

RTG/0003/2

УТВЕРЖДАЮ:
Председатель ФГУ «Государственная
комиссия Российской Федерации по
испытанию и охране селекционных
достижений»

В.В. Шмаль

27.10.2004 г. № 12-06/14

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ НА ОТЛИЧИМОСТЬ, ОДНОРОДНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ

ПШЕНИЦА МЯГКАЯ (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol.)*

I. Общие рекомендации

Данная методика применима ко всем сортам *Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol. Одновременно следует руководствоваться документом RTG/01/3 "Общее введение по испытанию на отличимость, однородность и стабильность и составлению описаний" от 22.07.2002 г. №12-06/52 (Официальный бюллетень Госкомиссии № 6, 2002 г.).

II. Требуемый материал

1. На весь цикл испытания необходим образец семян массой 4 кг и 130 колосьев для яровых и 180 для озимых сортов.
2. Семена по сортовым и посевным качествам должны соответствовать требованиям ГОСТа: по посевным качествам - 1-му классу, по сортовой чистоте - 1 категории. Колосья должны быть хорошо развитыми, без видимых повреждений болезнями и вредителями.
3. Семена не должны быть обработаны ядохимикатами и другими химическими препаратами.
4. Заявитель, высылающий семена и колосья из другой страны, должен полностью соблюдать все таможенные правила.

III. Проведение испытаний

1. Полевые опыты проводят в одном месте, в условиях, обеспечивающих нормальное развитие культуры, в течение двух вегетационных периодов. При необходимости испытание продолжают на третий год.
2. По каждому оцениваемому сорту в первый год закладывают три типа делянок: "А" - рядового посева не менее 2000 растений в двух повторениях (размещение сортов систематическое); "В" - 100 рядов с посевом в каждом из них семян одного колоса; "Г" - по озимым сортам при весеннем севе 50 рядов с посевом в каждом из них семян одного колоса.

* Использован документ УПОВ TG/3/11 + Corr. "GUIDELINES FOR THE CONDUCT OF TESTS FOR DISTINCTNESS, HOMOGENEITY AND STABILITY". Оригинал на английском языке от 04.11.94. + 18.10.96.

На второй год закладывают два типа делянок: “А” - семенами исходного образца и “Д” – семенами сомнительных по типичности рядов, выделенных в первый год испытания на делянке “В”, в качестве контроля высевают семена типичных растений.

3. Оцениваемый и похожие на него сорта размещают на смежных делянках. В опыте размещают и делянки эталонных сортов.

4. Для специальных целей могут быть назначены дополнительные испытания.

IV. Методы и наблюдения

1. Для определения отличимости и стабильности обследуют 20 растений или их частей.

2. При оценке однородности признаков количество отклоняющихся растений на делянке в целом не должно превышать 5 на 2000.

3. При оценке однородности признаков на колосо-рядах или отдельных растениях количество отклоняющихся не должно превышать 3 на 100.

4. Семена с сомнительных рядов растений (семьи), выделенные в первый год наблюдений, высевают на второй год на делянке “Д” для выяснения причин неоднородности.

5. Сорта, у которых число нетипичных растений превышает указанные выше числа, признаются не отвечающими критерию однородности.

V. Группировка сортов

Испытываемый сорт и похожие сорта реферативной коллекции должны быть разбиты на группы для облегчения оценки на отличимость. Для группировки используют такие признаки, которые, исходя из практического опыта, не варьируют или варьируют незначительно в пределах сорта, и их варьирование в пределах коллекции распределено равномерно.

Рекомендуется использовать следующие признаки:

- 1) колос: цвет (признак 16);
- 2) ости или остевидные отростки: наличие (признак 14);
- 3) зерновка: окраска (признак 24);
- 4) тип развития (признак 26).

VI. Признаки и обозначения

Признаки, используемые для оценки отличимости, однородности и стабильности и степени их выраженности, приведены в таблице VII. Отметка (*) указывает на то, что данный признак следует отмечать каждый вегетационный период для оценки всех сортов и всегда включать в описание сорта за исключением случаев, когда степень выраженности предыдущего признака указывает на его отсутствие, или когда условия окружающей среды делают это невозможным. Отметка (+) означает, что описание признака сопровождаются в методике дополнительными объяснениями и (или) иллюстрациями.

Оптимальное время учета признака указано во второй колонке кодом стадий развития зерновых культур (Приложение 1).

По каждому признаку указан метод его учета:

M - непосредственное измерение определенного количества растений или частей растений;

VG - визуальная однократная оценка группы растений или частей растений;

VS - визуальная индивидуальная оценка колосо-рядов и определенного количества растений или частей растений.

Значениям выраженности признака приданы индексы (1 - 9) для электронной обработки результатов. По каждой степени выраженности признаков в колонке «Сорт-эталон» указаны озимые и яровые сорта-эталоны.

VII. Таблица признаков

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон		Индекс
			озимый	яровой	
1. Колеоптиле: антоциановая окраска (+)	09-11 VS	отсутствует или очень слабая	Herzog, Поволжская 86, Омская 5	Delos, Новосибирская 15, Приокская	1
		слабая	Niklas, Дон 95, Заря	Baldus, Алтайская 50, Курская 2038	3
		средняя	Andros, Инна, Смуглянка	Planet, Алтайская 325	5
		сильная	Obelisk, Оренбургская 14	Briscard,	7
		очень сильная	Albatros		9
2. Растение: тип куста (* (+)	25-29 VG	прямостоячий	Castan, Зерноградка 10	Алтайская 50	1
		полупрямостоячий	Frandos, Памяти Федина, Прикумская 115	Remus, Приокская, Терция	3
		промежуточный	Obelisk, Инна, Престиж	Troll, Омская 20, Эстер	5
		полустелющийся	Boss, Оренбургская 105		7
		стелющийся	Beaver, Соратница		9
3. Флаговый лист: антоциановая окраска ушек	49-51 VG	отсутствует или очень слабая	Soissons, Иркутская, Престиж	Prinqual, Омская 28, Приокская	1
		слабая	Niklas, Инна, Прикумская 115	Troll, Алтайская 50, Эстер	3
		средняя	Cargidos, Оренбургская 14, Поволжская 86	Омская 29	5
		сильная	Cardo, Безенчукская 380	Sunnan, Курская 2038	7
		очень сильная	Recital	Dollar, Ирень	9
4. Растение: количество растений с наклонным флаговым листом (+)	47-51 VG	отсутствует или очень малое	Apollo, Оренбургская 105, Горлица	Памяти Азиева, Эстер	1
		малое	Recital, Московская 39, Скифянка	Ахопа, Омская 28	3

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон		Индекс
			озимый	яровой	
		среднее количество	Obelisk, Памяти Федина, Прикумская 115	Filou, Приокская	5
		большое	Frandos, Инна, Престиж	Prinqual, Алтайская 325, Курская 2038	7
		очень большое	Capitole, Заря	Ирень	9
5. Время колошения (первый колосок виден у 50% растений)	50-52 VG	очень раннее	Britta	Florence Aurore	1
		раннее	Recital, Дон 95	Remus, Иволга, Ирень	3
		среднее	Astron, Инна, Соратница	Paros, Алтайская 50, Приокская	5
		позднее	Moulin	Vitus, Алтайская 88	7
		очень позднее	Beaver		9
6. Флаговый лист: восковой налет на влагалище	60-65 VG	отсутствует или очень слабый	Cargo, Ника Кубани	Adonis, Амир	1
		слабый	Heiduck, Дон 95	Ventura, Приокская, Тулайковская 1	3
		средний	Agent, Иркутская, Скифянка	Hanno, Омская 26	5
		сильный	Orestis, Инна, Престиж	Prinqual, Терция, Эстер	7
		очень сильный	Haven	Wim, Алтайская 60	9
7. Колос: восковой налет	60-69 VG	отсутствует или очень слабый	Soissons, Ника Кубани	Adonis, Амурская 1495	1
		слабый	Garant, Дон 95	Ventura, Терция	3
		средний	Contra, Инна, Скифянка	Paros, Амир Алтайская 50	5
		сильный	Niklas, Заря	Combi, Курская 2038	7
		очень сильный	Boxer	Wim, Иволга	9
8. Соломина: восковой налет на верхнем междоузлии	60-69 VG	отсутствует или очень слабый	Goelent, Зерноградка 10	Adonis, Тулайковская 1	1
		слабый	Soissons, Дон 95	Ventura, Росинка	3
		средний	Haven, Омская 5, Скифянка	Attis, Амир, Омская 26	5
		сильный	Herzog, Инна, Поволжская 86	Nandu, Ирень, Эстер	7
		очень сильный	Quotador	Алтайская 60, Иволга, Wim	9
9. Растение: длина (стебель, колос, ости или остевидные отростки)	75-92 M	очень короткое	Courtot	Briscard	1
		короткое	Konsul	Remus	3
		средней длины	Sideral	Ventura	5
		длинное	Boxer	Adonis	7
		очень длинное	Aladin	Vitus	9
10. Соломина: выполненность в поперечном сечении	80-92 VS	выполнена слабо	Orestis, Инна, Скифянка	Амир, Remus, Курская 2038	3

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон		Индекс
			озимый	яровой	
(*) ченин (в середине между основанием колоса и верхним стеблевым узлом)		выполнена средне	Herzog, Смуглянка	Nandu, Тулайковская 1	5
(+)		выполнена полностью	Forby, Прикумская 115	Furio	7
11. Колос: форма в профиль	92 VS	пирамидальный	Slejpner, Эхо	Filou, Ирень, Эстер	1
(*)		цилиндрический	Поволжская 86, Соратница	Алтайская 60, Курская 2038	2
(+)		полубулавовидный	Pane 247		3
		булавовидный	Beauchamp	Prinqual	4
		веретеновидный	Declic, Инна, Скифянка	Алтайская 50, Мис, Nandu	5
12. Колос: плотность	80-92 VS	очень рыхлый	Demar 4		1
(*)		рыхлый	Castan, Смуглянка	Ventura, Ирень	3
(+)	или M	средний	Soissons, Заря, Скифянка	Алтайская 50, Hanno, Эстер	5
		плотный	Forby, Дон 95	Combi	7
		очень плотный			9
13. Колос: длина (исключая ости или остевидные отростки)	80-92 M	очень короткий			1
		короткий	Carat		3
		средней длины	Ritmo	Arkas	5
		длинный	Forby	Prinqual	7
		очень длинный	Amifort		9
14. Ости или остевидные отростки: наличие	80-92 VG	отсутствуют	Futur, Соратница	Ахона, Альбидум 188	1
(*)		остевидные отростки	Festival, Инна, Эхо	Алтайская 50, Эстер, Furio	2
(+)		ости	Soissons, Престиж	Ventura, Алтайская 60	3
15. Ости или остевидные отростки на конце колоса: длина	80-92 VG	очень короткие	Herzog, Дон 95, Иркутская	Эстер	1
(*)		короткие	Andros, Московская 39, Скифянка	Combi, Омская 28	3
		средней длины	Pagode, Эхо, Престиж	Hanno, Алтайская 50	5
		длинные	Инна, Fidel, Поволжская 86	Тулайковская 1	7
		очень длинные	Gaicho, Заря,		9
16. Колос: цвет	90-92 VG	белый	Herzog, Дон 95, Инна	Алтайская 50, Эстер, Furio	1
(*)		окрашенный	Gallo	Безим, Prinqual	2
17. Верхушечный сегмент оси колоса: опущение с выпуклой стороны	80-92 VS	отсутствует или очень слабое	Soissons, Эхо	Эстер	1
(+)		слабое	Инна, Slejpner, Престиж	Алтайская 60, Иволга, Furio	3
		среднее	Иркутская, Beaver, Русса	Rock, Омская 28, Амир	5
		сильное	Apollo, Малахит	Ахона, Тулайковская 1	7

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон		Индекс
			озимый	яровой	
		очень сильное	Carat, Дон 95	Амурская 1495	9
18. Нижняя колосковая (+) чешуя: ширина плеча (в средней трети колоса)	80-92 VS	отсутствует или очень узкое	Courtot, Зарница		1
		узкое	Soissons, Юна	Wim, Алтайская 50	3
		среднее	Инна, Sideral, Прикумская 115	Иволга, Furio, Ирень	5
		широкое	Оренбургская 14, Русса, Castan	Омская 26, Filou, Эстер	7
		очень широкое	Наследница, Або	Амурская 1495	9
19. Нижняя колосковая (+) чешуя: форма плеча (в средней трети колоса)	80-92 VS	скошенное	Courtot, Зарница	Алтайская 60, Курская 2038	1
		закругленное	Памяти Федина, Престиж, Forby	Омская 26, Эстер, Ventura	3
		прямое	Дон 95, Herzog, Московская 39	Иволга, Ирень, Prinqual	5
		приподнятое	Иркутская, Прикумская 115, Beaver	Adonis	7
		приподнятое со вторым острым концом	Farnese, Малахит		9
20. Нижняя колосковая (+) чешуя: длина зубца (в средней трети колоса)	80-92 VS	очень короткий	Aladin, Престиж	Sunnan, Омская 20, Эстер	1
		короткий	Памяти Федина, Эхо, Sideral	Алтайская 325, Приокская, Ахона	3
		средней длины	Инна, Recital, Поволжская 86	Furio, Тулайковская 1	5
		длинный	Soissons, Прикумская 115	Тежо, Амурская 1495	7
		очень длинный	Courtot, Московская 39	Зарянка, Prinqual	9
21. Нижняя колосковая (+) чешуя: форма зубца (в средней трети колоса)	80-92 VS	прямой	Festival, Иркутская, Поволжская 86	Lobo, Алтайская 50	1
		слегка изогнут	Заря, Slejпner, Прикумская 115	Furio, Курская 2038	3
		умеренно изогнут	Courtot, Старшина	Rock, Иволга	5
		сильно изогнут со значительным перегибом	Agum Казанская 285		7 9
22. Нижняя колосковая (+) чешуя: опущение внутренней стороны (в средней трети колоса)	80-92 VS	очень слабое	Иркутская, Наследница		1
		слабое	Slejпner, Омская 5, Ника Кубани	Prinqual, Алтайская 50, Курская 2038	3
		среднее	Sideral, Заря, Русса	Алтайская 325, Furio, Иволга	5
		сильное	Declic, Поволжская 86	Тежо	7
23. Нижняя цветковая чешуя: форма зубца (в	80-92 VS	прямой	Soissons, Станичная	Prinqual, Алтайская 50	1

Признак	Порядок учета	Степень выраженности	Сорт-эталон		Индекс
			озимый	яровой	
(+) средней трети колоса)		слегка изогнут	Slejpner, Иркутская, Прикумская 115	Алтайская 325, Briscard, Эстер	3
		умеренно изогнут	Памяти Федина, Поволжская 86, Sideral	Иволга, Учитель, Wim	5
		сильно изогнут	Русса, Parade	Курская 2038, Ахона	7
		со значительным перегибом	Tara, Смуглянка		9
24. (* (+) Зерновка: окраска	92 VG	белая	Recital, Иркутская	Florence, Aurore, Учитель	1
		красная	Дон 95, Soissons, Памяти Федина	Ventura, Алтайская 50	2
25. (* (+) Зерновка: окрашивание фенолом	92 VS	отсутствует или очень слабое	Зерноградка 10		1
		слабое	Омская 5, Soissons, Скифянка	Памяти Азиева	3
		среднее	Orestis, Иркутская, Эхо	Prinqual, Мис, Омская 26	5
		темное	Slejpner, Инна, Престиж	Курская 2038, Rock, Терция	7
		очень темное	Sideral, Поволжская 86	Иволга, Ventura, Новосибирская 15	9
26. (* (+) Тип развития	- VG	озимый	Slejpner, Инна, Дон 95		1
		двуручка	Fidel, Русса		2
		яровой		Nandu, Памяти Азиева	3

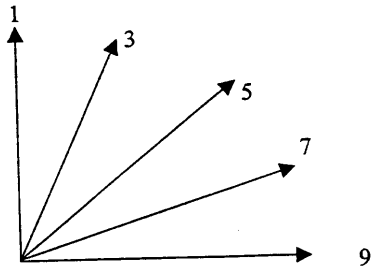
VIII. Объяснения и методы проведения учетов

К 1. Колеоптиле: антоциановая окраска

Метод определения антоциановой окраски:

Количество семян	20 семян для определения отличимости, 100 семян для определения однородности. Семена не должны быть обработаны химическими препаратами
Подготовка семян	семена, прошедшие период покоя, помещают на влажную фильтровальную бумагу, в чашку Петри и закрывают крышкой
Место проведения анализа	лаборатория или теплица
Освещение	выдерживают в темноте до появления колеоптиле длиной 1 см, затем 3-4 суток при освещении 15000 люкс (лампы дневного света)
Температура	15-20 °С
Время определения	колеоптиле полностью развился (около недели) в стадии 09-11
Шкала измерений	смотри признак 1
Примечание	при оценке отличимости как контроль используют не менее двух сортов-эталонов

К 2. Растение: тип куста



- 1 – прямостоячий
- 3 – полупрямостоячий
- 5 – промежуточный
- 7 – полустелющийся
- 9 – стелющийся

Тип куста оценивают визуально по расположению листьев и побегов. Используют угол, образованный между внешними листьями и побегами с воображаемой вертикальной осью.

К 4. Растение: количество растений с наклонённым флаговым листом

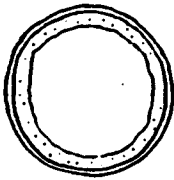
- 1. Все флаговые листья прямолинейные
- 3. Около 1/4 растений с наклоненными флаговыми листьями
- 5. Около 1/2 растений с наклоненными флаговыми листьями
- 7. Около 3/4 растений с наклоненными флаговыми листьями
- 9. Все растения с наклоненными флаговыми листьями

К 6. Флаговый лист: восковой налет на влагалище

Оценивают наибольшее состояние выраженности признака.

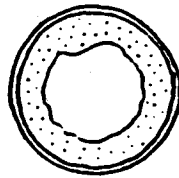
К 10. Соломина: выполненность в поперечном сечении (в середине между основанием колоса и верхним стеблевым узлом)

Все соломины растения должны быть просмотрены и отмечают наибольшую степень выраженности признака каждого растения.



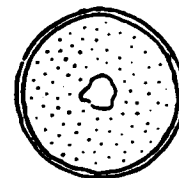
3

полая или выполнена слабо



5

выполнена средне



7

выполнена полностью

К 11. Колос: форма в профиль



1
пирамидаль-
ный



2
цилиндриче-
ский



3
полубулаво-
видный



4
булавовид-
ный



5
веретеновид-
ный

К 12. Колос: плотность

Плотность может быть оценена визуально или как отношение числа колосков к длине колоса.

К 14. Ости или остевидные отростки: наличие



1
отсутствуют



2
остевидные отростки



3
ости

К 17. Верхушечный сегмент оси колоса: опушение с выпуклой стороны



1
отсутствует или
очень слабое



3
слабое



5
среднее

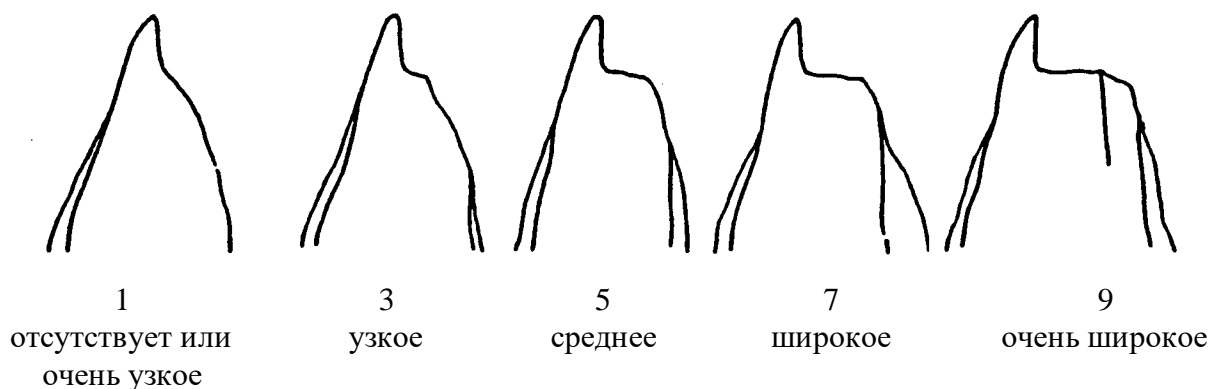


7
сильное



9
очень
сильное

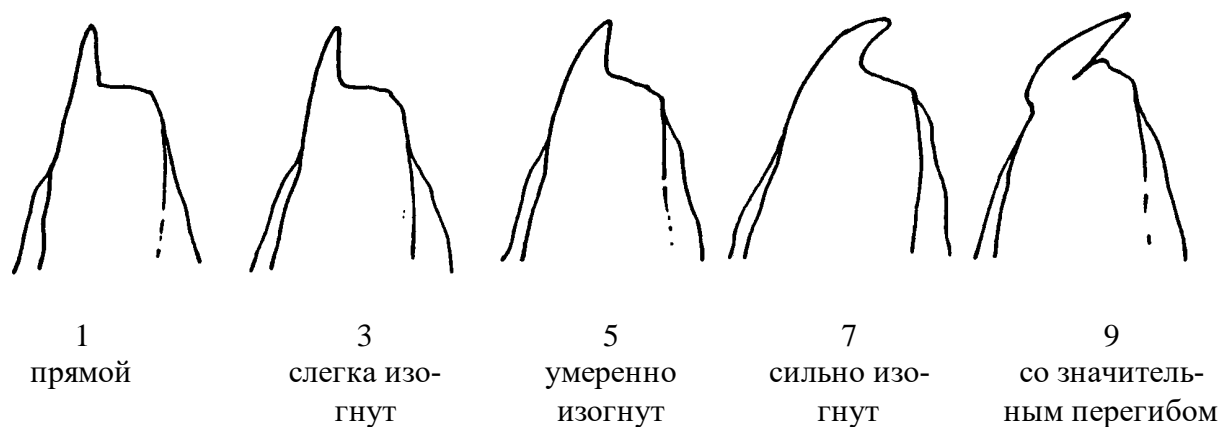
К 18. Нижняя колосковая чешуя: ширина плеча (в средней трети колоса)



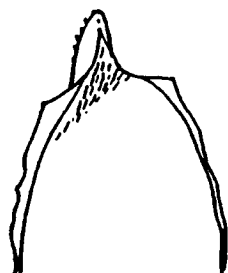
К 19. Нижняя колосковая чешуя: форма плеча (в средней трети колоса)



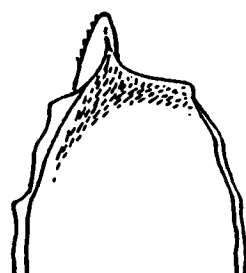
К 21. Нижняя колосковая чешуя: форма зубца (в средней трети колоса)



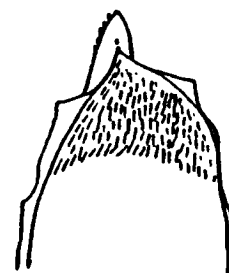
К 22. Нижняя колосковая чешуя: опушение внутренней стороны (в средней трети колоса)



3
слабое



5
среднее



7
сильное

К 23. Нижняя цветковая чешуя: форма зубца (в средней трети колоса)



1
прямой



3
слегка изогнут



5
умеренно изогнут



7
сильно изогнут



9
со значительным перегибом

К 25. Зерновка: окрашивание фенолом

Метод определения окрашивания фенолом

Количество семян, необходимых для исследований	20 семян для определения отличимости, 100 семян для определения однородности. Семена не должны быть обработаны химическими препаратами
Подготовка семян	замочить в воде на 16-20 ч, воду слить, семена подсушить, поместить в чашки бороздкой вниз, чашки закрыть крышкой
Концентрация раствора	1%-ный раствор фенола (свежеприготовленный)
Количество раствора	семена должны быть на 3/4 погружены в раствор
Место исследования	лаборатория
Освещение	дневной свет без прямых солнечных лучей
Температура	18 - 20 °С
Время исследования	через 4 часа (после погружения в раствор)
Определение степени окрашивания	см. признак 25 в таблице признаков
Примечание	необходимо включать в качестве контроля не менее двух сортов-эталонов

К 26. Тип развития

Изучают при весеннем посеве семян из 50 колосьев. Обязательно высевают эталонные сорта. Наблюдения проводят в стадии полной спелости самых позднеспелых яровых сортов (стадия 91/92). Если к этому времени изучаемый сорт достигнет максимум стадии соответственно коду 45, то тип развития определяют как озимый, если стадии с кодом от 75 до 90, то двуручка, яровые в стадии превышающей код 90.

IX. Литература

- Bezar, H.J., Hadfield, P.D., 1982: "Identification of New Zealand Wheat Cultivars." Crop Research Division, D.S.I.R. Christchurch, NZ, 39 pp.
- Briggles, L.W., Reitz, L.P., 1963: "Classification of Triticum Species and of Wheat Varieties Grown in the United States." United States Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 1278, US, 125 pp.
- Bustarret, J., 1944: "Varietes et variations." Annales agronomiques, 14eme annee, 336, 365, FR
- De Backer, A., 1983: "L'homogeneite des varietes de Ble." Memoire de fin d'etudes, 122e promotion Beauvais, 108 pp, FR
- Dhome, D., 1985: "Les cultivars de ble (triticum Spp) et leur identification." Memoire pour l'obtention du titre d'Ingenieur D.P.E., Ecole Nationale Superieure Agronomique de Toulouse, 124 pp, FR
- Feins, G.K. et al, 1975: "Australian Wheat Varieties." CSIR Wheat Research Unit, North Rye, New South Wales, AU
- Herve-Murray, C.G., 1980: "The identification of cereals varieties," Cambridge University Press, 187 p., GB
- Jonard, P., 1951: "Les bles tendres (triticum vulgare vill) cultives en France." Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 491 pp, FR
- Milatz, R., 1970: "Kriterien der Getreidearten einschliesslich Mais und ihre Bewertung zur Sortenidentifizierung", Verband Deutscher Pflanzenzuechter, Bonn, 236 pp, DE
- Payne, P.I., Lawrence, G.J., 1983: "Catalogue of Alleles for the Complex Gene Loci, Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1, Which Code for High Molecular Weight Subunits of Glutenin in Hexaploid Wheat. Cereal Research Communications 11, p. 29-35.
- Payne, P.I., 1987: "Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality." Annual Review of Plant Physiology 38, p. 141-153.
- Percival, J., 1921: "The Wheat Plant," monograph, London, Duckworth and Co., 463 pp, GB

Приложение 1

КОД СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР*

Код	Основные фазы развития	Дополнительное примечание для пшеницы, ячменя, ржи, овса, риса
<u>Прорастание</u>		
00	сухие семена	
01	начало набухания (семена нормальной величины, но влажные)	
03	полное набухание (семена разбухшие, но не проросшие)	
05	появление корешков у зерновки	

* Воспроизведено с Eucarpia Bulletin №.7, 1974, стр. 49-52, с разрешения авторов.

Код	Основные фазы развития	Дополнительное примечание для пшеницы, ячменя, ржи, овса, риса
07	появление coleoptiles из зерновки	
09	лист появляется в кончике coleoptiles	
	<u>Всходы</u>	
10	появление первого листа из coleoptiles	
11	развертывание первого листа (1)	второй лист виден (менее 1 см)
12	развертывание 2 листа	} 50% листовых пластинок развернуто
13	развертывание 3 листа	
14	развертывание 4 листа	
15	развертывание 5 листа	
16	развертывание 6 листа	
17	развертывание 7 листа	
18	развертывание 8 листа	
19	развертывание 9 или более листьев	
	<u>Кущение</u>	
20	только главный стебель	} показатели используются дополнительно к показателям таблицы: параллельные коды
21	главный стебель и 1 боковой	
22	главный стебель и 2 боковых	
23	главный стебель и 3 боковых	
24	главный стебель и 4 боковых	
25	главный стебель и 5 боковых	
26	главный стебель и 6 боковых	
27	главный стебель и 7 боковых	
28	главный стебель и 8 боковых	
29	главный стебель и 9 или более боковых	
	<u>Рост стебля</u>	
30	выпрямление псевдостебля (2)	} рис: вегетативная лаг фаза одновременные стадии
31	образование 1 узла	
32	образование 2 узла	
33	образование 3 узла	
34	образование 4 узла	
35	образование 5 узла	
36	образование 6 узла	
37	появление флагового листа	} узлы выше розетки
38	-	
39	видны язычок и ворончик флагового листа	стадия перед выходом в трубку
	<u>Выход в трубку</u>	
40	-	небольшое утолщение соцветия, ранняя стадия выхода в трубку
41	вытягивание влагалища флагового листа	
42	-	
43	трубка имеет слабовидимое утолщение	середина стадии выхода в трубку
44	-	
45	трубка утолщена	поздняя стадия выхода в трубку
46	-	

Код	Основные фазы развития	Дополнительное примечание для пшеницы, ячменя, ржи, овса, риса
47	влагалище флагового листа раскрыто	
48	-	
49	появление остей	только у остистых форм
<u>Колошение</u>		
50]	появление кончика соцветия	{ N
51]		{ S
52]	появление 1/2 соцветия	{ N N - перекрестники
53]		{ S S – самоопылители
54]	появление 1/4 соцветия	{ N
55]		{ S
56]	появление 2/3 соцветия	{ N
57]		{ S
58]	полное появление соцветий	{ N
59]		{ S
<u>Цветение</u>		
60]	начало цветения	{ N трудно определить у
61]		{ S ячменя; у риса: обычно
62	-	начинается сразу после
63	-	выметывания
64]	середина цветения	{ N
65]		{ S
66	-	
67	-	
68]	конец цветения	{ N
69]		{ S
<u>Молочная спелость</u>		
70	-	
71	водянистое состояние	
73	ранняя стадия молочной спелости	
75	середина молочной спелости	} затвердевание заметно, если раздавить зерновку между пальцами
76	-	
77	конец молочной спелости	
78	-	
79	-	
<u>Восковая спелость</u>		
80	-	
83	ранняя восковая спелость	
84	-	не остается следа после
85	мягкая восковая спелость	надавливания ногтем
87	твердая восковая спелость	след остается
88	-	хлорофилл пропадает
<u>Полная спелость</u>		
90	-	рис: созрели верхушечные колоски
91	зерно твердое (трудно режется ногтем) (3)	рис: 50% колосков созрело
92	зерно твердое (трудно режется ногтем) (4)	рис: более 90% колосков созрело (5)

Код	Основные фазы развития	Дополнительное примечание для пшеницы, ячменя, ржи, овса, риса
93	зерновки свободны в дневное время	риск потерь зерна от осыпания
94	сверхспелость, солома стареет и разрушается	
95	семена находятся в состоянии покоя	
96	жизнеспособные семена дают 50% всхожест	
97	семена не в состоянии покоя	
98	наступление вторичного покоя	
99	окончание вторичного покоя	
	<u>Пересака и приживание (только для риса)</u>	
T1	выдергивание сеянцев	
T2	-	
T3	укоренение	
T4	-	
T5	-	
T6	-	
T7	восстановление стебля	
T8	-	
T9	возобновление вегетативного роста	

Пояснения к таблице

- (1) Стадии инокуляции проростка ржавчиной в теплице
- (2) Применяется только к зерновым со стелющимся или полустелющимся типом роста на ранних стадиях развития
- (3) Зрелость для двухфазной уборки (влажность 16%). Хлорофилл в соцветии в основном отсутствует.
- (4) Зрелость для уборки прямым комбинированием (влажность зерна менее 16%).
- (5) Оптимальное времени уборки.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ К МЕТОДИКЕ

Приложение содержит признаки, оцениваемые при использовании электрофореза и описания используемых методов. UPOV решил поместить эти признаки в приложении к методике, посредством этого создать специальную категорию признаков, т.к. большинство стран-членов UPOV имеет мнение, что не возможно основывать отличимость только на основе различий. Эти признаки должны использоваться только в дополнение к другим отличиям по морфологическим или физиологическим признакам. UPOV обращает внимание, что эти признаки считаются полезными, но они не могут сами по себе быть достаточными для установления отличимости. Они не должны использоваться в повседневной практике, а лишь при запросе или с согласия заявителя сорта.

Для анализа высокомолекулярных глютеинов должен быть применен полиакриламидный гель для электрофореза в присутствии натрий-додосульфата (SDS PAGE). Глютеины кодируются тремя сложными локусами, известными как Glu-A1, Glu -B1 и Glu -D1 на длинном плече хромосомы первой группы (Payne, 1987). В каждом локусе имеется ряд аллелей и анализ глютеинов основан на распознавании этих аллелей по белкам, которые появляются в геле серией различных полос или моделей полос. Аллели можно обозначить (по Payne и Lawrence, 1983, смотри часть IX, литературы) в данном определении номерами полос. Соответствующее обозначение и определяемый молекулярный вес имеются в описании применяемых методов.

Таблица

	Признак	Степень выраженности	Сорт-эталон	Индекс
27. (+)	Состав глютеина: выра- жение аллели в локусе Glu- A1	полоса 1	Kadett	1
		полоса 2	Courtot	2
		нет полосы	Talent	3
28. (+)	Состав глютеина: выра- жение аллели в локусе Glu- B1	полосы 6+8	Norman	1
		полосы 7+8	Courtot	2
		полосы 7+9	Kadett	3
		полосы 7 (или 7+9 в присутствии полос 5+10 признака 29)	Okapi	4
		полосы 13+16	Carala	5
		полосы 14+15	Troll	6
		полосы 17+18	Moulin	7
		полоса 20	Figaro	8
29. (+)	Состав глютеина: выра- жение аллели в локусе Glu- D1	полосы 2+12	Courtot	1
		полосы 3+12	Norman	2
		полосы 4+12	Talent	3
		полосы 5+10	Kadett	4

Описание к применяемым методам

Состав глютенина: выражение аллели в локусе Glu-A1 (27),
Glu-B1 (28) и Glu-D1 (29)

SDS-PAGE метод для анализа высокомолекулярных глутенинов в пшенице мягкой

1. Приборы и оборудование

Можно применять любую вертикальную систему электрофореза, обеспечивающую постоянную температуру геля. Рекомендуемая толщина слоя геля – не более 1,5 мм. Применяемые источники энергии должны поставлять не только постоянную силу тока, но и постоянное напряжение.

2. Реактивы

Все применяемые реактивы должны быть уровня "аналитическая чистота" или лучше.

Акриламид (специального качества для электрофореза)

Бисакриламид (специального качества для электрофореза)

Трис (гидроксиметил) метиламин (ТРИС)

Натрий додецилсульфат (SDS)

Аммоний персульфат (APS)

2-меркаптоэтанол

NNN'N'-тетраметилэтилендиамид (TEMED)

Трихлоруксусная кислота (ТХУ)

Соляная кислота

Уксусная кислота

Глицин

n-бутанол

Пиронин Y (или G)

Глицерин (d-1,256)

Метанол

Диметилформанид (DMF)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (или эквивалентный) (краситель)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (или эквивалентный) (краситель)

3. Растворы

3.1 Растворы для экстракции

3.1.1 Экстракция глутенинов

Основной раствор:

6,25 мл накопительного буфера (смотри 3.3.2)

12,05 мл дистиллированной воды

2 г SDS

10 мг пиронина Y (или G)

10 мл глицерина

Этот раствор можно хранить 2 месяца при 4 °С.

Раствор для экстракции готовят непосредственно перед применением.

5,25 мл основного раствора и 0,75 мл 2-меркаптоэтанола доводят дистиллированной водой до 10 мл. Этот раствор готовят непосредственно перед употреблением и не хранят.

3.1.2 Двухступенчатая экстракция глутенинов и глиадинов

Раствор А: 25 мл 2-хлорэтанола и 50 мг пиронина Y (или G) доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Раствор В: 27,0 г мочевины, 3,0 мл 2-меркаптоэтанола и 10,0 г SDS растворяют в дистиллированной воде и доводят ею до 100 мл.

3.2 Буфер для электрофореза

Основной раствор:

141,1 г глицина
30,0 г ТРИС
10,0 г SDS

растворяют в дистиллированной воде и доводят его до 1 л. Непосредственно перед применением основной раствор разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:10. Основной раствор можно хранить 2 месяца при комнатной температуре. Разбавленный буфер хранят не более недели. Значение pH буфера должно быть 8,3.

3.3 Раствор для приготовления геля

3.3.1 Буфер разделяющего геля (1 М TRIS-HCl, pH 8,8)

121,14 TRIS и примерно 20 мл HCl ($d = 1,19$) растворить в дистиллированной воде и довести его до 1 л. Этот буфер можно хранить 2 месяца при 4 °C.

3.3.2 Буфер накопительного геля (1 М TRIS-HCl, pH 6,8)

121,14 TRIS и примерно 78 мл HCl ($d = 1,19$) растворить в дистиллированной воде и довести его до 1 л. Этот буфер можно хранить 2 месяца при 4 °C.

3.3.3 10% (w/v) SDS раствор

10 г SDS растворяют в дистиллированной воде и доводят до 100 мл. Этот раствор можно хранить 2 месяца при 4 °C. Перед применением раствор в данном случае осторожно перемешать и подогреть, чтобы SDS растворить снова.

3.3.4 1% (w/v) раствор аммония персульфата

1 г аммония персульфата растворить в дистиллированной воде и довести его до 10 мл. Этот раствор готовят непосредственно перед применением.

3.3.5 Основной раствор акриламида

40,02 г акриламида растворяют в дистиллированной воде и доводят его до 100 мл.

3.3.6 Основной раствор бисакриламида

0,5198 г бисакриламида растворяют в дистиллированной воде и доводят его до 130 мл.

3.4 Окрашивающие растворы

3.4.1 0,25 г Coomassie Brilliant Blue G-250 и 0,75 г Coomassie Brilliant Blue R-250 растворяют в дистиллированной воде и доводят до 100 мл.

3.4.2 55 г трихлоруксусной кислоты, 65 мл уксусной кислоты, 180 мл метанола и 25 мл раствора 3.4.1 доводят до 1 л дистиллированной водой.

4. Метод

4.1 Экстракция белков

Отдельные семена перед проведением экстракции разбивают молотком. Растолченные семена суспендируют в растворе для экстракции (3.1) в трехмиллилитровых трубочках для гемолиза из пропилена или подобного материала с винтовым запором. Соотношение семена/раствор для экстракции – 50 мг/0,75 мл. Пробы экстрагируют при комнатной температуре 2 часа, несколько раз встряхивают на миксере Vortex и затем нагревают на кипящей водяной бане. После этого пробы охлаждают и центрифугируют их при 18000 g в течение 5 минут.

4.1.2 Двухступенчатая экстракция глютеинов и глиадинов

Глютеины и глиадины можно анализировать на одной и той же пробе семян. Сначала экстрагируют глиадины из расчета 0,25 мл раствора А (3.1.2) на раздробленное зерно (или половину зерна) в микротитровальных пластинках или в пробирках для микроцентрифуги и инкубируют целую ночь при комнатной температуре. После этого экстрагируют глютеины, добавляют 0,5 мл раствора В (3.1.2) и инкубируют следующую ночь при комнатной температуре.

В зависимости от толщины геля и размера кармана геля можно менять объем полученного экстракта. Обычно достаточно от 10 до 25 μ л.

4.2 Подготовка геля

Собирают чистые и охлажденные кассеты в соответствии с руководством по применению оборудования. Для запечатывания кассет применяют клеящие полосы; как советуют, кас-

сету, по меньшей мере, составлять за один день до применения, т. к. клеящая полоса «стареет» и лучше склеивает.

4.2.1 Разделяющий гель (10% акриламид, рН 8,8)

Чтобы приготовить два геля формата 180x160x1,5 мм нужно приготовить следующую смесь:

20 мл основного раствора акриламида (3.3.5)

26 мл основного раствора бисакриламида (3.3.6)

30 мл буфера разделительного геля (3.3.1)

Температура должна быть 4 °С. Из смеси удаляют газ в течение 10 минут в 100 мл колбе Бюхнера. Потом добавляют:

2 мл раствора аммония персульфата (3.3.4)

0,8 мл раствора SDS (3.3.3)

40 μ л TEMED.

Затем гель осторожно разливают, стараясь избежать образования воздушных пузырьков, и полимеризацию проводят при комнатной температуре.

Кассеты наполняют гелем не полностью, чтобы оставить еще место (3-4 см) для накопительного геля. Потом осторожно наносят на середину поверхности геля n-бутанол (или дистиллированную воду). Если полимеризация закончена (примерно через 30 минут), поверхность геля осторожно споласкивают дистиллированной водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

4.2.2 Накопительный гель (7% акриламид, рН 8,8)

Чтобы растворить субъединицы 2 и 2*, надо использовать разделяющий гель с концентрацией 7%.

Для изготовления двух гелей формата 180x160x1,5 мм нужно приготовить следующую смесь:

14 мл основного раствора акриламида (3.3.5)

6 мл дистиллированной воды

26 мл основного раствора бисакриламида (3.3.6)

30 мл буфера накопительного геля (3.3.1).

Поддерживать температуру 4 °С. Из смеси удаляют пузыри газа в течение 10 минут в колбе Бюхнера. Потом добавить:

2 мл раствора аммония персульфата (3.3.4)

0,8 мл раствора SDS (3.3.3)

40 μ л TEMED.

Затем гель осторожно разливают, стараясь избежать образования воздушных пузырьков, и полимеризацию проводят при комнатной температуре.

Кассеты наполняют гелем не полностью, чтобы оставить еще место (3-4 см) для накопительного геля. Потом осторожно наносят на середину поверхности геля n-бутанол (или дистиллированную воду). Если полимеризация закончена (примерно через 30 минут), поверхность геля осторожно споласкивают дистиллированной водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

4.2.3 Накопительный гель (3,5% акриламид, рН 6,8)

В 50-и миллилитровой колбе Бюхнера перемешать:

1,5 мл основного раствора акриламида (3.3.5)

2,15 мл основного раствора бисакриламида (3.3.6)

2,5 мл буфера накопительного геля (3.3.2) и

13,5 мл дистиллированной воды.

Затем удаляют газ и добавляют:

0,75 мл раствора аммония персульфата (3.3.4)

0,2 мл раствора SDS (3.3.3)

15 μ л TEMED

Смесь осторожно и немедленно наливают на разделяющий гель. Поместите хорошо формирующуюся «гребенку», избегая образования воздушных пузырьков. Полимеризация при комнатной температуре 2 часа. Затем удаляют «гребни» из гелевых кассет и хорошо ополаскивают гелевые сумки (карманы) буфером для электрофореза (3.2)

4.3 Электрофорез

Резервуар заполняют соответствующим объемом охлажденного до 15 °С буфером для электрофореза. Экстрактом белков (4.1 или 4.2) заполняют гелевые сумки (карманы) и проводят электрофорез при постоянном токе 8 мА/см² гелевого профиля. Когда маркер пиронин Y/G перейдет в накопительный гель, силу тока увеличивают до 16 мА/см² гелевого профиля (максимум до 300 V). Поддерживают температуру 15 °С. По достижении маркером пиронином Y/G dna геля электрофорез останавливают.

4.4 Фиксация и окраска

Кассеты достают из камер электрофореза и открывают. Гель фиксируют в 250 мл 15% (w/v) трихлоруксусной кислоте 30 минут. Гель ополаскивают дистиллированной водой и окрашивают при комнатной температуре раствором красителя 250 мл всю ночь. Нет необходимости в обесцвечивании. Прежде чем положить на хранение в запечатанном полиэтиленовом мешке гель промывают в дистиллированной воде.

Для окрашивания применяют и другие красители (например, Coomassie Brilliant Blue G-250 или подобный, только растворенный в трихлоруксусной кислоте). Критерий для качественного окончательного контроля не только подготовки геля, но и окраски геля должен состоять в том, чтобы испытать соответствующие образцы эталонных сортов в каждой партии гелей. Разделение полученных полос и их относительная электрофоретическая подвижность (молекулярный вес) должны быть отчетливо ясны, чтобы можно было удовлетворительно обсудить результаты.

Распознавание глютениновых аллелей

Эти таблицы предназначены иллюстрировать выше описанные аллели и содействовать распознаванию различных полос. Они изображены позициями и молекулярным весом всех полос глютенинов для каждого локуса в сравнении с которыми дан пример сорта Courtot а также номера полос для применения перечня Рауне, в которой каждые аллели обозначенные Рауне и Lawrence (1983) можно разделить.

Субъединицы высокомолекулярных глютенинов: перечень отдельных полос и распознавание соответствующих аллелей

Признак 27: локус Glu-A1

	сорт-эталон (Courtot)	Индекс		
		1 (a)	2 (b)	3 (c)
1 (113)---		1---		
2/2* (108)---	2/2*---	2*---	n (no band)	
3 (107)---				
4 (106)---				
5 (105)---				
6 (100)---				
6.1 (99)---				
7 (98)---	7 ---			
13/14/ (94)---				
20				
15 (91)---				
16/ (90)---				
17/18 89.5)				
22 (87)---				
8 (86)---	8 ---			
9/10 (83)---				
12 (80)---	12 ---			

Признак 28: локус Glu-B1

	сорт-эталон (Courtot)			Индекс				
	1 2 (d)	3 (b)	4 (c)	5 (a)	6 (f)	7 (h)	8 (i)	9 (e)
1 (113)---								
2/2* (108)---	2/2*---							
3 (107)---								
4 (106)---								
5 (105)---								
6 (100)---		6---						
6.1 (99)---								6.1---
7 (98)---	7 ---	7---	7---					
13/14/ (94)---				13---14---		20---		
20								
15 (91)---					15---			
16/ (90)---				16---		17/18---		
17/18 89.5)								
22 (87)---								22---
8 (86)---	8 ---	8---	8---					
9/10 (83)---			9---					
12 (80)---	12 ---							

Признак 27: локус Glu-D1

	сорт-эталон (Courtot)	индекс			
		1 (a)	2 (b)	3 (c)	4 (d)
1 (113)---					
2/2* (108)---	2/2*---	2---			
3 (107)---			3---		
4 (106)---				4---	
5 (105)---					5---
6 (100)---					
6.1 (99)---					
7 (98)---	7 ---				
13/14/ (94)---					
20					
15 (91)---					
16/ (90)---					
17/18 89.5)					
22 (87)---					
8 (86)---	8 ---				
9/10 (83)---					10---
12 (80)---	12 ---	12---	12---	12---	

Примечание: определенные полосы (например, 9 и 10) имеют одинаковый молекулярный вес. Это приводит к тому, что невозможно различить между собой две степени выраженности признака 28 в присутствии полосы 5+10 признака 29. Следовательно, в присутствии полосы 5+10 признака 29 может быть отпечаток 4 признака 28 или полоса 7+9. Остальные полосы, имеющие одинаковый молекулярный вес можно различить между собой по известным сочетаниям с другими полосами. Для признака 28 полоса 13 всегда связана с полосой 16 и полоса 14 с полосой 15, в то время как полоса 40 остается изолированной.