеводов и фенольных соединений.

Биосинтез этих веществ значительно возрастет при обработке растений раствором KNO_3 , который мотивирует процессы фотосинтеза, усиливает синтез вторичных метаболитов, углеводов и их передвижение к различным частям растения. Это также приводит к усилению синтеза и транслокации пролина, фенольных соединений и флавоноидов.

Цинк является существенным микроэлементом, играющим значительную роль в жизни растения, его развития, оказывает влияние на первичный и вторичный метаболизм, в частности усиливает синтез фенольных соединений и сахаров.

Гибберелловая кислота, как и многие фитогормоны, способна усилить элиситорный ответ растительной клетки на биологические стрессы, стимулируя продукцию вторичных метаболитов.

Эксперименты по обработке растений подсолнечника растворами KNO_3 , $ZnSO_4$ и гибберелловой кислотой проводили в условиях теплицы, при комнатной температуре и достижении растениями стадии 4-х листьев, тремя дозами с интервалом в 5 дней.

По эффективности обработок на степень гигроскопичности зрелого зерна подсолнечника несомненно лидировала обработка KNO_3 (в концентрации 50 ppm), несколько меньшую эффективность проявила

обработка ZnSO₄ (30 ppm) и самый слабый эффект давала обработка гибберреловой кислотой (20 ppm) (табл. 5).

Таблица 5. Влияние различных обработок на степень выживания растений при прямом промораживании в камере и на степень гигроскопичности зрелого зерна различных сортов подсолнечника [24]

Сорта															
Rising Sun		SMH-0907		Ausigold-7		SMH-0939		US-444		Hysun-33		SMH-0917		HS-K6	
Контроль															
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
60	44	78	18	74	22	76	21	79	22	75	25	61	44	59	45
50 ppm KNO ₃															
40	80	42	77	59	40	53	47	58	43	41	75	40	79	38	83
30 ppm ZnSO ₄															
50	49	66	25	52	47	51	46	56	38	47	58	49	60	51	48
20 ppm GA ₃ (гибберреловая кислота)															
55	41	70	22	57	43	59	39	73	30	71	32	59	42	56	46

1 – количество супернатанта, % от начального объёма экстрагирующего буфера;

2 – количество растений, выживших после проморозки, % от общего числа растений.

ppm (от англ. parts per million) – миллионная доля: единица измерения каких-либо относительных величин, равная 1×10^{-6} от базового показателя (соотношение: 1 ppm = 0,0001 %).

Обобщённый анализ данных по 8-ми сортам подсолнечника, представленных в таблице 5, позволяет констатировать, что обработка растений раствором KNO₃ приводила к снижению выхода супернатанта (надосадочной жидкости) с 70% у контрольных семян подсолнечника до 45% у опытных, при обработке раствором ZnSO₄ - до 60% и при обработке гибберреловой кислотой – до 65%.

Соответственно, морозостойчивость (% выживших растений при промораживании) увеличивался с 30% в контрольном варианте до 67% при

обработке раствором KNO_3 , до 50% при обработке раствором $ZnSO_4$ и до 40% при обработке гибберреловой кислотой.

Сходную эффективность проявляли эти обработки и на содержание в листьях подсолнечника свободного пролина, фенольных соединений, углеводов и водорастворимых белков.

Наиболее высокая корреляция ($R^2 = 0,907$) обнаружена между гигроскопичностью зрелого зерна и содержанием в листьях фенольных соединений. Содержание растворимых белков в листьях также относительно высоко коррелировало с гигроскопичностью ($R^2 = 0,708$). Значительной была корреляция с углеводами ($R^2 = 0,673$) и свободным пролином ($R^2 = 0,623$) [24].

Следовательно, оценка гигроскопичности зрелого зерна вполне эффективно может заменять оценку содержания в зелёной массе перечисленных осмолитов.

Заключение

Интенсивность синтеза белка в клетках определяет скорость закалки растения и таким образом его морозоустойчивость. Ранее установленные факты сортоспецифического усиления *in vitro* трансляционной активности полисом из проростков пшеницы и ячменя под влиянием закалывающей температуры сталкиваются с теоретическим противоречием: если в этих условиях длина энхансера (усилителя) трансляции - поли-А-хвоста мРНК - у пшеницы увеличивалась, то у ячменя сокращалась [3, 8, 11].

Но ячмень содержит гораздо больше катионов магния по сравнению с пшеницей, что, возможно, и определяло увеличение трансляционной активности рибосом ячменя. Сорты озимого ячменя не различались по содержанию общего магния в зерне (в отличие от сортов озимой пшеницы), но при этом относительно высокоморозоустойчивые сорта озимого ячменя по сравнению с относительно слабоморозоустойчивыми сортами содержали существенно больше свободного магния, который

непосредственно участвует в формировании белоксинтезирующего аппарата клетки [6, 18].

Следовательно, увеличение трансляционной активности полирибосом может происходить как за счёт увеличения длины поли-А-хвоста мРНК как энхансера трансляции (пшеница), так и за счёт увеличения содержания катионов магния в рРНК (ячмень). Эта принципиально важная гипотеза требует детальной экспериментальной проверки.

При высоком содержании магния способность строить полипептиды приобретают многие синтетические мРНК. Это явление позволило расшифровать генетический код. При более низких концентрациях, синтез могут вести только те РНК, в которых присутствуют иницирующие кодоны АУГ и ГУГ [18].

Каким образом магний иницирует синтез? На этот вопрос нет однозначного ответа. Тем не менее, установлено, чем больше содержится магния в рРНК, тем активнее синтезируют белок (полифенилаланин) рибосомы зародышей пшеницы в бесклеточной системе синтеза белка (*in vitro*) на искусственной матрице (поли-У) [25].

Чем интенсивнее синтез белка, тем вероятнее усиление синтеза β -глюканов группой ферментов и накопления в растении растворимого крахмала, повышающего гигроскопичность зрелого зерна, положительно взаимосвязанного с морозоустойчивостью сортов.

Таким образом, проведённое в настоящей статье сопоставление результатов исследования гигроскопичности зрелого зерна различных сортов озимого ячменя и подсолнечника в связи с их морозоустойчивостью позволяет сделать вывод, что для эффективной оценки морозоустойчивости этих культур целесообразна предварительная обработка растений раствором KNO_3 (50 ppm), $ZnSO_4$ (30 ppm) или гиббереловой кислоты (20 ppm), теоретически стимулирующих сортоспецифическое накопление β -глюканов и других осмолитов (пролин,

растворимые белки, углеводы и фенольные соединения). Результаты сравнительных исследований морозоустойчивости по степени выживания растений при промораживании в холодильных камерах и по степени гигроскопичности зрелого зерна показали, что эти два метода оценки морозоустойчивости дают весьма близкие данные, как по озимому ячменю, так и по подсолнечнику.

Вместе с тем, по простоте и низким экономическим затратам предлагаемый лабораторный метод оценки морозоустойчивости озимого ячменя и подсолнечника значительно превосходит метод прямого промораживания растений, выгодно отличаясь от других лабораторных методов универсальностью по отношению к сортам различных культур и разного происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амерах А. Выше прибыль на зерновых рационах смешанного типа // Комбикорма, № 4, 2014, с.15-16.
2. Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н., Плотников В.К., Хлебцов Н.Г. Оптические свойства конъюгатов коллоидного золота с олиготимидином и их изменение при реакции гибридизации с полиадениловой кислотой // Коллоидный журнал, 2005, т.67, № 4, с.458-468.
3. Бакалдина Н.Б., Алексеенко Ж.В., Плотников В.К. Холодоиндуцированные изменения стабильности мРНК субъединицы альфа фактора элонгации трансляции 1 у проростков пшеницы и ячменя // Физиология растений, 2001, т.48, № 6, с. 879-885.
4. Евтушенко Я.Ю., Салфетников А.А., Репко Н.В., Плотников В.К. // Какова роль водорастворимого крахмала в формировании морозоустойчивости озимого ячменя // Материалы 2-й всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология», Саратов, 2014, с. 77.
5. Насонов А.И., Полежаев С.Л., Радуль А.П., Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Взаимосвязь содержания катионов магния (Mg^{++}), стабильности РНК и интенсивности метаболизма в клетках эукариот // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2008, № 2(11), с.104-110.
6. Насонов А.И., Евтушенко Я.Ю., Серкин Н.В., Плотников В.К. Особенности состава зерна среднеморозоустойчивых сортов ячменя // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2012, т. 1, № 38, с. 104 – 106.
7. Насонов А.И., Степанов И.В., Евтушенко Я.Ю., Плотников В.К. Дифференциальная стабильность 25S и 18S рибосомной РНК растений // Труды Кубанского аграрного университета, 2012, т. 1., № 38, с. 121-125.
8. Плотников В.К. Биология РНК зерновых культур. Краснодар: Эдви, 2009. 375 с.

9. Плотников В.К., Евтушенко Я.Ю., Серкин Н.В. Сравнительный анализ морозоустойчивости сортов озимого ячменя по результатам промораживания и по гигроскопичности зрелого зерна // Физиология растений, 2012, т. 59, № 2, с. 316-319.

10. Плотников В.К., Евтушенко Я.Ю., Серкин Н.В. Способ определения морозоустойчивости озимого ячменя // Патент на изобретение RUS 2479991 12.03.2012.

11. Плотников В.К., Евтушенко Я.Ю., Салфетников А.А., Репко Н.В., Насонов А.И. Биологические маркёры для селекции на морозоустойчивость озимых форм мягкой пшеницы и ячменя // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2014, № 104, с. 1855-1887.

12. Плотников В.К., Салфетников А.А. 60 лет в строю: особенности молекулярной биологии озимой мягкой пшеницы сорта Безостая 1 // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2016, № 118, с. 627-657.

13. Плотников В.К., Смирнова Е.В., Репко Н.В., Салфетников А.А. Сортоспецифичность действия трилона Б на прорастания семян озимого ячменя // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2016, № 120, с. 706-729.

14. Плотников В.К., Салфетников А.А., Насонов А.И., Ненько Н.И. Молекулярные маркёры эффекта взаимодействия «генотип-среда» у растений на основе закономерностей распада мРНК *in vivo* (РНК-интерференция) и *in vitro* (ommp-система) // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2018, № 141 (07), с. 41-64.

15. Полонский В. И., Сумина А. В. Актуальные проблемы селекции ячменя // <http://www/kgau.ru/konferenc/2010/b4.doc>

16. Репко Н.В. Селекция озимого ячменя в условиях юга России, Краснодар, КубГАУ, 2018, 258 с.

17. Рядчиков В. Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных: Краснодар, КубГау: 2013, 616 с.

18. Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Экспрессия генов эукариот при аминокислотном имбалансе, Краснодар, КубГау, 2014, 375 с.

19. Смирнова Е.В., Репко Н.В., Салфетников А.А., Плотников В.К. Оптимизация метода оценки морозоустойчивости сортов озимого ячменя по гигроскопичности зрелого зерна // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2016, № 62, с. 112-116.

20. Смирнова Е.В., Плотников В.К., Репко Н.В. Использование Трилона Б в качестве биологического маркёра при оценке морозоустойчивости озимого ячменя // Сборник статей по материалам X Всероссийской конференции молодых учёных, посвящённой 120-летию И.С. Косенко, Краснодар, КубГау, 2017, с. 110-111.

21. Смирнова Е.В., Плотников В.К., Репко Н.В., Салфетников А.А., Бойко Е.С. Способ оценки морозоустойчивости озимого ячменя // Патент РФ на изобретение № 2643833, патент на изобретение RUS 2643833 19.12.2016.

22. Смирнова Е.В. Биологические и молекулярные маркёры в оценке морозоустойчивости озимого ячменя // Автореф. дисс. на соиск. ст. канд. биол. наук, Краснодар, 2018, 23 с.

23. Шевцов В.М., Серкин Н.В., Фоменко Н.П., Костяной Д.В. Проблемы повышения зимостойкости озимого ячменя на Северном Кавказе // Докл. РАСХН. 2007. № 4. с. 3-5.

24. Jan A.U., Hadi F. Analysis of frost resistance of sunflower varieties by comparing freezing survival of whole plants and the hygrosopicity of mature seeds // Intern. Conf. of Botany, Chitral, Pakistan, March 29 – April 2, 2018. P. 1-17.

25. Sperrazza J.M., Spremulli L.L. Quantitation of cation binding to wheat germ ribosomes: influences on subunit association equilibria and ribosome activity // *Nucleic Acids Research*. 1983. v.11. № 9. P. 2665 – 2679.

References

1. Amerah A. Vyshe pribyl' na zernovyh racionah smeshannogo tipa // *Kombikorma*, № 4, 2014, s.15-16.
2. Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Hlebcov B.N., Plotnikov V.K., Hlebcov N.G. Opticheskie svojstva kon'yugatov kolloidnogo zolota s oligotimidinom i ih izmenenie pri reakcii gibridizacii s poliadenilovoj kislotoj // *Kolloidnyj zhurnal*, 2005, t.67, № 4, s.458-468.
3. Bakaldina N.B., Alekseenko ZH.V., Plotnikov V.K. Holodoinducirovannye izmeneniya stabil'nosti mRNK sub'edinicy al'fa faktora ehlongacii translyacii 1 u prorostkov pshenicy i yachmenya // *Fiziologiya rastenij*, 2001, t.48, № 6, s. 879-885.
4. Evtushenko YA.YU., Salfetnikov A.A., Repko N.V., Plotnikov V.K. // *Kakova rol' vodorastvorimogo krahmala v formirovanii morozoustojchivosti ozimogo yachmenya* // *Materialy 2-j vserossijskoj konferencii «Fundamental'naya glikobiologiya»*, Saratov, 2014, s. 77.
5. Nasonov A.I., Polezhaev S.L., Radul' A.P., Ryadchikov V.G., Plotnikov V.K. Vzaimosvyaz' sodержaniya kationov magniya (Mg⁺⁺), stabil'nosti RNK i intensivnosti metabolizma v kletkah ehukariot // *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2008, № 2(11), s.104-110.
6. Nasonov A.I., Evtushenko YA.YU., Serkin N.V., Plotnikov V.K. Osobennosti sostava zerna srednemorozoustojchivyh sortov yachmenya // *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2012,t. 1, № 38, s. 104 – 106.
7. Nasonov A.I., Stepanov I.V., Evtushenko YA.YU., Plotnikov V.K. Differencial'naya stabil'nost' 25S i 18S ribosomnoj RNK rastenij // *Trudy Kubanskogo agrarnogo universiteta*, 2012, t. 1., № 38, s. 121-125.
8. Plotnikov V.K. *Biologiya RNK zernovyh kul'tur*. Krasnodar: EHDvi, 2009. 375 s.
9. Plotnikov V.K., Evtushenko YA.YU., Serkin N.V. Sravnitel'nyj analiz morozoustojchivosti sortov ozimogo yachmenya po rezul'tatam promorazhivaniya i po gigroskopichnosti zrelogo zerna // *Fiziologiya rastenij*, 2012, t. 59, № 2, s. 316-319.
10. Plotnikov V.K., Evtushenko YA.YU., Serkin N.V. Sposob opredeleniya morozoustojchivosti ozimogo yachmenya // *Patent RF na izobrenenie № 2479991, Zaregistririvan v gosudarstvennom reestre izobrenenij Rossijskoj Federacii 27 aprelya 2013 g*
11. Plotnikov V.K., Evtushenko YA.YU., Salfetnikov A.A., Repko N.V., Nasonov A.I. Biologicheskie markyory dlya selekcii na morozoustojchivost' ozimyh form myagkoj pshenicy i yachmenya // *Politematicheskij setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2014, № 104, s. 1855-1887.
12. Plotnikov V.K., Salfetnikov A.A. 60 let v stroju: osobennosti molekulyarnoj biologii ozimoy myagkoj pshenicy sorta Bezostaya 1 // *Politematicheskij setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2016, № 118, s. 627-657.
13. Plotnikov V.K., Smirnova E.V., Repko N.V., Salfetnikov A.A. Sortospecifichnost' dejstviya trilona B na prarastaniya semyan ozimogo yachmenya // *Politematicheskij setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2016, № 120, s. 706-729.
14. Plotnikov V.K., Salfetnikov A.A., Nasonov A.I., Nen'ko N.I. Molekulyarnye markyory ehffekta vzaimodejstviya «genotip-sreda» u rastenij na osnove zakonomernostej raspada mRNK in vivo (RNK-interferenciya) i in vitro (ommp-sistema) // *Politematicheskij*

setevoj ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2018, № 141 (07), s. 41-64.

15. Polonskij V. I., Sumina A. V. Aktual'nye problemy selekcii yachmenya // <http://www/kgau.ru/konferenc/2010/b4.doc>

16. Repko N.V. Selekcija ozimogo yachmenya v usloviyah yuga Rossii, Krasnodar, KubGAU, 2018, 258 s.

17. Ryadchikov V. G. Osnovy pitaniya i kormleniya sel'skohozyajstvennyh zivotnyh: Krasnodar, KubGau: 2013, 616 s.

18. Ryadchikov V.G., Plotnikov V.K. EHkspressiya genov ehukariot pri aminokislotnom imbalance, Krasnodar, KubGau, 2014, 375 s.

19. Smirnova E.V., Repko N.V., Salfetnikov A.A., Plotnikov V.K. Optimizaciya metoda ocenki morozoustojchivosti sortov ozimogo yachmenya po gigroskopichnosti zrelogo zerna // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2016, № 62, s. 112-116.

20. Smirnova E.V., Plotnikov V.K., Repko N.V. Ispol'zovanie Trilona B v kachestve biologicheskogo markyora pri ocenke morozoustojchivosti ozimogo yachmenya // Sbornik statej po materialam H Vserossijskoj konferencii molodyh uchyonyh, posvyashchyonnoj 120-letiyu I.S. Kosenko, Krasnodar, KubGau, 2017, s. 110-111.

21. Smirnova E.V., Plotnikov V.K., Repko N.V., Salfetnikov A.A., Bojko E.S. Sposob ocenki morozoustojchivosti ozimogo yachmenya // Patent RF na izobrenenie № 2643833, Zaregistririvan v gosudarstvennom reestre izobrenenij Rossijskoj Federacii 6 fevralya 2018 g.

22. Smirnova E.V. Biologicheskie i molekulyarnye markyory v ocenke morozoustojchivosti ozimogo yachmenya // Avtoref. diss. na soisk. st. kand. biol. nauk, Krasnodar, 2018, 23 s.

23. SHEvcov V.M., Serkin N.V., Fomenko N.P., Kostyanov D.V. Problemy povysheniya zimostojkosti ozimogo yachmenya na Severnom Kavkaze // Dokl. RASKHN. 2007. № 4. s. 3-5.

24. Jan A.U., Hadi F. Analysis of frost resistance of sunflower varieties by comparing freezing survival of whole plants and the hygrosopicity of mature seeds // Intern. Conf. of Botany, Chitral, Pakistan, March 29 – April 2, 2018. P. 1-17.

25. Sperrazza J.M., Spremulli L.L. Quantitation of cation binding to wheat germ ribosomes: influences on subunit association equilibria and ribosome activity // Nucleic Acids Research. 1983. v.11. № 9. P. 2665 – 2679.