

RTG/80/2

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

В.В. Шмаль

30.10.2006 г. № 12-06/21

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ НА ОТЛИЧИМОСТЬ, ОДНОРОДНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ

СОЯ (*Glycine max* (L.) Merrill)*

I. Общие рекомендации

Настоящая методика испытаний применяется для всех сортов *Glycine max* (L.) Merrill. 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. Для испытания заявитель должен представить образец семян массой 2 кг.
2. Семена по посевным качествам должны соответствовать требованиям I класса ГОСТ.
3. Семена не должны быть обработаны ядохимикатами, если на то нет разрешения или требования Госкомиссии. Если растения были обработаны, то необходимо дать подробное описание обработки.
4. Заявитель, высылающий семена из другой страны, должен полностью соблюдать все таможенные правила.

III. Проведение испытаний

1. Полевые испытания проводят в условиях, обеспечивающих нормальное развитие растений, как правило, в одном месте, в течение двух сходных вегетационных периодов.
2. Если в данном месте оказывается невозможным наблюдать какие-либо важные признаки сорта, сорт может быть протестирован в дополнительном месте.
3. Размер делянок должен быть таким, чтобы растения или части растений могли быть отобраны для измерений и подсчетов без ущерба для наблюдений, которые должны производиться вплоть до конца вегетационного периода.

* Взамен RTG/80/1/. Вводится с 2007 года для новых сортов. Использован документ УПОВ TG/80/6 "GUIDELINES FOR THE CONDUCT OF TESTS FOR DISTINCTNESS, HOMOGENEITY AND STABILITY". Оригинал на английском языке от 01.04.98.

4. Каждое испытание должно включать не менее 300 растений, разделенных на два повторения. Отдельные делянки для наблюдений и измерений могут быть использованы лишь в случае, если они находятся в сходных климатических условиях.

5. Оцениваемый и похожий на него сорта размещают на смежных делянках. В опыте размещают и делянки эталонных сортов.

6. Для особых целей могут быть заложены дополнительные опыты.

IV. Методы и наблюдения

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

2. Для оценки однородности используют популяционный стандарт 0,5% при доверительной вероятности 95%. В случае образца, состоящего из 300 растений, максимально допустимое число нетипичных растений - 4.

3. Все наблюдения на листе и цветке должны быть проведены во время полного цветения.

V. Группирование сортов

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

Рекомендуется использовать для группировки следующие признаки:

- a) растение: окраска опушения главного стебля (в средней трети) (признак 5);
- b) цветок: окраска (признак 11);
- c) семена: окраска рубчика (признак 17);
- d) растение: время созревания (признак 20).

VI. Признаки и обозначения

Для оценки степени выраженности признаков отличимости, однородности и стабильности должны быть использованы признаки, приведенные в "Таблице признаков". Отметка (+) указывает на то, что описание признака сопровождается в методике объяснениями или иллюстрациями. 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 состояние выраженности признака или условия окружающей среды делают это невозможным.

Значениям выраженности признака приданы индексы (1 - 9) для электронной обработки результатов.

По некоторым значениям выраженности признака указаны эталонные сорта.

Оптимальное время проведения учета признака указано кодом стадий роста сои в третьей колонке. Шкала фенотипических стадий роста сои и соответствующий код приведены в конце раздела «Объяснения к таблице признаков».

VII. Таблица признаков

| Признак | Порядок учета | Степень выраженности | Сорт-эталон | Индекс |
|---|---------------|---|---|--------|
| 1. Гипокотиль: антоциановая окраска (*) | 10 | отсутствует | Chandor, Goldor, Быстрица 2, Светлая, Веста, СОЕР 6 | 1 |
| | | имеется | Alaric, Apache, Imari, Армавирская 2, Лань, Руно, СОЕР 4, СОЕР 5 | 9 |
| 2. Гипокотиль: интенсивность антоциановой окраски | 10 | очень слабая | Azzurra, Лада, Светлая, СОЕР 6 | 1 |
| | | слабая | Akashi, Candir, Соната, СИБНИИСХОЗ 6 | 3 |
| | | средняя | Canton, Kendo, Зерноградская 2, Гритиказ 80 | 5 |
| | | сильная | Agies, Visir, Армавирская 2, Астра, Лань, Руно, СОЕР 5 | 7 |
| | | очень сильная | СОЕР 4 | 9 |
| 3. Растение: тип развита (*) (+) | | детерминантный | Gnome, Spot, Fiskeby, СОЕР 5, СИБНИИСХОЗ 6, Фора | 1 |
| | | полудетерминантный | Alaric, Alba, Silvia, Paradis | 2 |
| | | от полудетерминантного до индетерминантного | Chandor, Kador | 3 |
| | | индетерминантный | Астра, Быстрица 2, Лада, Лань, Руно, СОЕР 6, Соната | 4 |
| 4. Растение: форма роста (+) | 66 | прямо стоячее | Руно, Гритиказ 80, Салтус | 1 |
| | | от прямо стоячего до полупрямо стоячего | Tirol, Queen, Essor, Labrador, Армавирская 2, Лада, Лань, Светлая, СОЕР 4, СОЕР 6 | 2 |
| | | полупрямо стоячее | Chandor, Apache, Paoki, Магева, Окская, Фора | 3 |
| | | от полупрямо стоячего до горизонтального | Alaric, Major, Sapporo, Селекта 301 | 4 |
| | | горизонтальное | | 5 |
| 5. Растение: окраска опушения главного стебля (в средней трети) (*) | 65-85 | серая | Apache, Alaric, Talon, Imari, Лань, Светлая, СОЕР 6, Руно | 1 |
| | | рыжевато-коричневая | Maple Glen, Chandor, Paoki, Agata, Армавирская 2, Астра, СОЕР 4, Быстрица 2, СОЕР 5, Соната | 2 |
| 6. Растение: высота (*) | 85 | низкое | Carla, Paradis, Spot, СОЕР 5, СИБНИИСХОЗ 6 | 3 |
| | | от низкого до среднего | Trump, Essor, Лада, Армавирская 2 | 4 |
| | | средней высоты | Alaric, Chandor, Руно, СОЕР 4, Соната, Зерноградская 2 | 5 |
| | | от среднего до высокого | Kador, Быстрица 2, Астра, Лань, Магева | 6 |
| | | высокое | Tirol, Toreador, Лиана, Трембита | 7 |
| 7. Лист: пузырчатый | 65 | отсутствует или очень | Bayou, Arpege, Chandor | 1 |

| Признак | По- рядок учета | Степень выраженности | Сорт-эталон | Ин- декс |
|---|-----------------------|-----------------------|--|-------------|
| тость | | слабая | Kador, Quito | 3 |
| | | слабая | Paoki, Imari | 5 |
| | | средняя | Matador | 7 |
| | | сильная | | 9 |
| | | очень сильная | | |
| 8. Лист: форма бокового листочка (*) (+) (сложного листа) | 65 | ланцетовидная | Toreador, Dumas, Tresor, Гармония, Ария, Ланцетная | 1 |
| | | треугольная | Contessa | 2 |
| | | заостренно-яйцевидная | Kador, Major, Apache, Talon, Соната, Лань, СОЕР 4 | 3 |
| | | округло-яйцевидная | Paoki, Agata, Chandor, Приморская 81 | 4 |
| 9. Лист: размер бокового листочка | 65 | маленький | Trump, Labrador, Baron, Arcade, Касатка, Кинелянка, Лидия | 3 |
| | | среднего размера | Alaric, Kushiro, Talon, Быстрица 2, Светлая, Соната, Лада, Лань, Руно, СОЕР 4, СОЕР 5 | 5 |
| | | большой | Williams, Армавирская 2, Магева, Лакта | 7 |
| 10. Лист: интенсивность зеленой окраски | 65 | светлая | Chandor, Arcade, Junior, Светлая, Гритиказ 80, Ланцетная | 3 |
| | | средняя | Alaric, Apache, Imari, Армавирская 2, Быстрица 2, Вега, Соната, СОЕР 4, СОЕР 5 | 5 |
| | | темная | Spot, Cresir, Jedor, Ardir, Астра, Руно, СОЕР 6 | 7 |
| 11. Цветок: окраска (*) | 66 | белый | Chandor, Cresir, Toreador, Ария, Быстрица 2, Лада, СОЕР 6, Дуар | 1 |
| | | фиолетовый | Fransoy 242, Imari, Apache, Queen, Армавирская 2, Магева, Соната, Касатка | 2 |
| 12. Боб: интенсивность коричневой окраски | 85 | светлая | Chandor, Contessa, Alba, Arcade Alaric, Apache, Fuji, Paoki, Лада, СОЕР 6, Соната, Селекта 301 | 3 |
| | | средняя | Армавирская 2, Быстрица 2, Светлая, СОЕР 5 | 5 |
| | | темная | Toreador, Tirol, Royal, Астра | 7 |
| 13. Семена: размер | 89 | мелкие | Alba, Aurelia, Flusk GT 512, Руно, Светлая | 3 |
| | | среднего размера | Queen, Goldor, Армавирская 2, Быстрица 2, Лада, Магева, СОЕР 5, Соната | 5 |
| | | крупные | Sledor, Cervin, Mondor, Фора, Лакта | 7 |
| 14. Семена: форма | 89 | шаровидные | Paoki, Valkir, Niva, Приморская 81, Салтус | 1 |

| Признак | По- рядок учета | Степень выраженности | Сорт-эталон | Ин- декс |
|--|-----------------------|----------------------------------|--|-------------|
| | | шаровидно-приплюснутые | Queen, Sapporo, Cledor, Армавир- ская 2, Гритиказ 80, Светлая, СОЕР 6, Соната | 2 |
| | | удлиненные | Soleo, Talon, Excel, Recor, Астра, Быстрица 2, Лада, СОЕР 4, Фора | 3 |
| | | удлиненно-приплюснутые | Лидия | 4 |
| | | округло-удлиненные | Руно, Касатка | 5 |
| 15. Семена: основная (*) окраска семенной кожуры (исключая рубчик) | 89 | желтая | Queen, Paoki, Астра, Быстрица 2, Лада, Руно, СОЕР 4, СОЕР 5, Со- ната | 1 |
| | | желто-зеленая | Армавирская 2, Гритиказ 80, Зер- ноградская 2 | 2 |
| | | зеленая | | 3 |
| | | светло-коричневая | | 4 |
| | | коричневая | | 5 |
| | | темно-коричневая | | 6 |
| | | черная | | 7 |
| 16. Семена: окрашива- (+) ние, вызванное ре- акцией пероксида- зы в семенной ко- журе | 89 | отсутствует | Bragg | 1 |
| | | имеется | Hood, Hood 75 | 2 |
| 17. Семена: окраска (*) рубчика | 89 | серый | Spot, Major, Apache, Руно | 1 |
| | | желтый | Maple Arrow, Imari, Talon, Лада, Магева, СОЕР 4, Соната | 2 |
| | | светло-коричневый | Kingsoy, Argenta, Baron, Opale, Армавирская 2, Быстрица 2, Зер- ноградская 2, Лань, Светлая, СОЕР 5, СОЕР 6 | 3 |
| | | темно-коричневый | Fransoy 242, Aurelia, Leman, Астра Wells, Kador, Folio, | 4 |
| | | почти черный | Chandor, Queen, Paoki, Гритиказ | 5 |
| | | черный | 80, Лиана | 6 |
| 18. Семена: окраска семяножки рубчи- ка | 89 | как у семенной кожуры | Queen | 1 |
| | | другая | Gieso | 2 |
| 19. Растение: время (*) начала цветения (50% растений не менее чем с одним | | очень раннее | Sito, Trump, Carla, Paradis, СОЕР 5, СИБНИИСХОЗ 6, Касатка | 1 |
| | | от очень раннего до ран- него | Labrador, Essor, Arcade, Армавир- ская 2, Лада, Светлая, СОЕР 4 | 2 |

| Признак | По- рядок учета | Степень выраженности | Сорт-эталон | Ин- декс |
|--|-----------------------|-------------------------------|---|-------------|
| открытым цвет- ком) | | раннее | Canton, Queen, Imari, Быстрица 2, Вега, Магева, Руно, СОЕР 6, Соната | 3 |
| | | от раннего до среднего | Kador, Alaric, Niva, Лань, Астра, Окская, Дива | 4 |
| | | среднее | Williams, Брянская 11, Трембита | 5 |
| | | от среднего до позднего | Лиана, Приморская 81 | 6 |
| | | позднее | | 7 |
| | | от позднего до очень позднего | | 8 |
| | | очень позднее | | 9 |
| 20. Растение: время (*) созревания | 89 | очень раннее | Trump, Soleo, Kola, Carla, Paradis, СИБНИИСХОЗ 6 | 1 |
| | | от очень раннего до раннего | Chandor, Apache, Labrador, Быстрица 2, Руно, Светлая, СОЕР 4, Касатка | 2 |
| | | раннее | Canton, Queen, Paoki, Aurelia, Астра, Черноградская 2, Лада, Лань, Магева, СОЕР 5, СОЕР 6, Соната | 3 |
| | | от раннего до среднего | Kador, Kingsoy, Alaric, Niva, Армавирская 2, Окская | 4 |
| | | среднее | Williams, Дуар, Лакта | 5 |
| | | от среднего до позднего | Лиана, Приморская 81, Трембита | 6 |
| | | позднее | | 7 |
| | | от позднего до очень позднего | | 8 |
| | | очень позднее | | 9 |

VIII. Объяснения и методы проведения учетов

К 3. Растение: тип развития

Закладка опытов: Данный признак оценивают преимущественно в особом испытании с 3 - 4-мя повторениями по 20-ть растений в каждом с расстоянием в рядке между растениями приблизительно 9 см. Не учитывают любой краевой эффект.

Растительный материал: Заявленный сорт и сорта-эталон выращивают рядом в соответствии с их группой спелости (признак 20).

Наблюдение: В начале цветения (1 цветок на любом уровне главного стебля) верхушка растения должна быть помечена.

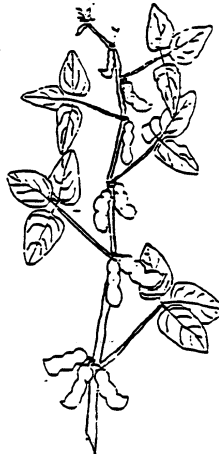
По достижении спелости (свободные зерна в стручке) подсчитывают количество узлов между отметкой и верхушкой растения. Средняя величина по сорту определяет, в сравнении со стандартными сортами, степень выраженности данного признака.

Дополнительно может быть также рассмотрен признак «Размер примордиального листа», для того чтобы определить более точно степень выраженности «детерминантный» (индекс 1) от других степеней. Примордиальный лист на главном стебле детерминантных сортов более или менее эквивалентен другим листьям на нижних уровнях. Для других типов примордиальный лист заметно мельче.



1

детерминантный



4

индетерминантный

К 4. Растение: форма роста



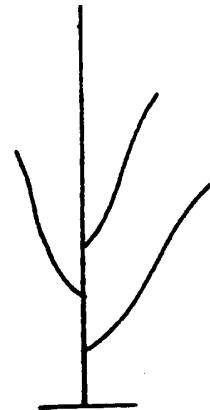
1

прямо стоячее



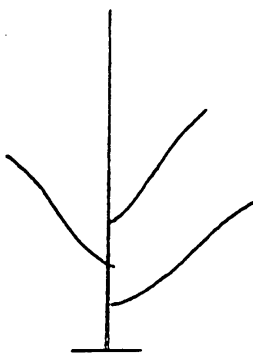
2

от прямо стоячего до
полу прямо стоячего



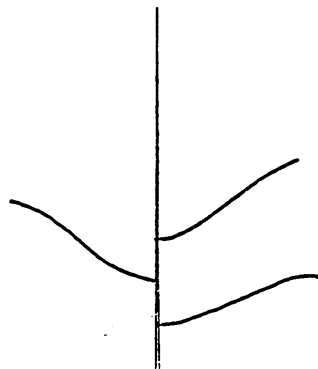
3

полу прямо стоячее



4

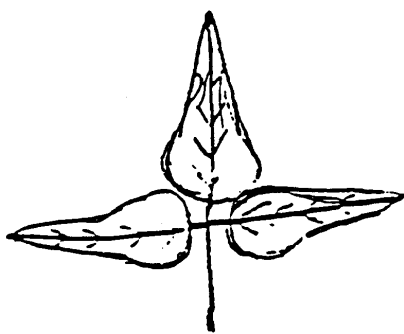
от полу прямо стоячего до
горизонтального



5

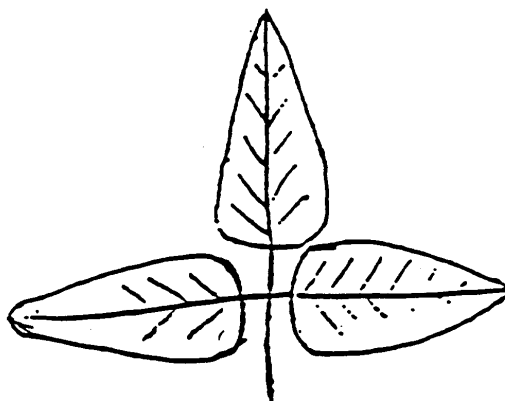
горизонтальное

К 8. Лист: форма бокового листочка



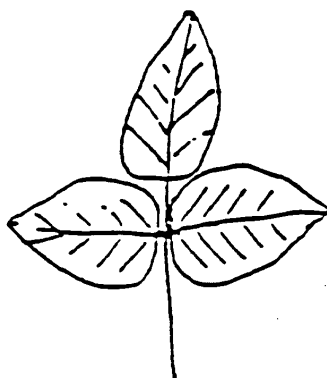
1

ланцетовидная



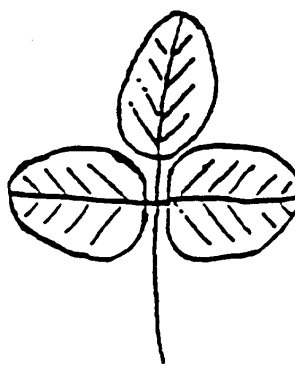
2

треугольная



3

заостренно-яйцевидная



4

округло-яйцевидная

К 16. Семена: окрашивание, вызванное реакцией пероксидазы в семенной кожуре

По каждому сорту должно быть испытано 20 семян.

Следует осторожно удалить семенную кожуру с семени, так чтобы не осталось ни кусочка семядоли. Для облегчения данной процедуры семя следует поместить на 2 часа в воду.

Семенную кожуру следует поместить в ячеистую емкость или в пробирки (одна пробирка на семя) и добавить 3-4 см³ 0,5%-ного раствора гваякола. Этот раствор хранят в холодильнике не более 2-х месяцев. Если оставить его при комнатной температуре на день или более, он станет непригодным для использования.

Спустя 10 мин следует добавить 0,1%-ный раствор H₂O₂, который изменит цвет на темно-красный/коричневый при положительной реакции или останется бесцветным при отрицательной реакции. Для проверки 0,5%-ного раствора гваякола рекомендуют включить немного семян эталонного сорта с положительной реакцией. Регистрацию реакции проводят в течение 60-ти сек после добавления H₂O₂. Наблюдение не должно длиться дольше 60-ти сек, потому что в противном случае оно приводит к искаженным результатам.

Ячеистую емкость или пробирки осторожно встряхивают для усиления реакции. Для лучшей регистрации наблюдения ячеистую емкость или пробирки помещают на белый фон.

Шкала фенологических стадий роста и ВВСН-идентификационные показатели сои*.

| КОД 2 и 3 цифры | ОПИСАНИЕ |
|--------------------|----------|
|--------------------|----------|

Основная стадия роста 0: Прорастание

| | | |
|----|-----|--|
| 00 | 000 | Сухое семя |
| 01 | 001 | Начало набухания семян |
| 02 | 002 | - |
| 03 | 003 | Набухание семян завершилось |
| 04 | 004 | - |
| 05 | 005 | Появление корешка из семени |
| 06 | 006 | Удлинение корешка; формирование корневых волосков |
| 07 | 007 | Сквозь семенную оболочку прорезывается гипокотиль с семядолями |
| 08 | 008 | Гипокотиль достигает поверхности почвы; виден гипокотильный свод |
| 09 | 009 | Появление всходов: гипокотиль с семядолями появляется над поверхностью почвы («стадия растрескивания») |

Основная стадия роста 1: Развитие листы (Главный побег)

| | | |
|----|-----|---|
| 10 | 100 | Семядоли полностью распустились |
| 11 | 101 | Распустилась первая пара настоящих листьев (односложные листья на первом узле) |
| 12 | 102 | Распустились трехсложные листья на 2-ом узле |
| 13 | 103 | Распустились трехсложные листья на 3-м узле |
| 1 | 10 | Состояние длится до ... |
| 19 | 109 | Распустились трехсложные листья на 9-м узле. Боковые побеги не видны ¹ . |
| - | 110 | Распустились трехсложные листья на 10-м узле ¹ |
| - | 111 | Распустились трехсложные листья на 11-м узле ¹ |
| - | 112 | Распустились трехсложные листья на 12-м узле ¹ |
| - | 113 | Распустились трехсложные листья на 13-м узле ¹ |
| - | 11 | Состояние длится до ... |
| - | 119 | Распустились трехсложные листья на 19-м узле ¹ |

Основная стадия роста 2: Формирование боковых побегов

| | | |
|----|-----|--|
| 20 | 200 | - |
| 21 | 201 | Виден первый боковой побег |
| 22 | 202 | Виден второй боковой побег первого порядка |
| 23 | 203 | Виден третий боковой побег первого порядка |
| 2 | 20 | Состояние длится до ... |
| 29 | 209 | Видны 9-й или более боковых побегов первого порядка (2 цифры) Виден 9-й боковой побег первого порядка (3 цифры) |
| - | 210 | Виден 10-й боковой побег первого порядка |
| - | 221 | Виден первый боковой побег второго порядка |
| - | 22. | Состояние длится до ... |
| - | 229 | Виден 9-й боковой побег второго порядка |
| - | 2N1 | Виден первый боковой побег N-ого порядка |
| - | 2N9 | Виден 9-й боковой побег N-ого порядка |

Основная стадия роста 3: ²

Основная стадия роста 4: Развитие генеративных частей растения (Главный побег)

| | | |
|----|-----|---|
| 40 | 400 | - |
| 41 | 401 | - |
| 42 | 402 | - |
| 43 | 403 | - |
| 44 | 404 | - |
| 45 | 405 | - |

| КОД 2 и 3 цифры | ОПИСАНИЕ |
|--|---|
| 46 406 | - |
| 47 407 | - |
| 48 408 | - |
| 49 409 | Генеративные части растения достигли конечного размера (Уборка сои на кормовые цели) |
| Основная стадия роста 5: Появление соцветия (Главный побег) | |
| 50 500 | - |
| 51 501 | Видны бутоны первых цветков |
| 52 502 | - |
| 53 503 | - |
| 54 504 | - |
| 55 505 | Бутоны первых цветков увеличиваются |
| 56 506 | - |
| 57 507 | - |
| 58 508 | - |
| 59 509 | Видны лепестки первых цветков; цветочные бутоны все еще закрыты |
| Основная стадия роста 6: Цветение (Главный побег) | |
| 60 600 | Открыты первые цветки (случайным образом в популяции) |
| 61 601 | Начало цветения: открыто около 10% цветков ³ Начало цветения ⁴ |
| 62 602 | Открыто около 20% цветков ³ |
| 63 603 | Открыто около 30% цветков ³ |
| 64 604 | Открыто около 40% цветков ³ |
| 65 605 | Полное цветение: открыто около 50% цветков ³ Основной период цветения ⁴ |
| 66 606 | Открыто около 60% цветков ³ |
| 67 607 | Цветки начинают засыхать ³ |
| 68 608 | - |
| 69 609 | Окончание фазы цветения: видны первые стручки (приблизительно 5 мм длиной) ³ |
| Основная стадия роста 7: Развитие плодов и семян | |
| 70 700 | Первый боб достиг конечной величины (15-20 мм) |
| 71 701 | Около 10% бобов достигли конечной величины (15-20 мм) ³ Начало развития стручка ⁴ |
| 72 702 | Около 20% бобов достигли конечной величины (15-20 мм) ³ |
| 73 703 | Около 30% бобов достигли конечной величины (15-20 мм) ³ Начало налива боба ⁴ |
| 74 704 | Около 40% бобов достигли конечной величины (15-20 мм) ³ |
| 75 705 | Около 50% бобов достигли конечной величины (15-20 мм) Продолжение налива боба. ³ Основной период развития боба Продолжение налива боба |
| 76 706 | - |
| 77 707 | Около 70% бобов достигли конечной величины (15-20 мм): Продвинутая стадия налива боба ³ Продвинутая стадия налива боба ⁴ |
| 78 708 | - |
| 79 709 | Приблизительно все бобы достигли конечной величины (15-20 мм) Семена заполняют полость большинства бобов ^{3,4} |
| Основная стадия роста 8: Созревание плодов и семян | |

| КОД 2 и 3 цифры | ОПИСАНИЕ |
|--------------------|--|
| 80 800 | Созрел первый боб, семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые |
| 81 801 | Начало созревания; созрело около 10% бобов, семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые. ³ Начало созревания бобов и семян ⁴ |
| 82 802 | Созрело около 20% бобов; семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые ³ |
| 83 803 | Созрело около 30% бобов; семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые ³ |
| 84 804 | Созрело около 40% бобов; семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые ³ |
| 85 805 | Созрело около 50% бобов; семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые. ³ Основной период созревания бобов и семян ⁴ |
| 86 806 | Созрело около 60% бобов; семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые ³ |
| 87 807 | Созрело около 70% бобов; семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые ³ |
| 88 808 | Созрело около 80% бобов; семена приобрели свойственную окраску, они, сухие и твердые ³ |
| 89 809 | Полное созревание: приблизительно все бобы созрели; семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые (= Урожайная спелость) ³ Большинство бобов созрело; семена приобрели свойственную окраску, они сухие и твердые ⁴ |

Основная стадия роста 9: Увядание

| | |
|--------|--------------------------------------|
| 90 900 | - |
| 91 901 | Около 10% листьев поблекло или опало |
| 92 902 | Около 20% листьев поблекло или опало |
| 93 903 | Около 30% листьев поблекло или опало |
| 94 904 | Около 40% листьев поблекло или опало |
| 95 905 | Около 50% листьев поблекло или опало |
| 96 906 | Около 60% листьев поблекло или опало |
| 97 907 | Надземные части растения засохли |
| 98 908 | - |
| 99 909 | Уборка на семена |

* Воспроизводится с любезного разрешения авторов: «Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants» (См. литературу - Meier, Uwe (Editor), 1997).

¹ Развитие боковых побегов может произойти ранее; в данном случае следует продолжить в пределах основной стадии роста 2.

² Удлинение стебля соевого растения (Основная стадия роста 3) происходит одновременно с развитием листвы. Поэтому кодировка основной стадии роста 3 опущена.

³ Данное определение относится к детерминантным сортам.

⁴ Данное определение относится к индетерминантным сортам.

IX. Литература

Buzzell and Buttery, 1969: Inheritance of peroxidase activity on soybean seed coats. *Crop Sci.*, 9, 387-388.

Cardy, B.J. and Beversdorf, W.D., 1984: Identification of soybean cultivars using isoenzyme electrophoresis. *Seed Sci. Technol.*, 12(3), 943-954

Gorman, M.B. and Kiang, Y.T., 1977: Variety specific electrophoretic variants of four soybean enzymes. *Crop Sci.*, 17(6), 963-965.

Gorman, M.B. and Kiang, Y.T., 1983: Inheritance of soybean electrophoretic variants. *Soybean Genet. Newsl.*, 10, 67-84.

Kiang, Y.T. and Gorman, M.B., 1985: Inheritance of NADP active isocitrate dehydrogenase isozymes in soybean. *J. Hered.*, 76, 279-284.

Palmer, R.G., Shoemaker, R.C. and Rennie, B., 1987: Approved soybean gene symbols. *Soybean Genet. Newsl.*, 41-58/

Bourgoin-Greneche M. And Lallemand J., 1993: «L'electrophorese et son application a la description des varietes. Presentation des techniques utilisees par le GEVES» GEVES, France

Meier, Uwe (Editor), 1997: «Growth Stages of Mono- and Dicotyledonous Plants», BBCH-Monograph, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin-Wien 1997 (quadrilingual version: English, francais, deutsch, espanol)

ПРИЛОЖЕНИЕ Введение

Приложение содержит признаки, оцениваемые при использовании электрофореза, и описания используемых методов. UPOV помещает данные признаки в приложение к методике, таким образом создает специальную категорию признаков, т.к. большинство стран-членов UPOV имеет мнение, что не возможно установить отличимость исключительно на основе найденных отличий в признаках, оцениваемых при использовании электрофореза. Такие признаки нужно использовать только в дополнение к другим отличиям по морфологическим или физиологическим признакам. UPOV обращает внимание, что данные признаки считаются полезными, но они не могут сами по себе быть достаточными для установления отличимости. Их нельзя использовать как обычные признаки, а лишь при запросе или с согласия заявителя сорта.

Для анализа ферментов рекомендуют электрофорез в крахмальном геле. Может наблюдаться полиморфизм ферментов (т.е. 8 ферментных локусов). Известен генетический контроль по каждому ферментному локусу. При описании метода и генетической интерпретации зимogramм сделаны ссылки на «L'electrophorese et son application a la description des varietes. Presentation des techniques utilisees par le GEVES,» Mireille Bourgoin-Greeneche and Joelle Lallemand, GEVES, September 1993 и на дополнительные источники, описанные в Пункте IX, Литература, настоящей Методики.

Признаки, полученные с использованием электрофореза

| Признак | Степень выраженности | Сорт-эталон | Индекс |
|---|----------------------|-------------|--------|
| 21. Выражение аллели в локусе Pgd | Генотип a/a | Essor | 1 |
| | b/b | Apache | 2 |
| 22. Выражение аллели в локусе Idh 1 + Idh 2 | Генотип a/a + a/a | Imari | 1 |
| | a/a + b/b | Apache | 2 |
| | b/b + a/a | Essor | 3 |
| | b/b + b/b | Sapporo | 4 |
| 23. Выражение аллели в локусе Ep | Генотип * Ep a/Ep a | Apache | 1 |
| | ep n/ep n | Goldor | 2 |
| 24. Выражение аллели в локусе Mpi | Генотип b/b | Essor | 1 |
| | c/c | Apache | 2 |
| 25. Выражение аллели в локусе Pgm 1 | Генотип a/a | Apache | 1 |
| | b/b | Essor | 2 |
| 26. Выражение аллели в локусе Asp | Генотип a/a | Goldor | 1 |
| | b/b | Apache | 2 |
| 27. Выражение аллели в локусе | Генотип * | | |

* Применяемая для аллелей номенклатура одобрена Генетическим Комитетом по Сое (PALMER *et al*, 1987). Тем не менее, к нулевым аллелям dia3 и ep была добавлена «n», а к активным аллелям dia3 и ep - «a», - для облегчения их распознавания от наименования генов и для сохранения возможности назначать новые аллели в будущем.

| Признак | Степень выраженности | Сорт-эталон | Индекс |
|---------|----------------------|-------------|--------|
| Dia 3 | Dia3 a/Dia3 a | Apache | 1 |
| | dia3 ndia3 n | Goldor | 2 |

Описание метода, подлежащего применению

Методика SGE для анализа изоферментов сои

1. Число семян для испытания на ООС

не менее 20-ти

2. Приборы и оборудование

Может использоваться любая подходящая система горизонтального электрофореза, при условии, что гели могут выдерживаться при температуре 4 °С. Рекомендуемая толщина геля - 10 мм. Используемый источник энергии должен обеспечивать на выходе постоянное напряжение.

3. Химикаты

Все химикаты должны соответствовать уровню «аналитический реагент» или выше.

3.1 Химикаты для экстракции ферментов

β-меркаптоэтанол

Соляная кислота

Трис (гидроксиметил) метиламин (ТРИС)

3.2 Химикаты для электрофореза

Бромфенол синий

Моногидрат лимонной кислоты

L-гистидин

Гидролизованный крахмал для электрофореза (Sigma s-4501 или равноценный)

3.3 Химикаты для окрашивания ферментов

Ледяная уксусная кислота

Этанол

EDTA-Na₂ (Na₂ соль этилендиамина тетраальдегидной кислоты)

Fast Garnet GBC соль

Глюкоза-1-фосфатдегидрогеназа (Serva 22820 или 22822 или Sigma G5885)

Maker yates

Соляная кислота (HCl)

Перекись водорода

Соль Na₃ DL-изолимонной кислоты

Гексагидрат хлорида магния

Menadoine

DL-оксиянтарная кислота

Диметилтиазолдифенилтетразоль (МТТ)

Na₃ соль 1-нафтилфосфорной кислоты

β-никотинамидадениндинуклеотид (NAD)

β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный (NADH)

β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP)

Nitro-blue tetrazol (NBT)

Дигидрат Na₃ соли 6-фосфоглюкозной кислоты

Феназинметосульфат (PMS)

Поливинилпиролидон 40 (PVP-40)

Тригидрат ацетата натрия

NaOH

Tris -(hydroxymethyl) aminomethane (Tris)

4. Растворы

4.1 Раствор для экстракции

10 ml Трис-НСl

+ 20 μ l β -меркаптоэтанола

доводят до 100 мл деионизированной водой

4.2 Буферы для электрофореза

4.2.1 Основной раствор: 0,364 М L-гистидин цитрата

50,44 Na₃Г L-гистидина

8,20 г моногидрата лимонной кислоты

довести до 1 л деионизированной водой

4.2.2 Буфер для миграции: 0,072 М L-гистидин цитрата pH 6,5

(основной раствор, разведенный 1 к 5)

400 мл основного раствора (4.2.1) доводят до 2 л деионизированной водой

4.2.3 Буфер для геля: 0,024 М L-гистидин цитрата

(основной раствор, разведенный 1 к 15)

80 мл основного раствора (4.2.1) доводят до 1200 мл деионизированной водой

4.2.4 Раствор бромфенола синего

50 г бромфенола синего растворяют в 100 мл деионизированной воды

4.3 Окрашивающие растворы

4.3.1 Основные растворы

4.3.1.1 1 М Трис-НСl pH 8,0

121,1 г Трис, доводят до 1 л деионизированной водой и подкисляют до pH 8,0 50% HCl

4.3.1.2 1 М Трис-НСl pH 9

121,1 г Трис, доводят до 1 л деионизированной водой и подкисляют до pH 9 50% HCl

4.3.1.3 1 М Трис-НСl pH 7,5

121,1 г Трис, доводят до 1 л деионизированной водой и подкисляют до pH 7,5 50% HCl

4.3.1.4 Раствор МТТ

1,0 г МТТ доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.1.5 Раствор NBT

1,0 г NBT доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.1.6 Раствор PMS

200 мг PMS доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.1.7 Раствор MgCl₂

21,35 г MgCl₂ доводят до 100 мл деионизированной водой

4.3.1.8 1 М ацетата натрия pH 5,5

136,08 г тригидрата ацетата натрия доводят до 1 л деионизированной водой и подкисляют до pH 5,5 ледяной уксусной кислотой

4.3.2 Окрашивающие растворы (объем: 200 мл)

4.3.2.1 Окрашивающий раствор PGD IDH

20 мл Трис-НСl pH 8,0 (4.3.1.1)

+ 180 мл деионизированной воды

+ 100 мг соли Na₃ DL-изолимонной кислоты

+ 100 мг дигидрата соли Na₃ 6-фосфоглюконовой кислоты

+ 10 мл раствора MgCl₂ (4.3.1.7)

+ 6 мг NADP

+ 4 мл раствора МТТ (4.3.1.4)

+ 4 мл раствора PMS (4.3.1.6)

4.3.2.2 Окрашивающий раствор PRX

40 мл Трис-НСl pH 9,0 (4.3.1.2)

- + 160 мл деионизированной воды
- + 34 μ l перекиси водорода
- + 200 мг Baker yeast
- 4.3.2.3 Окрашивающий раствор MPI
 - 16 мл Tris-HCl pH 7,5 (4.3.1.3)
 - + 72 мл деионизированной воды
 - + 48 мг Na₂-маннозо-6-фосфат
 - + 1,6 мл раствора MgCl₂ (4.3.1.7)
 - + 20 мг NADP
 - + 2 мл раствора МТТ (4.3.1.4)
 - + 10 мл раствора PMS (4.3.1.6)
 - + 60 единиц глюкоза 6-фосфат дегидрогеназы
 - + 120 единиц фосфоглюкозоизомеразы
 - + 100 мл 2% агара
- 4.3.2.4 Окрашивающий раствор PGM
 - 20 мл Tris HCl pH 8,0 (4.3.1.1)
 - + 180 мл деионизированной воды
 - + 200 мг глюкоза 1-фосфат
 - + 20 мл раствора MgCl₂ (4.3.1.7)
 - + 10 мг NADP
 - + 3 мл раствора МТТ (4.3.1.4)
 - + 2 мл раствора PMS (4.3.1.6)
 - + 120 единиц глюкоза 6-фосфат дегидрогеназы
- 4.3.2.5 Окрашивающий раствор ACP
 - 40 мл раствора ацетата натрия pH 5,5 (4.3.1.8)
 - + 160 мл деионизированной воды
 - + 150 мг соли Fast Garnet GBC
 - + 200 мг дигидрата соли Na₃ 1-нафтилфосфата
 - + 0,5 мл раствора MgCl₂ (4.3.1.7)
- 4.3.2.6 Окрашивающий раствор DIA
 - 10 мл Tris-HCl pH 7,5 (4.3.1.1)
 - + 190 мл деионизированной воды
 - + 68 мг NADH
 - + 2,7 мл раствора NBT (4.3.1.5)
 - + 53 мг Menadione

5. Процедура

5.1 Экстракция фермента

Отдельные семена дробят молотком и добавляют 1 мл раствора для экстракции (4.1), имеющего температуру 4 °С.

5.2 Приготовление геля

Приготовление двух 12,5% крахмальных гелей (18x18x1 см): 128 г крахмала смешать с 1020 мл буфера для геля (4.2.1.3 или 4.2.2.2) в колбе Бюхнера при температуре 80 °С. Удалить газы из смеси в течение 40 секунд. Гель влить в формы для геля, как описано в инструкции к используемому оборудованию. Удалить образовавшиеся воздушные пузырьки. Гели оставить остывать при комнатной температуре не менее чем на два часа и обернуть полиэтиленом для ночного хранения. Перед электрофорезом гель охладить до 4 °С в течение, по крайней мере, одного часа.

5.3 Электрофорез

5.3.1 Танки для миграции наполнить соответствующим объемом буфера (4.2.2), предварительно охлажденным до температуры 4 °С. Щель вырезать в геле в 1 см от катода. Экстракты фер-

ментов (5.1) (30 экстрактов на гель 18x18x1 см) абсорбируют фитилями из хроматографической бумаги (ватман N 3) размером 15x2x1 мм. Фитили помещают в продольный разрез. В 1 см от каждого конца геля вставляют фитиль, смоченный раствором бромфенола синего. Электрофорез проводят при температуре 4 °С. Постоянное напряжение 200 V (максимальный ток 150 мА на 2 геля 18x18x1 см на 20 минут). Фитили затем удаляют, и электрофорез продолжают при постоянном напряжении 280 V (максимальный ток 180 мА на два геля 18x18x1 см) до тех пор, пока маркер RTA/012/1 (бромфеноловый синий) не мигрирует на 13 см (приблизительно 4 часа).

5.4 Окрашивание ферментов

После электрофореза гели режут горизонтально на слои толщиной 1 мм. Верхний слой удаляют. Индивидуальные слои геля окрашивают выдерживанием в следующих растворах при температуре 37 °С, в темноте:

| | | | |
|----------------|------------------|----------|------------------|
| для PGD и IDH: | раствор 4.3.2.1, | для PRX: | раствор 4.3.2.2, |
| для MPI: | раствор 4.3.2.3, | для PGM: | раствор 4.3.2.4, |
| для ACP: | раствор 4.3.2.5, | для DIA: | раствор 4.3.2.6 |

Время окрашивания варьирует между 30 и 120 минутами. После окрашивания слои геля промывают в дистиллированной воде перед хранением. Последующую процедуру используют для долговременного хранения: сушка геля между двумя слоями целлофана или хранение в запечатанных полиэтиленовых пакетах.

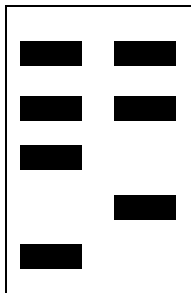
6. Идентификация аллелей, кодирующих изоферменты

6.1 Идентификация аллелей, кодирующих PGD

6.1.1 Генетическая интерпретация зимограмм

| Фермент | Четвертичная структура | Локус | Аллели |
|---------------------------------|------------------------|-------|-------------------------|
| Фосфоглюкозодегидрогеназа (PGD) | Димерная | Pgd | a (Essor) b (Apache) |

6.1.2 Расшифровка зимограмм

| | |
|-------|---|
| |  |
| Pgd 1 | a/a b/b |

6.2 Идентификация аллелей, кодирующих IDH

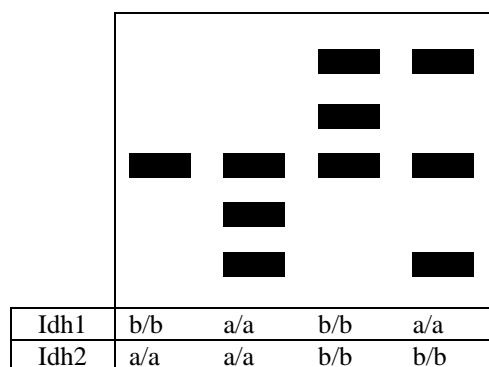
6.2.1 Генетическая интерпретация зимограмм

| Фермент | Четвертичная структура | Локус | Аллели | |
|------------------------------|------------------------|-------|-------------------------|--------------------------|
| Изоцитратдегидрогеназа (IDH) | Димерная | Idh 1 | a (Apache) b (Essor) | Межгенные взаимодействия |
| | | Idh 2 | a (Essor) b (Apache) | |

Имеют место взаимодействия между продуктами генов (полипептидными субединицами), закодированными Idh1, Idh2. Проще анализировать два гена в комбинации:

| Генотип | | Пример сортов |
|---------|------|---------------|
| Idh1 | Idh2 | |
| b/b | a/a | Essor |
| a/a | a/a | Imari |
| b/b | b/b | Sapporo |
| a/a | b/b | Apache |

6.2.2 Расшифровка зимограмм

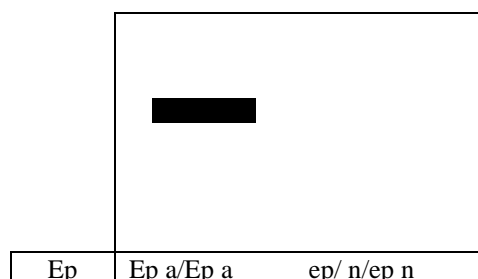


6.3 Идентификация аллелей, кодирующих PRX

6.3.1 Генетическая интерпретация зимограмм

| Фермент | Четвертичная структура | Локус | Аллели |
|-------------------|------------------------|-------|--------------------------------|
| Пероксидаза (PRX) | Димерная | Ep | Ep a (Apache) ep n (Goldor) |

6.3.2 Расшифровка зимограмм

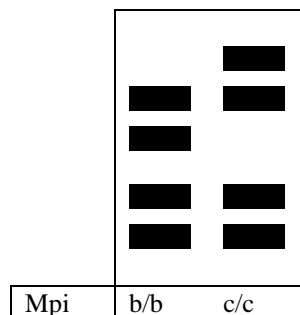


6.4 Идентификация аллелей, кодирующих MPI

6.4.1 Генетическая интерпретация зимограмм

| Фермент | Четвертичная структура | Локус | Аллели |
|----------------------------------|------------------------|-------|-------------------------|
| Маннозофосфатдегидрогеназа (MPI) | Димерная | Mpi | b (Essor) c (Apache) |

6.4.2 Расшифровка зимограмм

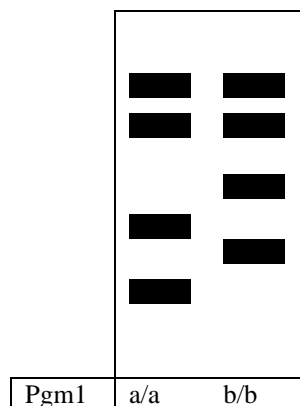


6.5 Идентификация аллелей, кодирующих PGM

6.5.1 Генетическая интерпретация зимограмм

| Фермент | Четвертичная структура | Локус | Аллели |
|------------------------|------------------------|-------|-------------------------|
| Фосфоглюкомутаза (PGM) | Мономерная | Pgm1 | a (Apache) b (Essor) |

6.5.2 Расшифровка зимограмм

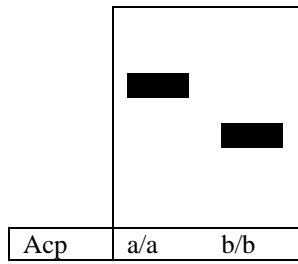


6.6 Идентификация аллелей, кодирующих ACP

6.6.1 Генетическая интерпретация зимограмм

| Фермент | Четвертичная структура | Локус | Аллели |
|-----------------------|------------------------|-------|--------------------------|
| Ацетилфосфатаза (ACP) | Димерная | Аср | a (Goldor) b (Apache) |

6.6.2 Расшифровка зимограмм



6.7 Идентификация аллелей, кодирующих DIA

6.7.1 Генетическая интерпретация зимограмм

| Фермент | Четвертичная структура | Локус | Аллели | |
|-----------------|------------------------|-------|------------------------------------|--------------------------|
| Диафораза (DIA) | Тетрамерная | Dia3 | Dia3 a (Apache) Dia3 n (Goldor) | Межгенные взаимодействия |

Имеют место межгенные взаимодействия между Dia3 и Dia4.

6.7.2 Расшифровка зимограмм

