

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ РИСА» (ФГБНУ «ВНИИ РИСА») ФАНО РОССИИ**

Согласовано:
ФАНО России

«_____» _____ 2017г

Технологический паспорт коллекции

«Коллекция генетических ресурсов риса»

Краснодар - 2017

1. Общая информация:

- **Название коллекции** – семенная «Коллекция генетических ресурсов риса (*Oryza s.L.*)».
- **Держатель коллекции** - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт риса» (ФГБНУ ВНИИ РИСА).
- **Цели и задачи** - Коллекция «ВНИИ риса» предназначена для обеспечения исходными формами селекционных программ по созданию новых сортов, проведения комплексных фундаментальных и прикладных исследований по культуре в области селекции, физиологии, генетики и биотехнологии, а также сохранения достижений отечественной селекции и пополнения генофонда риса зарубежными сортами, адаптированными к почвенно-климатическим условиям северной зоны мирового рисосеяния – юга России.
- **Объем коллекции** - всего 6987 образцов риса культурного посевного из 40 рисосеющих стран мира.

Директор ФГБНУ «ВНИИ риса», доктор с.-х. наук,
профессор Гаркуша Сергей Валентинович

Адрес: 350921, Россия, Краснодарский край, город Краснодар,
поселок Белозерный, 3

Телефон: +7 861 2294149

Тел./факс: +7 861 2294423

Е-mail: vniirice@vniirice.ru

Е-mail: arrri_kub@mail.ru

Страница УНУ Коллекции на сайте ВНИИ риса:

<http://www.vniirice.ru/page/structure/semennaya-kollekciya-fgbnu-vnii-risa>

УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»
зарегистрирована на портале УНУ/ЦКП: <http://ckp-rf.ru/usu/505967/>

РУКОВОДИТЕЛЬ БИОРЕСУРСНОЙ КОЛЛЕКЦИИ

- Коротенко Татьяна Леонидовна
- 8 (928) 4393336
- ✉ korotenrko.tatyan@mail.ru

- **Перечень ключевых СОПов:**

СОП для поддержания единиц хранения и контроля качества

СОП 01: Прием образцов риса в Коллекцию, регистрация, учет и документирование

СОП 02: Порядок выдачи образцов из Коллекции и обмена генплазмой

СОП 03: Систематизация, размещение и инвентаризация образцов коллекции

СОП 04: Инструкция по подготовке проб генофонда коллекции для изучения: Передвижение коллекционного материала и передача в структурные подразделения института

СОП 05: Правила хранения коллекционного фонда риса в контролируемых и неконтролируемых условиях

СОП 06: Мониторинг жизнеспособности семян. Определение посевных качеств семян образцов риса

СОП 07: Подготовка семян к посеву, восстановление их всхожести образцов генофонда риса и размножение (опыт полевой)

СОП 08: Подготовка семян к посеву, восстановление их всхожести образцов генофонда риса и размножение (опыт вегетационный)

СОП характеристики единиц хранения

СОП 09: Морфо-биологическое описание генофонда риса

СОП 10: Оценка хозяйственно-ценных признаков генофонда риса

СОП 11: Фитопатологическая оценка устойчивости образцов риса к пирикулярриозу на искусственном инфекционном фоне

СОП 12: ДНК-паспортизация сортов риса на основе мультиплексного SSR-анализа

СОП 13: Генотипирование коллекционного и селекционного материала риса методами биотехнологии: ДНК-маркирования и ПЦР

- **Инфраструктура Коллекции**

- **Помещение для хранения генофонда риса**

- **Лабораторная комната**

- **Вегетационная площадка**

- **Опытный участок на оросительной системе ВНИИ риса, 0,17 га**

2. Полная информация в Приложениях:

- **Сборник стандартных операционных процедур «КОЛЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РИСА» УНУ ВНИИ риса, 2017г.**
- **Расчет стоимости затрат на выполнение СОП (1-13).**

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт риса»
ФГБНУ «ВНИИ риса»



УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБНУ «ВНИИ риса»
С. В. Гаркуша
_____ 2017 г.

**СБОРНИК СТАНДАРТНЫХ ОПЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕДУР
«КОЛЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РИСА» УНУ ВНИИ риса**

Согласовано:

Зам. директора по научной работе

В.С. Ковалев

04 Октяб. 2017г.

Руководитель УНУ «ВНИИ риса»

Т.Л. Коротенко Т.Л. Коротенко

Краснодар, 2017

В Сборнике стандартных операционных процедур (СОП) коллекции «Генетические ресурсы риса» представлены правила и инструкции для работы с семенами и растениями коллекции: регистрация, учет, пополнение, передача семенного материала, изучение, а также идентификация и паспортизация сортов и образцов генофонда с применением методов фенотипирования, фитопатологии, энтомологии и биотехнологии; разработаны требования к сохранению биоресурсной коллекции риса. Изложена последовательность работ, описана процедура восстановления всхожести, размножения, изучения и хранения семян.

Сборник СОП впервые разработан для УНУ ВНИИ риса «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» при выполнении дополнительного госзадания ФАНО в рамках мероприятий по поддержке биоресурсных коллекций по Программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013 - 2020 годы, по распоряжению Правительства Российской Федерации от 3 декабря 2012 г. N 2237-р.

Сборник СОП подготовлен под руководством директора ФГБНУ ВНИИ риса, д.с.-х.н., профессора С.В. Гаркуши, коллективом авторов: к.с.-х.н.Т.Л. Коротенко, к.б.н. И.И. Супрун, к.с.-х.н. О.Брагиной, Ю.В. Епифанович, Н.В. Епифанович.

Пересмотр СОП осуществляется по мере необходимости, но не реже 1 раза в 5 лет.

Ключевые слова: *коллекция, рис, генетические ресурсы, доноры признаков, условия хранения, жизнеспособность семян, иммунологическая оценка, молекулярное маркирование, генотипирование, ДНК-паспортизация.*

Цель разработки сборника стандартных операционных процедур состоит:

- в организации эффективного управления Коллекцией и документировании информации;
- в организации качественной работы с генофондом коллекции, обеспечении целесообразности и эффективности использования генетических растительных ресурсов;
- в обеспечении надежного сохранения образцов риса для выполнения прикладных и фундаментальных исследований;
- в методическом обеспечении комплексной оценки образцов риса для выделения источников полезных признаков и систематизированном информационном обеспечении единиц хранения;
- в обеспечении достоверных результатов изучения образцов при выполнении генетических, иммунологических, селекционных, морфологических исследований в рамках НИР Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук;
- в широком представлении в рамках проводимых исследований результатов оценки образцов из разных эколого-географических зон возделывания культуры.

Рецензенты: д.с.-х.н. Ковалев В.С., д.б.н. Дзюба В.А., д.с.-х.н. Зеленский Г.Л., д.б.н. Мухина Ж.М.

Содержание сборника СОП

1. Общее описание	9
Терминология	10
СОП для поддержания единиц хранения и контроля качества	
СОП 01: Прием образцов риса в Коллекцию, регистрация, учет и документирование	12
СОП 02: Порядок выдачи образцов из Коллекции и обмена генплазмой	22
СОП 03: Систематизация, размещение и инвентаризация образцов коллекции	29
СОП 04: Инструкция по подготовке проб генофонда коллекции для изучения: Передвижение коллекционного материала и передача в структурные подразделения института	37
СОП 05: Правила хранения коллекционного фонда риса в контролируемых и неконтролируемых условиях	43
СОП 06: Мониторинг жизнеспособности семян. Определение посевных качеств семян образцов риса	55
СОП 07: Подготовка семян к посеву, восстановление их всхожести образцов генофонда риса и размножение (опыт полевой)	63
СОП 08: Подготовка семян к посеву, восстановление их всхожести образцов генофонда риса и размножение (опыт вегетационный)	71
СОП характеристики единиц хранения	
СОП 09: Морфо-биологическое описание генофонда риса	78
СОП 10: Оценка хозяйственно-ценных признаков генофонда риса	87
СОП 11: Фитопатологическая оценка устойчивости образцов риса к пирикуляриозу на искусственном инфекционном фоне	95
СОП 12: ДНК-паспортизация сортов риса на основе мультиплексного SSR-анализа	106
СОП 13: Генотипирование коллекционного и селекционного материала риса методами биотехнологии: ДНК-маркирования и ПЦР	113

Общее описание

Основное назначение семенных коллекций — хранение материалов по биоразнообразию растений и предоставление селекционерам, специалистам и иным заинтересованным лицам возможностей для работы с этими коллекциями.

Научные Коллекции сохраняют сведения о разнообразии таксонов растений, об их происхождении, изменчивости и свойствах собранного материала. Чем обширнее генетическое разнообразие семенных коллекций сельскохозяйственных культур, тем выше ценность их материалов и тем шире область их применения. Описания, оценочные характеристики, фотографии при всей своей полезности не могут содержать полной информации о растении и никогда не смогут заменить жизнеспособный образец. Нередко семенные коллекции — единственный доступный источник получения материалов для некоторых специальных исследований растений: морфологических, анатомо-физиологических, таксономических, генетических и т. д. Таким образом, существующие семенные коллекции позволяют решать разнообразные прикладные и фундаментальные задачи исследований.

УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» ВНИИ риса как экспериментальная база предназначена для проведения комплексных фундаментальных, прикладных, теоретически и междисциплинарных исследований подразделениями института по сельскохозяйственным культурам в области селекции, генетики, биотехнологии и физиологии; УНУ обеспечивает накопление и сохранение генофонда; поддержание национальной коллекции риса ВИР им. Н.И. Вавилова; создание баз данных и информационную доступность; обмен генплазмой с научными организациями, а также интеграцию науки и образования.

Основой функционирования УНУ является пополнение, сохранение, изучение коллекции генетических ресурсов и обеспечение коллективного доступа к генофонду структурным подразделениям ФГБНУ «ВНИИ риса», а также другим институтам РАН, высшим учебным заведениям сельскохозяйственного и биологического профилей, учреждениям других ведомств.

«Коллекция генетических ресурсов риса» Всероссийского научно-исследовательского института риса представляет собой семенной генофонд культуры риса посевного (*Oryza sativa* L.) подвидов *indica* и *japonica* (генетическое разнообразие форм – источников и доноров селекционно-ценных признаков и модельных объектов для полевых и лабораторных экспериментов), лабораторные помещения и хранилище семян, оборудованное для краткосрочного и среднесрочного низкотемпературного хранения.

Биоресурсная коллекция «ВНИИ риса» зарегистрирована на портале ЦКП/УНУ (<http://ckp-rf.ru/>), реестровый номер УНУ – 505967. Положение об УНУ «ВНИИ риса» от 05.07.2017г.

В структуре коллекции «Генетические ресурсы риса»: Рабочая коллекция, Интродукционный фонд и перспективные сорта-дуплеты из национальной коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова.

Коллекция ВНИИ риса включает сорта риса сети селекцентров РФ, лучшие образцы мировой коллекции ВИР, мутанты, регенераты и полиплоидные формы, линии конкурсного испытания, индивидуальных отборов из гибридных популяций, отечественные стародавние и новые сорта, а также интродуцированные формы из-за рубежа в рамках международного научно-технического сотрудничества и обмена с селекционными центрами и генбанками стран ближнего и дальнего зарубежья (сорта и образцы зарубежной селекции из IRRI и ICARDA.).

ТЕРМИНОЛОГИЯ.

Генетические ресурсы растений для производства сельскохозяйственной продукции (далее - генетические ресурсы растений) - часть биологических ресурсов, включающая генетический материал растительного происхождения, содержащий функциональные единицы наследственности;

единица хранения – хранящийся в коллекции образец (сорт, семена одного растительного организма), который получает индивидуальный регистрационный номер;

деятельность с коллекциями генетических ресурсов растений - формирование, регистрация, хранение, изучение, воспроизводство и рациональное использование коллекций генетических ресурсов растений;

документирование образцов коллекций генетических ресурсов растений - фиксирование информации об образцах коллекций генетических ресурсов растений на материальных носителях;

доступ к информации об образцах коллекций генетических ресурсов растений - возможность получения информации, а также ее использования способами, не противоречащими законодательству Российской Федерации;

доступ к образцам коллекций генетических ресурсов растений - предоставление образцов коллекций генетических ресурсов растений заинтересованным лицам;

коллекция генетических ресурсов растений - совокупность собранных, систематизированных и документированных в установленном порядке образцов генетических ресурсов растений, сохраняемых вне мест их естественного произрастания или возделывания сельскохозяйственных растений и представляющих особую научную ценность;

комплексная оценка образцов - проведение полевых и лабораторных исследований образцов коллекций генетических ресурсов растений с целью получения информации об их генетической структуре, селекционных признаках и сельскохозяйственном потенциале;

мониторинг состояния генетических ресурсов растений - система наблюдений за состоянием генетических ресурсов растений в местах их естественного произрастания или возделывания сельскохозяйственных растений, оценки и прогноза изменений их состояния под влиянием природных и антропогенных факторов;

маркировкой называют надписи, которые наносят на упаковку, на каждую единицу хранения. Маркировка облегчает обращение с образцами в процессе хранения. Маркировку наносят непосредственно на тару или на ярлык (бирку).

образец - сохраняемое в живом виде растение, а также его части, из которых можно получить целый организм или организмы, относящиеся к одному виду или внутривидовому таксону одного ранга, которые являются компонентами коллекций генетических ресурсов растений и основными единицами хранения, изучения и использования в научных, селекционных и образовательных программах;

оригинальный образец - первичный образец, поступивший в коллекцию генетических ресурсов растений в результате биоизыскательской деятельности или от оригинатора сорта и используемый в качестве эталонного;

описательные данные образца - информация, содержащая сведения об основных простых наследуемых характеристиках признаков, проявление которых не зависит от условий внешней среды;

оценочные данные образца - информация, содержащая сведения, полученные в процессе комплексной оценки образца;

паспортные данные образца - информация, содержащая номер образца, сведения о ботаническом и научном названиях, дате поступления в коллекцию генетических ресурсов растений, географическом происхождении и генеалогии;

регистрация коллекций генетических ресурсов растений - деятельность по учету данных о коллекциях генетических ресурсов растений на основе их сортового состава, видового разнообразия и нахождения у держателей коллекций генетических ресурсов растений;

систематизация образцов коллекций генетических ресурсов растений - деятельность по установлению таксономической принадлежности, ботанического разнообразия и научного названия объектов растительного происхождения;

экспертиза паспортных, описательных и оценочных данных образцов коллекций генетических ресурсов растений - проведение исследований с целью определения степени изученности и типичности образца коллекции генетических ресурсов растений.

Держатель коллекции генетических ресурсов растений - юридическое лицо, являющееся государственной научной организацией, находящееся в ведении Главного распорядителя коллекций генетических ресурсов растений владеющее, пользующееся и распоряжающееся в соответствии с законодательством Российской Федерации зарегистрированными коллекциями генетических ресурсов растений, предоставленными ему Главным распорядителем коллекций генетических ресурсов растений, а также иные юридические лица, осуществляющие в соответствии с уставом биоисследовательскую деятельность, хранение и изучение образцов генетических ресурсов растений с целью их использования в научных, селекционных и образовательных программах, и которым предоставлены права, в соответствии с законодательством Российской Федерации, зарегистрированные коллекции генетических ресурсов растений.

Каталог образцов коллекций генетических ресурсов растений Российской Федерации - база данных, содержащая паспортные, описательные и оценочные данные оригинальных образцов, находящихся у держателей коллекций генетических ресурсов растений на территории Российской Федерации.

Коллекции генетических ресурсов растений в соответствии с их целевым назначением, охватом таксономического и генетического разнообразия, на основании экспертизы паспортных, описательных и оценочных данных образцов коллекций генетических ресурсов растений подразделяются на следующие **категории**:

1. Первая категория - коллекции генетических ресурсов растений, в состав которых входят оригинальные образцы, находящиеся на долгосрочном безопасном хранении, являющиеся стратегической основой устойчивого развития сельскохозяйственного производства и предназначенные для решения задач, обеспечивающих экономическую, продовольственную и экологическую безопасность Российской Федерации. Коллекции первой категории являются национальным достоянием;

2. Вторая категория - коллекции генетических ресурсов растений, в состав которых входят образцы, переданные на хранение в Центр генетических ресурсов растений на основании соглашений о передаче генетического материала международными центрами и организациями иностранных государств;

3. Третья категория - коллекции генетических ресурсов растений, в состав которых входят дублетные образцы, предназначенные для хранения, изучения и использования в научных, селекционных и образовательных программах.



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-
исследовательский институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):

**Прием образцов риса в Коллекцию, регистрация, учет и
документирование**

СОП № 01/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» ВНИИ риса

Дата разработки: июль 2017г.

Срок действия: 10 лет

Страниц: 10

Подпись рецензента:

д.б.н. Дзюба В.А.

д. с.-х.н. Зеленский Г.Л.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП является руководством в работе с генофондом семенной коллекции риса, устанавливает единый порядок регистрации поступлений образцов и учета единиц хранения, для обеспечения качественного выполнения целей и задач по сохранению генетических ресурсов сельскохозяйственных культур. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса.

Процедуру необходимо повторять при поступлении новых образцов в коллекцию в установленные сроки.

Цель: Организация качества работы с генофондом коллекции, документирование информации и систематизированное информационное обеспечение единиц хранения.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения и научных сотрудников (м.н.с., с.н.с.).

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

- Стол рабочий
- Пластиковые или стеклянные лабораторные баночки, 250 мл (емкости для хранения)
- Разборная доска
- Шпатель
- Компьютер Acer, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt, *Kumai*)
- Влагомер зерна *Helite, Германия*
- Программное обеспечение Microsoft office-2010, FileMaker Pro 13 Advanced
- Канцелярские принадлежности

Документирование:

- Журнал-каталог
- журнал учета
- база данных
- характеристика образцов на электронных носителях

Общее описание:

В УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» из отдела селекции передаются образцы конкурсного испытания, выделившиеся по хозяйственно-ценным признакам, принявшие статус сорта, планируемые на передачу в ГСИ. По усмотрению селекционера также могут передаваться константные сортообразцы (обладающие различной селекционной ценностью, устойчивые к заболеваниям формы и др.) как новый исходный материал.

Образцы риса зарубежной селекции, поступающие в институт, первоначально регистрируются в спецчасти ФГБНУ «ВНИИ риса», а затем семенной материал по акту передается в группу ИКП исходного материала для фитосанитарного контроля и получения репродукции в агроклиматических условиях Краснодарского края. Семена образцов риса зарубежной селекции высеваются в интродукционно-карантинном питомнике (далее ИКП).

Образцы риса, давшие репродукцию в ИКП, перед уборкой инспектируются комиссией (создается и утверждается приказом директора) для выявления перспективных для селекционной работы и фундаментальных исследований. После карантинной проверки семена интродуцированных образцов, имеющих практическое значение для научных программ института и материалы по изучению интродукционных образцов на ИКП передаются в УНУ «ВНИИ риса».

Допуск к генофонду Коллекции ВНИИ риса разрешен только сотрудникам УНУ «ВНИИ риса».

Обоснование:

Процедура регистрации новых сортообразцов проводится ответственным за Коллекцию сотрудником по мере их поступления в соответствии с СОП.

Учет – это упорядоченная система сбора и обобщения информации о состоянии единиц хранения коллекции путём непрерывного и документального отражения всех операций с образцами. Основной задачей учета является формирование полной и достоверной информации о накопленном генофонде культуры, для контроля качества и сохранности семян, сроков посева, целесообразности изучения, движения и эффективности использования. Учет образцов коллекций генетических ресурсов растений - деятельность по созданию баз данных, включающих паспортные, описательные и оценочные данные образцов коллекций генетических ресурсов растений.

Порядок выполнения:

1. Все образцы семян, поступающие в коллекцию, должны быть получены законным образом и с соответствующей документацией.

2. Минимальное количество семян одного образца (единицы хранения), которое принимается в Коллекцию для хранения – 100 шт.

3. Провести предварительный осмотр семян образца на соответствие ботанической разновидности, однородность передаваемого материала, согласно прилагаемой сопроводительной документации и на отсутствие поврежденных и зараженных вредителями семян. (3 мин.)

4. Поступивший в лабораторию образец риса отечественной селекции в тот же день регистрируется ответственным сотрудником за Коллекцию в журнале-каталоге Рабочей коллекции. Ему присваивается каталожный порядковый номер генофонда. Каждый образец обозначается индивидуальным идентификационным номером, представляющим собой пятизначное число.

5. В Рабочую коллекцию принимаются сорта и сортообразцы из отдела селекции, с сопроводительным документом, оформленным согласно правилам описания и учета по Положению об УНУ «ВНИИ риса» (Приложение 1).

6. Внести в Каталог рабочей коллекции паспортные данные образца: наименование сортообразца, год поступления в коллекцию, автор сорта, источник поступления: организация-оригинатор, ботаническая разновидность, происхождение и генеалогия сорта. Паспортные данные чрезвычайно важны для идентификации и классификации образцов и служат отправной точкой при выборе и использовании образца. (2 мин.)

7. Подготовить емкость для хранения (стеклянная или пластиковая лабораторная баночка с завинчивающейся крышкой, 250 мл) и этикетку. Наклеить на баночку специальную бумажную этикетку, распечатанную на принтере, с порядковым номером единицы хранения, присвоенным образцу, и годом поступления в коллекцию. (2 мин.)

8. Проверить влажность семян на влажномере. Сухие семена нового сортообразца в количестве не более 200 грамм засыпать в емкость для хранения, вложить метелку оригинального образца и закрыть плотно крышку. (3 мин.)

9. Установить банку с образцом в шкаф для постоянного хранения на свое место в помещении хранилища семян в соответствии с порядковым номером образцов Рабочей коллекции, закрыть дверцы шкафа. (30 сек.)

10. Факт передачи генетического материала селекционерами института фиксируется двухсторонним Актом приема-передачи и дает право дальнейшей передачи новых сортов в ГСИ. Оформить на компьютере и распечатать Акт приема-передачи в двух экземплярах. (Приложение 2). (2 мин.)

11. Факт передачи сорта или сортообразца в Коллекцию фиксируется сотрудником в журнале «Учет входящего и исходящего материала» (Приложение 3). (30 сек)

Регистрация интродуцированных образцов в рамках международного сотрудничества и обмена генплазмой.

1. Все образцы семян, поступающие в коллекцию, должны быть получены законным образом и с соответствующей сопроводительной документацией.

2. Минимальное количество семян одного образца (единицы хранения), которое принимается в Коллекцию для хранения – 100 шт.

3. Провести предварительный осмотр семян образца на соответствие ботанической разновидности, однородность передаваемого материала согласно прилагаемой сопроводительной документации и отсутствие поврежденных и зараженных вредителями семян. (3 мин.)

4. Поступивший интродуцированный образец зарубежной селекции из Интродукционно-карантинного питомника (ИКП) группы исходного материала регистрируется ответственным сотрудником за Коллекцию в каталоге «Интродукционный материал».

5. Внести в каталог «Интродукционный материал» следующие паспортные данные нового образца: идентификационный номер ИКП, интродукционный порядковый номер Коллекции ВНИИ риса, год поступления, метод получения, наименование, страна происхождения. (2 мин.)

3. Материалы по изучению интродукционных образцов на ИКП «ВНИИ риса» должны сопровождаться при передаче описанием по признакам, указанным в Приложении 4.

4. Факт передачи образцов зарубежной селекции новых поступлений фиксируется двухсторонним Актом приема-передачи и в журнале «Учет входящего и исходящего материала». Оформить на компьютере и распечатать Акт приема-передачи в двух экземплярах. (2 мин.30 сек)

5. Подготовить емкость для хранения (стеклянная или пластиковая лабораторная баночка, 250 мл) и этикетку. Наклеить на сосуд специальную бумажную этикетку с порядковым интродукционным номером, присвоенным образцу, и годом поступления в коллекцию. (2 мин.)

6. Проверить влажность семян на влагомере. Сухие семена нового сортаобразца в имеющемся количестве засыпать в емкость для хранения, вложить метелку оригинального образца и закрыть плотно крышку. (3 мин.)

7. Установить банку с образцом в шкаф для постоянного хранения интродукции в помещении Коллекции ВНИИ риса на свое место в соответствии с порядковым номером интродуцированных образцов, закрыть дверцы шкафа. (30 сек.)

Регистрация и учет коллекционных образцов в компьютерной базе данных рабочей коллекции.

Систематизировать и рационально использовать огромное количество информации можно только с помощью компьютерных баз данных. Для накопления, сохранения данных по оценке генофонда риса и оперативного получения информации о накопленном материале специалистами различного профиля для прикладных и фундаментальных исследований, выполнения заявок на исходный материал во ВНИИ риса создана база данных генетических ресурсов риса. Использование компьютерной программы FileMaker Pro 13 Advanced для управления базой данных позволило организовать данные и эффективно управлять ими: добавлять и удалять записи, редактировать, сохранять, выполнять выборку данных из таблиц. Практически неограниченные размеры базы данных, позволяют проводить ее ежегодную актуализацию.

Структура **Банка данных образцов коллекции риса посевного (*Oryza sativa* L.)** основана на дифференциации признаков риса, содержит результаты исследований образцов рабочей коллекции риса по комплексу из более 40 признаков, представленных совокупностью данных, систематизированных по номеру регистрации образца в каталоге коллекции и году изучения.

1. Структура Банка данных рабочей коллекции: паспортная и оценочная база разработана сотрудниками УНУ и утверждена директором института.

2. Основные функции, реализованные в БД: ввод и корректировка данных, вывод информации, экранная форма просмотра данных, получение информации по запросам к базе данных, выборка образцов из общего списка, визуализация изображений подвидового разнообразия культуры рис. Добавлять и удалять записи, редактировать, сохранять, выполнять выборку данных из таблиц базы данных могут только сотрудники УНУ, ответственные за Коллекцию.

3. Для доступа к работе с базой данных Коллекции сотрудникам института необходимо получить письменное разрешение руководителя института.

4. Работа с базой данных сотрудниками подразделений института осуществляется в присутствии лица, ответственного за Коллекцию УНУ.

5. Факт работы сотрудников института с автоматической системой Банка данных фиксируется в журнале учета.

6. Учет образцов Рабочей коллекции осуществляется в компьютерной базе данных Коллекции. Для внесения данных и регистрации образцов в электронной базе щелчком мыши на стартовой странице Банка данных открыть «Каталог образцов коллекции» (рисунок 1).

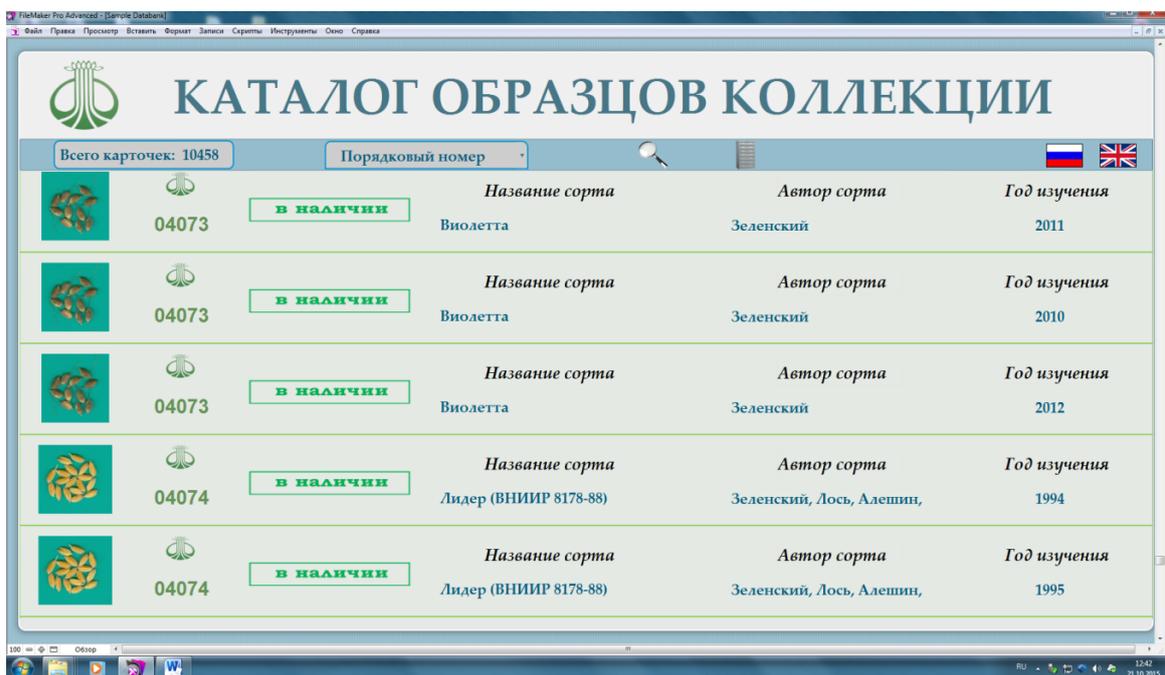


Рисунок 1- Списочный Каталог образцов рабочей коллекции

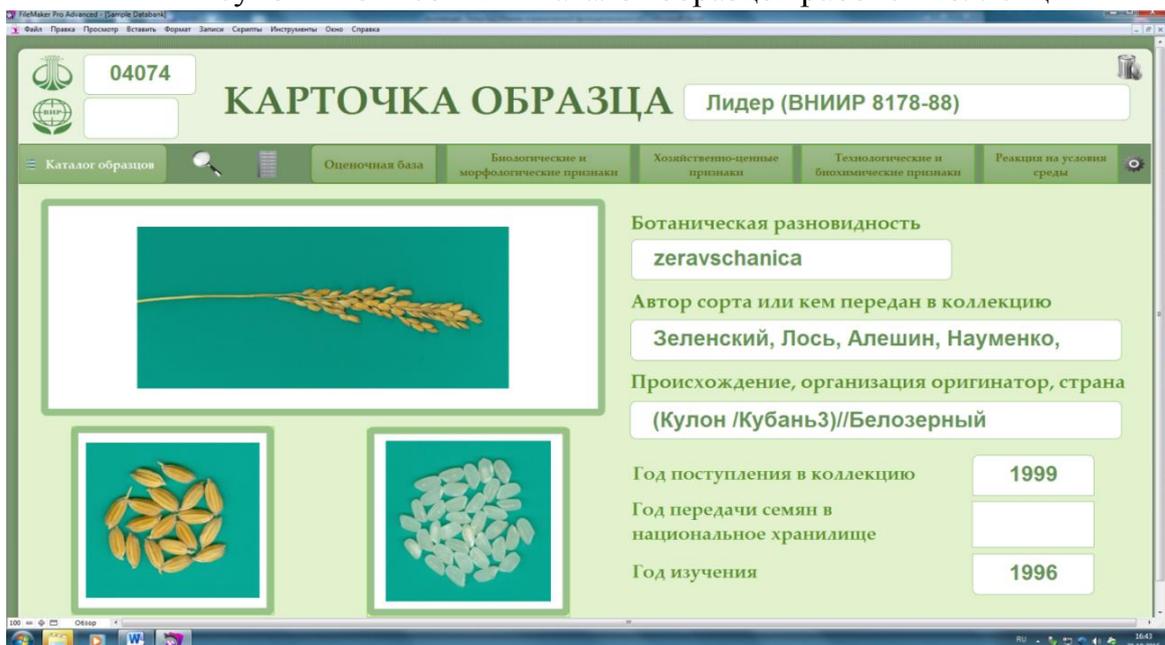


Рисунок 2- Скриншот экранной формы Банка данных «Карточка образца»

7. Для регистрации и внесения паспортных данных образцов нового поступления нажатием на макете кнопки «Поиск» осуществить переход в пользовательском интерфейсе Банка данных к «Карточке образца» (рисунок 2).

8. Открыть чистую «Карточку образца» и внести паспортные данные регистрируемого в базе данных сортообразца из сопроводительной документации. (5 мин.)

9. Нажатием кнопки «Оценочная база» на макете «Карточки образца» открывается экранная форма «Оценочные признаки характеристики образца», куда внести необходимые параметры образца риса по всем полям (рисунок 3). (10 мин.)

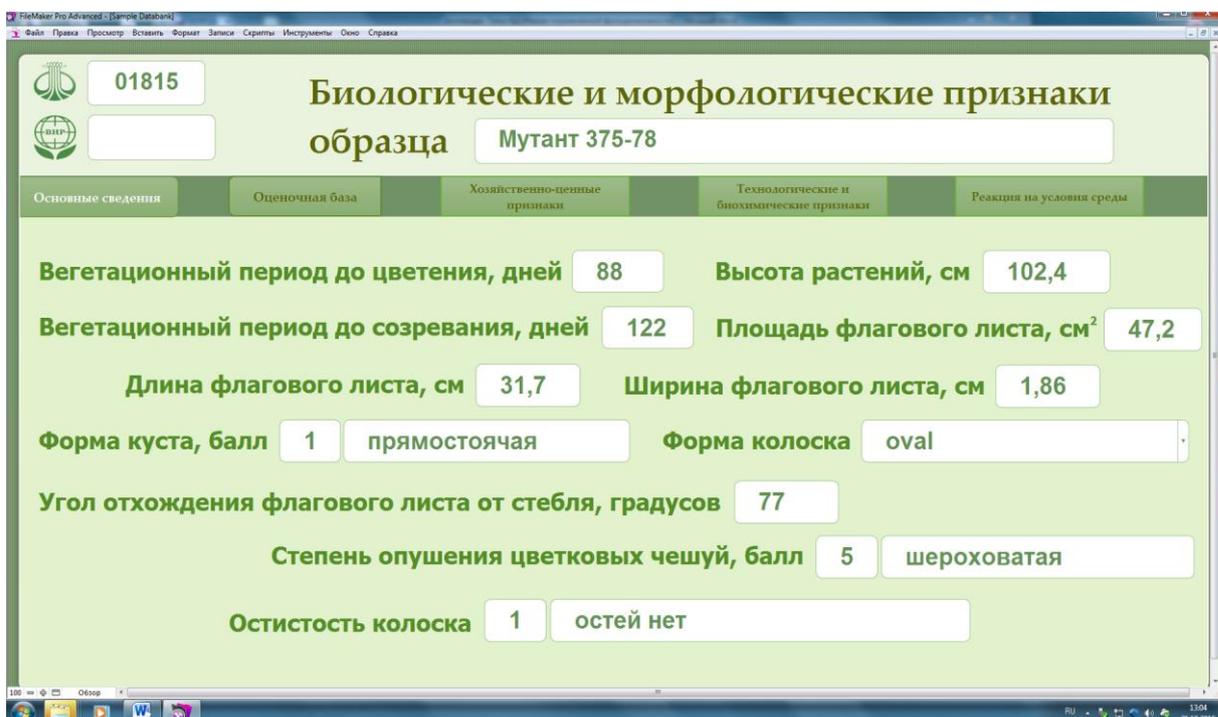


Рисунок 3 - Скриншот экранной формы Банка данных оценочных характеристик, биологических и морфологических признаков образца

10. После проведения комплексной оценки сортообразца в структурных подразделениях института Банк данных пополняется экспериментальными данными скрининговых исследований по оценке холодостойкости, устойчивости к заболеваниям, отзывчивости на дозы удобрений, качеству зерна и другим хозяйственно-ценным признакам. Каждой единице хранения соответствует одна отдельная запись в электронном каталоге Рабочей коллекции.

11. В электронной базе данных следует регистрировать всю важную, подробную и новейшую информацию, включая сведения, как за прошлые, так и текущие периоды. Наличие информации о сохраняемой зародышевой плазме и легкий доступ к ней способствуют более активному использованию генофонда.

12. Ведение базы данных относится к компетенции куратора Коллекции. Актуализация базы данных проводится в течение года по мере поступления данных по изучению образцов коллекции.

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 28 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Положение об УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур», от 05.07. 2017г.
2. FAO/IPGRI. 1994. *Genebank standards*. Rome, FAO and IPGRI (available at: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf>).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение № 1

Паспортные данные (образца) сорта, передаваемого в Коллекцию

Название сорта, сортообразца (селекционный номер)	
Ботаническая разновидность и подвид	
Происхождение (родословная) образца	
Автор сорта или кем передан в коллекцию	
Годы изучения	

Описание по признакам

Биологические и морфологические признаки	Хозяйственно-ценные признаки	Технологичес. и биохимические признаки	Реакция на условия среды (биотические и абиотические факторы)
Вегетационный период до цветения, дней	Форма метелки -компактная -слаборазвесистая -среднеразвесистая -развесистая	Масса 1000 зерен, г	Устойчивость к осыпанию, -высокая (неосыпаемые даже при сжатии) -средняя (менее 25 %) -слабая (около 50% осыпается) - все колоски осыпаются
Вегетационный период до полного созревания, дней	Положение метелки, -вертикальное -наклонное -понижающее	Стекловидность, %	Устойчивость к полеганию, -очень высокая (растения стоят вертикально) -высокая (небольшой наклон) -средняя (наклон растений разной степени) -низкая (полегло 50 %)

			-очень низкая (растения полностью лежат на земле)
Высота растений, см	Густота всходов, балл (1,3,5,7,9)	Плёнчатость, %	Устойчивость к холоду, -холодоустойчивый -среднехолодостойкий -низкая устойчивость
Форма куста, -прямостоячая -слабо развалистая - среднеразвалист. -развалистая	Длина метелки, см	Общий выход крупы, %	Устойчивость к <i>Piricularia ogyzae</i> на естественном фоне, -высокоустойчив -устойчив -среднеустойчив -умеренно восприимчив - неустойчив
Длина флагового листа, см	Количество колосков в метелке, шт.	Содержание целого ядра, %	Степень устойчивости к <i>Piricularia ogyzae</i> при оценке в поле на инфекц. фоне, ИРБ, % -устойчив -среднеустойчив -неустойчив
Ширина флагового листа, см	Пустозёрность, %	Длина зерновки, мм	
Площадь флагового листа, см ²	Масса зерна с метёлки, г	Ширина зерновки, мм	
Угол отхождения флагового листа от стебля, градусы	Плотность метёлки, шт./см	Толщина зерновки, мм	
Окраска листа -светло-зеленая -зеленая -темно-зеленая -с фиол. полосами или пятнами - фиолетовая	Отзывчивость на дозы удобрений, -высокая -средняя - низкая	Длина/ширина (l/b)	
Степень опушения цветковых чешуй, -гладкая -слегка шероховатая -шероховатая -слабо опушенная -сильно опушенная		Содержание белка в зерне, %	
Форма колоска, -округлая -овально-округлая -удлиненная -длинная -с перетяжкой		Содержание амилозы в крупе, %	
Остистость колоска, -ости отсутствуют -ости короткие		Тип эндосперма, -глиутинозный -амилозный	

-ости средние -ости длинные			
Цвет зерна (цветковых чешуй) -соломенно желтая -коричневая -красная -бурая, -серая -черно-фиолетовая -двухцветная			

Дата

Подпись

Приложение № 2

ФГБНУ «ВНИИ риса»
УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых
культур» отдел селекции

наименование структурного
подразделения, передающего образец

АКТ Приема-передачи образцов в коллекцию ВНИИ риса

Для пополнения генофонда риса передаем в Коллекцию «ВНИИ риса» зерно, метелку и описание нового сорта риса (наименование), передаваемого в 20__г. на госсортоиспытание с/х культур.

Образцы передал:
(Ф.И.О., должность)

Подпись

Образцы принял:
(Ф.И.О., должность)

Подпись

Согласовано:
Зав. отделом селекции

Подпись

Дата

**Форма ведения журнала
«Учет входящего и исходящего материала»**

№п./п	Дата	Получен или передан генетический материал. Для каких целей.	В каком количестве, шт.	Из какого подразделения, или в какое подразделение, организация. Ф.И.О.

Форма для передачи зарубежных образцов в интродукционный фонд ВНИИ риса.

ИКП «ВНИИ риса»,
группа исходного материала

Паспортные данные интродукционного образца риса, передаваемого в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Идентификационный номер интродуцента	
Название сортообразца, вид, разновидность	
Происхождение образца (страна, питомник изучения)	
Год поступления в институт	
Год репродукции семян	
Кем передан в коллекцию	

Описание сортообразца по признакам

Продолжительность вегетационного периода (всходы-выметывание-полная спелость), дней	
высота растений, см	
длина метёлки, см	
масса зерна с метелки, г	
общая масса образца, г	

Образцы передал
(Ф.И.О., должность)

Подпись

Образцы принял
(Ф.И.О., должность)

Подпись, Дата



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):

Порядок выдачи образцов из Коллекции и обмена генплазмой

СОП № 02/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: июль 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 7

Подпись рецензента:

д.б.н. Дзюба В.А.

д. с.-х.н. Зеленский Г.Л.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП является руководством в работе с генофондом семенной коллекции риса, устанавливает единый порядок передачи коллекционных образцов как в структурные подразделения института, так и другие научные и образовательные учреждения в рамках научно-технического сотрудничества ВНИИ риса. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса.

СОП применима к образцам риса, включенным в Коллекцию.

Процедуру необходимо повторять при передаче генплазмы из Коллекции в неустановленные сроки.

Цель: Организация качества работы с генофондом коллекции, упорядочение передачи образцов для научно-исследовательских целей и обеспечение целесообразности и эффективности использования генетических ресурсов риса.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения, научных сотрудников (с.н.с., м.н.с.) и лаборантов.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

- Рабочий стол для заполнения документации
- лабораторный стол
- разборная доска для зерна
- шпатель
- упаковочные материалы: бумажные, пластиковые или фольгированные пакеты
- биноклярная лупа ТК 1008-1
- Компьютер Acer, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt, Китай)
- Программное обеспечение Microsoft Office-2010
- канцелярские принадлежности.

Документирование:

- Журнал учета

Общее описание:

Национальные коллекции мировых растительных ресурсов играют огромную и незаменимую роль в непрерывном процессе улучшения культурных растений. С каждым годом увеличивается объем взаимного обмена генресурсами между странами и континентами. Главной составляющей стратегии и политики государства в области генетических ресурсов является Конвенция о биоразнообразии (КБР, 1994), цель которой сохранение биоразнообразия, рациональное использование его компонентов и совместное получение на справедливой и равной основе выгод, связанных с использованием генетических ресурсов, в том числе путем предоставления необходимого доступа к ним и надлежащей передачи соответствующих технологий, с учетом всех прав на такие ресурсы и технологии, а также путем должного финансирования. Со вступлением в силу КБР (1994 г.) изменились приоритеты деятельности в области сохранения генетических ресурсов, страны юридически оформили суверенное право на определение доступа к своим биоресурсам и контроль над ними, а также право получения равных выгод от их использования. Помимо «прав селекционеров» появилась возможность устанавливать другие права интеллектуальной собственности на биоресурсы.

Международное сотрудничество предоставляет неограниченные возможности использования селекционных достижений по культуре. Международное сотрудничество Российской Федерации в области генетических ресурсов растений осуществляется на основе общепризнанных принципов и норм международного права и международных договоров РФ.

Для поддержания географического и пополнения генетического разнообразия Коллекции «ВНИИ риса» производит обмен исходным материалом с отечественными и зарубежными научными организациями: ФНЦ ВИР им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург), ВНИИЗК (г.

Зерноград, Ростовская область), Приморским НИИСХ (г. Владивосток), институтом риса УААН (г. Скадовск, Украина), ближнего зарубежья из Узбекистана, Азербайджана, Казахстана, а также Италией, Турцией, Китаем и институтом IRRI (Филиппины).

Допуск к генофонду Коллекции ВНИИ риса разрешен только сотрудникам УНУ «ВНИИ риса», а в их отсутствии, по распоряжению директора – другому лицу.

Обоснование: Коллекция института предназначена для проведения комплексных фундаментальных и прикладных исследований по культурам в области селекции, генетики, биотехнологии и физиологии; УНУ обеспечивает обмен генплазмой с научными организациями для широкого его использования в исследовательских целях смежных наук, а также интеграцию науки и образования: обширный коллекционный фонд является экспериментальной базой для студенческих, магистерских и аспирантских работ.

Доступ к Коллекции для сотрудников ВНИИ риса осуществляется путем оформления заявки, размещенной на интернет-сайте ВНИИ риса. Доступ к генофонду Коллекции и получение коллекционных образцов другим научно-исследовательским учреждениям ФАНО, образовательным и иным организациям осуществляется на основе договоров и соглашений. Ответственный за коллекцию сотрудник формирует заказы по мере их поступления, осуществляет прием, обработку и хранение заявок от заинтересованных пользователей, заявок на получение образцов, на проведение научных исследований и оказание услуг УНУ.

Процедура выдачи или отправки семян генофонда риса проводится ответственным за Коллекцию сотрудником по мере поступления заявки согласно Положения об УНУ (2017г). Подготовка семян образца для передачи производится научным сотрудником или лаборантом УНУ «ВНИИ риса».

Порядок выполнения:

Выдача семян коллекционных образцов в структурные подразделения института.

1. Информация о наличии необходимых пользователю образцов в Коллекции, дополнительные сведения по каталогам рабочей коллекции и интродукции выдаются сотрудникам института без дополнительных согласований. (30 сек)

3. Семена образцов коллекции для научных исследований и практического использования выдаются из Коллекции сотрудникам института в порядке очередности при наличии заявки, оформленной и подписанной руководством института в соответствии с Приложением 1.

4. Заявки на генплазму (или услуги) рассматриваются руководителем УНУ по мере их поступления в течение установленного периода времени с момента регистрации заявки (5-7 дней).

5. Процедура передачи семян образцов Пользователям коллекции вместе с информацией базы данных, достаточной для исследования образцов в их лабораториях, осуществляется в соответствии с Положением об УНУ «ВНИИ риса».

5. Оформить на компьютере факт передачи образцов коллекции в структурные подразделения института для изучения и распечатать двухсторонний Акт-передачи, зафиксировать в журнале «Учет входящего и исходящего материала». Акт-передачи оформить в двух экземплярах. (5 мин)

6. Если сотрудник института обращается к материалу генофонда несколько раз в течение года, каждая выдача должна регистрироваться отдельно.

7. Для упорядочения работы с образцами местной и зарубежной селекции Лицо, использующее образец, полученный из Коллекции обязано предоставить руководителю УНУ отчет о результатах его использования. Ссылки в публикациях (в «материалах исследований») на использование сортообразцов коллекции УНУ должны быть обязательными для всех

печатных работ, в которых используются научные данные, полученные с использованием генофонда «ВНИИ риса».

8. Для выдачи семян сорта, заявленного Пользователем, сначала устанавливается идентификационный номер сорта по каталогу Коллекции или базе данных. (30 сек)

9. Отбор семян для передачи по заявке производится сотрудником в помещении Коллекции на специально отведенном месте (лабораторный стол) на разборной доске.

10. В помещении хранилища семян Коллекции достать банку единицы хранения с регистрационным номером, высыпать зерно на разборную доску и отсчитать необходимое количество семян. (3 мин.)

11. Не допускается передавать по заявке последние семена из банки без остатка.

12. Подготовить бумажный или пластиковый пакет (в зависимости от количества передаваемого материала) и нанести на пакет маркировку надежно его идентифицирующую (номер по каталогу, название образца и год репродукции) или вложить этикетку. (2 мин.)

12. Проверить внешне качество семян с помощью бинокулярной лупы: в образце для передачи не допускается присутствие примесей или поврежденных семян (2 мин.)

13. Банка образца, из которого была выделена проба семян для передачи на исследования, возвращается на полку шкафа в исходную ячейку хранения и хранится в далее стандартных условиях. Лаборант УНУ относит пакет с семенами и Акт-передачи в структурное подразделение, подавшее заявку на образец под роспись. (2 мин.)

Порядок передачи семян коллекционных образцов сторонним организациям.

1. Коллекционные образцы УНУ «ВНИИ риса» могут использоваться научными сотрудниками учреждений РАН, подведомственных ФАНО и других сторонних организаций как по заявкам, так и в рамках договора или соглашения по обмену генплазмой.

2. Услуги УНУ могут предоставляться как на возмездной, так и безвозмездной основе по Положению об УНУ (2017г).

3 Для учреждений РАН, подведомственных ФАНО, и других сторонних организаций условия получения генплазмы или оказания услуг определяются в договоре с ФГБНУ «ВНИИ риса» и организацией-заказчиком.

4. Для заказчиков образцов Коллекции на интернет-сайте УНУ ВНИИ риса размещен Перечень услуг, оказываемых заинтересованным пользователям

5. УНУ осуществляет прием от заинтересованных пользователей заявок на генплазму, проведение научных исследований и оказание услуг по форме в Приложении 2. Форма заявки, типовой договор и перечень услуг размещены на интернет-сайте «ВНИИ риса».

6. Заявки на генплазму (или услуги) рассматриваются руководителем УНУ по мере их поступления в течение установленного периода времени с момента регистрации заявки (5-7 дней) и сообщает заявителям условия заключения соглашения или договора соответственно. Решение о невозможности заключения договора необходимо довести до сведения заявителя не позднее трех дней со дня принятия такого решения.

7. Образцы коллекции могут быть предоставлены для проведения курсов по обучению студентов, магистров, аспирантов; для подготовки дипломных и диссертационных работ, для подготовки и повышения квалификации специалистов на следующих условиях:

- программа проведения экскурсий, лекций, курсов, стажировок с использованием коллекционных образцов и приборов УНУ утверждается директором ФГБНУ «ВНИИ риса»;
- заключается стандартное Соглашение о научно-техническом сотрудничестве между организацией-заявителем и ФГБНУ «ВНИИ риса».

8. Пользователь Коллекции подает заявку на передачу семян (оказание услуг) Руководителю УНУ «ВНИИ риса», заполняя Заявку.

9. Требования к подготовке исходного материала или оборудования для исследования определяются поставленной в заявке задачей.

10. Руководитель Коллекции готовит сопроводительную документацию для отправки семян в стороннюю организацию. Составляет на компьютере Соглашение на передачу генплазмы и Акт-передачи коллекционных образцов в двух экземплярах. (5 мин.)

11. Для выдачи семян сорта, заявленного Пользователем, устанавливается идентификационный номер сорта по каталогу регистрации или базе данных Коллекции. (30 сек)

13. Отбор семян для передачи по заявке производится в помещении Коллекции на специально отведенном месте (лабораторный стол), на разборной доске.

14. Достать банку семян с регистрационным номером, высыпать зерно на разборную доску и отсчитать необходимое количество семян. (3 мин.)

15. Не допускается передавать по заявке последние семена из банки без остатка.

16. Подготовить бумажный или пластиковый пакет (в зависимости от количества передаваемого материала) и нанести на пакет маркировку надежно его идентифицирующую (номер по каталогу, название образца и год репродукции) или вложить этикетку. (2 мин.)

17. Проверить внешне качество семян с помощью бинокулярной лупы: в образце для передачи не допускается присутствие примесей или поврежденных семян. (2 мин.)

18. Банка образца, из которого была выделена проба для передачи на исследования, возвращается на полку шкафа в исходную ячейку хранения и хранится далее в стандартных условиях. Лаборант УНУ относит пакет с семенами и сопроводительную документацию в Канцелярию для отправки. (2 мин)

19. Пересылка семян сторонним организациям осуществляется за счет стороны заказчика.

20. Выдача материала сторонним организациям фиксируется в журнале «Учет входящего и исходящего материала».

21. Рассылка семян зарубежным организациям должна осуществляться в соответствии с национальным законодательством и соответствующими международными договорами и конвенциями.

22. Образцы семян предоставляются вместе со всеми необходимыми документами, требуемыми страной-получателем.

23. Для культуры рис, предоставляемый образец включает как минимум 30–50 жизнеспособных семян. Это касается образцов, семена которых имеются в достаточном количестве.

24. Для коллекционных образцов, запас семян, которых в момент поступления заявки мал и нет образцов, которые можно было бы предложить в качестве альтернативы, то такие образцы предоставляются после их размножения, при получении повторной заявки.

25. Когда иностранный пользователь запрашивает образец из Коллекции, он должен указать национальные требования для импорта семян, в частности, карантинные положения в его стране, во избежание распространения карантинных заболеваний, регулируемых вредителей или инвазивных видов, которые могут сильно повлиять на национальное производство.

26. Рассылка зародышевой плазмы должна осуществляться таким образом, чтобы семена приходили в пункт назначения в хорошем состоянии. Семена для пересылки необходимо тщательно упаковать в герметичные влагонепроницаемые фольгированные пакеты, чтобы защитить их во время перевозки.

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 15 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Положение об УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур», от 05.07. 2017г.

2. Соглашение о сотрудничестве в области сохранения генетических ресурсов культурных растений государств-участников СНГ (1999 г.);

3. Стратегия сохранения генетических ресурсов растений стран ЦАЗ (2007 г.)
4. Конвенция о приграничном сотрудничестве стран СНГ (2008 г.)
5. Международный договор о генетических ресурсах растений для продовольствия и сельского хозяйства (ФАО, 2004).
6. Международный стандарт генбанков (ФАО, 1994).
7. Модельный закон «О сохранение генетических ресурсов культурных растений и их рациональном использовании» (Информ. бюл. №46, 2010).
8. Распоряжение Правительства РФ от 2 июня 2016 г. № 1101-р, МОСКВА «О подписании Конвенции о сохранении агробиоразнообразия».
9. FAO. 2009. Standard Material Transfer Agreement of the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (SMTA of the ITPGRFA), Rome (available at: <http://www.itpgrfa.net/International>).
10. FAO/IPGRI. 1994. *Genebank standards*. Rome, FAO and IPGRI (available at: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf>).
11. Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. 2006. *Manual of seed handling in genebanks*. Handbooks for Genebanks No. 8. Rome, Bioversity International.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение № 1

Зам. директора
(по науке или инновационной
деятельности)
ФГБНУ ВНИИ риса

ФОРМА ЗАЯВКИ НА ПОЛУЧЕНИЕ СЕМЯН ИЗ КОЛЛЕКЦИИ

Ф.И.О., должность получателя
Наименование научного подразделения

Прошу разрешить выделить семена (кол-во, штук) коллекционных образцов (сортов) для проведения научных исследований (указать цель использования семян) по следующему списку:

№ сорта по каталогу ВНИИ риса	Наименование сорта (сортобразца)

Дата

Подпись

**Форма заявки на получение услуг УНУ
«Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» ФГБНУ
ВНИИ риса**

Наименование услуги _____

ФИО заказчика _____

Должность _____

Организация _____

Адрес _____

Телефон/факс _____ Электронная почта _____

Цель работы _____

Наименование НИР, проекта (гранта, контракта и др.),
в рамках которого заказывается услуга _____

Характер работы _____

Объект исследований (образец) _____

Требуемый метод исследования _____

Сроки выполнения услуги (число, месяц, год) _____

Специальная пробоподготовка образца _____

Количество образцов _____

Использование результатов в образовательном процессе
(диплом, диссертация, др.) _____

Заключение договора на оказание услуг _____

Сроки оплаты услуги _____

В случае опубликования результатов работ обязуюсь в публикации указать, что результат получен посредством использования генофонда УНУ ВНИИ риса

Дата _____ Подпись _____

Согласовано

Руководитель УНУ
_____/_____/_____

Регистрационный № _____

« »
_____ 20____ г



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):
**Систематизация, размещение и инвентаризация
образцов в коллекции**

СОП № 03/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: июль 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 8

Подпись рецензента:

д.б.н. Дзюба В.А.

д. с.-х.н. Зеленский Г.Л.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП является руководством в работе с генофондом семенной коллекции риса, устанавливает правила размещения образцов коллекции в помещении хранилища семян, а также порядок систематизации и инвентаризации генплазмы для выполнения целей и задач по сохранению генетических ресурсов сельскохозяйственных культур. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса.

Процедуру инвентаризации необходимо повторять ежегодно при подготовке посевной ведомости перед посевом.

Цель: Организация мероприятий, обеспечивающих корректную работу с коллекцией, контроль полноты информации об образцах: таксономической, наличия семян генофонда и порядка размещения единиц хранения.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения, научных сотрудников (с.н.с., м.н.с.) и лаборантов.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

- Стол рабочий для регистрации результатов исследования.
- Шкафы для хранения семян образцов (мебель)
- Емкости с семенами коллекционных образцов (пластиковые или стеклянные баночки с завинчивающимися крышками, 250 мл)
- Компьютер Acer, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt, Китай)
- Программное обеспечение Microsoft office-2010, FileMaker Pro 13 Advanced
- Сканер Hp Scanjet G4050, Китай
- Бумага для этикеток А4 210x297
- Канцелярские принадлежности (клей, ручка)
- Халат белый лабораторный

Документирование:

- блокнот -инвентаризационный реестр
- журнал-каталог
- база данных

Эталонные материалы:

- Классификатор рода *Oryza s.L.*
- метелки оригинальных образцов.

Общее описание:

УНУ Коллекция ВНИИ риса обеспечивает накопление и долгосрочное сохранение генофонда и достижений отечественной отрасли рисоводства для фундаментальных и прикладных исследований по рису; поддержание национальной коллекции риса ВИР им. Н.И. Вавилова; создание баз данных и информационную доступность; обмен генплазмой с научными организациями, а также интеграцию науки и образования.

Основные принципы организации семенных коллекций: 1. Безусловное отделение мест хранения основных коллекций от рабочих мест сотрудников; 2. Отдельное, особо тщательное хранение основных фондов; 3. Создание специализированных признаковых и генетических коллекций; 4. Отдельное хранение дублетного фонда.

Постоянное хранение коллекции ВНИИ риса осуществляется в соответствии с формой хранения семян в специально оборудованном помещении с соблюдением правил пожарной безопасности и санитарных норм.

Коллекционный фонд и электронный ресурс «Банк данных коллекции риса «УНУ и обладают также образовательной ценностью, используются как демонстрационный материал при обучении аспирантов института, образовательных экскурсиях для студентов и школьников, проведении стажировок, семинаров, курсов повышения квалификации научных сотрудников и работников рисовой отрасли; при подготовке справочных материалов и научных статей, публикаций в СМИ (рисунок 1).



Рисунок 1 – Профорientационная экскурсия для учащихся СОШ в Коллекции ВНИИ риса

Успешная работа в Коллекциях была бы невозможной без четкой системы маркировки и расположения образцов, обеспечивающих как быстрый поиск отдельных образцов, так и возможность пополнения коллекции без нарушения общего порядка их хранения. Помимо удобства работы с единицами хранения коллекции необходимо обеспечить и наглядность сохраняемого материала с целью продвижения научных разработок и поддержания имиджа института.

Обоснование.

Систематизация образцов риса в каталоге Коллекции является важнейшим этапом в процессе его подготовки. Выбор структуры каталога зависит от особенности той или иной коллекции, её численности, однотипности единиц хранения, принципа комплектования и т.д. Ведущим для каталогов сельскохозяйственных культур является хронологический принцип поступлений в Коллекцию. Принцип расположения образцов риса в Коллекции ВНИИ риса – в соответствии с порядковым регистрационным номером (идентификационным номером), присвоенным образцу. Образцы риса, принятые на хранение в Коллекцию, хранятся в закрытых шкафах в оборудованном помещении ВНИИ риса (хранилище семян – каб.120).

Когда запасы семян истощаются, образцы надлежит незамедлительно размножить, чтобы удовлетворять спрос со стороны пользователей. Когда всхожесть семян снижается до 50% и менее образцы подлежат пересеву для сохранения жизнеспособности (в неконтролируемых условиях срок посева для культуры риса – 3 года). Инвентаризация коллекционных фондов проводится по мере необходимости, но не реже 1 раза в 3 года.

В ходе инвентаризации проверяется соответствие коллекционных фондов и регистрации образцов в каталоге коллекции, наличие хранящихся зарегистрированных образцов, проводится оптимизация системы хранения, оценивается качество и сохранность образцов.

Инвентаризация проводится в целях: получения достоверных данных о количестве образцов, подлежащих репродуцированию, организации рационального размещения образцов в коллекции, количеству образцов, подлежащих оценке и мониторингу, наличия повреждений или заражений вредителями.

Порядок выполнения.

Размещение единиц хранения.

1. Помещение Коллекции ВНИИ риса оборудовано шкафами, состоящими из трех секций в высоту и 7 секций в ширину. Каждая секция включает шкаф с тремя полками, где могут храниться до 168 образцов в стеклянных банках или 204 образца в пластиковых банках. Выдвижных нижних шкафов - 12 (рисунок 2).



Рисунок 2- Помещение хранилище семян риса УНУ «ВНИИ риса»

2. Место для хранения образца определяет ответственный за Коллекцию сотрудник.
3. Размещение в хранилище семян Рабочей коллекции, Интродукционного фонда и сортов-дублетов мировой коллекции ВИР и регистрация образцов риса – раздельное.
4. Каждый образец коллекции должен иметь маркировку надежно его идентифицирующую (регистрационный номер Каталога), для этого на банку приклеивается по центру этикетка с номером единицы хранения. Регистрационный номер образца на бумажной этикетке дублируется и вкладывается внутрь банки с указанием года репродукции. (1 мин.)
5. Нумерация единиц хранения в коллекции «ВНИИ риса» - в хронологическом порядке (сквозная последовательная нумерация). Для образцов Рабочей коллекции принята нумерация: пятизначное число с 0 в начале. Например, № 02848, 04780, 04888.
6. Для единиц хранения интродукционного фонда принята нумерация: порядковый номер через дефис с годом поступления в коллекцию. Например, № 12-08, 3-12, 8-16.
7. Для единиц хранения дублетов мировой коллекции риса принята нумерация генбанка ВИР. Например, к-268, к-5622, к-8600.
8. Установить банку сортообразца с семенами в шкаф для постоянного хранения на свое место в соответствии с порядковым номером, закрыть дверцы шкафа. (30 сек.)



9. На дверцы шкафа в правом нижнем углу приклеивается этикетка (распечатанная на компьютере) с указанием номеров первого и последнего образца в секции для удобства поиска. Например, 02550-02754. (30 сек)

10. Любые изменения в перемещении мест хранения образцов согласуются с Руководителем Коллекции.

Размещение дублетных образцов коллекции в холодильных камерах.

1. Для надежного сохранения генплазмы коллекции риса используются фармацевтические холодильные камеры с разными температурными режимами ($t = +4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $-4,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $-18,0\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2. В помещении хранилища семян «ВНИИ риса» установлены 7 холодильных камер. Семена сортообразцов риса закладывают в холодильные камеры в фольгированных влагонепроницаемых пакетах. Этикетка с идентификационным номером образца и указанием года репродукции крепится степлером снаружи пакета и закладывается вовнутрь.

3. Списки заложенных на низкотемпературное хранение образцов составляются в двух экземплярах, один экземпляр храниться в папке делопроизводства Коллекции, второй экземпляр прикрепляется внутри холодильной камеры на дверцы полок, где размещены пакеты с сортообразцами.

Инвентаризация Коллекции.

1. Инвентаризацию проводят совместно сотрудник лаборатории и лаборант.

2. Сотрудник лаборатории заполняет инвентаризационный реестр (блокнот) и делает рабочие записи по форме: (2 мин.)

Год инвентаризации	2017
Рабочая коллекция	
Номер образца с указанием года репродукции	Примечание
010/14	На пересев
011/15	
....	
04890/16	
Интродукция 2011 года	
1-11/16	
2-11/16	
3-11/16	Мало семян
И т.д.	

3. При проведении инвентаризации лаборант открывает шкаф и проводит осмотр и перечисление вслух номеров единиц хранения на банках по порядку с самого начала нумерации Коллекции. В ходе инвентаризационных работ оценивается сохранность образца, целостность емкости для хранения, контроль количества семян в банке, сохранность этикетки, год репродукции семян по этикетке на банке, порядок расположения банок на стеллажах. (3 мин)

4. При необходимости осуществляется замена банки, крышки (фиксатора), этикетки. (2 мин).

5. Результаты проведенной инвентаризации используются при формировании календарных планов НИР по коллекции, планировании закладки коллекционного питомника; данная информация используется для планирования деятельности по восстановлению всхожести и составления списков на размножение, чтобы поддерживать необходимые запасы семян генофонда риса.

6. После инвентаризации подлежат списанию образцы: уже имеющиеся образцы в коллекции (дублиеты), не представляющие ценности для включения в Каталог и др.; утратившие всхожесть.

Систематизация и идентификация образцов по таксономической принадлежности.

1. При работе с генофондом коллекции необходимо тщательно заботиться о том, чтобы подлинность накапливаемых образцов, сохранялась на протяжении всех этапов, включая поступление, хранение, поддержание и размножение.

2. Надлежащая идентификация семян единиц хранения, сохраняемых в Коллекциях научных учреждений, тесно связана с документированием данных о генетических ресурсах.

3. Информация о паспортных характеристиках образца регистрируется в журнале Каталоге, где указывается ботаническая разновидность единицы хранения. Необходимо проверять при поступлении оригинального образца правильность указанной таксономии.

4. Справочная информация по установлению таксономической принадлежности сорта для риса содержится в научной литературе: Классификация рода *Oryza sativa* L.(Ляховкин А.Г.,1994; Гушин Г.Г, 1938).

5. Сотрудник Коллекции устанавливает ботаническую разновидность коллекционного образца в пределах подвидов *indica* и *japonica*, используя классификацию авторов по форме и размерам колосков и зерновок, окраске чешуй и плода, остистости колоска (рисунок 3). Если не удастся идентифицировать таксономическую принадлежность образца по имеющимся семенам, то во избежание ошибочной оценки необходимо провести идентификацию при пересеве в коллекционном питомнике. (2 мин.)





Рисунок 3 – Генотипическое разнообразие в Коллекции риса по морфотипу растений, размеру зерновки и структуре эндосперма

6. Для идентификации репродукций единиц хранения используются сканированные изображения метелки и зерна сортообразца, которые проходят оцифровку на компьютере и помещаются в Банк данных Коллекции (рисунок 4). Для оцифровки изображений зерна и метелки заготавливают гербарный образец на бумажной подложке каждой единицы хранения после уборки урожая. (2 мин.)

7. Сотрудник Коллекции сканирует отдельно взятую метелку сортообразца, а затем с нее – зерновки. Для сканирования метелки, зерна сортообразца и их оцифровки используется Рабочая станция Hp Pro 3130Mt, сканер HP Scanjet G 4050. (12 мин)





Рисунок 4 – Отсканированные метелка и зерно сортообразца № 212-05 (Heibar)

8. Для управления базой данных образцов коллекции использовать компьютерную программу FileMaker Pro 13 Advanced. Кликом мыши открыть в базе данных Макет «карточка образца» с его паспортными данными и изображением. Добавить отсканированные и оцифрованные изображения: метелки, зерна и крупы сортообразца. (5 мин.)

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 30 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Сметанин, А.П. Методики опытных работ по селекции, семеноводству, семеноведению и контролю за качеством семян риса / А.П. Сметанин, В.А. Дзюба, А.И. Апрод. - Краснодар, 1972. – 156 с.
2. Методические указания по изучению мировой коллекции риса и классификатор рода *Oryza* L. (1982).
3. Ляховкин, А.Г. Состав и классификация риса *Oryza Sativa* L. / А.Г. Ляховкин. – Ханой, 1994. – 72 с.
4. Ляховкин А.Г. Рис. Мировое производство. - 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: ПРОФИ-ИНФОРМ, 2005. - 288 с.
5. Дзюба, В.А. Теоретическое и прикладное растениеводство: на примере пшеницы, ячменя и риса: Науч.-метод. пособие / В.А. Дзюба. – Краснодар, 2010. – 475 с.
6. Национальный стандарт РФ. Семена сельскохозяйственных растений. Сортовые и посевные качества. Общие технические условия. - ГОСТ Р 52325-2005.



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):

**Инструкция по подготовке проб генофонда коллекции для изучения:
Передвижение коллекционного материала и передача в структурные
подразделения института**

СОП № 04/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: июль 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 6

Подпись рецензента:

д.б.н. Дзюба В.А.

д. с.-х.н. Зеленский Г.Л.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП является руководством по подготовке проб коллекционных образцов для анализа, устанавливает единый порядок передачи коллекционных образцов в структурные подразделения института для комплексной оценки. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса.

СОП применима к образцам риса, включенным в Коллекцию.

Процедуру необходимо повторять ежегодно после уборки урожая при передаче генплазмы для изучения в структурные подразделения института, причем один и тот же образец может быть подготовлен и передан неоднократно.

Цель: обеспечение комплексной оценки образцов риса для выделения источников ценных признаков и организация качества научно-исследовательской работы с генофондом коллекции.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения, научных сотрудников (с.н.с. и м.н.с.) и лаборантов.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

- Рабочий стол для заполнения документации
- Лабораторный стол, разборная доска для зерна
- Банки с семенами коллекционных образцов, 250 мл
- Весы лабораторные электронные Scout (0,01), США
- Влагомер зерна Helite, Германия
- Шпатель
- Упаковочные материалы: бумажные и пластиковые пакеты с защелкой
- Компьютер Acer, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt, Китай)
- Программное обеспечение Microsoft office-2010
- Канцелярские принадлежности (степлер, ручка).
- Бумага А4 210x297

Документирование:

- Журнал учета на 96 листов
- Акт-передачи
- Заявка на проведение оценки сортообразцов

Общее описание:

Сформированные в научно-исследовательских учреждениях Коллекции значимых в экономическом отношении сельскохозяйственных культур - важное звено в общей системе сохранения генетических ресурсов, а также научный потенциал как для прикладных, так и фундаментальных исследований. В последнее десятилетие государственная политика России направлена на формирование, сохранение, изучение и рациональное использование биоразнообразия растений с целью обеспечения экономической, продовольственной и экологической безопасности. Задачей селекционеров остается создание сортов устойчивых к полеганию и болезням, совмещающих трудно сочетаемые признаки (адаптивность к стрессовым факторам внешней среды, раннеспелость и повышенная урожайность, продуктивность и высокие технологические качества зерна, низкорослость с оптимальным сочетанием соломы и зерна и т.п.). Для решения поставленных задач необходим поиск перспективных форм различного эколого-географического происхождения в качестве родительских форм, источников конкретных признаков в программах гибридизации. Интродукция новых сортов и форм растений риса позволяет расширить спектр использования

генетических ресурсов в научно-практической деятельности. Всего в коллекцию ВНИИ риса поступило 3142 интродукционных форм, однако ввиду их фоточувствительности и непригодности возделывания в условиях Кубани, часть образцов выбраковывается.

Во «ВНИИ риса» ведется поэтапная комплексная оценка накопленного исходного материала совместно с другими лабораториями института (генетиками, физиологами, технологами, фитопатологами и биотехнологами) и выделение источников ценных признаков для практического использования. Получены экспериментальные данные для дифференциации образцов в группы «признаковых коллекций».

Обоснование.

Генетическое разнообразие коллекции риса изучается в коллекционном питомнике по биологическим, морфологическим признакам растений, таксономической принадлежности к ботанической разновидности, элементам структуры продуктивности, устойчивости к полеганию.

Комплексная оценка исходного материала включает изучение устойчивости генотипов к стрессовым факторам среды (биотическим и абиотическим) для создания нового сортового состава с высоким адаптивным потенциалом. В лаборатории физиологии исходный материал изучают на холодостойкость (пониженные температуры в фазу прорастания). Оценка исходных форм на иммунитет, т.е. на устойчивость к болезням и вредителям, является едва ли не самой важной составляющей селекционного процесса. Изучение устойчивости коллекционных образцов к патогену пирикуляриоза Краснодарской популяции проводят как на естественном фоне в коллекционном питомнике в полевых условиях, так и на провокационном фоне в инфекционном питомнике группы защиты риса (лаборатории земледелия). Как известно, рис является крупяной культурой, в связи с этим важен анализ генетического разнообразия по качественным показателям зерна. Содержание амилозы – основной показатель при определении кулинарного типа использования рисовой крупы. Оценку технологических признаков коллекционных образцов проводит лаборатория качества ВНИИ риса. Изучение генетического разнообразия риса, собранного в коллекции, методами молекулярного маркирования проводят сотрудники лаборатории биотехнологии.

Подготовка проб для анализа – важный этап в работе с генетическими ресурсами. Подготовку проб для исследований коллекционных образцов, в достаточном для анализа количестве в соответствии с требованиями применяемых стандартных методик, осуществляют лаборант и сотрудники УНУ Коллекции ВНИИ риса.

Порядок выполнения:

1. Отбор проб для анализа проводят только из свежих семян репродукции текущего года для повышения объективности оценки. Нельзя смешивать репродукцию семян текущего и предыдущих лет.

2. Подготовку проб для анализа и передачи в структурные подразделения института проводят в период октябрь-декабрь после уборки урожая риса.

3. Список образцов в компьютерной форме для изучения и передачи в лаборатории института готовит Руководитель Коллекции в двух экземплярах по форме в Приложении 1. Списки образцов для изучения единиц хранения составляются на основании инвентаризации информационного ресурса (банка данных) Коллекции. (2 мин.)

4. Процедура передачи проб образцов на изучение оформляется Заявкой по форме в Приложении 2. (1 мин.)

5. Каждая передача образцов в структурные подразделения института фиксируется Руководителем Коллекции в журнале «Учета входящего и исходящего материала» с указанием количества передаваемых образцов коллекции. (1 мин.)

6. Семена свежей репродукции перед передачей на изучение необходимо проверить на влажность на портативном влагомере зерна *Helite*. Передают сухие семена влажностью не более 14,0 %. (2 мин.)

7. Не допускается в пробах для анализа наличие поврежденных, отшелушенных, неполноценных зерновок риса.

8. Для повышения эффективности использования генетических ресурсов риса УНУ «ВНИИ риса» проводится ежегодная актуализация Банка данных коллекции результатами изучения генофонда в структурных подразделениях института. В целях обеспечения научной деятельности и отчетности УНУ структурные подразделения института своевременно передают оценочную информацию по изучению генофонда риса.

Подготовка проб:

9. Для передачи зерна в лабораторию физиологии для оценки на холодостойкость сотрудник УНУ достает банки с номерами образцов из шкафа в помещении Коллекции согласно подготовленного списка. Отсчитывает по 100 полноценных зерновок каждого образца. В подготовленный пластиковый пакет с защелкой высыпает зерно образца и вкладывает бумажную этикетку с регистрационным номером, указанием года репродукции и надписью «на холод». (2 мин.)

10. Для передачи зерна в группу защиты риса на оценку устойчивости к патогену пирикулярноза сотрудник УНУ достает банки с номерами образцов из шкафа в помещении Коллекции согласно подготовленного руководителем списка. Отсчитывает 120 полноценных зерновок каждого образца. В подготовленный бумажный пакет высыпает зерно, подписывает пакет «на пирикулярноза», указывает регистрационный номер образца и год репродукции. (2 мин.)

11. Для передачи зерна в лабораторию качества на технологическую оценку сотрудник УНУ достает банки с номерами образцов из шкафа в помещении Коллекции согласно подготовленного руководителем списка. Затем на весах отвешивает по 50 грамм каждого образца, в подготовленный бумажный пакет высыпает зерно, подписывает пакет «на техноценку», указывает регистрационный номер образца и год репродукции. (2 мин.)

12. Для передачи зерна на биохимическую оценку на содержание амилозы в лаборатории качества сотрудник УНУ достает банки с номерами образцов из шкафа в помещении Коллекции согласно подготовленного руководителем списка. Затем на весах отвешивает по 10 грамм каждого образца. В подготовленный пластиковый пакет с защелкой высыпает зерно, вкладывает бумажную этикетку с регистрационным номером образца, указанием года репродукции и надписью «на амилозу». (2 мин.)

13. Для передачи зерна для молекулярно-генетических исследований в лаборатории биотехнологии сотрудник УНУ достает банки с номерами образцов из шкафа в помещении Коллекции согласно подготовленного руководителем списка. Отсчитывает на разборной доске с помощью шпателя 50 полноценных зерен каждого образца. В подготовленный пластиковый пакет с защелкой высыпает зерно, вкладывает бумажную этикетку с регистрационным номером образца, указанием года репродукции и надписью «на генотипирование». (2 мин.)

14. После отсыпки зерна все банки коллекционных образцов лаборант УНУ возвращает на свои места на полки в шкафы в хранилище семян, проверяет плотность закрытия крышек и правильность размещения единиц хранения. (1 мин.)

Передача проб для анализа в структурные подразделения.

15. Лаборант УНУ ВНИИ риса складывает партии образцов отдельно по назначению. Научный сотрудник проверяет количество подготовленных образцов и их соответствие по списку. (2 мин.)

16. Лаборант разносит партии образцов с распечатанным в двух экземплярах Актом-передачи и Списком образцов в структурные подразделения под роспись. Один экземпляр

сопроводительной документации возвращается в УНУ «ВНИИ риса» и регистрируется Руководителем Коллекции в журнале «Входящего и исходящего материала». (2 мин.)

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 21 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. ГОСТ 12036-85 Семена сельскохозяйственных культур. Правила приемки и методы отбора проб.
2. ГОСТ 12041-82 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения влажности.
3. ГОСТ 12042-80 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения массы 1000 семян.
4. ГОСТ 12043-88 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения подлинности.
5. ГОСТ 12044-93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями ГОСТ 12045-97
6. ГОСТ Р 52325-2005. Семена сельскохозяйственных растений. Сортовые и посевные качества. Общие технические условия.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

СПИСОК

сортообразцов риса, передаваемых в лабораторию _____
(наименование научного подразделения)
для проведения оценки _____ (на
устойчивость к пирикулярриозу, холодостойкость, теханализа и др.)
(УНУ Коллекция ВНИИ риса) _____ Репродукция 2017 г.

№ п/п	№ каталога ВНИИ риса	Название образца	Происхождение
1	00263	Б/названия	ВНИИ риса
2	01450	Б/названия	Баянг Аллорио *(Балилла гр.гр.* Донской 1)
3	01511	Б/названия	ВНИИР 6080 * Пратао Прекоче
4	12-09	Volano	Италия
....			
....			
Итого	100 шт.		

Образцы передал

(Ф.И.О., должность)

Образцы принял

(Ф.И.О., должность)

Подпись

Подпись, Дата

Заведующему лабораторией

(наимен. подразделения)
ФГБНУ «ВНИИ риса»

(Ф.И.О. руководителя лаборатории)

ЗАЯВКА

в лабораторию _____

Руководителя УНУ
Коллекция ВНИИ риса
_____ Ф.И.О.

Просим Вас провести оценку (*количество цифрами*) коллекционных сортообразцов риса репродукции 20____г. на устойчивость к пирикулярриозу (*холодостойкость, качество зерна, содержание амилозы и др.*).

Список передаваемых образцов прилагается.

Подпись

Дата



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):

**Правила хранения коллекционного фонда риса в контролируемых
и неконтролируемых условиях**

СОП № 05/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 12

Подпись рецензента:

д.б.н. Дзюба В.А.

д. с.-х.н. Зеленский Г.Л.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП является руководством при закладке семян коллекционных образцов на хранение, устанавливает порядок подготовки семян единиц хранения к краткосрочному и долгосрочному низкотемпературному хранению. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса.

СОП применима к образцам риса, включенным в Коллекцию.

Процедуру необходимо повторять ежегодно после уборки урожая при закладке свежей репродукции семян коллекционных образцов на хранение.

Цель: Организация безопасного хранения генофонда риса с учетом сроков, способов и режимов хранения семян для поддержания их жизнеспособности.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения, научных сотрудников (с.н.с., м.н.с.) и лаборантов.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

1. Стол лабораторный
2. стол рабочий для регистрации результатов исследования
3. банки пластиковые или стеклянные с крышками для хранения образцов риса (объемом 250 мл).
4. этиловый спирт
5. канцелярские принадлежности (ручка, карандаш, стерка, клей)
6. термостат электрический суховоздушный *Barnstead Lab-Line General Purpose*.
Производитель: США
7. шкафы для хранения образцов
8. пластиковые и фольгированные пакеты различного размера для упаковки семян, подлежащих вакуумированию
9. лабораторные весы *Scout* (0,01), США
10. холодильники для хранения при низких положительных температурах *Paracels Pozis №206 Am – 2000 3037; XF-400 (Pozis)* ЗАО «Атлант» с-к-200 Н 5-02 (+4,5 °С); Россия
11. холодильные камеры для заморозки: *Paracels MM 180/20/35* (-18 °С); Россия
12. фармакологические холодильные камеры для хранения при отрицательных температурах *Super polo Indesit SFR 167* (-5 °С) - 2шт.; Италия
13. ручной импульсный сварщик пакетов *PFS-300*; Китай
14. вакуумный упаковщик *Mini Jumbo Henkelman*, Голландия
15. влагомер зерна *Helite*, Германия
16. инкубатор-термостат *Barnstead Lab-Line General Purpose*, США
17. настольная леофильная сушилка *Labconco* модель 7740031, Производитель: США
18. дихлофос
19. набор лабораторных сит
20. шпатель
21. разборная доска
22. перчатки нитриловые
23. термометр низкотемпературный
24. биноклярная лупа
25. лабораторные халаты
26. бумажные крафт-пакеты 25х35 см
27. термометр низкотемпературный от 0 до -30 С

Эталонные материалы:

- оригинальные семена единиц хранения

Документирование:

- Журнал каталог

Общее описание: Постоянное хранение коллекций растительных ресурсов производится в соответствии с формой хранения в специально оборудованных помещениях с соблюдением правил пожарной безопасности и санитарных норм.

Различают 3 типа коллекций культурных растений и их диких сородичей:

Базовые коллекции - стратегические, длительно хранящиеся обычно при температуре более -18°C при предварительном высушивании до установленной влажности. Эти коллекции служат страховочным материалом для активной и рабочей коллекций.

Активные коллекции в целом поддерживаются при умеренных сроках хранения при температуре $<4^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности 15%. Их принципиальная роль — удовлетворение спроса на материал, поступающий из базовой коллекции, изучение коллекции, интегрированное в фундаментальные и прикладные научные программы, обмен генплазмой.

Рабочие коллекции являются краткосрочными и создаются для специфических групп пользователей (селекционеры и специализированные исследовательские группы).

По продолжительности хранения коллекционных образцов может быть **временным (краткосрочным) и длительным (долгосрочным)**. Как временное, так и долгосрочное хранение должно быть организовано так, чтобы не было потерь в массе (кроме неизбежных) и тем более потерь в качестве зерна.

Поддержание Коллекции риса осуществляется путем хранения сухих семян образцов двумя способами: краткосрочное в неконтролируемых условиях комнатных температур и долгосрочное низкотемпературное хранение в холодильных камерах (рисунок 1).



Рисунок 1- Способы хранения генофонда Коллекции риса

Срок хранения – это период, по истечении которого семена пригодны к использованию по назначению, однако, их посевные и потребительские характеристики могут быть снижены.

Способы хранения семян: в таре, упаковке (мешках, пакетах, емкостях стеклянных или пластиковых) и насыпью (в складах, бункерах, силосах). Способ хранения в упаковке более дорогостоящий, однако, его необходимо применять в определенных случаях для

предотвращения потерь семян в массе и качестве. Семенные коллекционные фонды необходимо после созревания размещать в специально оборудованных хранилищах.

Режимы хранения зерновых масс: 1) в сухом состоянии, то есть с влажностью до критической, 2) в охлажденном состоянии (когда температура зерна понижена до пределов, значительно тормозящих жизненные функции компонентов зерновой массы); 3) без доступа воздуха (в герметическом состоянии).

Режимы и способы хранения семян зерновых культур основаны на их видовых свойствах. При выборе режима хранения учитывают: целевое назначение, исходное качество и экономическую целесообразность применения того или иного режима.

Обоснование СОП:

Качество семян определяется генотипической природой сорта, условиями окружающей среды в период их формирования, развития и хранения. Семена риса, собранные в поле, редко находятся в таком состоянии (физиологическом и фитосанитарном) и количестве, которые автоматически гарантируют длительное сохранение. Когда собранный образец содержит значительную долю (>10%) незрелых семян, следует принять меры по обеспечению послеуборочного дозревания. Семенной материал необходимо перевести в контролируемые условия для высушивания, обычно для этого материал помещают в условия с хорошей вентиляцией и защитой от осадков. Послеуборочное дозревание у риса может длиться 1-2 месяца при хранении в условиях положительных температур и доступа воздуха.

Уборка урожая риса коллекционных образцов осуществляется вручную, путем срезки метелок с делянок в бумажные пакеты. Для обеспечения максимального качества семян, период между их сбором и помещением в контролируемые условия высушивания должен быть от 3 до 5 дней или максимально коротким, принимая во внимание то, что семена не должны подвергаться воздействию высоких температур и интенсивного света. После уборки урожая влажные семена образцов коллекции (с влажностью от 14 до 18 %) должны быть разложены в бумажных пакетах для естественного высушивания в хорошо проветриваемом помещении. Во ВНИИ риса для таких целей используют крытую теплицу с металлическими сетчатыми стеллажами.

Необходимое условие, которое влияет на ход процессов послеуборочного дозревания - температура. Семена риса дозревают только при положительной температуре и наиболее интенсивно при 15-30 °С. Поэтому в первый период хранения сухие свежесобраные семена риса не охлаждают.

Для сохранения коллекционного фонда важно качество подготовки семян к хранению. Семена многих растений (их называют ортодоксальными) могут сохранять жизнеспособность, оставаясь в состоянии покоя, сотни лет, если находятся в условиях низкой влажности. Получение качественных семян — процесс длительный и сложный, он не ограничивается каким-либо одним приемом, например, сортированием, а предполагает целый комплекс мероприятий. Решающим для обеспечения качества семян является подготовительная работа с семенами после сбора и прежде, чем они будут помещены в контролируемые условия.

Коллекции семян должны храниться в прохладном, сухом месте. Во ВНИИ риса оборудовано отдельное помещение для хранения генофонда коллекции риса со шкафами и семью холодильными камерами.

Краткосрочное хранение семян образцов риса Коллекции осуществляют в пластиковых или стеклянных банках с завинчивающимися крышками в неконтролируемых условиях естественных температур в помещении хранилища.

Для хранения коллекций в контролируемых условиях используют режимы: в охлажденном состоянии и без доступа воздуха. Для хранения в неконтролируемых условиях используют режим – в сухом состоянии. Долгосрочное хранение семян образцов риса Коллекции осуществляется в морозильной камере, обеспечивающей постоянное поддержание температуры на уровне минус 4,5 °С и 18 °С и фармакологических холодильниках с

температурой +4,5 °С. Длительность хранения образцов риса при соблюдении рекомендованного температурного режима ограничена.

За работой холодильного оборудования сотрудниками осуществляется систематический визуальный контроль. Показания встроенных датчиков температуры, отражающих температуру внутри холодильников, контролируют с помощью низкотемпературного термометра сотрудники УНУ ежедневно. Кроме того, используемые модели морозильников, снабжены звуковыми сигнальными устройствами, которые включаются в случае повышения температуры внутри морозильной камеры, что позволяет своевременно принять меры к сохранности биоресурсной коллекции.

При аварийном отключении электроэнергии и размораживании холодильной камеры составляют акт о нарушении хранения образцов риса. Биологические образцы с утраченными посевными качествами, подлежат списанию.

Изменение и модернизация системы хранения производятся по мере необходимости на основании решения руководителя коллекции по согласованию с руководством ВНИИ риса.

Профилактические мероприятия (мониторинг всхожести семян, пересев) по обеспечению сохранности образцов проводятся по мере необходимости, но не реже: для краткосрочного хранения 1 раза в 3 года; для долгосрочного низкотемпературного хранения в холодильных камерах 1 раза в 5-10 лет.

Для Коллекции риса приняты послабления с точки зрения требуемого для закладки количества материала к позднеспелым и редким сортообразцам, для которых сбор семян с оптимальным качеством и в достаточном количестве затруднен.

Порядок выполнения процедур:

При закладке на хранение необходимо выполнять *общие правила работы* с коллекционными образцами:

- 1) Работа с образцами проводится в отведенном для этой цели месте.
- 2) Приборы и инструменты для работы с образцами должны быть чистыми.
- 3) Для исключения возможности механического загрязнения и смешивания образцов при манипуляциях следует избегать работы с двумя и более открытыми образцами в одном рабочем пространстве одновременно.
- 4) При работе с единицей хранения запрещены любые действия, которые могут повлечь за собой повреждение образца, либо потерю места его хранения.
- 5) Емкость для хранения семян должна быть герметично закрыта и маркирована идентификационным номером коллекционного образца.
- 6) Режим хранения образца коллекции определяется Руководителем УНУ с учётом особенностей и специфики единицы хранения.
- 7) Доступ к образцам, заложенным на долгосрочное низкотемпературное хранение, определяет Руководитель УНУ.
- 8) При возможности, создаваемые для обеспечения надежности сохранения образцы должны содержать не менее 300 генетически однородных семян.
- 9) На хранение закладывают семена со всхожестью не ниже 95 %.
- 10) Размер образца не должен ограничиваться каким-то конкретным минимальным количеством. Количество семян единицы хранения должно быть достаточно для проведения как минимум трех пересевов.
- 11) После засыпки семян в емкость коллекционный образец следует разместить на место своего постоянного хранения в соответствии с порядком размещения Коллекции ВНИИ риса.
- 12) Основными вредителями семян риса являются зерновая моль и ее личинки. Защита коллекции от вредителей имеет большое значение. Наиболее безвредной для работающих с коллекцией сотрудников и эффективной для защиты является обработка семян дихлофосом. Внешнюю поверхность можно эффективно очистить с помощью процедуры поверхностного

обеззараживания. Для обработки каждой единицы хранения от вредителей зерновой моли применяется аэрозольный дихлофос.

13) В процессе хранения коллекции необходимо вести регулярные наблюдения. Помещения, в которых хранятся семена, следует периодически проветривать и обеспечить меры сохранности от повреждений грызунами.

Подготовка семян коллекции к хранению: сушка, очистка, сортировка

1. Для закладки образцов на хранение, прежде всего, надо вырастить высококачественные семена и организовать их своевременную уборку, не допуская потерь.

2. Убранные семена до засыпки в тару на хранение необходимо очистить, просушить и отсортировать. Только в таком состоянии они хорошо сохраняют посевные качества и урожайные свойства.

3. Важным условием сохранности семян коллекции является их оптимальная влажность. При хранении влажных семян наблюдаются значительные потери сухого вещества за счет интенсивного дыхания и деятельности микроорганизмов. Недопустимо закладывать на хранение семена риса Коллекции с повышенной влажностью, так как это может привести к их полной порче за счет самосогревания, слеживания и гниения, развития микрофлоры и зерновых вредителей.

4. Семена риса должны быть просушены в теплице до кондиционной влажности 13,0 - 14%.

5. Сушку зерна коллекционных образцов риса до влажности ниже критической проводят для перевода семян в анабиотическое состояние. Эта процедура применяется для поддержания высокой жизнеспособности семян в течение срока хранения.

6. Сушка зерна коллекционных образцов риса производится с использованием тепла (в теплице на солнце: воздушно-солнечная) и с использованием сушильного термошкафа.

7. Убранные в поле метелки сортообразцов сушатся в течение 20 дней упакованными в бумажный крафт-пакет на стеллажах (1,5 х 3,0 м) теплицы с хорошей циркуляцией воздуха. Пакеты сортообразцов Коллекции раскладывают на стеллажах в теплице в один ярус. Расстояние между стеллажами и полом не менее 25 см, от стены не менее 60 см. Раз в три дня пакеты перекалывают и переворачивают. (7 мин.)

8. Перед закладкой на низкотемпературное хранение семена каждого отдельного образца досушить в течение 2 часов в бумажном пакете при температуре 40 °С до 6–7 % влажности в Инкубаторе-термостате *Barnstead Lab-Line General Purpose* (рисунок 2).



Рисунок 2 – Сушильный термостат

Предельная температура нагрева воздуха для семян риса - 50 °С при влажности семян ниже 18 %, при этом температура нагрева семян не должна превышать 35 °С. В термостат для досушивания закладывают партию образцов. Режим сушки устанавливают после определения влажности зерна убранных образцов. Если влажность семян велика, то в этом случае используют ступенчатую сушку, то есть лишнюю влагу удаляют за несколько приемов сушки, каждый раз убирая по 3-5%. Нельзя за один прием убрать большое количество влаги, так как это может привести к травмированию зародыша и ухудшению качеств семян. (5 мин.)

9. Для закладки семян на краткосрочное хранение (3 года) при положительных температурах допустима влажность зерна 10-12 %.

10. Контроль влажности зерна проводить с помощью влагомера зерна *Helite*, используя инструкцию к прибору. Контроль влажности проводят после сушки в теплице и после сушки в сушильном шкафу. (3 мин.)

11. Для предотвращения самосогревания семена коллекционных образцов необходимо очистить от примесей (особенно влажных). Для специалиста, занятого обработкой и хранением семян, их запах должен быть первоочередным индикатором состояния семян.

12. При подготовке образца коллекции к хранению метелки вытаскивают из пакета, раскладывают на столе на полиэтиленовую пленку и проводят осмотр на наличие примеси, зараженности (с помощью бинокулярной лупы), проводят идентификацию и оценку подлинности образца по ботанической разновидности и морфологии зерна, сравнивая с оригиналом и каталогом Коллекции. Метелки образца из пакета, не соответствующие оригиналу, выбрасываются. (5 мин.)

13. Для идентификации убранных семян с делянки необходимо достать из шкафа в помещении Коллекции банку с идентификационным номером образца, сравнить регистрационный номер на пакете и на банке. (1 мин.)

14. Зерно со всех метелок образца обмолачивают вручную с помощью стеклянной чашки Петри. (2 мин.)

15. Далее проводят очистку и сортировку: поместив зерно на разборную доску или лист белой гладкой бумаги, его тщательно разбирают. Очистку проводят вручную с помощью шпателя, удаляют веточки, посторонние крупные примеси (части растения). Затем всю навеску зерна риса высыпают на набор сит с отверстиями диаметром 3,0; 2,0 и 1,5 мм и отсеивают мелкие примеси (пыль, ости, минеральные остатки). (7 мин.)

16. Необходимо обеспечить максимально высокое качество семян и избегать хранения незрелых семян или семян с механическими или другими повреждениями. Необходимый прием обработки семенного материала коллекции — сортировка. Сортировка — это операция по устранению семян с дефектами, вызванных неправильным сбором или появившихся при сушке или транспортировке сырья, удаление изменивших свою естественную окраску, заплесневевших, поврежденных, битых, щуплых и других дефектных зерен, пустых стерильных колосков.

17. Сортировку и калибровку семян коллекции сложно проводить с помощью набора зерновых сит, так собранное генетическое разнообразие по форме и размерам зерна варьирует от мелкозерных до крупно и длиннозерных ($l/b = 1.5-4.9$). Поэтому после очистки сортировку семян проводят сотрудники УНУ вручную на разборной доске. (3 мин.)

18. Основная задача сортирования — удаление из семенной партии сортообразца мелких, щуплых и легковесных семян, с целью выделения для посева наиболее полноценных крупных тяжеловесных и выравненных семян. Такие семена обеспечивают более высокую полевую всхожесть, лучшую выживаемость растений и долговечность при хранении.

19. После проведения технологических операций по подготовке зерна к хранению проводят закладку, маркировку или упаковку семян в зависимости от режима хранения.

Условия хранения Коллекции риса

1. Лучшей температурой для краткосрочного хранения семян зерновых культур является 5–10°C, но удержать такую температуру можно лишь посредством кондиционеров, что достаточно дорого для хранилищ коллекционных образцов научных учреждений.
2. Высокая эффективность отмечается при длительном хранении замороженных ортодоксальных семян. Понижение не только влажности, но и температуры замедляет метаболические процессы, продлевая долговечность семян. Среди растений с ортодоксальными семенами кукуруза (*Zea mays* L.), пшеница (*Triticum* spp.), рис (*Oryza* spp.) и др. В генбанках и хранилищах семян Коллекций при научных учреждениях принято сохранение коллекционных семян зерновых культур с влажностью 6...8 % в режимах низких положительных температур (+5 °C) и неглубоком замораживании (от -5 до -20 °C).
3. Образцы активной коллекции ВНИИ риса для прикладных целей и фундаментальных исследований закладываются на краткосрочное хранение в сухом состоянии семян с влажностью ниже критической (10-12 %). Влажность выше критической (14—16 %) способствует усилению биохимических изменений, при хранении повышает интенсивность дыхания, семена теряют посевные качества.
4. В условиях среднесрочного хранения (активные коллекции) семена образцов сохраняются охлажденными при температуре 5–10 °C и относительной влажности в 15 ± 3 %.
5. Дублеты, созданные для надежности сохранения, помещают на среднесрочное хранение в охлажденном состоянии при температуре +4,5 и -4,5 °C
6. Наиболее оригинальные образцы, а также дублеты, помещают на долгосрочное хранение (базовые коллекции) при температуре минус 18 ± 3 °C и относительной влажности в 15 ± 3 %.
7. При закладке образцов на низкотемпературное хранение используют в качестве упаковочного материала фольгированные влагонепроницаемые пакеты.
8. Для герметичной упаковки используют ручной импульсный сварщик пакетов *PFS-300* и вакуумный упаковщик *Mini Jumbo Henkelman*.
9. Хранение семян под вакуумом от 10⁻¹ до 10⁻² Мбар дает возможность сохранять всхожесть и энергию прорастания очень долгое время, сокращая частоту пересева коллекционных образцов.
10. Еженедельно проводят контроль температуры хранения семян с помощью низкотемпературного термометра. (1 мин.)

Сроки хранения.

1. Культура рис по классификации семян по долголетию относится к микробиотикам. Краткосрочное хранение предполагает поддержание посевных качеств семян в течение трех лет для риса, и это возможно при окружающей температуре воздуха не выше 25 °C. Для поддержания необходимой температуры в летний период в помещении хранилища Коллекции ВНИИ риса использовать установленную сплит-систему.
2. В зависимости от условий хранения долговечность семян риса может изменяться до 10-30 лет. При влажности 13 % и температуре 0 °C, срок хранения риса 12 лет.
3. В неконтролируемых условиях семена генофонда хранятся при естественной температуре помещения, при влажности семян 12,0-13,0 %, не более 3 лет.
4. Условия долгосрочного хранения позволяют сохранять жизнеспособным материал в течение 30 лет, для чего требуется охлаждение семян и хранение при пониженных температурах. При температуре +4,5 0 °C длительность хранения увеличивается до 5 лет, при температуре -4,5 0 °C – до 10 лет, а при -18 0 °C – до 20-30 лет в зависимости от сортовых и видовых особенностей генотипа риса.
5. На продолжительность сохранения семенами всхожести оказывают влияние доступ воздуха и света, при этом усиливается дыхание семян и затрачиваются запасные вещества зерна, сокращается их долговечность. Семена коллекционных образцов следует хранить в закрытых шкафах без доступа света и в емкостях, ограничивающих доступ воздуха.

6. Периодичность пересева определяется установленным графиком восстановления всхожести и способом хранения образца Коллекции.

Закладка семян образцов на краткосрочное хранение.

1. В тех случаях, когда к образцам коллекции требуется частый доступ, или, когда велика вероятность, что запасы семян будут исчерпаны задолго до прогнозируемого времени утраты жизнеспособности, можно хранить семена в негерметичных контейнерах. Банки пластиковые или стеклянные с завинчивающейся крышкой используют для упаковки гигроскопичного сырья.

2. В целях облегчения доступа к генетическому разнообразию в научных целях, обмена генплазмой, восстановления всхожести, размножения коллекционные образцы риса закладывают в пластиковые или стеклянные лабораторные баночки на краткосрочное хранение.

3. После подготовки свежей репродукции семян к закладке на хранение сотрудник УНУ удаляет из банки остатки зерна прошлой репродукции, очищает емкость от пыли, закладывает в банку метелку оригинала и засыпает семена свежей репродукции. (2 мин.)

4. Вкладывает в банку бирку с регистрационным номером образца и указанием года репродукции. Проводит дезинфекцию семян в банке дихлофосом и плотно закрывает емкость крышкой. (1 мин.)

5. Проверяет сохранность маркировки единицы хранения на банке и меняет наклейку с указанием года репродукции. Ставит тару в шкаф на свое место в соответствии с порядковым номером и правилами размещения образцов в Коллекции. (1 мин.)

Закладка семян образцов на долгосрочное низкотемпературное хранение, упаковка.

Дублирование в целях обеспечения надежности сохранения гарантирует наличие генетической идентичности образца, предназначенной для снижения риска частичной или полной утраты образца Коллекции. Международные стандарты рекомендуют дублировать количество накопленного материала и сохранять дубликаты в разных местах.

1. Понижение температуры служит условием благоприятного режима долгосрочного хранения семян генетических растительных ресурсов. Следует различать хранение при пониженных температурах: выше 0°C и хранение при низких температурах ниже 0°C. Температура ниже 0°C вызывает подмерзание клеток, в результате чего наступает разрушение ее плазменной структуры.

2. Ортодоксальные семена-микробиотики или семена низкого исходного качества могут быстрее портиться во время хранения и не соответствовать стандартам долгосрочного хранения, если не использовать криоконсервацию. Для долгосрочного хранения рекомендована температура -18 °C, так как это самая низкая температура, которую обеспечивает обычный одноступенчатый компрессор морозильной камеры.

3. Требования к упаковке образцов на хранение при низких положительных температурах иные, чем для образцов на хранение в морозильных камерах.

4. Цель упаковки - защита от неблагоприятных факторов при хранении, т.е. упаковка должна обеспечить качественную и количественную сохранность семян. Главные требования к упаковке — она должна быть чистой, прочной, сухой, без посторонних запахов, однородной и соответствующей свойствам зерна.

5. Для низкотемпературного хранения семян Коллекции используется герметичная упаковка. Ламинированная упаковка со слоем металлической фольги достаточной толщины позволяют поддерживать желаемую влажность семян. В Коллекции ВНИИ риса используют пакеты из ламинированной алюминиевой фольги толщиной 11µm.

6. Для упаковки дублетов требуется материал, в котором средний слой выполнен из металлической фольги. Из этого материала делается пакет, запаянный со всех четырех сторон

без усилительных вставок. Таким образом, обеспечивается достаточная влагозащита семян при хранении при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение как минимум 30 лет.

7. После высушивания, все образцы семян необходимо запечатать (запаять с использованием упаковочного оборудования) в герметичные гидроизолированные контейнеры, приемлемые для долгосрочного хранения.



Рисунок 3– Закладка образцов в холодильные камеры в фольгированных пакетах

8. После очистки и достижения семенами желаемой влажности, их следует засыпать в пакет, заложить метелку образца, упаковать и поместить на хранение в холодильные камеры (рисунок 3). Каждый пакет с семенами снабжается внешней и внутренней бумажными этикетками с номером сортообразца для надежной идентификации генплазмы. (3 мин.)

9. Семена, находящиеся на долгосрочном хранении, следует извлекать редко и только в том случае, если закончились семена образца на краткосрочном хранении или семена нуждаются в тестировании всхожести.

10. Для упаковки семян, предназначенных для хранения в холодильниках при пониженных положительных температурах, использовать ручной импульсный сварщик пакетов *PFS-300*. (2 мин.)

11. Для упаковки семян, предназначенных для хранения в холодильниках при отрицательных температурах, использовать Вакуумный упаковщик *Mini Jumbo Henkelman* (рисунок 4,5). (5 мин.)



Рисунок 4– Вакуумная упаковка коллекционных образцов



Рисунок 5 - Вакуумный упаковщик пакетов

13. Списки заложённых на хранение в холодильные камеры образцов составляются в двух экземплярах: один список хранится в Учетной папке, вторая опись хранящихся образцов крепится внутрь холодильной камеры (рис.3) на внутреннюю дверцу каждой полки. (1 мин.)

14. Научный персонал, обслуживающий оборудование УНУ, должен знать их устройство и правила эксплуатации, назначение и технологический процесс сушки, очистки, упаковки зерна, а также действующие правила техники безопасности, производственной санитарии и пожарной безопасности и отвечать за работу на своем рабочем месте.

15. После выполнения СОП для партии образцов необходимо обработать сушильный шкаф изнутри, упаковщик и инструменты этиловым спиртом для дезинфекции. (1 мин.)

16. Сотрудники и лаборанты, работающие с Коллекцией, должны соблюдать режимы сушки зерна и хранения, нормы расхода электроэнергии и ресурсов, соблюдать временной регламент выполнения СОП.

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 50 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Рекомендации по сушке и хранению семян. Под ред. Е.П. Алешина. - Краснодар, 1978. - 20 с.
2. СанПиН 2.3.2.1324-03. Гигиенические требования к срокам годности и условиям хранения пищевых продуктов. – Введ. 25.06.2003. – М., 2003.
3. Методические указания по изучению и сохранению мировой коллекции ячменя и овса / изд. 4, доп. и перераб. под ред. И.Г. Лоскутова. - Санкт-Петербург, 2012. – 64 с.
4. Методы оценки качества зерна риса в процессе уборки и послеуборочной обработки. – Рекомендации.- Краснодар, 1980.-18 с.
5. Казаков Е.Д. Вредные примеси в зерне / Е.Д. Казаков. - Заготиздат, Москва, 1961. - 192 с.
6. Жизнеспособность семян. Перевод с англ. Н.А. Емельяновой, под ред. М.К. Фирсовой. - Москва: Колос, 1978.- 415 с.
7. Ewart A.J. On the longevity of seeds. –Proc. Roy. Soc, Victoria. -1908. -21. 1-210.



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-
исследовательский институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):

**Мониторинг жизнеспособности семян. Определение посевных
качеств образцов риса**

СОП № 06/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 8

Подпись рецензента:

д.б.н. Дзюба В.А.

д. с.-х.н. Зеленский Г.Л.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП является руководством для контроля качества единиц хранения Коллекции с целью коррекции нарушения качества семян генофонда. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса.

СОП применима к образцам риса, включенным в Коллекцию.

Процедуру повторять неоднократно по мере необходимости: при оценке исходной всхожести свежей репродукции; в условиях краткосрочного хранения – не реже 1 раза в три года, для средне- и долгосрочного хранения – 1 раз в 5-10 лет.

Цель: обеспечение надежности сохранения накопленного материала в Коллекции и проведение профилактических работ по оценке сохранности образцов.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения, научных сотрудников (с.н.с. и м.н.с.) и лаборантов УНУ.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

1. Столы лабораторные
2. стол рабочий для регистрации результатов исследования
3. этиловый спирт
4. канцелярские принадлежности (ручка, карандаш)
5. инкубатор-термостат *Barnstead Lab-Line General Purpose, США*
6. компьютер Асер, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt), *Kumai*
7. программное обеспечение Microsoft office-2010
8. шкафы для хранения образцов
9. разборная доска
10. шпатель
11. чашки Петри
12. бумага фильтровальная
13. марля
14. пинцет
15. перчатки, халаты

Эталонные материалы:

- семена единиц хранения

Документирование:

- лабораторный рабочий журнал

Общее описание:

УНУ «ВНИИ риса» обеспечивает накопление и долгосрочное сохранение генофонда и достижений отечественной отрасли рисоводства, а также поддержание национальной коллекции риса ГНЦ ВИР им. Н.И. Вавилова.

Так как семена риса являются живыми организмами, то основные жизненные функции не затухают в них даже в состоянии относительного покоя при хранении. Основой жизнедеятельности любого организма, как известно, является дыхание. Следствием дыхания является потеря сухих веществ, увеличение количества гигроскопической влаги в зерне и повышение относительной влажности воздуха межзерновых пространств.

Период, в течение которого зерно и семена сохраняют свои свойства, называют **долговечностью**. Под хозяйственной долговечностью понимают период хранения при оптимальных условиях, в течение которого всхожесть семян остается кондиционной и отвечает требованиям ГОСТа.

Жизнеспособность – способность семян прорасти и давать всходы, это содержание в семенном материале живых семян, выраженное в процентах. Жизнеспособность определяют для быстрого установления качества семян или выяснения причин их низкой всхожести.

Под всхожестью семян понимают количество нормально проросших семян в пробе в условиях достаточного увлажнения и теплоты, взятой для анализа, выраженное в процентах. **Полевая всхожесть** считается основным интегрирующим показателем качества семян, так как определяется в полевых условиях. **Лабораторная всхожесть** характеризует процент проростков, а полевая — долю всходов от количества высеянных в поле всхожих семян. Полевая всхожесть полевых культур всегда ниже (на 5- 20 % и более) лабораторной всхожести.

Полевая всхожесть зависит от многих факторов, но в первую очередь от **посевных качеств семян** (энергия прорастания, лабораторная всхожесть и сила роста), а также от агротехнологии и экологических условий. Стандартом на сортовые и посевные качества семей предъявляются высокие требования к нормам всхожести. Всхожесть семян риса должна быть не менее 95 %.

Под энергией прорастания, характеризующей дружность прорастания семян, понимают количество нормально проросших семян за определенный срок, установленный для каждой культуры, выраженный в процентах. **Энергия прорастания** - число семян риса, проросших за первые 3 дня, в процентах. Энергия прорастания характеризует скорость и дружность прорастания семян.

Критерием качества признан показатель, названный условно сила роста семян. Определение термина сила роста дается в стандарте СЭВ 6090-87. До настоящего времени нет универсального метода определения силы роста семян. С 1983 г. действуют утвержденные Государственной семенной инспекцией три метода: определение силы роста семян при проращивании в песке, в почве и определение силы роста методом морфофизиологической оценки проростков (в рулонах фильтровальной бумаги). Из-за трудоемкости и громоздкости метода определения силы роста при проращивании в песке и в почве используются редко. **Силу роста** семян характеризует количество сильных (полегших) ростков и выражается в процентах к высеянному семенам.

Чистоту семян (%) при проведении мониторинга посевных качеств коллекционных образцов не определяют, ввиду того, что для хранения закладываются только чистосортные семена образца.

Чтобы начался процесс прорастания семян, необходимы влага, тепло, кислород и для некоторых культур свет. Самая благоприятная температура, при которой прорастание семян идет очень быстро, называется оптимальной, для большинства полевых культур она составляет +25-30 °С.

Обоснование.

Поддержание жизнеспособности, генетической целостности и качества образцов семян в генбанках и хранилищах семян научных учреждений, а также обеспечение возможности их использования являются конечной целью работы Коллекций.

Мониторинг состояния жизнеспособности семян Коллекции риса осуществляют в целях оценки посевных качеств и их динамики, а также оценки эффективности применяемых режимов хранения, для проведения мероприятий по восстановлению качественных показателей в соответствии с СОП.

Основная задача мониторинга посевных качеств генофонда состоит в выявлении утраты жизнеспособности отдельных образцов в процессе хранения прежде, чем она упадет ниже порогового значения (50 %) для восстановления всхожести.

Качественные условия хранения семян способствуют поддержанию всхожести зародышевой плазмы, но даже в оптимальных условиях она уменьшается по мере хранения. Поэтому необходимо периодически ее определять. Для различных сельскохозяйственных культур имеются модели для прогнозирования долговечности семян в широких пределах – от различных условий хранения до замораживания. Стандарты ФАО рекомендуют накапливать и

распространять новые данные, описывающие и уточняющие реакцию различных видов растительных ресурсов на условия хранения.

В Коллекциях следует организовать систему проверки степени жизнеспособности хранящихся образцов через соответствующие интервалы времени, в зависимости от ожидаемой жизнеспособности семян. Некоторые виды из средиземноморских и тропических засушливых регионов произрастания чрезвычайно долговечны. И, наоборот, некоторые виды из холодных, умеренных регионов недолговечны.

Сотрудниками ВНИИ риса установлено, что долговечность семян риса зависит от подвидовой таксономической принадлежности образца, сортовых генотипических особенностей, биохимического состава зерновки, условий произрастания, сроков уборки, а также режимов хранения. Долговечность семян коллекционных образцов варьирует от 3 до 30 лет.

Мониторинг жизнеспособности коллекционных фондов в условиях краткосрочного хранения проводится по мере необходимости, но не реже 1 раза в 3 года. Слишком частые проверки у образцов, заложенных на низкотемпературное хранение, приводят к ненужному расходу семян и ресурсов, возможному их засорению, появлению спонтанных мутаций. С другой стороны, значительное снижение жизнеспособности можно пропустить, если мониторинг проводится с опозданием или слишком редко; прогрессирующее сильное старение образца может привести к генетическим изменениям (случайный или направленный отбор) или полной утрате образца.

Регулярно проводится тестирование образцов на всхожесть, и, если она снижается ниже допустимого уровня (примерно 65 %), то партию обновляют, проращивая семена и получая новую репродукцию. Восстановление всхожести — это наиболее сложная и дорогостоящая часть процесса работы с генофондом. Даже если она проходит успешно в количественном плане, неизбежен инбридинг, который чреват снижением качества обновленных запасов.

Установить жесткий стандарт количества семян для проверки всхожести в генных банках сложно, однако есть стандартные протоколы Международной ассоциации по контролю за качеством семян (ISTA), которые широко используются. Рекомендуется использовать 200 семян для первоначального определения всхожести (ISTA, 2008). Если семян немного, достаточно 100 или даже меньше штук для проверки в двух повторностях.

Следует свести к минимуму количество ценных семян, отбираемых для проращивания. В случае малого размера образца (как это часто бывает с позднеспелыми и интродуцированными образцами), приемлем размер пробы в 50 семян и менее. Проверка на всхожесть является ориентиром для определения жизнеспособности, и даже небольшие пробы семян могут предоставить Кураторам коллекций полезную информацию.

Порядок выполнения:

1. Мониторинг состояния жизнеспособности семян коллекции риса осуществляется в помещении хранилища семян.

2. В Коллекции ВНИИ риса сохраняются только образцы вида *Oryza s.L.* - риса культурного посевного. Известно, что мониторинг-контроль жизнеспособности требует немалых расходов, и генбанки ведут поиск менее затратных процедур. Один из способов – проверка качества семян в выборке, взятой из образцов одного и того же вида и одного и того же года урожая (репродукции). Благодаря такой практике можно установить общие тенденции во влиянии условий года выращивания на качество семян, но при этом не будет учитываться взаимодействие генотипа с условиями конкретного года, которые важны для качества семян.

3. Руководителем Коллекции выдается задание сотрудникам УНУ на выполнение работ по мониторингу – составляется на компьютере список сортообразцов риса для оценки посевных качеств семян. (1 мин.)

4. При формировании списка для проверки жизнеспособности следует учитывать характеристики условий сбора образцов, их различий по времени созревания. Выборка

образцов для контроля жизнеспособности проводится с учетом включения в Список для мониторинга образцов всех групп спелости, разновидностей, но одного года репродукции.

5. При планировании мероприятий по мониторингу следует учесть необходимость сведения к минимуму антропогенных факторов и рациональную частоту мониторинга.

6. Первая выборочная проверка жизнеспособности семян единиц хранения проводится в период послеуборочного дозревания, очистки и высушивания новых репродукций, или не позднее 6 месяцев после уборки урожая (т.е. перед посевом). Данные мониторинга используются при формировании посевной ведомости.

7. Проверка исходной всхожести семян коллекционных образцов должна проводиться как можно раньше, прежде чем семена будут упакованы и помещены на хранение, а последующие проверки проводятся через установленные интервалы в течение срока хранения. Исходный показатель всхожести должен быть не ниже 85 % для большинства образцов коллекции свежей репродукции.

8. Интервалы между проверками в рамках мониторинга жизнеспособности должны соответствовать сроку, в течение которого, как ожидается, что всхожесть упадет ниже 50%. Для краткосрочного хранения это 3 года, а для долгосрочного хранения – 10 лет. Если этот период ухудшения качества нельзя определить расчетным методом, а образцы находятся на долгосрочном хранении при -18°C в герметически запечатанных контейнерах, то этот интервал должен составлять пять лет для видов с невысокой долговечностью (микробиотиков).

9. Образцы более низкого качества (позднеспелые формы) могут оказаться в опасной близости от переломного момента, если жизнеспособность будет снижаться сравнительно быстро. Такие образцы требуют особо тщательного обращения, и первые проверки их жизнеспособности должны осуществляться через каждые 3–5 лет хранения.

10. До начала выполнения процедуры лаборант достает по списку из шкафов емкости с образцами в количестве не более 100 единиц хранения. (1 мин.)

11. Сотрудник проводит сначала оценку качества семян органолептически: по запаху, цвету и их внешним признакам. При закладке в чашки Петри биологической пробы контролируется общее состояние образца после хранения. Перед началом отсчета семян для анализа следует осмотреть весь образец в таре на наличие поврежденных зерен, плесневелых, имеющих внешние изменения зерна. (3 мин.)

12. Лаборант подготавливает требуемое количество чашек Петри, тщательно вымывает, высушивает, обрабатывает изнутри смоченной в этиловом спирте марлей. (3 мин.)

13. Для проращивания семян в качестве подстилки (ложка) применяют фильтровальную бумагу. Фильтровальную бумагу применяют белую, не окрашенную ядовитым составом. Используют ее в форме кружков (в чашках Петри).

14. Следует подготовить требуемое количество кружков фильтровальной бумаги (по количеству образцов в задании). Заложить внутрь чаши Петри кружок фильтровальной бумаги. Сделать простым карандашом надпись номера по каталогу закладываемого коллекционного образца на бумаге на верхней и нижней чаше и дату закладки в термостат. (2 мин.)

15. Сотрудник готовит на компьютере и распечатывает для заполнения формы по мониторингу. При наличии видимых изменений зерна сортообразца делается соответствующая запись в «Форме для регистрации данных по мониторингу» (Приложение 1). (2 мин.)

16. Размеры пробы для проверки жизнеспособности будут зависеть от количества семян образца, но при этом быть максимально большим для обеспечения статистической точности, необходимо свести к минимуму размер такой пробы, чтобы избежать пустой траты семян.

17. Для определения всхожести из фракции чистых семян образца отсчитывают две пробы по 100 шт., для малосемянных образцов - две пробы по 50 семян в каждой. (2 мин.)

18. Для увлажнения подстилки используют воду комнатной температуры. Подстилку (фильтровальную бумагу) увлажняют непосредственно перед закладкой семян на всхожесть. Семена помещают на увлажненное ложе для проращивания (фильтровальную бумагу). Закрывают чашку Петри верхней крышкой. (1 мин.)

19. Перед закладкой в термостат на проращивание готовят всю партию коллекционных образцов (не менее 100 единиц хранения). Меньшее количество экономически неоправданно по затратам электроэнергии. Включают термостат, и чашки Петри с семенами в термостате ставят одну на другую в два яруса. (1 мин.)

20. Нельзя допускать подсыхания подстилки, для этого сотрудники ее увлажняют ежедневно в течение 7 дней проращивания, применяя пульверизатор или лейку. При этом каждый образец ежедневно вынимается из термостата для увлажнения, открывается чашка Петри и вновь ставится в термостат (14 мин.)

21. Проращивание ведут в термостате-растительном в темноте при $25 \pm 3^\circ\text{C}$, для оценки всхожести на 7 день подсчитывают количество проросших семян. Сотрудник Коллекции ежедневно осуществляет контроль температуры в термостате. (1 мин.)

22. Термостат один раз в сутки в течение 7 дней вентилируют путем открывания дверцы на 3-5 мин. для удаления конденсата влаги. (2 мин.)

23. На третьи сутки определяют для каждой единицы хранения энергию прорастания по ГОСТ20290-74. После оценки энергии прорастания чашки Петри с проростками в термостате держат в открытом состоянии. (5 мин.)

24. Для оценки всхожести на 7 сутки чашку Петри вынимают из термостата, подсчитывают число всхожих семян (имеющих нормально развитые корешки размером не менее длины семени и росток не менее половины длины семени (рисунок 1)). Повторяют действие для второй повторности образца. Процент всхожести устанавливают, как среднее арифметическое из двух сотен проанализированных семян. Окончательный результат определения выражают в целых процентах с округлением, при этом доли менее 0,5 % отбрасывают, а доли 0,5 % и более считают за 1 %. (10 мин.)



Рисунок 1- Определение всхожести семян риса

25. Определяют для каждого образца интенсивность роста проростков (в баллах) на 7 сутки. (2 мин.)

26. Проводят учет количества аномально прорастающих семян. Медленное прорастание и увеличение количества аномальных семян нередко оказываются ранними показателями того, что происходит ухудшение всхожести (рисунок 2). К невсхожим относят семена: ненормально проросшие; с уродливыми ростками или корешками; без корешков; с водянистыми или нитевидными корешками без волосков; набухшие семена, которые к моменту окончательного подсчета всхожести не проросли, но имеют здоровый вид и не раздавливаются пинцетом; твердые семена, которые к установленному сроку определения всхожести остались не набухшими и не изменили внешнего вида. К загнившим относят семена с мягким

разложившимся эндоспермом, почерневшим зародышем или семядолями, а также развившиеся корешки, которые ко времени подсчета частично или полностью загнили. (3 мин.)



Рисунок 2 – Определение аномально прорастающих семян в образце риса

27. Одновременно с определением всхожести и энергии прорастания по СОП проводят учет поражения семян плесневыми грибами. Средний процент пораженных семян определяют по двум пробам, после чего устанавливают ее степень. (2 мин.)

28. Все данные и информацию, полученную в ходе мониторинга жизнеспособности, необходимо регистрировать и учитывать в системе документирования. Руководитель УНУ проверяет наличие Форм для регистрации данных по мониторингу (Приложение 1) у сотрудников и лаборантов и регулярность их заполнения. (2 мин.)

29. После мониторинга жизнеспособности семян, образец с низкой всхожестью вносится на компьютере в списки образцов, требующих срочного восстановления всхожести. (1 мин.)

30. По результатам мониторинга исследуемые сортобразцы, разбиваются на категории: 1) без признаков ослабления жизнеспособности; 2) ослабленные; 3) сильно ослабленные; 4) не всхожие. Проверка жизнеспособности должна показать руководителю Коллекции примерный уровень жизнеспособности взятой на проверку выборки образцов.

31. Интервалы между проверками жизнеспособности у образцов, заложенных на низкотемпературное хранение, следует корректировать в соответствии с данными, полученными при оценке всхожести. При ее значительном снижении, интервалы между испытаниями следует сократить, чтобы «отрегулировать» по времени осуществление проверки для соблюдения стандарта жизнеспособности.

32. После проверки жизнеспособности семян все образцы возвращаются на прежнее место хранения в соответствии с Правилами размещения в Коллекции. (1 мин)

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 63 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести.
2. ГОСТ 12039-82 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения жизнеспособности.

3. ГОСТ 12043-88 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения подлинности.

3. ГОСТ 12044-93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями ГОСТ 12045-97.

4. ГОСТ 20290-74 Семена сельскохозяйственных культур. Определение посевных качеств семян. Термины и определения

5. Жизнеспособность семян. Перевод с англ. Н.А. Емельяновой, под ред. М.К. Фирсовой. - Москва: Колос, 1978.- 415 с.

6. Методы оценки качества зерна риса в процессе уборки и послеуборочной обработки. – Рекомендации.- Краснодар, 1980.-18 с.

7. AOSA (Association of Official Seed Analysts). 2005. Page 113 in Capashew, ed. *Rules for testing seeds*, 4–0, 4–11. Las Cruces, New Mexico, USA.

8. Ellis, R.H. & Roberts, E.H. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45: 13–30.

9. Engels, J.M.M. & Visser, L., eds. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.

10. ISTA (International Seed Testing Association). 2008. *International rules for seed testing*. Bassersdorf, Switzerland.

11. Nagel, M. & Borner, A. 2010. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research*, 20: 1–12.

12. Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, eds. 2003. *Seed conservation: turning science into practice*. Chapters 17 and 24. Kew, UK, Royal Botanic Gardens (available at: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsip.htm>).

Приложение 1

ФОРМА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

Номер каталога /год репродукц.	Разновидность	Дата закладки в термостат	Кол-во семян в ЧП, шт.	Кол-во всхожих семян, шт.	Всхожесть семян, %	Интенсив. роста пророст. в ЧП на 7 день, балл	Энергия прорастания на 3 сутки, %	Примечание	Способ хранения образца
0577/15									
0908/15									
02602/15									
02604/15									
02615/15									
04293/15									
04680/15									
119-05/11									

Подпись, Дата



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):
**Подготовка к посеву, восстановление всхожести семян
генофонда риса и размножение (опыт полевой)**

СОП № 07/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 8

Подпись рецензента:

д.б.н. Дзюба В.А.

д. с.-х.н. Зеленский Г.Л.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП устанавливает порядок подготовки к посеву, закладки полевого опыта для восстановления всхожести и размножения семян единиц хранения Коллекции риса. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса.

СОП применима к образцам риса, включенным в Коллекцию.

Закладка коллекционного питомника в полевом опыте повторяется ежегодно для разных сортообразцов, длительность выполнения СОП - с мая по сентябрь.

Цель: организация мероприятий по обеспечению сохранности образцов - закладка коллекционного питомника для полевых оценок, восстановление всхожести, размножение семян генофонда Коллекции риса и уборка.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения, научных сотрудников (с.н.с., м.н.с.) и лаборантов.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

1. Стол лабораторный
2. стол рабочий для регистрации результатов исследования
4. канцелярские принадлежности: ручка, карандаш, маркер черный, клей
5. лабораторные весы *Scout* (0,01); США
6. компьютер Acer, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt), Китай
7. программное обеспечение Microsoft office-2010
8. шпатель
9. пакеты бумажные
10. шпагат льняной
11. мешки полипропиленовые 25 кг
12. колья деревянные 120 см
13. тяпки, тяпка плоскорез
14. линейки 1,5 м – 2 шт.
15. краска белая
16. молоток деревянный
17. минеральные удобрения (мочевина)
18. перчатки тряпичные и латексные
19. ножницы
20. спецодежда, сапоги резиновые

Документирование:

- полевой журнал
- рабочий журнал морфо-биологического описания
- формы описания

Общее описание.

Процесс предпосевной подготовки в УНУ Коллекция «ВНИИ риса» включает следующие работы: отбор и отсыпка семян в посевочные пакеты, составление схемы посева, подготовка и заполнение полевого журнала, проращивание семян (для вегетационного опыта), подготовка инвентаря и опытного участка др.

Полевой опыт - основной метод изучения различных полевых культур в естественных (природных) условиях на специально выделенном участке с использованием оптимальной агротехники, максимально приближенной к производственным условиям. Особенность его состоит в том, что культурное растение изучается вместе со всей совокупностью почвенных, климатических, агротехнических, экологических условиях. При помощи этого метода испытываются новые сорта и гибриды, результаты полевых опытов используют при разработке

технологий возделывания сельскохозяйственных растений, районировании новых сортов и гибридов. В полевом опыте получают свежую репродукцию семян, и размножают семена для дальнейшего хранения и научных исследований.

В полевых опытах экспериментальной единицей служит делянка. В зависимости от ее площади различают микрополевые (до 1 м²), мелкоделяночные (до 10 м²) и собственно полевые опыты (от 20 до 1000 м², в условиях производства >1000 м²). Микрополевые опыты базируются на ручном труде, а обычные - на механизированных технологиях. На таких делянках все работы выполняются вручную, количество растений незначительно, а их агротехника - не типичная для производственных условий. Между учетными площадками оставляют буферные полосы почвы в качестве защиток. Все разнообразие полевых опытов делится на две группы: 1) опыты агротехнические; 2) опыты по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур.

Опыты по сортоиспытанию, где сравниваются при одинаковых условиях генетически различные растения, служат для объективной оценки сортов и гибридов с/х культур. На основании полевых опытов наиболее урожайные, ценные по качеству и устойчивые сортообразцы и сорта Коллекции выделяются как источники и доноры ценных признаков.

Каждый ряд делянок в коллекционном питомнике называют ярусом. Внутри яруса делянки примыкают одна к другой боковыми сторонами. Выбор количества ярусов определяется, с одной стороны, количеством вариантов, размерами делянок, повторностью, а с другой - конфигурацией опытного участка. Обязательно ярусы включают сорта-стандарты.

Обоснование СОП:

Когда запасы семян истощаются, образцы надлежит незамедлительно размножить, чтобы удовлетворять спрос со стороны пользователей Коллекции. По мере возможности, во время получения образца семян необходимо стремиться к тому, чтобы он был достаточно репрезентативен, хорошего качества и в достаточном количестве.

Восстановление всхожести и размножение следует проводить тогда, когда жизнеспособность образца снижается до 50 % (для риса – через 3 года), или когда оставшееся количество семян меньше, чем требуется для выращивания трех репрезентативных популяций образца. Восстановление всхожести в полевых условиях необходимо проводить таким образом, чтобы не нарушить генетическую целостность конкретного образца.

Восстановление всхожести – одна из основных операций любой Коллекции растительных ресурсов, сохраняющей ортодоксальные семена. Это процесс, ведущий к увеличению хранимого количества семян (также называемый «размножением») и повышению жизнеспособности семян до или выше согласованного минимума, который называется порогом восстановления всхожести. Размножение необходимо проводить, когда запас семян исчерпан из-за частого использования этого образца. Для редко запрашиваемых образцов Коллекции большего количества семян не требуется.

Эффективное управление Коллекцией помогает решить, в какой момент лучше всего проводить восстановление всхожести единицы хранения. Окружающие условия места сбора интродуцированного образца следует учитывать при проведении восстановления его всхожести.

Нередко возникают трудности со сбором достаточного количества семян у некоторых видов по причине малого количества семян или растений, либо из-за механизма распространения семян, например, их осыпания. Могут также потребоваться повторные циклы размножения, чтобы обеспечить достаточное количество сохраняемых семян. При этом лучше всего создавать благоприятные экологические условия для производства семян и свести к минимуму конкуренцию между растениями.

Для сохранения генетической целостности образцов Коллекций во время восстановления всхожести семян необходимо правильно отбирать семена из коллекции. Количество семян для посева должно быть достаточным, чтобы гарантировать репрезентативность генетического разнообразия образца и обеспечить наличие одного или более редких аллелей генов.

Методология восстановления всхожести может быть разной для отдельных видов растительных ресурсов и зависит, помимо прочих факторов, от размера популяции, системы размножения и эффективности опыления. Кроме того, по рекомендации ФАО, когда это возможно и целесообразно, процедуру восстановления всхожести рекомендуется использовать также и для описания и изучения восстановленных образцов.

Порядок выполнения процедур:

Подготовительный этап: Подготовка семян к посеву

1. Перед посевом Руководителем Коллекции готовится схема посева, где указывают номер карты и чека оросительной системы ВНИИ риса, на котором планируется закладка коллекционного питомника, дату посева, размер площади участка под коллекционный питомник, предварительное количество делянок и посевная ведомость. (1 мин.)
2. Ориентировочная площадь участка под коллекционный питомник может варьировать от 0,12 до 0,17 га (размер участка от 35 до 50 м). Число сортов, входящих в питомник изучения и размножения изменяется в зависимости от количества образцов по графику плановых пересевов и результатам инвентаризации (от 1000 до 2000 образцов).
3. По количеству образцов в посевной ведомости сотрудники изготавливают посевные бумажные пакеты размером 5,0 x15 см для полевого опыта. (1 мин.)
4. Отсыпку семян образцов риса для посева начинают с начала коллекции в порядке возрастания регистрационных номеров в помещении хранилища семян Коллекции. Исходя из плана-графика посева и результатов инвентаризации коллекции, сотрудник УНУ и лаборант осуществляют отсыпку семян из банок в посевочные бумажные пакеты, сверяя номер образца на банке и на пакете. Для полевого опыта отбирается 140 семян, проводят взвешивание семян на электронных весах, исходя из нормы высева. (3 мин.)
5. Пакеты с семенами заворачиваются конвертиком, подписываются и укладываются на рабочий стол в порядке возрастания идентификационных номеров единиц хранения. (1 мин.)
6. Образцы с достаточным количеством семян (раннеспелые и среднеспелые формы) высеваются в полевом опыте. Раскладку пакетов для посева в полевом опыте и на вегетационной площадке сотрудники делают отдельно на разных столах. (1 мин.)
7. После отсыпки семян сотрудник тщательно проверяет последовательность раскладки пакетов на рабочих столах по номерам каталога и подписывают номер на пакете, соответствующий номеру делянки: например, дел.1 - № 056, дел. 2- № 088, дел. 3- № 094 и т.д. (3 мин.)
8. По посевной ведомости сотрудник Коллекции заполняет «полевой журнал». На титульном листе вписывает культуру, наименование организации, название питомника, наименование темы НИР по госзаданию, ответственного за тему и исполнителей, год посева. Затем вписывают в журнал по порядку номера делянок с соответствующим названием и номером образца по каталогу, а также сведения о происхождении образца (Приложение 1). (3 мин.)
9. В журнале регистрируются и описываются полевой опыт и вегетационный отдельно. Страницы журнала нумеруются, прошиваются. В последующем, после закладки опытов, в полевой журнал заносят данные о наступлении биологических фаз вегетации растений (всходы, цветение, зрелость) и описательные данные образцов, даты внесения минеральных удобрений и обработок. (2 мин.)
10. Подготовленные пакеты с семенами сортообразцов коллекции лаборант сшивает по порядку льняным шпагатом партиями по 100 штук. Связки сортообразцов для посева аккуратно помещаются в полиэтиленовые мешки для транспортировки на поле. (2 мин.)

Закладка полевого опыта для размножения и изучения.

1. Подготовку участка для размещения коллекционного питомника ведут с учетом биологических особенностей и почвенно-экологических требований растений риса.

2. При закладке «Коллекционного питомника» обработка почвы, внесение удобрений, сроки посева, уход за посевами осуществляется в соответствии с агротехническими правилами рисосеяния Краснодарского края.

3. Участок для выращивания риса должен быть оборудован оросительной и сбросной системой, позволяющий своевременно и за короткий срок орошать участок или сбрасывать воду. Верхний слой почвы должен иметь (2-3 см) мелко-комковатую структуру с размером почвенных агрегатов не более 15 мм в диаметре.

4. Коллекционный питомник располагают отдельно от производственных посевов риса. По краям Коллекционного питомника сеют «защитку» - обсев районированным сортом риса.

5. К посеву риса приступают при среднесуточной температуре почвы 11-13 °С. Семена заделываются на глубину 1,5-2,0 см в проделанные трактором бороздки. Предварительно нарезаются полосы для ручного посева трактором с маркером с зубьями через 15 см.

6. Перед закладкой полевого опыта лаборант и сотрудник Коллекции готовят колья (красят белой краской, высушивают, подписывают черным водостойким маркером через 5 номеров, связывают шпагатом по 10 шт.). (15 мин)

7. Посев коллекционного питомника ручной. Для посева мелкоделяночных опытов по реперным кольям шнуром отбивают участок поля, который разбивается с помощью 1,5 м линеек на полосы (ярусы), перпендикулярные его длине, шириной 1 метр, 60 см дорожка между рядами делянок. Все шнуры полипропиленовые привязывают к колышкам по краям поля. Расстояние между рядками 15 см, между делянками 30 см. (рисунок 1). Разбивка участка на ярусы повторяется многократно, путем переноса реперных колея по периметру питомника (30 мин.)



Рисунок 1- Подготовка участка для посева Коллекционного питомника

8. Ширина делянки в коллекционном питомнике составляет 100 см, ширина межделяночных полос 40 см, делянки двухрядковые, ширина рабочей дорожки 60 см. На этапе восстановления всхожести и размножения все образцы высеваются без повторностей, в два рядка по 70 зерновок на каждый.

9. Для посева сотрудники Коллекции сначала проводят последовательную раскладку пакетов с сортообразца, забивку колея через пять номеров. По краям делянок вдоль дорожек ставятся деревянные колья высотой 120 см с нумерацией делянок (рисунок 2). (10 мин.)

10. Семена сеют вручную в борозды, затем присыпают почвой с помощью тяпки или плоскореза. Через каждые 100 изучаемых сортообразцов размещают групповой стандарт из районированных сортов риса (раннеспелый сорт, среднеспелый сорт, позднеспелый (коротко- и длиннозерные сорта). (10 мин.)



Рисунок 2- Посев коллекционного питомника

11. Сразу после посева семян участок заливают водой слоем 7-10 см, который сохраняют до начала наклевывания семян.
12. После появления всходов риса проводят прополку дорожек вручную и обработку сорняков гербицидом. При этом поверхностный слой почвы должен быть слегка подсушен. В дальнейшем слой воды поддерживают на уровне 10-12 см. (15 мин.)
13. Внесение минеральных удобрений под растения риса в течение периода вегетации двукратное. Внесение мочевины на делянки вручную должно быть равномерным. (10 мин.)
14. Расстановка кольев на делянках до получения всходов обеспечивает правильную идентификацию образца в полевых условиях. Это связано с тем, что под воздействием различных внешних факторов или слабой всхожести семян, делянка может быть без всходов (выпадает из посева). Такая полевая маркировка снижает вероятность ошибок и дополнительно гарантирует подлинность образца. Вначале опыта устанавливается этикетка с названием опыта (рисунок 3).



Рисунок 3 - Коллекционный питомник в фазе всходов и перед уборкой

14. Уход за растениями на делянках должен отвечать местным агротехническим требованиям. Важно каждый вид работы выполнять в оптимальные сроки и одинаково на каждой делянке. Необходимо контролировать ситуацию с сорняками и болезнями на протяжении всего цикла выращивания растений риса. Делянки поддерживают в чистоте от сорняков еженедельно в период с июня по август. (60 мин.)

15. Особое внимание следует уделять сохранению сортовой чистоты и подлинности образцов, следует неоднократно делать чистку посевов на наличие нетипичных растений, примесей на делянке в период налива и созревания зерна. Сортовую чистоту делянки определяют при осмотре растений на корню без отбора снопа. (30 мин.)

16. Перед уборкой готовятся бумажные уборочные пакеты (25x35 см) с помощью клея и степлера. Пакеты подписывают по полевому журналу, на них указывают номер делянки, номер образца по каталогу ВНИИ риса и год репродукции. (3 мин.)

17. После проведения сортовой прополки на делянках, по мере созревания зерна сортообразцов разных групп спелости, в сентябре приступают к уборке урожая по 100-200 метелок каждого образца в уборочные крафт-пакеты. Уборка метелок коллекционных образцов ножницами вручную. (15 мин.)

18. Сбор семян следует проводить максимально близко ко времени полного созревания и до естественного осыпания семян, во избежание потенциального генетического засорения и для обеспечения максимального качества семян. Объем собираемого материала должен быть достаточным, чтобы охватить генетическое разнообразие образца. Поэтому с делянки проводят уборку всех растений.

19. Пакеты с образцами выносят из чека на валик, укладывают в мешки полипропиленовые и вывозят с поля в теплицу. После уборки семенного материала коллекции его необходимо тщательно просушить в крафт-пакетах в остекленной теплице на стеллажах. (10 мин.)

20. Уборка и учет коллекционных образцов требуют большого внимания и аккуратности во избежание травмирования, небрежности, излишней поспешности и ошибок, допущенных во время работы.

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 225 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А.Доспехов. - М.: Агропромиздат, 1985. - 351 с.
2. Методические указания по технологии возделывания риса.- Москва: Колос, 1979.- 96 с.
3. Методические указания по изучению мировой коллекции риса и классификатор рода *Oryza s.L.*- ВИР.Ленинград, 1974.- 26 с.
4. Методические указания по изучению и сохранению мировой коллекции ячменя и овса. – изд. 4, доп. и перераб.- ВИР, С.-Петербург, 2012.- 64 с.
5. Ляховкин А.Г. Рис. Мировое производство.- 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: ПРОФИ-ИНФОРМ, 2005.- 288 с.
6. Дзюба, В.А. Генетика риса / В.А. Дзюба. – Краснодар, 2004. – 284 с.
7. M.E. Dooloo, I. Thormann, M.A. Jorge & J. Hanson, eds. *Crop specific regeneration guidelines*. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 6 pp. Also see: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/>
8. Engels, J.M.M. & Visser, L., eds. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.
9. Reed, B.M., Engelmann, F., Dooloo, M.E. & Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.
10. SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base. Field genebanks (available at: <http://cropgenebank>).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Форма заполнения данных в «полевом журнале»

№ делянки	№ каталога	Наименование образца	Происхождение	Разновидность	Дата всходов	Дата выметывания	Дата спелости	Густота на дел., балл	Высота растений, см	Примечание
25	044	б/н	ВНИИ риса	italica	28.05	19.07	25.08	7	96,0	Узколистный
....										
....										



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):

**Подготовка к посеву, восстановление всхожести семян
генофонда риса и размножение (опыт вегетационный)**

СОП № 08/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 7

Подпись рецензента:

д.б.н. Дзюба В.А.

д. с.-х.н. Зеленский Г.Л.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП устанавливает порядок подготовки к посеву, закладки вегетационного опыта для восстановления всхожести и размножения семян единиц хранения Коллекции риса. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса.

СОП применима к образцам риса, включенным в Коллекцию.

Закладка вегетационного опыта повторяется ежегодно для разных сортообразцов, длительность выполнения СОП - с мая по октябрь.

Цель: организация мероприятий по обеспечению сохранности образцов, восстановление всхожести и размножение семян позднеспелых и малосемянных образцов Коллекции риса, а также поддержание образцов риса национальной коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения, научных сотрудников (с.н.с. и м.н.с.) и лаборантов.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

1. Стол лабораторный
2. стол рабочий для регистрации результатов исследования
3. канцелярские принадлежности (ручка, карандаш, стерка)
4. инкубатор-термостат *Barnstead Lab-Line General Purpose; США*
5. чашки Петри
6. шпатель
7. пакеты бумажные 3,5 x 10,0 см
8. шпагат льняной
9. сосуды (ведра, оцинкованные 8-10 л)
10. этикетки ламинированные на сосуды
11. шланг поливочный
12. минеральные удобрения (мочевина)
13. перчатки хлопчатобумажные и латексные
14. ножницы
15. спецодежда, полотенца
16. пинцет
17. бумага фильтровальная
18. этиловый спирт
19. компьютер Acer, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt), Китай
20. программное обеспечение Microsoft office-2010
21. лабораторные весы *Scout (0,01)*, США
22. марля

Документирование:

- полевой журнал
- формы описания

Общее описание.

Процесс предпосевной подготовки в УНУ Коллекции «ВНИИ риса» включает следующие работы: отбор и отсыпка семян в посевочные пакеты, составление схемы посева, подготовка посевного журнала, проращивание семян и подготовка инвентаря.

Вегетационные опыты проводятся в искусственных условиях, в вегетационных сосудах в агрономически обоснованной обстановке, регулируемой экспериментатором. Сосуды для вегетационных опытов применяются из самых различных материалов: стекла, глины, оцинкованного железа, пластика. А в качестве субстрата (среды) для растений может

использоваться вода, песок, почва и т.д. Экспериментальными единицами служат сосуды, заполняемые почвой. Для коллекций вегетационный опыт – это способ поддержания всхожести и размножения малосемянных, очень позднеспелых или особо ценных зарубежных форм культуры после низкотемпературного хранения в морозильных камерах. Искусственные условия дают возможность исключить все неблагоприятные не изучаемые факторы и выявить значение того или иного из них в возможно более чистом виде.

Для интродукционного исходного материала важным является адаптивность сорта к конкретным агроэкологическим условиям выращивания. На основании вегетационных опытов устанавливают ритм развития и адаптивность интродуцированных зарубежных генотипов, выделяют образцы с отличительными маркерными признаками или морфотипом растения, выделяют перспективные для селекции образцы.

Обоснование СОП:

Восстановление всхожести – одна из основных операций любой Коллекции растительных ресурсов, сохраняющей ортодоксальные семена. Это процесс, ведущий к увеличению хранимого количества семян (также называемый «размножением») и повышению жизнеспособности семян до или выше согласованного минимума, который называется порогом восстановления всхожести. Размножение необходимо проводить, когда запас семян исчерпан из-за частого использования этого образца. Для редко запрашиваемых образцов Коллекции большего количества семян не требуется.

Генофонд активной коллекции риса находится на краткосрочном хранении, требующий поддержания всхожести семян путем пересева. Наряду с традиционным (краткосрочным) методом сохранения семян генетических ресурсов риса существует наиболее перспективный подход к длительному сохранению жизнеспособности семян – низкотемпературное хранение. Использование этого метода позволяет продлить период долговечности семян и снизить затраты на репродуцирование коллекции без частых пересевов. Предпочтительной температурой хранения семян по рекомендации ФАО считается $t = -18-20$ °С. Однако многолетние исследования показали, что после долгосрочного хранения репродуцируется лишь около 70 % коллекционных образцов, даже в контролируемых низкотемпературных условиях семена риса утрачивают жизнеспособность, что затрудняет обновление их всхожести.

Для поддержания всхожести после длительного низкотемпературного хранения по договору между ВНИИ риса и ФИЦ ВНИИР им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург) и филиалом ВИР «Кубанский генетический банк семян» (п. Ботаника) ежегодно поступают 300 образцов риса, которые высаживаются в сосуды проростками через чашки Петри. Полученная репродукция семян на вегетационной площадке подготавливается для дальнейшего пересева и размножения в полевых условиях.

Порядок выполнения процедур:

Подготовительный этап: Подготовка семян к посеву в сосуды

1. По базе данных Руководитель коллекции проводит сверку наличия позднеспелых форм в схеме посева, планируя их поддержание в вегетационном опыте. (1 мин.)
2. Число сортов, высеваемых на вегетационной площадке для изучения и размножения изменяется в зависимости от количества образцов по графику плановых пересевов и результатам инвентаризации (от 600 до 650 образцов). Перед посевом Руководитель Коллекции составляет план посева на вегетационной площадке, где указывают дату посева, предварительное количество сосудов и посевную ведомость. (1 мин.)
3. Перед посевом сотрудники по количеству сортов заготавливают посевные бумажные пакеты размером 3,5x10 см для вегетационного опыта.
4. Исходя из плана-графика пересева и результатов инвентаризации коллекции, сотрудник УНУ и лаборант осуществляют отсыпку семян из банок в посевочные бумажные пакеты, сверяя

номер образца на банке и на пакете. Для вегетационного опыта отбирается 50 зерновок. Отсыпку семян образцов риса для посева начинают с начала коллекции в порядке возрастания регистрационных номеров в помещении хранилища семян Коллекции. (1 мин.)

5. Пакеты с семенами заворачиваются конвертиком, подписываются и укладываются на рабочий стол в порядке возрастания идентификационных номеров единиц хранения. (1 мин.)

6. Раскладку пакетов для посева в полевом опыте и на вегетационной площадке делают отдельно на разных столах.

7. После отсыпки семян тщательно проверяют последовательность раскладки пакетов на рабочих столах по номерам каталога и подписывают номер на пакете, соответствующий номеру сосуда: например, сос.1 - № 056, сос. 2- № 088, сос. 3- № 094 и т.д.

8. Составляют «полевой журнал». В журнале регистрируются и описываются полевой опыт и вегетационный отдельно. Страницы журнала нумеруются, прошиваются. На титульном листе вписывают культуру, наименование организации, наименование темы НИР по госзаданию, ответственного за тему и исполнителей, год посева. Затем вписывают в журнал по порядку номера сосудов с соответствующим названием и номером образца по каталогу, а также сведения о происхождении образца (Приложение 1). (2 мин.)

9. В последующем, после закладки опыта на площадке в полевой журнал заносят данные о наступлении фаз вегетации (всходы, цветение, зрелость) и описательные данные образцов, даты внесения минеральных удобрений и обработок.

10. Подготовленные пакеты с семенами сортообразцов коллекции складываются партиями по 50 штук. Аккуратно помещаются в картонные коробки для переноса на вегетационную площадку института. (1 мин.)

11. Образцы мировой коллекции ВИР после низкотемпературного хранения закладываются в одной повторности в чашки Петри по 50 зерновок для проращивания в Инкубаторе-термостате Barnstead Lab-Line General Purpose. В чашку Петри вкладывают фильтровальный кружок, подписывают карандашом номер сосуда и каталожный номер образца. (3 мин.)

12. Для увлажнения подстилки используют воду комнатной температуры. Подстилку (фильтровальную бумагу) увлажняют непосредственно перед закладкой семян на всхожесть. Семена помещают на увлажненное ложе для проращивания (фильтровальную бумагу). Закрывают чашку Петри верхней крышкой. (1 мин.)

13. Перед закладкой в термостат на проращивание готовят всю партию коллекционных образцов 300 единиц хранения. Включают термостат и чашки Петри с семенами в термостате ставят одну на другую в два яруса. (1 мин.)

14. Нельзя допускать подсыхания подстилки, для этого сотрудники ее увлажняют ежедневно в течение 3 дней проращивания, применяя пульверизатор или лейку. При этом каждый образец ежедневно вынимается из термостата для увлажнения, открывается чашка Петри и вновь ставится в термостат (2 мин.)

15. Проращивание семян ведут в термостате-растительне в темноте при $25 \pm 3^\circ\text{C}$ в течение 3-х дней. Термостат один раз в сутки вентилируют путем открывания дверцы на 3-5 мин. для удаления конденсата влаги. (1 мин.)

16. На третьи сутки чашки Петри с проростками выставляют на столы для дорастивания на свету до появления зеленой окраски и держат в открытом состоянии с ежедневным увлажнением до 10 дней. (10 мин.) (рис.1)

17. На седьмые сутки подсчитывают число проросших семян для каждой единицы хранения, определяют всхожесть по ГОСТ 12038-84. Результаты оценки всхожести заносят в распечатанные на компьютере формы для заполнения. Не проросшие семена в чашках Петри выбраковываются Руководителем Коллекции с внесением соответствующей информации в формы для заполнения. (3 мин)



Рисунок 1- Получение проростков для высадки в сосуды на вегетационной площадке

Закладка вегетационного опыта.

1. Интродукционные сортообразцы, а также малосемянные образцы рабочей коллекции и ВИР после низкотемпературного долгосрочного хранения высевают на вегетационной площадке в открытой теплице ВНИИ риса в сосуды.

2. Перед посевом готовят оцинкованные ведра (8-10 л), красят изнутри битумным лаком, ламинируют этикетки с номером сосуда. (5 мин.)

3. Сосуды лопатой заполняют почвой на 2/3, привезенной грузовым автомобилем ГАЗ с рисового поля, оставляя свободный объем для полива растений риса водой. Сосуды с почвой ставят на четырехколесную телегу и перевозят на вегетационную площадку. (6 мин)

4. Посев на вегетационной площадке в 8-10 литровые сосуды, заполненные почвой, осуществляют проростками через чашки Петри или сухими семенами (по 50 зерновок на сосуд). Перед посевом семян в сосуды делают раскладку пакетов по номерам сосудов (3 мин.)

5. Высаженные образцы сухими семенами, в фазе первого листа прореживают в сосудах и делают расстановку, оставляя 15 здоровых проростков на сосуд, рисунок 2. (5 мин.)

6. В рабочем журнале отмечают дату посева сухими семенами и дату высадки проростков на вегетационной площадке (1 мин.)

7. Внесение удобрений, сроки посева, уход за посевами осуществляется в соответствии с агротехническими правилами рисосеяния Краснодарского края. Основное внесение удобрений в сосуд перед посевом, затем 2 подкормки растений мочевиной в фазу 3-4 листа и в кушение. Перед внесением удобрений в сосуд проводят взвешивание однократной дозы удобрений на лабораторных весах Scout (0,01). (5 мин.)

8. По мере роста и развития растений риса повышают слой воды в сосуде до 8-10 см с помощью поливочного шланга и поддерживают ежедневным поливом в течение вегетации растений до полного созревания зерна. Полив сосудов осуществляют лаборант или сотрудник в период с 10 мая по 28 сентября ежедневно, исключая выходные дни. (110 мин.)

9. Сотрудникам УНУ следует применять методы контроля, снижающие риски распространения болезней генофонда коллекции. Необходимо еженедельно контролировать ситуацию на вегетационной площадке с сорняками и болезнями на протяжении всего цикла выращивания растений риса. Особое внимание следует уделять сохранению сортовой чистоты и подлинности образцов (10 мин.)



Рисунок 2- Размножение и восстановление всхожести Коллекции на вегетационной площадке ВНИИ риса

10. Перед уборкой готовятся бумажные уборочные крафт пакеты (25 x3 5 см) на которых должен быть указан номер сосуда, номер образца по каталогу ВНИИ риса и год репродукции. (1 мин.)

11. Уборку в фазу полной спелости зерна риса в вегетационном опыте проводят вручную ножницами, срезая все метелки с одного сосуда в бумажный крафт-пакет, по мере созревания зерна сортообразцов разных групп спелости. (8 мин.)

12. Дозревание зерна в колосе (или метелке) до обмолота улучшает его посевные качества - повышает энергию прорастания и всхожесть, а также силу роста. Поэтому семена риса с метелок коллекционных образцов сразу не обмолачиваются, их оставляют в таком виде на период послеуборочного дозревания, перенося для просушивания в бумажных пакетах в остекленную теплицу. Пакеты с метелками сортообразцов раскладывают на металлических стеллажах для просушивания. (1 мин.)

13. Для обеспечения генетической идентичности каждого образца следует избегать любой засоренности и смешения образцов. Восстановление всхожести и размножение призваны, в конечном итоге, обеспечить отсутствие потерь каких-либо единиц хранения в коллекции.

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 183 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

3. Методические указания по изучению мировой коллекции риса и классификатор рода *Oryza s.L.*- ВИР. Ленинград, 1974.- 26 с.

4. Методические указания по изучению и сохранению мировой коллекции ячменя и овса. – изд. 4, доп. и перераб.- ВИР, С.-Петербург, 2012.- 64 с.

5. Ляховкин А.Г. Рис. Мировое производство.- 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: ПРОФИ-ИНФОРМ, 2005.- 288 с.
6. Дзюба, В.А. Генетика риса / В.А. Дзюба. – Краснодар, 2004. – 284 с.
7. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести.
8. М.Е. Dulloo, I. Thormann, М.А. Jorge & J. Hanson, eds. *Crop specific regeneration guidelines*. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 6 pp. Also see: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/>
9. Engels, J.M.M. & Visser, L., eds. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.
10. Lawrence, L. 2002. A comprehensive collection and regeneration strategy for *ex situ* conservation. *Genetic resources and crop evolution*, 49(2): 199–209.
11. Reed, В.М., Engelmann, F., Dulloo, М.Е. & Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Форма заполнения данных вегетационного опыта в «полевом журнале»

№ сосуда	№ каталога	Наименование образца	Происхождение	Разновидность	Дата всходов	Дата выметывания	Дата спелости	Высота растений, см	Примечание
25	044	б/н	ВНИИ риса	italica	28.05	19.07	25.08	96,0	Узколиственный
....									
....									



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):
Морфо-биологическое описание генофонда риса

СОП № 09/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 9

Подпись рецензента:

д.с.-х.н. Ковалев В.С.

д.б.н. Мухина Ж.М.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП, устанавливает порядок и методологические основы полевой оценки коллекционных образцов риса по биологическим и морфологическим признакам. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса. Может быть использована в отделе селекции при оценке сортов, гибридов и селекционных форм риса.

СОП относится к методам характеристики и применима к образцам риса, включенным в Коллекцию.

Процедуру проводят ежегодно в период вегетации риса на орошаемом участке ВНИИ риса. Место выполнения СОП: полевой опыт на оросительной системе - коллекционный питомник.

Цель: выделение источников полезных признаков в результате полевых испытаний, обеспечение комплексной оценки образцов риса, организация качества научно-исследовательской работы с генофондом коллекции.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения и научных сотрудников (с.н.с., м.н.с.).

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

- Стол рабочий для заполнения документации.
- компьютер Acer, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt), Китай
- сканер Hp Scanjet G4050, Китай
- программное обеспечение Microsoft office-2010
- линейки 50 см и 1,5 м
- транспорт
- канцелярские принадлежности (ручка, карандаш)
- спецодежда, сапоги резиновые

Документирование:

- полевой журнал
- рабочий журнал

Общее описание:

Изучение мирового генофонда сельскохозяйственных культур – важное направление исследований Коллекций.

Описание заключается в составлении характеристик генофонда растений. Описание можно делать на любом этапе процесса сохранения до тех пор, пока образец содержит достаточное количество семян. О сохраняемой зародышевой плазме должно быть собрано как можно больше информации и максимально подробных фенотипических описаний, чтобы гарантировать ее наилучшее использование селекционерами. Наличие комплексной оценки максимально повышает ценность Коллекции. Использование согласованных на международном уровне стандартов описательных данных повышает ценность публикуемых сведений. Описание позволяет выявить разнообразие между образцами и внутри образца. Чрезвычайно важно документирование всех наблюдений и результатов применяемой системы оценки генплазмы.

Описание требует большого объема времени и затрат. В научных учреждениях, держателях Коллекций ортодоксальных семян культурных растений, объединяют проведение описания с размножением или восстановлением всхожести образцов. При этом ФАО рекомендует проводить повторные описания высоко наследуемых признаков. Характеристики и признаки сельскохозяйственных культур выбираются для описания специалистами по культурам и/или кураторами Коллекций. Учет данных должен вестись обученным персоналом с использованием стандартов и шкал для измерения параметров в соответствии с рекомендациями по сельскохозяйственным культурам. Также известно, что справочные коллекции (гербарные

образцы, справочные коллекции семян, фотографии) играют немаловажную роль для определения типичности образца.

Степень достоверности данных, собранных разными специалистами, может различаться и зависит от подготовки и опыта сотрудников. Поэтому в течение всего вегетационного периода учетом и документированием описательных данных должен заниматься научный персонал, обученный в области генетических ресурсов растений. Определение некоторых признаков, например, содержания масла или белка, требует лабораторных анализов, которые либо не всегда возможны, либо могут оказаться дорогостоящими.

При работе с генетическими ресурсами используют все многообразие методов анализа. Методы оценки подразделяют на три группы: 1) полевые, 2) лабораторные, 3) лабораторно-полевые. 4) оценки на обычных и провокационных фонах; 5) оценки по прямым и косвенным показателям; 6) оценки на различных этапах селекционного процесса.

Обоснование СОП:

Коллекционный питомник — питомник, в котором проводят первичное изучение нового исходного материала, отбор элитных растений для гибридизации или селекционного питомника и поддержание жизнеспособности генофонда.

Полевая и лабораторная оценка образцов Коллекции проводится с целью получения разносторонних сведений о биологических, морфологических свойствах и хозяйственно-ценных признаках сортообразцов, выделения наиболее перспективного исходного материала (источники и доноры) для решения актуальных задач селекции. Наличие такого рода информации в базах данных Коллекции позволяет осуществлять более целенаправленную идентификацию зародышевой плазмы для удовлетворения потенциальных потребностей пользователей.

Все разнообразие форм возделываемого риса укладывается в определенную схему по ряду важнейших признаков. К ним относятся признаки вегетативных частей растения (морфологические), репродуктивных органов и биологические, связанные с жизнью самого растения.

К биологическим свойствам растительных ресурсов относятся: тип размножения, продолжительность жизни (однолетник, двулетник, многолетник), тип развития (яровой, озимый, двуручка), даты прохождения и продолжительность отдельных фенологических фаз и всей вегетации, требования к теплу и влаге.

Морфологические признаки основаны на характеристике внешних признаков и особенностях внутреннего строения. Описание морфологических признаков охватывает форму, окраску, размеры растения и зерна.

При изучении исходных форм основное внимание уделяется характеристике ботанико-морфологических и биологических свойств, ценных в селекционном отношении. К таким важным показателям для риса относятся: 1. Продолжительность вегетационного периода; 2. Прохождение отдельных фаз развития – структура вегетационного периода; 3. Вегетативные признаки (длина стебля, облиственность, форма куста и метелки и т.д.); 4. Остистость; 6. Окраска листьев, зерна и чешуй; 7. Таксономическая принадлежность.

Определение таксономической принадлежности образца связано с внешними различиями подвидов и разновидностей риса. Вид — это совокупность экотипов, отличающихся друг от друга рядом внутренних и внешних признаков, имеющих значение в выживании вида. Экотипы могут различаться морфологически, но это не обязательно. Так, у полиморфных видов разным местообитаниям часто соответствуют экотипы, отличающиеся формой роста, размерами листьев, опушением и другими признаками, но у большинства растений экологически различающиеся формы внешне не отличаются.

Порядок выполнения процедур.

Общая схема изучения генетического разнообразия Коллекции риса.

1. Предварительная оценка зарубежной генплазмы на карантинном питомнике.
2. Предварительная оценка отечественных селекционных форм в селекционном или контрольном питомнике.
3. Первичная оценка биологических свойств по адаптивности к условиям выращивания (период вегетации, устойчивость к полеганию и осыпанию) и получение репродукции в коллекционном питомнике.
4. Размножение, описание ботанико-морфологических свойств, оценка продуктивности и ее элементов, сравнение со стандартами в коллекционном питомнике.
5. Углубленное изучение лучших образцов в полевых и лабораторных условиях (пищевые, биохимические, технологические качества, иммунологическая оценка, устойчивость к стрессовым факторам) в структурных подразделениях института.
6. Обработка и анализ данных в лабораторных условиях УНУ. Дифференциация выделенных образцов в «признаковые» или «генколлекции».
7. Генетическое, молекулярное, ботаническое и селекционное изучение генетического разнообразия вида в структурных подразделениях ВНИИ риса.
8. Идентификация коллекционных образцов в процессе сохранения в составе Коллекции включает: идентификацию с ботанической точки зрения (культура, вид, разновидность); идентификацию в сравнении с оригиналом; идентификация в полевых условиях по известным характеристикам и описаниям образца; цитогенетический анализ и молекулярная идентификация генов.

Фенотипирование образцов Коллекции риса в питомнике.

1. Оценка исходного материала осуществляется путем непосредственного его осмотра, измерения растений или их органов, подсчета в условиях полевого опыта. Прежде всего, необходимо разместить изучаемый материал на поле в соответствии со схемой опыта.
2. Полевые опыты по оценке морфо-биологических свойств растений сортообразцов коллекции риса проводят в равных условиях, обеспечивающих нормальное развитие культуры.
3. В коллекционном питомнике проводят подробное изучение биологических и морфологических особенностей растений интродуцированных генотипов риса зарубежной селекции для выделения перспективного исходного материала для отечественной селекции. Оценки и описания сортообразцов риса в коллекционном питомнике проводят в течение всего вегетационного периода, для каждого отдельного признака – в определенную фазу (рисунок1).
4. В течение вегетации рис проходит следующие фазы: прорастание, всходы, кущение, выход в трубку, выметывание, цветение и созревание. Переход от одной фазы к другой происходит по биологическим законам количественных и качественных изменений в организме растения, что приводит к появлению морфологических признаков. Продолжительность периода вегетации риса варьирует в зависимости от генотипа от 85 до 140 дней.
5. Наблюдения и описания в полевом опыте проводят в период с мая по август. Чтобы проследить за ходом развития растений и наступлением основных фаз, необходимо организовать наблюдения, регистрируя в полевом журнале даты, когда в фазу развития вступило 75 % растений на делянке.
6. Фенологические наблюдения в коллекционном питомнике проводятся систематически (через каждые три дня), так высейнное генетическое разнообразие имеет широкий спектр вариации признака по скорости развития растений и созревания. Для коллекционных образцов отмечают в журнале даты наступления фаз вегетации: всходы-цветение-полная спелость. (15 мин.)
7. Оценку и описание сортообразцов в коллекционном питомнике проводят по деляночно, делая запись в рабочем журнале наблюдений, сверяя номер делянки и номер сортообразца по каталогу Коллекции.

8. При оценке исходного материала использовать: описание, балльную шкалу оценки и цифровые значения, применяя: непосредственное измерение определенного количества растений или частей растений; визуальную оценку группы растений или частей растений на делянке.



Рисунок 1 – Вид коллекционного питомника ВНИИ риса в фазу кушения и полной спелости зерна

9. Для проведения визуально-балльной оценки использовать международную *девятибалльную систему* по Международному классификатору признаков СЭВ, позволяющую лучше дифференцировать оценку: Показатели 1-2-3-4-5 по пятибалльной шкале соответствуют показателям 1-3-5-7-9 по девятибалльной системе оценки. При этом балл 1 присваивается лучшему (желательному) показателю признака, а 9- не желательному. *Например:* 1-высокоустойчив, 9- не устойчив.

10. При изучении биологических и морфологических признаков использовать систему оценок по форме, приведенной в Приложении 1. Выборка 18 признаков растений и зерна для изучения в коллекционном питомнике проведена с учетом формирования базы данных Коллекции, особенностей накопленного генофонда и востребованности информации пользователями коллекции.

11. В коллекционном питомнике, где много образцов, невозможно осуществить весь объем оценок по комплексу признаков в один год. Подробное описание и изучение генофонда проводить поэтапно в последующие годы пересевов. При необходимости количество изучаемых признаков может быть расширено в соответствии с классификатором признаков рода *Oryza* L.



Рисунок 2 – Образцы риса для описания морфологических признаков зерна и метелки

12. Фенотипическое описание коллекции проводят, когда растения находятся в поле, регистрацию соответствующих признаков по балльной системе для составления описания осуществляют в оптимальное для культуры рис время. Оценку морфологических признаков зерна (форма, окраска, опушение, размеры) проводят в лабораторных условиях после уборки, используя компьютер и сканер Hp Scanjet G4050, систему анализа изображений. (Рисунок 2). Время, затрачиваемое на сканирование и оцифровку изображений одного образца - 15 мин.

13. Для оценки каждого образца следует использовать репрезентативное количество растений (не менее 10 шт.).

14. Для описания, измерений и визуальной оценки используют случайную выборку группы растений, исключая крайние на делянке. Измерения каждого отдельного растения используются для вычисления среднего значения. В журнал заносят средние значения оценки сортообразца.

15. Определение принадлежности образца к ботанической разновидности проводят в фазу спелости зерна, используя при этом классификацию А.Г. Ляховкина (1994), основанную на морфологических признаках зерна. (5 мин.)

При определении разновидностей риса обыкновенного важными отличительными морфологическими признаками являются:

- Остистость (наличие или отсутствие остей);
- Окраска цветковых чешуй (от соломенно-желтой, красной, коричневой до темно-фиолетовой и черной.);
- Размеры и окраска колосковых чешуй.
- Окраска остей (может иногда отличаться от окраски несущих их цветочных чешуй);

- Окраска зерна (белая, красная, коричневая, черная, темно-коричневая).

- Консистенция эндосперма зерновки риса: стекловидная, мучнистая.

17. Описание вегетативных признаков растения необходимо для более полной характеристики образца коллекции и определения его морфотипа. Измерению линейкой подлежат следующие признаки: высота растений, длина флагового листа, ширина флагового листа, угол отхождения флагового листа от соломины измеряют транспортиром, остальные признаки оценивают глазомерно.

18. Высоту растений измеряют линейкой (1,5 м) от уровня почвы до верхнего колоска метелки в выпрямленном состоянии. Высота растений взаимосвязана с устойчивостью растений к полеганию и К хоз.

19. Площадь флагового листа вычисляют путем умножения показателя измерения линейкой длины флаг-листа (ДФЛ) на ширину флаг-листа (ШФЛ), на коэффициент 0,82 - для культуры рис.

20. Система оценки морфо-биологических признаков образцов включает 18 признаков, на каждый признак в среднем затрачивается 12 мин. (216 мин.)

21. Все данные и сведения, полученные в процессе описания, оценки и поддержания в жизнеспособном состоянии способствуют улучшению использования зародышевой плазмы, идентификации отдельных образцов, охватывают широкий спектр сведений о полиморфизме признаков генетического разнообразия Коллекции риса. Вся полученная информация подлежит документированию в рабочих журналах УНУ.

23. Куратору Коллекции необходимо обеспечить ведение надлежащей регистрации всей информации, связанной с оценкой и управлением Коллекции, и надлежащее ее сохранение на цифровых носителях. (2 мин.)

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 253 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Сметанин А.П. Методика селекционных работ по рису /А.П. Сметанин, В.А. Дзюба, А.И. Апрод // Методика опытных работ по селекции, семеноводству, семеноведению и контролю за качеством семян риса. – Краснодар, 1972. – 96 с.

2. Ляховкин, А.Г. Состав и классификация риса *Oryza Sativa L.* / А.Г. Ляховкин. – Ханой, 1994. – 72 с.

3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. - М.: Агропромиздат, 1985. - 351 с.

4. Методические указания по изучению мировой коллекции риса и классификатор рода *Oryza L.* -1982.

5. Alercia, A., Diulgheroff, S. & Mackay, M. 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors* (MCPD V.2). Rome, FAO and Bioversity International (available at: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).

6. Lehmann, C.O. & Mansfeld, R. 1957. Zur Technik der Sortimentserhaltung. *Kulturpflanze*, 5: 108–138.

7. UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). Test Guidelines – English Index (available at: http://www.upov.int/en/publications/tg_rom/tg_index.html).

8. USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Online Database] Evaluation/characterization. Data Queries. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, USA (available at: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/croplist.pl>).

9. Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. 2006. *Manual of seed handling in genebanks*. Handbooks for Genebanks No. 8. Rome, Bioversity International. UPOV. Test Guidelines – English Index (available at: http://www.upov.int/en/publications/tg_rom/tg_index.html).

Система оценок признаков в Коллекционном питомнике

Наименование признака	Числовое значение (градация признака)	Описание	Шкала оценки в баллах	Оптимальное время учета: фаза вегетации
Фенология: всходы, цветение, спелость	Дата наступления фазы вегетации	-	-	50% на делянке
Фенология: время созревания, дней	менее 100 101- 110 111-120 121-130 более 130	очень раннеспелый раннеспелый средеспелый средне-позднеспелый позднеспелый	1 3 5 7 9	У 50% растений полная спелость
Окраска листовой пластинки	-	светло зеленая зеленая темно-зеленая фиолетовая края антоциановые	1 3 5 7 9	в фазу трубкования
Угол отклонения флагового листа от стебля, градусы	до 15 градусов 15-30 град 30-45 град 50-70 град 80-90 град более 90 градусов	эректоидное вертикальное полувертикальное промежуточное горизонтальное загнутое или пониклое	1 3 5 7 9	В фазу цветения
Длина флагового листа, см	до 17 18- 25 26 -40 более 40	короткая средняя длинная очень длинная	3 5 7 9	В фазу цветения
Ширина флагового листа, см	до 1,0 1,1-1,5 1,6-2,0 более 2,0	узкий средний широкий очень широкий	1 3 5 7	В фазу цветения
Площадь флагового листа	-	низкая средняя высокая очень высокая	1 3 5 7	-
Окраска междоузлий	-	отсутствует присутствует	1 9	В фазу цветения
Форма куста, расположение побегов относительно уровня почвы	80-90 градусов 80-70 градусов 70-60 градусов 60-50 < 45 градусов	прямостоячий слаборазвалистый среднеразвалистый, сильноразвалистый простертый	1 3 5 7 9	В фазу выметывания
Высота растений, включая метелку, см	менее 50 51- 80 81- 110 111-140	карлик низкорослый среднерослый высокорослый	1 3 5 7	в фазу цветения

	более 140 см	очень высокорослый	9	
Положение метелки	-	вертикальное наклонное поникающее	1 5 9	в фазу созревания
Форма метелки	-	компактная слаборазвесистая среднеразвесистая развесистая	1 3 5 7	В фазу созревания
Длина метелки, см	до 10 11- 15 16- 25 более 25	короткая средней длины длинная очень длинная	1 3 5 7	В фазу созревания
Выход метелки из флагового листа	-	заключенная, выступающая, едва выступающая, умеренно выступающая, хорошо выступающая	-	В фазу цветения
Остистость колоска	-	отсутствуют короткие ости средней длины ости длинные	1 3 5 7	В фазу созревания
Окраска цветковых чешуй	-	соломенная золотистая красная коричневая рыжая фиолетовая черная	1 2 3 4 5 7 9	В фазу созревания
Опушение цветковых чешуй	-	поверхность гладкая слегка шероховатая шероховатая слабо опушенная сильно опушенная	1 3 5 7 9	В фазу полной спелости
Форма колоска	-	округлая овальная удлиненная длинная очень длинная	1 3 5 7 9	В фазу полной спелости
Окраска зерновки	-	белая, бежевая, красная, светло- коричневая, темно- коричневая, фиолетовая, темно- фиолетовая почти черная	-	В фазу полной спелости
Наличие окраски верхушки колоска	-	отсутствует присутствует	1 9	В фазу полной спелости



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):

Оценка хозяйственно-ценных признаков генофонда риса

СОП № 10/2017

Разработчик: к.с.-х. н. Коротенко Т.Л.

Подразделение: УНУ «Коллекция генетических
ресурсов риса, овощных и бахчевых культур»

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 8

Подпись рецензента:

д.с.-х.н. Ковалев В.С.

д.б.н. Мухина Ж.М.

Область применения: в научных учреждениях подведомственных ФАНО России, являющихся держателями биоресурсных коллекций зерновых культур. Настоящая СОП, устанавливает порядок и методологические основы полевой и лабораторной оценки хозяйственно-ценных признаков коллекционных образцов риса. Разработанная СОП обязательна для использования в УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» отдела селекции ВНИИ риса. Может быть использована в отделе селекции при оценке сортов, гибридов и селекционных форм риса.

СОП относится к методам характеристики и применима к образцам риса, включенным в Коллекцию. Процедуру проводят ежегодно в период вегетации риса на орошаемом участке ВНИИ риса и в послеуборочный период.

Цель: Организация комплексной оценки образцов риса, выделение источников хозяйственно-ценных признаков в результате полевых и лабораторных испытаний, обеспечение качества научно-исследовательской работы с генофондом коллекции.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для руководителя структурного подразделения, научных сотрудников (с.н.с., м.н.с.) и лаборантов.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

- Стол лабораторный
- стол рабочий для регистрации результатов исследования
- компьютер Acer, принтер Canon (Рабочая станция Hp Pro 3130Mt), Китай
- программное обеспечение Microsoft office-2010
- канцелярские принадлежности
- лабораторные весы *Scout* (0,01), США
- система анализа изображений LA 2400, WinSEEDLE – ЦКП института
- спецодежда, сапоги резиновые
- ножницы
- шпагат
- разборная доска
- шпатель
- бумажный крафт-пакет
- линейка 50 см

Документирование:

- полевой журнал
- рабочий журнал
- лабораторный журнал биометрический

Общее описание:

Изучение мирового генофонда сельскохозяйственных культур – важное направление исследований Коллекций. Оно включает полевую и лабораторную оценку образцов, с целью получения разносторонних сведений о биологических свойствах и хозяйственно-ценных признаках сортов, выделения наиболее перспективного исходного материала (источники и доноры) для решения актуальных задач селекции.

О сохраняемой зародышевой плазме должно было собрано как можно больше информации и максимально подробных фенотипических описаний, чтобы гарантировать ее наилучшее использование в фундаментальных и прикладных программах по рису. Наличие комплексной оценки каждой единицы хранения максимально повышает ценность Коллекции. Подробная характеристика генетической плазмы риса из отдаленных эколого-географических зон в составе Коллекции позволяет выявить разнообразие между образцами и внутри вида. Чрезвычайно важно документирование всех наблюдений и результатов применяемой системы оценки генплазмы. Признаки для оценки и характеристики образцов сельскохозяйственных культур выбираются специалистами по культурам и/или кураторами Коллекций.

Оценка – это регистрация признаков, выражение которых часто находится под воздействием факторов окружающей среды. Она включает методический сбор данных об агрономических и качественных признаках генетического разнообразия культуры посредством правильно разработанных экспериментальных испытаний. Оценочные данные включают информацию о продуктивности растений, об устойчивости к насекомым-вредителям, о патологии растений и качестве зерна, а также о признаках взаимодействия с окружающей средой (засухоустойчивость, холодостойкость и др.). Формат оценочных данных должен основываться на применении стандартов и шкал для измерения параметров признаков.

При работе с генетическими ресурсами используют все многообразие методов анализа. Методы оценки подразделяют на группы: 1) полевые, 2) лабораторные, 3) лабораторно-полевые; 4) оценки на обычных и провокационных фонах; 5) оценки по прямым и косвенным показателям; 6) оценки на различных этапах селекционного процесса.

Получение оценочных данных занимает много времени и является более дорогостоящим, чем получение описательной информации. Результаты тепличных, лабораторных или полевых оценок, согласно стандартизированным методикам и экспериментальным процедурам, обычно представляют в виде дискретных величин (например, оценка степени заболевания в баллах; результат подсчета) или непрерывных величин (полученных на основе измерений).

Обоснование СОП:

Наличие достоверной оценочной информации хозяйственно-ценных признаков Коллекции ВНИИ риса позволяет сделать выбор зародышевой плазмы для селекционных программ более сфокусированным. Некоторые агрономические признаки, представляющие интерес для селекционеров, являются генетически сложными для скрининга в процессе предварительной оценки генофонда. Поэтому оценку продуктивности растений и устойчивости к стрессовым факторам желательно повторять в разные годы в различных условиях окружающей среды. Комплексная оценка генплазмы растений риса является трудоемкой и требует соответствующего специализированного оборудования, квалифицированных сотрудников и устойчивого финансирования, позволяющего проводить сбор надежных данных высокого качества.

Такие признаки, как урожайность, продуктивность, высокое содержание питательных веществ, устойчивость к болезням и вредителям, пригодность к механизированному возделыванию и уборке урожая, являются хозяйственно ценными для большинства культур. Хозяйственная ценность сорта может определяться физиологическими, морфологическими, биологическими и биохимическими свойствами растения. Ряд хозяйственно-ценных признаков у перспективных исходных форм Коллекции определяются в лабораториях ВНИИ риса (физиологии, качества риса) по стандартным методикам и ГОСТам.

Сотрудниками УНУ «ВНИИ риса» проводится оценка образцов Коллекции по продуктивности и ее элементам, устойчивости к полеганию, осыпанию, устойчивости к биотическим факторам на естественном фоне в коллекционном питомнике, оценка густоты стояния по всходам, крупности зерна и формы зерна.

Порядок выполнения процедур:

Общая схема изучения образцов Коллекции.

1. Предварительная оценка зарубежной генплазмы сотрудниками группы исходного материала на карантинном питомнике, отечественной – селекционерами в селекционных питомниках.

2. Первичная оценка биологических свойств растений сортообразцов по адаптивности к условиям выращивания (период вегетации, устойчивость к полеганию и осыпанию) и получение репродукции в коллекционном питомнике.

3. Размножение, описание ботанико-морфологических свойств, оценка продуктивности и ее элементов, сравнение со стандартами в коллекционном питомнике.

5. Углубленное изучение лучших образцов в полевых и лабораторных условиях (пищевые, биохимические, технологические качества, иммунологическая оценка, устойчивость к стрессовым факторам) в структурных подразделениях института.

6. Обработка и анализ данных в лабораторных условиях УНУ. Дифференциация выделенных образцов в признаковые или генколлекции.

7. Генетическое, молекулярное, ботаническое и селекционное изучение генетического разнообразия вида в структурных подразделениях ВНИИ риса.

8. Идентификация коллекционных образцов в процессе сохранения в составе Коллекции включает: идентификацию с ботанической точки зрения (культура, вид, разновидность); идентификацию в сравнении с оригиналом; идентификация в полевых условиях по известным характеристикам и описаниям образца; цитогенетический анализ и молекулярная идентификация генов.

Изучение хозяйственной ценности образцов Коллекции риса в питомнике.

1. Оценка исходного материала осуществляется путем непосредственного его осмотра, измерения растений, подсчета в условиях полевого опыта и регистрации данных в рабочем и полевом журналах. Прежде всего, необходимо разместить изучаемый материал на поле в соответствии со схемой опыта.

2. Полевые опыты по оценке хозяйственно-ценных признаков растений коллекции риса проводят в равных условиях, обеспечивающих нормальное развитие культуры. Оценка признаков сортообразцов риса в коллекционном питомнике проводят в течение всего вегетационного периода, для каждого отдельного признака – в определенную фазу

3. Визуально-бальную оценку густоты стояния растений на делянке по всходам в сравнении со стандартами проводят (в мае месяце), используя международную *девятибалльную систему* по Международному классификатору признаков СЭВ, позволяющую лучше дифференцировать оценку: Показатели 1-2-3-4-5 по пятибалльной шкале соответствуют показателям 1-3-5-7-9 по девятибалльной системе оценки. Показатель густоты стояния играет большую роль в любых агротехнологиях, так как изреженные или загущенные посевы отрицательно сказываются на продукционном процессе формирования урожая.

4. Оценка проводят поделочно, делая запись в рабочем журнале наблюдений, контролируя номер делянки и номер сортообразца по каталогу Коллекции. Первоначально делают оценку густоты стояния растений на делянках со стандартами, путем подсчета растений. При густоте стояния растений более 250 шт./м² образцу присваивается максимальный балл визуальной оценки – 9 (высокая густота). Визуальная оценка густоты стояния растений сортообразца на делянке в 3 балла присваивается образцу с низкой густотой, 1 балл – при стоянии на делянке единичных растений. (15 мин.)

5. Оценка устойчивости растений сортообразца в коллекционном питомнике к поражению патогеном *Piricularia oryzae* на естественном фоне проводят двукратно в фазы выметывание-цветение и налива зерна (период июль-август). Устойчивость сортообразцов к заболеванию определяют визуальным осмотром всего растения по поражению листьев, узлов, стеблей и метелки. (15 мин)

Шкала учета устойчивости к пирикулярриозу (балл):

1 – поражение отсутствует (высокоустойчив);

3 – поражение очень слабое (устойчив);

5 – поражение слабое (среднеустойчив)

7 – поражение среднее (слабоустойчив);

9 – поражение сильное (неустойчив).

Для оценки интенсивности поражения образцов риса пирикулярриозом в условиях естественного фона используют общепринятую шкалу Р.Ф. Петерсона или Международную шкалу классификатора СЭВ:

- Инфекции нет или на листьях единичные маленькие коричневые пятна – 1 балл,

- На листьях небольшие округлые пятна или слегка удлиненные с коричневыми краями – 3 балла,
- Площадь типичного поражения листа эллиптической формы у листовых жилок менее 10 % - 5 баллов,
- То же около 50 % - 7 баллов;
- То же более 75 % - 9 баллов.

6. Обследование делянок образцов коллекционного питомника на наличие других болезней и вредителей следует проводить в течение всего вегетационного периода. При обнаружении заболевания растений или зерна неясной этиологии следует привлекать специалистов - фитопатологов. (3 мин.)

7. В коллекционном питомнике проводят предварительное изучение адаптивных особенностей растений интродуцированных генотипов риса зарубежной селекции к условиям возделывания на Кубани для выяснения его перспективности для отечественной селекции.

8. Перед отбором модельных снопов для биометрического анализа проводят оценку устойчивости растений коллекционных образцов к полеганию и осыпанию зерна (реакция на условия среды). Визуально-балльную оценку на делянках ведут в фазу созревания зерна на метелках в период с августа по сентябрь (рис.1). (5 мин.)



Рисунок 1- Визуально-балльная оценка устойчивости растений к полеганию в коллекционном питомнике

Шкала учета устойчивости к полеганию (балл):

- 1- высокоустойчив (растения стоят вертикально);
- 3- устойчив (полегания нет, небольшой наклон растений или изгиб);
- 5- среднеустойчив (растения наклонены в разной степени, 20-30 % метелок касаются земли);
- 7- неустойчив (полегло более 50 % растений);
- 9- полное полегание (растения полностью лежат на земле).

9. Балльную оценку устойчивости к осыпанию проводят перед самой уборкой в фазу полной спелости зерна (сентябрь-октябрь). Для этого метелку сортообразца сжимают в руке и по количеству колосков, оставшихся в руке, оценивают степень осыпания зерна. (5 мин.)

Шкала учета степени осыпания (балл):

- 1 - устойчив к осыпанию (при сильном сжатии метелки колоски не осыпаются);
- 3- осыпание слабое (осыпалось несколько колосков);
- 5 – среднее (осыпалось около 50 % колосков);
- 7- сильное осыпание (колоски осыпаются при легком потряхивании метелки).

Шкала учета устойчивости к осыпанию (балл):

- 1- высокоустойчив к осыпанию;
- 3 - устойчив к осыпанию;
- 5 - среднеустойчив к осыпанию;
- 7 - слабоустойчив к осыпанию;
- 9 - неустойчив к осыпанию.

9. Для оценки продуктивности растений коллекционных образцов производят отбор модельных снопов согласно списка, составленного и распечатанного Руководителем УНУ. В список образцов на оценку продуктивности вносят лучшие образцы, выделившиеся по ряду признаков на предыдущих этапах исследований, или высокопродуктивные, превосходящие визуально стандарты, либо несущие ценные признаки (доноры), представляющие интерес для фундаментальных исследований по заявкам пользователей Коллекции. Количество образцов, отбираемых для оценки элементов продуктивности растений может ежегодно варьировать, но не должно быть менее 100 образцов. (2 мин.)

10. Отбор растений с делянок для биометрического анализа проводят при условии оценки густоты стояния растений сортообразца - не менее 7 баллов. С делянки отбирают ручную модельный сноп из 10 растений, сноп связывают шпагатом, прикрепляя этикетку с номером делянки, номером сортообразца по каталогу регистрации и годом репродукции. Снопы транспортируют в теплицу для просушивания. (15 мин.)

Изучение хозяйственной ценности образцов Коллекции риса в лабораторных условиях.

1. Элементы продуктивности сортообразца определяют при лабораторном анализе, проводя биометрический анализ отобранных снопов по 10 растений с делянки.

2. В каждом снопе сотрудники подсчитывают число всех побегов на растении и количество продуктивных побегов кущения. (5 мин.)

3. Потом отрезают ножницами главные метелки и боковые метелки, берут подряд по 5 штук и измеряют их длину линейкой, подсчитывают общее число колосков, число зерен и число стерильных колосков. Выводят средние величины по этим показателям. Экспериментальные данные заносят в биометрический журнал. (15 мин.)

4. После обмолота метелок зерно взвешивают на Лабораторных весах Scout (0,01) с каждой метелки отдельно, определяя массу зерна с метелки в граммах. (2 мин.)

5. Пустозерность высчитывают делением пустых колосков на общее число колосков метелки, выраженную в процентах. Стерильность колосков менее 10 процентов оценивают, как очень низкую (1 балл), от 11 до 40% - низкую (3 балла), от 41 до 60% - среднюю (5 баллов), от 61 до 80 % - высокую (7 баллов), более 80% - очень высокую (9 баллов). (1 мин.)

6. Плотность метелки рассчитывают делением общего числа колосков на метелке на длину метелки, выраженную в шт./см. Выводят средние величины для десяти растений. По количеству колосков на одном сантиметре длины метелки подразделяют на плотные и рыхлые. (1 мин.)

7. Далее определяют массу 1000 зерен путем подсчета двух проб по 500 зерен подряд без выбора и их взвешиванием на Лабораторных весах Scout (0,01). Взвешивают их с точностью до 0,01 г, переводят вес на 1000 семян и вычисляют средний вес. (5 мин.)

8. Масса 1000 зерен - важный хозяйственный признак, характеризующий качество семенного материала. Она связана с крупностью и выполненностью семян. Масса 1000 зерен менее 20 грамм считается очень низкой, от 20 до 25 гр.- низкой, от 26 до 30 гр.- средней, от 31

до 35 гр.- высокой, более 35 грамм- очень высокой. К крупнозерным сортам риса относят образцы с массой 1000 зерен более 30 грамм.

9. Из данных, полученных при анализе отдельных пробных снопов, выводят средние показатели образца, которые записываются по форме в Приложении 1. (1 мин.)

10. Все остальные метелки обмолачиваются вместе, зерно взвешивается на Лабораторных весах Scout (0,01) и производится расчет веса зерна на 1 растение. (12 мин.)

11. Биологическая урожайность образца может рассчитывается по формуле:

$Y = A * B * V * G / 100$, где Y - урожайность, т/га, A - количество растений, млн./га, B - продуктивная кустистость, V - среднее число зерен в колосе, G - масса 1000 зерен, г.

12. Все зерно с каждого образца после биометрического анализа ссыпается в пакеты с подписанными номерами каталога и указанием года репродукции и подлежит сканированию в ЦКП на системе анализа изображений LA 2400, WinSEEDLE для определения числового значения формы зерна l/b , опушенности зерна и оцифровки изображения для Банка данных генетических ресурсов риса. (7 мин.)

13. Форму колоска определяют визуально: короткозерные сорта, в зависимости от l/b имеют округлую или овально-округлую форму зерновки, среднезерные сорта имеют удлиненную, полуверетеновидную форму зерна, а длиннозерные сорта длинную, веретеновидную форму. (1 мин.)

14. Вся полученная информация подлежит документированию в рабочих журналах УНУ. Куратору Коллекции необходимо обеспечить ведение надлежащей регистрации всей информации на электронных носителях и компьютере Рабочая станция Hp Pro 3130Mt, связанной с оценкой и управлением Коллекции и надлежащее ее сохранение. (5 мин.)

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 115 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам. Методическое пособие.- М.: Россельхозакадемия, 2008.- 416 с.

2. ГОСТ 12042-80. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения массы 1000 семян.

3. Скаженник М.А. Методы физиологических исследований в рисоводстве / М.А. Скаженник, Н.В. Воробьев, О.А. Досеева.- Краснодар, 2009.- 23 с.

4. Методические указания по технологии возделывания риса.- Москва: Колос, 1979.- 96 с.

5. Методические указания по изучению мировой коллекции риса и классификатор рода *Oryza* L. -1982.

6. Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. 2006. *Manual of seed handling in genebanks*. Handbooks for Genebanks No. 8. Rome, Bioversity International.UPOV. Test Guidelines – English Index (available at: http://www.upov.int/en/publications/tg_rom/tg_index.html).

7. USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Online Database] Evaluation/characterization. Data Queries. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, USA (available at: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/croplist.pl>).

Приложения:

Приложение 1

Форма рабочего журнала по оценке морфологических и хозяйственных признаков

№ делян ки/сос уда	№ катало- га	Форма куста, балл	Форма метелки, балл	Положение метелки, балл	Длина флагового листа, см	Ширина флагового листа, см	Угол отклонения флага от стебля	Устойчивос ть к полеганию, балл	Устойчивос ть к осыпанию, балл	Устойчивос ть к пирикулярн оу, балл
1200	04723	1	2	5	21,0	1,5	45	1	1	3
...										
...										

Приложение 2

Форма лабораторного журнала по биометрическому анализу

№ деля нки	№ катало -га	Номер растения	Количество прод.стеблей, шт.	Длина метелки, см	Количество колосков выполненных, шт.	Количество колосков пустых, шт.	Общее кол-во колосков, шт.	Пустозерность, %	Плотность метелки, шт./см	Масса зерна с метелки, г	Масса зерна с растения, г	Масса 1000 зерен, г
100	01222	1	2									
...												



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):
**Фитопатологическая оценка устойчивости образцов риса к
пирикулярриозу на искусственном инфекционном фоне**

СОП № 11/2017

Разработчик: к.б.н. Брагина О. А.

Подразделение: лаборатория земледелия отдела технологии

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 10

Подпись рецензента:

д.с.-х.н. Ковалев В.С.

д.б.н. Мухина Ж.М.

Область применения: иммунологические оценки применяют на всех этапах селекционного процесса и начальных стадиях семеноводства в научных учреждениях подведомственных ФАНО России. Настоящая СОП является руководством при закладке опыта на инфекционном фоне, устанавливает порядок подготовки и получения инокулюма, выделения гриба *Rydicularia oryzae* Savaва из пораженной ткани в чистую культуру, искусственного заражения и оценки устойчивости образцов и сортов риса. Разработанная СОП обязательна для использования в технологическом отделе, группе защиты риса «ВНИИ риса».

СОП применима к коллекционному и селекционному материалу.

Цель: Организация фитопатологической оценки коллекционного, селекционного материала на устойчивость к пирикулярриозу на искусственном инфекционном фоне.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для научных сотрудников (с.н.с., н.с.) и лаборантов лаборатории земледелия.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

1. Весы АСОМ JW-1-2000
2. Микроскоп «Биолар», МБС-10
3. Биноклярная лупа
4. Ламинарный бокс БАВп-01
5. Сушильный шкаф/стерилизатор ED 115
6. Термостат «Бруве»
7. Электрическая плита
8. Холодильная камера (+4,5 °С)
9. Ранцевый опрыскиватель аккумуляторный
10. Спиртовая горелка
11. Предметные стекла
12. Чашки Петри
13. Ножницы
14. Стерильная игла
15. Шпатель металлический
16. Фильтровальная бумага
17. Ультрафиолетовая лампа
18. Этиловый спирт
19. Бактериологическая петля
20. Агар
21. сахароза
22. карбамид
23. моющие средства
24. фольга пищевая
25. халат лабораторный белый
26. перчатки нитриловые

Эталонные материалы: индикаторы уровня инфекционного фона сорта Авангард (устойчивый) и Победа-65 (восприимчивый).

Документирование:

- полевой журнал

Общее описание:

Об устойчивости или восприимчивости зерновой культуры судят по двум критериям по интенсивности поражения растений и проявлению внешне видимых реакций. В связи с этим существуют два подхода к оценкам устойчивости 1) учет интенсивности проявления болезни 2) выявление показателей иммунности или их отсутствия.

Иммунологическая оценка сортов риса на устойчивость к пирикулярриозу базируется на создании жесткого инфекционного фона и провокационных условий при возделывании культуры. Ежегодный сбор инфицированного пирикулярриозом материала на полях рисосеющих хозяйств края обеспечивает высокое качество краснодарской популяции патогена, используемой для создания искусственного инфекционного фона.

Возбудитель пирикулярриоза риса – несовершенный гриб *Pyricularia oryzae* Вгооте et Савага (половая форма *Magnaportha grisea* Cav.) порядка *Hyphomycetales*, паразитирующий на молодых активно вегетирующих тканях, образуя бесцветную многоклеточную грибницу, которая распространяется по межклеточникам и тканям растений. Конидиеносцы одиночные или собраны в пучки, оливковые или дымчатые, имеют 2-4 поперечные перегородки. Конидии грушевидные или яйцевидные, двух-, четырех клеточные, светло-оливковые.

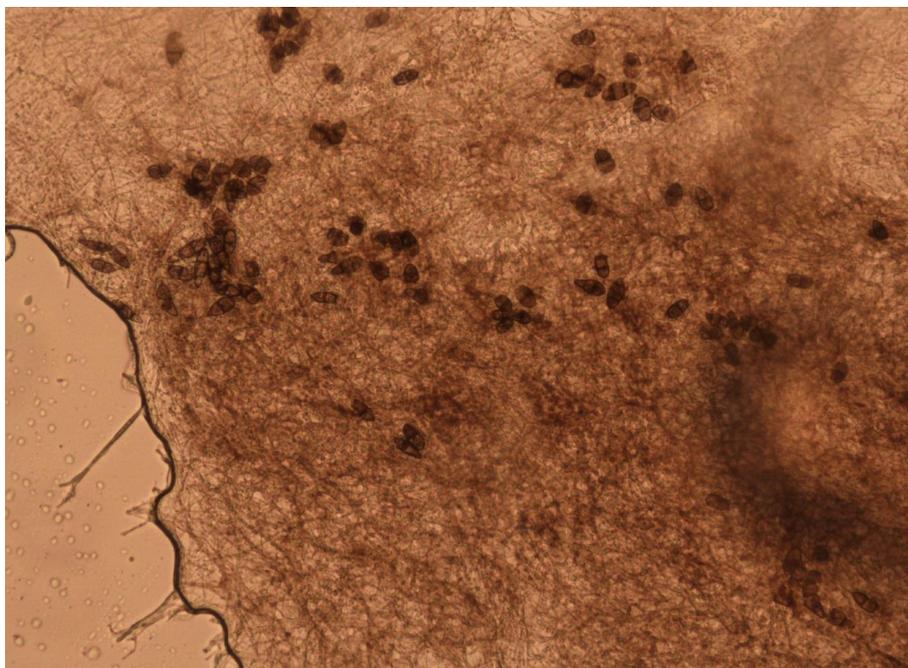


Рисунок 1 – Мицелий и конидии гриба *Pyricularia oryzae*



Рисунок 2 – Конидии с ростковой гифой *Pyricularia oryzae*

Заражение растений риса может происходить на протяжении всего периода вегетации при наличии на них конидий и свободной влаги. При благоприятных условиях (температура 20-28°C, влажность 90-95 % воздуха) конидия прорастает, и ростковая трубка формирует аппрессорию, с помощью которой гриб проникает в ткани и клетки растений. Инкубационный период длится 4-5 дней. Процесс образования конидий на пораженном растении обычно происходит на второй – третий день после завершения инкубационного периода. Пятно на листе продуцирует в сутки в среднем до 6 тыс. конидий в течение двух-трех недель. Каждая вновь образовавшаяся конидия потенциально способна вызвать новое заражение, то есть пораженные растения становятся источниками вторичной инфекции. При наличии благоприятных погодных условий в течение вегетационного периода могут развиваться более 10 генераций патогена.

Патоген снижает фотосинтетическую активность растений и увеличивает транспирацию. Это приводит к прекращению притока питательных веществ, преждевременному усыханию листьев, уменьшению озерненности метелок и щуплости семян. Интенсивное развитие метельчатой формы пирикулярноза приводит к потере урожая в пределах 50-70%.

Устойчивость сорта при непрерывном возделывании снижается из-за накопления патогенных рас возбудителя, способных преодолеть механизмы устойчивости растения-хозяина. Сортосмена не позволяет патогену накапливаться в необходимом для эпифитотии количестве, поэтому она является одним из возможных элементов системы защиты посевов риса.

Обоснование:

Основным направлением повышения продуктивности сельскохозяйственных растений будет создание новых технологий селекции на основе интенсивного использования генетических ресурсов и повышения способности растений противостоять влиянию биотических и абиотических факторов. Селекционные программы предусматривают использование генетических источников устойчивости риса к пирикулярнозу. Основными этапами этой работы являются поиск и выявление доноров среди коллекционного материала. Возможность приспособления фитопатогенов и вредителей к устойчивым хозяевам обуславливает необходимость постоянного поиска новых эффективных генов и генетических систем резистентности. Реализация любой из стратегий селекции основана на изучении наследования устойчивости и создании доноров с эффективными генами.

Порядок выполнения процедур:

1 Стандартный способ получения инокулюма для культивирования гриба PYRICULARIA ORYZAE SAVARA

1.1 Подготовка оборудования и материалов к работе (23 мин.)

Для получения экспериментальных результатов необходимо подготовить оборудование и материалы к работе. Для этого перед работой в ламинарном боксе БАВn-01 проводят стерилизацию, включают ультрафиолетовую лампу на 2 часа. Чистые и сухие чашки Петри дезинфицируют 70 % этиловым спиртом, затем их прокаливают в сушильном шкафу/стерилизаторе ED 115 при температуре 180 °C в течение 2 часов. Термостат для культивирования патогена, обрабатывают ватой, смоченной в 70 % этиловом спирте, и обжигают спиртовкой. Предметные стекла, стерильную иглу, металлический шпатель, бактериологическую петлю, ножницы так же дезинфицируют 70 % этиловым спиртом.

1.2 Приготовление питательной среды (30 мин.)

Споры возбудителя пирикулярриоза риса выращивают на морковном агаре. Для его приготовления потребуется взвесить на весах АСОМ JW-1-2000 (питательная среда для партии из 100 образцов):

морковь свежая	200 г
агар микробиологический	20 г
сахароза	20 г
вода водопроводная	1 л

1.2.1 Приготовление: нарезанную мелко морковь заливают холодной водой и ставят на электрическую плиту, с момента ее закипания уменьшают пламя огня и готовят 20-30 минут. Предварительно замачивают агар в 300 мл холодной воды с учетом 1 литра. Через 30 минут морковную воду снимают с огня, процеживают через марлю и добавляют разбухший агар. Затем снова ставят среду на медленный огонь до полного растворения агара, при этом непрерывно ее помешивают, затем добавляют сахарозу и разливают по колбам объемом 250-300 мл, закрывают их марлевыми пробками, и сверху колбу обворачивают фольгой и стерилизуют в автоклаве при 1 атмосфере в течение 1 часа.

1.2.2 Затем, разливают в чашки Петри по 15-20 мл среды. Для этого стерильную чашку Петри помещают в ламинарный бокс вблизи пламени спиртовой горелки, осторожно приоткрывают крышку пальцами левой руки, вносят правой рукой расплавленную агаризованную среду и опускают крышку. Оставляют среду остывать до температуры 40 °С.

1.3 Выделение гриба из пораженной ткани растений риса в чистую культуру (38 мин.)

1.3.1 Выделяют гриб, как из зеленых, так и с гербарных образцов растений с хорошо выраженными симптомами заболевания. Для освобождения от посторонней грибной и бактериальной флоры пораженные ткани растений промывают в проточной воде в течение двух часов. (5 мин)

1.3.2. В чашке Петри создают влажную камеру. Заготавливают кружки из фильтровальной бумаги. Дно чашки и внутреннюю поверхность выстилают кругами фильтровальной бумаги, соответствующего диаметра и увлажняют дистиллированной водой. Небольшие части исследуемых тканей растений в количестве 3-10 шт. раскладывают на дно чашки, на предметное стекло. (5 мин)

1.3.3 Чашки с образцами экспонируют в термостате при температуре (27±1)°С. За ростом гриба сотрудник начинает наблюдать через 48 часов под бинокулярной лупой при 20-50-кратном увеличении. После появления спороношения конидии переносят в каплю дистиллированной воды на предметное стекло, просматривают под микроскопом при увеличении х120 и визуально определяют идентичность конидий гриба виду *Pyricularia oryzae*. (7 мин.)

1.3.4 Затем, в стерильной камере, для получения колоний гриба, в чашки Петри со средой переносят кусочки образца диаметром 10-20 мм, наклеивая их на внутреннюю крышку чашки (рис.3). (1 мин.)

1.3.5 Ежедневно в течение 3-5 суток наблюдают за ростом грибницы. После появления роста грибницы очищают культуру от посторонних микроорганизмов многократными пересевами на стерильную питательную среду. Небольшое количество гриба берут на культуральную петлю и наносят штрихами на поверхность агара в чашки Петри. По мере

продления штриха споры все более разделяются до тех пор, пока в итоге не получаются индивидуальные колонии, возникшие из нескольких или единичных спор. (15 мин.)

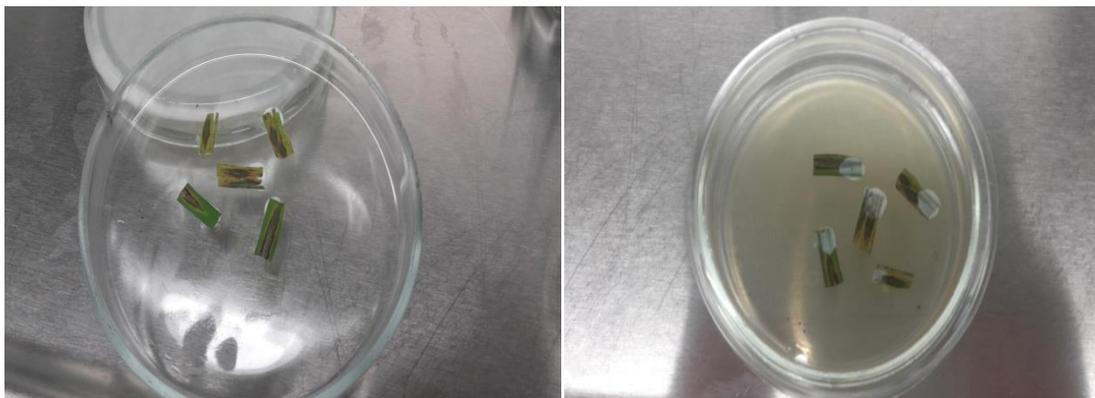


Рисунок 3 – Кусочки образца, наклеенные на внутреннюю сторону крышки чашки Петри.

1.3.6 При достижении колоний гриба диаметра от 0,5 до 0,75 от размера чашки Петри их рассеивают. Для этого чашку Петри с посевным материалом фиксируют левой рукой, рядом с ней помещают чашку Петри со стерильной средой вблизи пламени горелки. Крышку чашки Петри с посевным материалом приподнимают большим, средним и указательным пальцами настолько, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходила стерильная игла, которой вырезают агаровый блок диаметром 2 мм с мицелием. Агаровый блок помещают в центр чашки Петри с агаризованной морковной средой, ставят на чашке карандашом дату посева, и инкубируют в термостате при температуре $(27\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 14 суток. (5 мин.)

При этом соблюдают строгую стерильность. Посевы производят непосредственно около зажженной горелки; тщательно стерилизуют в пламени культуральную петлю. При посеве не допускают разговоров, кашля, чихания, переходов и других движений, так как выделяемое с мельчайшими капельками слизи из ротовой и носовой полости или поднимаемые с пылью микробы могут попасть в чашки.

1.4 Определение жизнеспособности конидий и приготовление суспензии (27 мин.)

Под жизнеспособностью конидий понимается их способность образовывать ростковые гифы. Она измеряется количеством конидий, проросших на той или иной среде в оптимальных условиях за 18-24 часа. Проращивание конидий осуществляют на 1 % водном агаре или в капле воды.

1.4.1 Результат определения жизнеспособности конидий в значительной мере зависит от степени чистоты, используемой при проращивании, стеклянной посуды и стекол, которые сотрудник предварительно тщательно обрабатывает и дезинфицирует. (1 мин.)

1.4.2 Приготовленный 1 %-ный водный агар (1 г агара растворяют при нагревании на электрической плите в 100 мл дистиллированной воды и стерилизуют 30 мин при давлении в 1 атм.) разливают по поверхности предметных стекол слоем 2-5 мм. (3 мин.)

1.4.3. Предметные стекла с застывшим агаром помещают на П-образную стеклянную подставку в чашку Петри, на дно которой предварительно кладут фильтровальную бумагу и наливают 4 мл дистиллированной воды, а внутреннюю поверхность крышки закрывают смоченными кругами фильтровальной бумаги. (1 мин.)

1.4.4 Конидиальную суспензию готовят непосредственно перед нанесением на агар. Для этого пробу конидий заливают дистиллированной водой и тщательно встряхивают в течение 10 минут вручную. На поверхность агара вносят суспензию концентрацией 1×10^6 конидий на 1 мл (10-15 конидий в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 120$). (10 мин.)

1.4.5 Чашки Петри устанавливают в термоста для проращивания. Проращивание конидий осуществляют в термостате с температурой $(27 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18-24 часов. (1 мин.)

1.4.6 По истечении указанного времени проводят подсчет проросших конидий с помощью микроскопа. Проросшей считается конидия, образующая ростковую гифу, длина которой не менее поперечника конидий. На каждом стекле подсчитывают количество проросших конидий из 100 просмотренных. Просмотр необходимого количества полей зрения осуществляют без выбора, в каждом поле зрения учитывают все отдельно лежащие конидии. (10 мин.)

1.4.7 Ведут подсчет и определяют жизнеспособность конидий (1 мин.)

Средний арифметический показатель прораастаемости из 6 учтенных сотен принимают за жизнеспособность данного образца конидий.

Жизнеспособность определяют по формуле:

$$P = \frac{a \cdot x \cdot 100}{v}, \text{ где}$$

P – количество проросших конидий, %;

a – количество проросших конидий, шт.;

v – общее количество учтенных конидий, шт.

1.5 Получение сухого спорового материала (7 мин.)

Сухой споровый материал получают из чистой 14-дневной культуры гриба *Pyricularia ogyzae*, со споруляцией не ниже 20 млн. кон./ч. Петри (рис. 4).



Рисунок 4 – 14-дневная культура гриба *Pyricularia ogyzae*

Достать чашки Петри с чистой 14-дневной культурой из термостата, открыть крышку чашки и поставить сушиться при комнатной температуре в течение 10-14 дней. Затем, из высушенной чашки с помощью металлического шпателя сотрудник снимает верхний слой мицелия с конидиями и высыпает в стеклянную емкость с крышкой, полученный материал взвешивают на весах АСОМ JW-1-2000, записывают вес спорового материала в лабораторном журнале, кладут на хранение на 1-2 месяца в холодильник при $4 \pm 1 ^\circ\text{C}$, далее используют для исследовательских работ.

2 Оценка образцов риса на искусственном инфекционном фоне

2.1 Подготовка к посеву и размещение инфекционного питомника на орошаемом участке (10 мин.)

Инфекционный питомник располагают с подветренной стороны, в значительном удалении от производственных посевов риса. Участок для выращивания риса должен быть оборудован оросительной и сбросной системой, позволяющий своевременно и за короткий срок орошать участок или сбрасывать воду.

Поверхность участка выравнивают, отклонение отметок на участке от среднего уровня не должно превышать ± 5 см. Верхний слой почвы должен иметь (2-3 см) мелко-комковатую структуру с размером почвенных агрегатов не более 15 мм в диаметре.

2.1.1 Перед посевом сотрудник готовит схема посева, где указывают номер карты и чека оросительной системы ВНИИ риса, на котором планируется закладка инфекционного питомника, дату посева, размер площади участка под питомник, предварительное количество делянок и посевная ведомость. (1 мин.)

2.1.2 Пакеты с семенами заворачиваются конвертиком, подписываются и укладываются на рабочий стол в порядке возрастания регистрационных номеров в полевом опыте. Сотрудник тщательно проверяет последовательность раскладки пакетов на рабочем столе и подписывают номер на пакете, соответствующий номеру делянки. (1 мин.)

2.1.3 По посевной ведомости сотрудник заполняет «полевой журнал». На титульном листе вписывает культуру, наименование организации, название питомника, наименование темы НИР по госзаданию, ответственного за тему и исполнителей, год посева. Затем вписывают в журнал по порядку номера делянок с соответствующим названием и номером образца. (3 мин.)

2.1.4 В соответствии со схемой посева сотрудники лаборатории осуществляют закладку семян в кассеты для механизированного посева малогабаритной сеялкой. (5 мин.)

2.2 Внесение удобрений в инфекционном питомнике (20 мин.)

Для создания повышенного азотного фона – N_{180} , способствующего лучшему развитию пирикулярриоза, основную дозу азота (50 % от общей дозы на 1 га) вносят перед посевом риса с заделкой в почву. Остальную часть карбамида вносят вручную на делянкой с растениями в качестве подкормки в два срока: по всходам и за неделю до инокуляции.

2.3 Посев семян образцов на инфекционном питомнике (5 мин.)

2.3.1 Перед закладкой полевого опыта сотрудник и лаборант готовят колья (красят белой краской, высушивают, подписывают черным водостойким маркером, связывают шпагатом по 10 шт.). (15 мин)

2.3.2 Осуществляют отбивку участка под посев. Шнуры полипропиленовые привязывают к колышкам по периметру питомника.

2.3.3 К посеву риса приступают при среднесуточной температуре почвы 11-13 °С на глубине 5 см. Семена сеют рядковой кассетной сеялкой. Через каждые 20 изучаемых сортообразцов размещают стандарты – индикаторы уровня инфекционного фона сорта Авангард (устойчивый) и Победа-65 (восприимчивый). При использовании для посева рядковой сеялки ширина делянки составляет 140 см, ширина межделяночных полос 40 см, длина делянки 200 см, ширина рабочей дорожки 60 см. Делянка состоит из шести рядков, в рядке по 200 всхожих семян.

2.4 Уход за посевами (8 мин.)

Сразу после посева семян участок заливают водой слоем 7-10 см, который сохраняют до начала наклевывания семян. Если к этому времени вся вода не впиталась, производят сброс воды до появления полных всходов риса (2-3 листа). В этот период почва должна находиться во влажном состоянии.

После появления всходов риса проводят прополку дорожек вручную и обработку сорняков гербицидом. При этом поверхностный слой почвы должен быть слегка подсушен. В дальнейшем слой воды поддерживают на уровне 10-12 см.

2.5 Искусственное заражение растений (25 мин.)

Растения инокулируют в наиболее уязвимые фазы развития риса: кущение (5-7 листьев), выметывание – цветение суспензией спор.

2.5.1 Для получения суспензии для искусственного заражения используют смесь сухого спорового материала и 14-дневную культуру гриба на морковном агаре. В день инокуляции споры смывают дистиллированной водой и доводят концентрацию спор до 10^5 спор в 1 мл. Взвешивают сухой споровый материал на весах АСОМ JW-1-2000, норма расхода сухого спорового материала – 5 мг/м^2 при 100 % всхожести спор, на делянку – 2,5 мг. (10 мин.)

2.5.2 Заражение растений на делянках проводят в вечерние часы, в период выпадения росы и при отсутствии ветра, равномерно на каждую делянку распыляют суспензию. Успешное заражение происходит при продолжительности росяного периода не менее 8-10 часов, частые слабые дожди, туманы при температуре 25-28 °С. В случае отсутствия естественной росы, растения риса перед инокуляцией опрыскивают водой. Для инокуляции используют аккумуляторный ранцевый опрыскиватель, расход рабочей жидкости 500 л/га. (15 мин.)

2.6 Оценка степени устойчивости образцов риса (20 мин.)

Устойчивость сортообразцов риса сотрудник определяет по поражению листьев, узлов, стеблей и метелки и оценивает интенсивность развития болезни. Как правило, учитывают растения, расположенные только в среднем ряду делянки, на крайних рядах учет не проводят.

2.6.1 Поражаемость растений листовой формой пирикулярриоза в фазу полного кущения определяют через 10 и 20 дней после инокуляции. Учитывают два показателя: тип реакции (в баллах) и интенсивность поражаемости растений в %. (10 мин.)

Для оценки этих показателей используют десятибалльную шкалу международного института риса. Оценка в баллах проводят по преобладающему типу реакции.

Шкала учета развития пирикулярриоза на листьях

0 – поражение отсутствует;

1 – единичные коричневые точки или нет симптомов;

2 – многочисленные мелкие точки;

3 – маленькие округлые пятна около 2 мм в диаметре, с серым центром и коричневой каймой;

4 – типичные пятна пирикулярриоза, эллиптические, 1-2 см, поражено 2 % площади листа;

5 – типичные пятна пирикулярриоза, поражено до 10 % площади листа;

6 – типичные пятна пирикулярриоза, поражено до 25 % площади листа;

7 – типичные пятна пирикулярриоза, поражено до 50 % площади листа;

8 – типичные пятна пирикулярриоза, поражено до 75 % площади листа;

9 – типичные пятна пирикулярриоза, поражено до 100 % площади листа.

Учет поражения пирикулярриозом узлов и метелки растений проводят в фазу молочно-восковой и полной спелости. (10 мин.)

2.6.2 Шкала учета развития пирикулярриоза на узлах

- 0 – признаки заболевания отсутствуют;
- 1 – небольшие, вдавленные бурые пятна диаметром 2-3 мм, поражение не затрагивает проводящую систему;
- 2 – пятна круглые черные, охватывают 2/3 узла. Наблюдается щуплость зерна;
- 3 – чернеющие пятна охватывают весь стебель; узел загнивает, стебли надламываются; нередко влагалище листа удерживает стебель с пустой метелкой.

Шкала учета развития пирикулярриоза на метелках

- 0 – поражение отсутствует;
- 1 – единичные коричневые точки;
- 2 – многочисленные коричневые точки;
- 3 – маленькие округлые пятна с серым центром на зерновках, около 2 мм в диаметре, с коричневой каймой;
- 4 – единичные типичные пятна пирикулярриоза на зерновках или на веточках, всего поражено 2 % зерновок;
- 5 – типичные пятна пирикулярриоза, поражены зерновки, веточки, оси; щуплость зерна – 10 %;
- 6 – поражена часть «шейки», веточки, зерновки; щуплость зерна – 25 %;
- 7 – поражена часть «шейки», веточки, зерновки; щуплость зерна – 50 %;
- 8 – поражена часть «шейки», веточки, зерновки; щуплые зерна составляют 75 %;
- 9 – полностью поражена «шейка», щуплость зерна – 100 %.

2.7 Обработка и анализ данных интенсивности развития болезни (7 мин.)

Все данные полевого эксперимента и результаты анализа данных устойчивости регистрируются в журнале по форме в Приложении 1.

Данные по степени поражения листьев, узлов, метелок и количеству пораженных растений используют для подсчета интенсивности развития болезни по формуле:

$$\% = \frac{\sum(a*b)*100}{n*9}, \text{ где}$$

% - интенсивность развития болезни;

$\sum(a*b)$ - сумма произведений количества пораженных растений, умноженных на соответствующий балл поражения;

n – число учтенных растений, шт.;

9 – наивысший балл поражения.

По результатам оценки сортообразцы классифицируют на устойчивые, среднеустойчивые и неустойчивые – интенсивность развития болезни:

- устойчивые 0-25 %;

- среднеустойчивые 25,1-50 %;

- неустойчивые >50 %

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 220 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Билай, В.И. Методы экспериментальной микологии / В.И. Билай. – Киев, Наука думка, 1982. – 550 с.

2. Ежов, Г.И. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии / Г.И. Ежов. – М.: Высшая школа, 1974. – 288 с.
3. Методические указания по диагностике, учету и оценке вредоносности пирикулярриоза риса – Москва, ВНИИ фитопатологии, 1988. – 38 с.
4. Методические указания по оценке устойчивости сортов риса к возбудителю пирикулярриоза. – М., ВАСХНИЛ, 1988. – 30 с.
5. Чумаков, А.Е. Основные методы фитопатологических исследований / А.Е. Чумаков, И.И. Минкевич, Ю.И. Власов, Е.А. Гаврилова – М., ВАСХНИЛ, 1974. – 190 с.
6. Касьянов А.И. Вредители риса: справочник / А.И. Касьянов.- Краснодар: ВНИИ риса, 2008.- 164 с.
7. Зеленский Г.Л. Борьба с пирикулярриозом риса путем создания устойчивых сортов: монография / Г.Л. Зеленский.- Краснодар: КубГАУ, 2013.- 92 с.
8. Изучение генетических ресурсов зерновых культур по устойчивости к вредным организмам. Методическое пособие. – Москва: Россельхозакадемия, 2008.- 416 с.

Приложения:

Приложение 1

Форма ведения полевого журнала «Оценка устойчивости сортообразцов риса на инфекционном фоне»

№ п/п	Название образца	Балл поражения	∑ баллов	ИРБ, %	Степень устойчивости



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):
**«ДНК-паспортизация сортов риса на основе
мультиплексного SSR-анализа»**

СОП № 12/2017

Разработчик: к.б.н. Супрун И.И.

Подразделение: лаборатория биотехнологии
и молекулярной биологии «ВНИИ риса»

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 7

Подпись рецензента:

д.с.-х.н. Ковалев В.С.

д.б.н. Мухина Ж.М.

Область применения:

Настоящая СОП распространяется на методы ДНК-маркерной идентификации образцов (сортов, селекционных форм, гибридов) риса. Основана на использовании мультиплексной ПЦР и последующего фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABI-prism 3130. Позволяет эффективно выполнять SSR-генотипирование образцов (сортов, селекционных форм, гибридов) риса и может быть использована для получения ДНК-паспортов генотипов при решении селекционно-генетических задач, а также в семеноводстве. Предназначена для специализированных НИИ, занимающихся селекционно - генетическими исследованиями риса.

СОП применима к коллекционному и селекционному материалу.

Цель: Выполнение ДНК-паспортизации образцов коллекции генетических ресурсов риса.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для научных сотрудников и лаборантов лаборатории биотехнологии и генетики (в.н.с., с.н.с., м.н.с.)

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

- ДНК-амплификатор Eppendorf mastercycler gradient или модель, не уступающая данной по характеристикам скорости нагрева/охлаждения реакционного блока;
- центрифуга для микропробирок объемом 1,5 мл с максимальной скоростью вращения не менее 13000 об./мин;
- термостат Термит твердотельный для микропробирок объемом 1,5 мл (производства ООО «ДНК-технология») или аналогичный ему;
- автоматический генетический анализатор с характеристиками не ниже, чем ABIprism 3130.
- источник питания к электрофоретической камере EPS-300 X;
- микродозаторы автоматические с переменным объемом следующих рабочих диапазонов: 1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл;
- набор для экстракции ДНК Gene Jet Plant Genomic DNA Purification mini kit (производства компании Thermo Scientific - кат. № 0791);
- набор для постановки ПЦР (производства НПО «Сибэнзим», кат. № K002);
- полимер POP-7 для фрагментного анализа производства компании Applied Biosystems или аналогичный ему полимер ПДМА 6, производства ЗАО «Синтол»;
- олигонуклеотиды синтетические, соответствующие праймерам ДНК-маркеров, входящих в мультиплексные наборы;
- Hi-Di Formamide производства Applied Biosystems;
- пробирки градуированные, 1,5 мл;
- пробирки в стрипах по 8 штук, классические;
- наконечники Vertex до 200 мкл, наконечники универсальные, до 300 мкл и 1000 мкл;
- цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ);
- ЭДТА, динатриевая соль, дигидрат;
- Трис;
- Маркер длины фрагментов ДНК MS-450 (канал LIZ).
- халат лабораторный белый
- перчатки нитриловые

Документирование:

- лабораторный журнал

Общее описание:

В настоящей СОП применены следующие термины с соответствующим определением:

ПЦР - полимеразная цепная реакция - реакция, позволяющая синтезировать целевые фрагменты ДНК и за счет этого многократно увеличивать их концентрацию в реакционной смеси до количеств, достаточных для идентификации;

SSR-маркеры – **ДНК-маркеры**, основанные на анализе простых повторяющихся последовательностей генома;

SSR-генотипирование - анализ геномного полиморфизма с использованием SSR-маркеров;

мультиплексная ПЦР – **ПЦР**, предполагающая одновременный синтез нескольких целевых фрагментов генома за счет одновременного внесения в реакционную смесь нескольких праймерных пар, определяющих специфичность синтеза каждого из фрагментов;

фрагментный анализ – определение размера фрагментов, синтезированных в ходе ПЦР с использованием автоматических генетических анализаторов;

SSR-фингерпринт - совокупность данных о размере амплифицированных фрагментов, полученных с использованием SSR ДНК-маркеров.

ДНК-паспорт – информация об аллельных вариантах SSR ДНК-маркеров, с использованием которых был выполнен анализ образца (сорта, селекционной формы, гибрида).

На современном этапе селекционно - генетических исследований сельскохозяйственных культур все большую актуальность приобретает внедрение экспресс-методов идентификации и паспортизации генотипов. В настоящее время наиболее эффективными методами идентификации генотипов являются методы, основанные на анализе первичной структуры ДНК – методы ДНК-маркирования. Идентификация генотипов может быть использована при включении новых образцов в коллекции генетических ресурсов, для выявления образцов «двойников», подтверждение генеалогии получаемых гибридов, а также для идентификации сортовой принадлежности спорных образцов.

Обоснование:

Предлагаемая СОП основана на применении генотипирования с использованием микросателлитных ДНК-маркеров (SSR-маркеров) и мультиплексного фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism3130. Для сокращения времени, необходимого для проведения анализа, и снижения себестоимости SSR-маркеры объединены в мультиплексные наборы - по 3-4 в каждом наборе. При этом каждый SSR-маркер в наборе имеет специфичную для него флуоресцентную метку, что обеспечивает безошибочную идентификацию целевых продуктов амплификации при выполнении фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism3130.

Характеристика мультиплексных наборов ДНК-маркеров: используемые SSR ДНК-маркеры сгруппированы в мультиплексные наборы в соответствии с размером амплифицируемых фрагментов таким образом, что в каждый набор входят маркеры с неперекрывающимися диапазонами размеров амплифицированных фрагментов (Приложение 1). Это необходимо для предотвращения перекрытия спектров флуоресценции продуктов ПЦР при проведении фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе. Для каждого маркера в мультиплексном наборе используется специфичный для него флуоресцентный краситель: карбоксифлуоресцеин (FAM), 6-карбоксихродамиин (R6G), карбокси-X-родамин (ROX), тетраметилкарбоксихродамиин (TAMRA). Каждый из приведенных красителей имеет разные оптические спектры флуоресценции, что также позволяет проводить в одной реакции одновременную идентификацию нескольких фрагментов, синтезированных с использованием праймеров, меченых разными красителями.

Порядок выполнения процедур:

1. Характеристика генетического анализатора

1 Точность идентификации размеров амплифицированных фрагментов не менее 1 пары нуклеотидов;

2 Анализатор ABIprism должен быть подключен к персональному компьютеру с установленным программным обеспечением, позволяющим выполнять сбор, хранение и анализ полученных данных (Foundation Data Collection, Gene Mapper 4.1. или аналогичное).

3 На приборе необходимо своевременное выполнение пространственной и спектральной калибровки, в соответствии с инструкцией пользователя от фирмы-производителя.

2. Пробоподготовка, постановка ПЦР и выполнение фрагментного анализа

2.1 Закладка образцов на проращивание (11 мин.)

- подготовка лабораторной посуды (чашка Петри): помывка, сушка, маркировка: 3 мин.
- подготовка образца: отбор семян по количеству (30-40 шт.), антисептическая обработка 70% этанолом, промывка, закладка образцов на проращивание в термостат «Термит»: 5 мин.
- контроль прорастания и увлажнение проростков в чашках Петри при необходимости: 3 мин.

2.2. Экстракция ДНК сортообразцов риса (27 мин.)

- подготовка навески: 4 мин
- подготовка лабораторной посуды (пестик, ступка): 5 мин
- измельчение образца с помощью пестика и ступки и перенесение в микропробирку: 5 мин.
- выполнение необходимых операционных процедур протокола экстракции (закладка в термостат «Термит», закладка в центрифугу Eppendorf MiniSpin, подготовка и маркировка чистых пробирок, отбор супернатанта и перенос его в чистую пробирку с помощью дозатора) – всего 6 этапов: 11 мин.

- контроль высухания полученной пробы ДНК, растворение в буфер хранения и маркировка пробирки: 2 мин.

Экстракция проб ДНК, необходимых для выполнения анализа проводится с использованием набора Gene Jet Plant Genomic DNA Purification mini kit в соответствии с прилагаемой инструкцией.

2.3 Проверка концентрации ДНК в полученных пробах методом электрофореза в геле (15 мин.)

- приготовление электродного буфера: 3 мин.
- приготовление 1% агарозного геля: 3 мин
- приготовление серии разведений пробы ДНК: 3 мин
- нанесение пробы: 1 мин
- проведение электрофореза с помощью электрофоретической камеры: 2 мин
- окрашивание геля и анализ интенсивности свечения фрагментов ДНК, сопоставление со стандартным образцом с известной концентрацией: 3 мин.

2.4. Постановка ПЦР (49 мин.)

- проведение расчета ПЦР смеси: 2 мин
- подготовка реактивов и расходных материалов: 1 мин
- подготовка стоковых и рабочих растворов праймеров: 1 мин.
- постановка ПЦР: 15 SSR-маркеров×3 мин=45 мин.

Постановка ПЦР проводится по следующему протоколу:

Компонентный состав реакционной смеси (в расчете на одну реакцию):

Буфер десятикратный для ПЦР (из набора для постановки ПЦР производства НПО «Сибэнзим», кат. № K002): 2,5 мкл;

Дезоксинуклеотидтрифосфаты (смесь из набора для постановки ПЦР производства НПО «Сибэнзим», кат. № K002) в концентрации 0,5 мм: 2 мкл;

Праймеры: по 2 мкл каждого праймера (прямого и обратного) из рабочего раствора с концентрацией 3,75 мМ; Таq ДНК-полимераза: 1 единица активности; ДНК - 1 мкл; Вода Мq: до объема 25 мкл.

Температурно-временные параметры ПЦР:

Начальная денатурация - 5 мин. при 95 °С,

Следующие 35 циклов:

Денатурация - 15 сек. при 95 °С

Отжиг праймеров - 30 сек. при 58 °С

Элонгация - 30 сек. при 72 °С

2.5 Проверка наличия положительного синтеза продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле (10 мин.)

- приготовление электродного буфера: 3 мин.

- приготовление 2% агарозного геля: 3 мин.

- нанесение пробы: 1 мин.

- проведение электрофореза: 2 мин.

- окрашивание геля и анализ наличия целевых фрагментов амплификации: 3 мин.

Завершающий цикл синтеза - 5 мин. при 72°С. По завершении ПЦР образцы подготавливают к фрагментному анализу по следующему протоколу:

- 1 мкл ПРЦ-продукта растворяют в 30 мкл деионизированной воды;

- 1 мкл разбавленного ПРЦ-продукта переносят в приготовленный непосредственно перед использованием буфер нанесения следующего состава – 8,85 мкл Hi-Di™ Formamide и 0,15 мкл размерного стандарта (S450, COrDIS, Syntol) и проводят денатурацию в течение 5 минут при 95 °С. После денатурации образцы охлаждают на льду и вносят в плашку генетического анализатора ABIprism.

2.6 Фрагментный анализ продуктов амплификации (288 мин.)

- разведение образца и подготовка к денатурации: 3 мин

- денатурация образца: 15 SSR-маркеров×3 мин = 45 мин

- программирование генетического анализатора ABIprism, формирование рабочей плашки, нумерация образцов в базе данных прибора: 15 SSR-маркеров×4 = 60 мин.

- нанесение образцов в прибор, запуск прибора, контроль работы прибора при выполнении анализа: 15 SSR-маркеров×2 мин = 30 мин.

- анализ данных фрагментного анализа: 15 SSR-маркеров×10 мин = 150 мин.

При проведении фрагментного анализа задают следующие параметры на генетическом анализаторе ABI prism3130:

Вольтаж при нанесении образцов – 1,2 kVolts.

Время нанесения образцов – 16 секунд.

Время задержки считывания результата – 240 секунд.

Напряжение электрофореза – 15 kVolts.

Длительность электрофореза – 600 секунд.

После проведения фрагментного анализа проводят обработку данных в программе GeneMapper 4.1. Целевые пики на электрофореграмме идентифицируют по типу красителя и диапазону размера амплифицированных фрагментов (Приложение 2).

Данные, полученные после обработки, представляют собой числовые значения, характеризующие размер амплифицированного фрагмента по целевым SSR-маркерам (Приложение 3). Совокупность данных по всем используемым SSR-маркерам является ДНК-паспортом образца, используемым для его идентификации.

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 400 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Великов В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство // Саратов: «Саратовский источник». –2013. –84 с. – 2013.
2. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – №. 4-2. – С. 1044-1054.
3. Murray, M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray // Genomt. 1980.V. 40. P. 379-378.
4. Bretting, P.K. & Widrlechner, M.P. 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13:11–86.
5. De Vicente, M.C., Metz, T. & Alercia, A. 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. Rome, IPGRI. Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. & Hodgkin, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin No. 2. Rome, IPGRI.

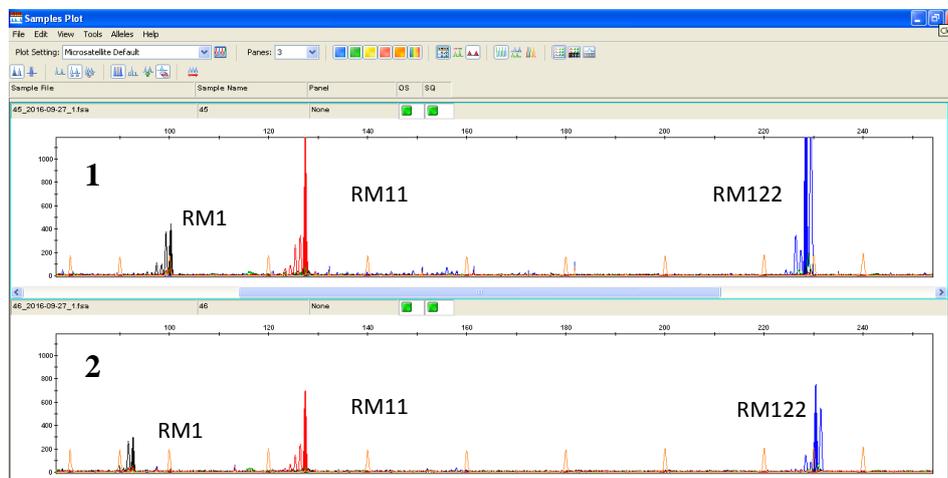
ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение № 1

Мультиплексные наборы SSR-маркеров для ДНК-паспортизации сортов риса

№	SSR-локус	Флуорофор	Диапазон размера фрагментов
1	RM168	R6G	97-109
	RM167	TAMRA	129-153
	RM164	ROX	249-305
2	RM122	FAM	224-238
	RM1	TAMRA	83-115
	RM11	ROX	123-147
3	RM154	ROX	167-195
	RM307	R6G	123-133
	RM510	TAMRA	113-127
	RM162	FAM	203-247

Фрагментный анализ сортов риса Олимп (1) и Дружный (2) по мультиплексному набору, включающему SSR-маркеры RM1, RM11 и RM122



ДНК-паспорта сортов риса, полученные по результатам SSR-генотипирования

	RM1	RM11	RM122	Rm168	Rm167	Rm164	Rm510	Rm307	Rm154	Rm162
Краснодарский 3352	93	127	230	99	145	271	125	129	185	247
Краснодарский 424	93	127	230	99	145	271	125	129	185	247
Кубань 3	102	127	224	99	145	276	125	129	185	237
Красноармейский 313	100	134	228	97	149	298	125	131	185	243
Спальник	93	127	224	97	149	271	125	129	185	225
Лиман	91	127	224	97	149	271	125	129	185	225
Кулон	94	127	230	99	153	269	123	131	189	225
Старт	93	127	224	97	149	271	125	129	184	225
Рапан	93	127	230	97	149	305	125	129	185	225

журнал «Результаты ПЦР анализа»

№ п.п.	Дата анализа	Ген	Маркер	Результат +/-	Примечание



Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт риса»**
ФГБНУ «ВНИИ риса»

Стандартная операционная процедура (СОП):
**Генотипирование коллекционного и селекционного материала риса
методами ДНК-маркирования**
СОП № 13/2017

Разработчик:

Епифанович Ю.В., Епифанович Н.В.

Подразделение:

лаборатория биотехнологии и молекулярной
биологии «ВНИИ риса», ЦКП ВНИИ риса

Дата разработки: август 2017г.

Срок действия: 5 лет

Страниц: 9

Подпись рецензента:

д.с.-х.н. Ковалев В.С.

д.б.н. Мухина Ж.М.

Область применения: Предназначена для специализированных НИИ, подведомственных ФАНО РФ, занимающихся селекционно - генетическими исследованиями риса.

Настоящая СОП определяет порядок действий при генотипировании образцов риса.

Цель: Генотипирование коллекционного и селекционного материала осуществляется с целью выявления образцов, несущих аллели генов, детерминирующих важные для целей практической селекции признаки.

Исполнитель: Настоящая СОП предназначена для научных сотрудников лабораторий биотехнологии и генетики.

Оборудование, приборы, сырье и реагенты:

- Термостат «Термит»
- Центрифуга Eppendorf MiniSpin
- Источник питания к электрофоретической камере EPS-300 X
- Электрофоретическая камера для горизонтального электрофореза Helicon
- Транслюминатор ЕСХ-26.МХ.
- Дозатор одноканальный 100-1000 мкл.
- Дозатор одноканальный 20-200 мкл.
- Пробирки градуированные, 1,5 мл
- Наконечники, до 200 мкл
- Наконечники до 1000 мкл универсальные
- Система капиллярного гель-электрофореза "QIAxcel Advanced System"
- Четырехканальный ДНК-амплификатор «Терцик»
- Термоциклер T100 (BIO-RAD)
- Стрипы для QIAxcel бесцветные "QX 0.2 ml 12-Tube Strip
- Крышки для стрипов "QX 0.2 ml 12
- перчатки нитриловые
- халат лабораторный

Реактивы:

СТАВ: на 1л СТАВ буфера

100 ml – 1 MTris, pH 8.0

280 ml – 5 MNaCl

40 ml – 0.5 M EDTA

20 г. – СТАВ (CetylTrimethyl Ammonium Bromide)

Довести до 1л дистиллированной водой.

1 MTris, pH 8.0: на 1 л

121,1 гTris

700 мл ddH₂O

Растворить tris и довести до 900 ml.

pH довести до 8,0 концентрированной HCl (потребуется ~50ml)

Довести до 1 л.

0.5 M EDTA pH 8,0: на 1 л

186,12 г EDTA

750 мл ddH₂O

Добавить около 20 г гранул NaOH

Медленно добавлять NaOH до pH 8.0, EDTA не растворится пока pH не достигнет 8,0.

5 MNaCl: на 1 л

292,2 г NaCl

700 ml ddH₂O

Растворить и довести до 1 л.

Реактивы для ПЦР:

- Вода стерильная деионизованная
- ДНК-матрица
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (смесь из набора для постановки ПЦР производства НПО «Сибэнзим», кат. № K002) в концентрации 0,5 мМ: 2 мкл;
- Праймеры прямой и обратный
- 10X Таq буфер
- 25mM MgCl₂ (при необходимости)
- Таq ДНК-полимераза
- Маркер для QIAxcel QX Alignment Marker

Документирование:

- лабораторный журнал

Общее описание:

Генотипированием называется процесс определения комбинации аллелей данного гена, которой обладает конкретный организм. Набор генов, по которым ведется генотипирование образцов коллекции, определяется задачами практической селекции. Генотипирование – это метод, основанный на новейших достижениях в области биотехнологии и молекулярной биологии.

Образцы в Коллекции должны быть охарактеризованы с помощью классических современных молекулярно-генетических методов.

Благодаря достижениям в области биотехнологии, для описания все чаще используются технологии молекулярного маркирования и геномики, в сочетании с фенотипическими наблюдениями, потому что они имеют преимущества в плане оценки изменчивости и отборе уникальных образцов. При этом, генотипические данные, полученные в процессе описания зародышевой плазмы с использованием молекулярных методов, имеют преимущества по сравнению с фенотипическими данными, поскольку выявляемая изменчивость не зависит от условий окружающей среды. Тем не менее, использование молекулярных технологий остается проблемой для некоторых организаций, так как для этого необходимы современная лабораторная база и технические возможности, что требует больших затрат, особенно когда для новых объектов необходимо разработать *de novo* геномоспецифичные маркеры (например, микросателлитные маркеры - SSR).

Для многих сельскохозяйственных культур был разработан широкий спектр праймеров для маркеров, которые можно использовать для описания генетического разнообразия, а также были созданы минимальные наборы наиболее важных (ключевых) маркеров. Для того чтобы обеспечить сопоставимость результатов независимых анализов, определенные образцы генбанка следует включить в качестве реверсных генотипов при анализе каждой выборки. Использование одних и тех же рефересных генотипов в молекулярных исследованиях играет важную роль для сопоставления данных различных генбанков. Молекулярные маркеры различаются по уровню выявляемого генетического полиморфизма; по типу получаемых данных; по возможностям их применения на том или ином таксономическом уровне, а также по техническим требованиям их применения и финансовым затратам. В тех случаях, когда возможно проведение маркер-вспомогательного отбора – MAS (т.е. отбор селекционного материала на наличие или отсутствие определенных признаков на молекулярном уровне), такой подход можно применить и для оценки зародышевой плазмы на наличие целевых признаков.

Обоснование СОП:

Выделение и очистка нуклеиновых кислот – это первый шаг в большинстве молекулярно-биологических исследований и во всех методиках, связанных с рекомбинантными ДНК. В нашем случае задачей методов выделения нуклеиновых кислот является получение очищенных нуклеиновых кислот из разных источников с целью проведения генотипирования образцов риса методом ПЦР анализа. Метод основан на многократном избирательном копировании

определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*invitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований.

Для визуализации ПЦР продукта используется электрофоретическое разделение фрагментов ДНК. При проведении электрофореза фрагменты ДНК мигрируют в геле под воздействием сил электрического поля. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

Перед началом электрофореза к образцам принято добавлять два разных красителя с кислым значением pH (часто для этих целей используют, ксиленовый голубой и бромфеноловый синий), чтобы визуализировать ход электрофореза и утяжелять образцы глицерином (до 20 % глицерина в образце). Краситель также необходим для того, чтобы определить, когда стоит остановить процесс.

Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором. Чаще всего используются буферы, содержащие ЭДТА, трис, а также борную или уксусную кислоты. Соответственно, буфер, содержащий борную кислоту, называется ТВЕ (*tris-borate-EDTA*), а буфер, содержащий уксусную кислоту, — ТАЕ (*tris-acetate-EDTA*). Концентрации маточных растворов ТВЕ и ТАЕ составляют 6х и 50х соответственно, если сравнивать с их рабочими концентрациями. Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля.

После разделения (иногда краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в -лучах.

Определение размеров производят путём сравнения наборов коммерческих фрагментов ДНК известной длины («DNA ladder», «линейка», «маркеры ДНК»), и ДНК в проверяемых образцах.

Порядок выполнения процедур:

1. МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК

1.1. Приготовление реагентов (80 мин)

1.1.1. Приготовление 5 M NaCl: на 1 л (10 мин.)

1.1.2. Приготовление 0.5 M EDTA pH 8.0 (20 мин.)

1.1.3. Приготовление 1 M Tris, pH 8.0 (20 мин.)

1.1.4. Приготовление СТАВ (30 мин.)

1.2. Выделение геномной ДНК (90 мин.)

1.2.1. Для генотипирования отобрать несколько (не более 5) этиолированных проростков (размером около 1 см каждый), или 2,5-3 см листовой пластинки растения, выращенного в коллекционном питомнике, поместить в пробирку эппендорфа, 1,5 мл на стенке пробирки указывается номер образца, соответствующий индивидуальному идентификационному номеру, присвоенному ему каталожному порядковому номеру генофонда. В лабораторный журнал «Экстракции ДНК» вносится соответствующая запись. (5 мин.)

1.2.2. Ткань растереть в ступке на холоде. (5 мин.)

1.2.3. Перенести растертую ткань в прогретую до 65 °С пробирку с 2х СТАВ (из расчёта 25 мл 2х СТАВ (СТАВ - 2% (w/v), 1,4M NaCl, 0,1M Tris-HCl, pH 8.0, 20mM ЭДТА, довести dH₂O) на 2–5 г ткани), очень хорошо и быстро перемешать. (3 мин.)

1.2.4. Инкубировать при 65 °С - 1 час.

1.2.5. Охладить до комнатной температуры, добавить равный объем хлороформа: изоамилового спирта (24 : 1), перемешивать и оставить инкубироваться на 20 мин. (2 мин.)

1.2.6. Центрифугировать Eppendorf MiniSpin на 5 000 rpm при комнатной температуре 10 мин. (11 мин.)

1.2.7. Снять водную фазу, добавить к ней 0,2 объема 5x СТАВ (СТАВ – 5 % (w/v), 350mM ЭДТА, довести dH₂O), перемешать и инкубировать при 65 °С 10 мин. (11 мин.)

1.2.8. Добавить равный объем хлороформ: изоамиловый спирт, инкубировать 1 мин, периодически перемешивая. (2 мин.)

1.2.9. Центрифугировать на 5 000 rpm при комнатной температуре 10 мин. (10 мин.)

1.2.10. Добавить равный объем буфера для преципитации (СТАВ – 1 % (w/v), 0,05M Tris-HCl, pH 8,0, 10mM ЭДТА, довести dH₂O) (можно и 2–3 объема), перемешать и оставить на 1 час при комнатной температуре. (5 мин.)

1.2.11. Центрифугировать Eppendorf MiniSpin на 8 000 rpm при комнатной температуре 20 мин. (2 мин.)

1.2.12. Растворить осадок в 1–2 мл HS-TE буфере (1M NaCl, 0.01M Tris-HCl, pH 8,0, 1mM ЭДТА, довести dH₂O); добавить 2 объема 96 % этанол и инкубировать 1 час при –20 °С или 30 мин при –70 °С (15 мин.)

1.2.13. Центрифугировать 8 000 rpm при 4 °С - 10 мин. (10 мин.)

1.2.14. Образец центрифугировать 5 минут при 12000 rpm, полученный осадок промыть 200мкл 70% этанола, высушить и растворить в 100мкл 0,1*TE-буфера. (9 мин.)

В ПЦР смесь вносится по 2 мкл раствора ДНК, выделенного данным методом.

2. МЕТОДИКА ПЦР АНАЛИЗА (30 мин)

Компонентный состав реакционной смеси (в расчете на одну реакцию):

Буфер десятикратный для ПЦР (из набора для постановки ПЦР производства НПО «Сибэнзим», кат.№ К002): 2,5 мкл;

Дезоксинуклеотидтрифосфаты (смесь из набора для постановки ПЦР производства НПО «Сибэнзим», кат.№ К002) в концентрации 0,5 mM: 2 мкл;

Праймеры: по 2 мкл каждого праймера (прямого и обратного) из рабочего раствора с концентрацией 3,75 mM;

Тaq ДНК-полимераза: 1 единица активности;

ДНК - 1 мкл;

Вода Мq: до объема 25 мкл.

Температурно-временные параметры ПЦР:

Начальная денатурация - 5 мин. при 95 °С,

Следующие 35 циклов:

Денатурация - 15 сек. при 95 °С

Отжиг праймеров - 30 сек. (Для расчета температуры отжига праймеров будет использована следующая формула: $Ta=2(A+T)+4(G+C)-5$, где:

Ta-температура отжига (*annealing temperature*)

A, T, G, C – количество оснований аденозин, тимин, гуанин, цитозин, соответственно.)

Элонгация - 30 сек. при 72°С.

Предотвращение контаминации. Контрольные реакции при постановке ПЦР

Даже небольшие количества посторонней ДНК-матрицы могут привести к образованию неспецифичного продукта в ходе процесса амплификации. Что еще важнее, малейшее загрязнение препаратов нуклеазами приводят к быстрой дегградации ДНК.

При работе следует использовать одноразовую пластиковую посуду (носики, пробирки и т.д.) и небольшие одноразовые фасовки реактивов.

При одновременном проведении нескольких реакций рекомендуется приготовление общих реакционных смесей, содержащих общие для всех реакций компоненты. Те компоненты,

которые варьируют от реакции к реакции, добавляют после разнесения аликвот реакционной смеси по пробиркам для проведения реакции. I Использование общей реакционной смеси позволяет уменьшить вариации в количестве различных компонентов от пробирки к пробирке. Для компенсации погрешности пипетирования реальный объем общей реакционной смеси должен примерно на 5-10% превышать расчетный. Перед распределением аликвот реакционной смеси по пробиркам необходимо перемешать ее содержимое, например, с помощью пипетирования. После перемешивания необходимо сбросить оставшиеся на стенках пробирки капли с помощью быстрого центрифугирования. При смешивании малых объемов реагентов (например, при их добавлении непосредственно в пробирку для ПЦР) необходимо обратить внимание, чтобы на внешней стороне носика не оставалось дополнительных капель. После добавления реагента в пробирку следует аккуратно перемешать содержимое пипетированием. Ферменты следует добавлять в реакционную смесь в последнюю очередь и перемешивать аккуратным пипетированием, избегая вспенивания смеси.

1. Контроль контаминации Отрицательный контроль ПЦР (ОКП) в котором присутствуют все необходимые компоненты, кроме матрицы ДНК, необходим для оценки уровня контаминации. Наличие продукта амплификации в ОКП свидетельствует о загрязнении реактивов или инструментария нецелевым фрагментом ДНК, содержащим сайты отжига праймеров, используемых в ПЦР. В случае контаминации может потребоваться замена реактивов для ПЦР, замена автоматических пипеток, перенос работ по данной тематике в другое помещение.

2. Контроль специфичности праймеров При использовании новых праймеров нужно убедиться в том, что они не имеют альтернативных сайтов отжига и не являются источником неспецифической амплификации. Для этого вместе с экспериментальной реакцией ставят две контрольные (КСП1 и КСП2) с каждым праймером по отдельности. Отсутствие продуктов амплификации в этих реакциях означает, что праймеры можно использовать для амплификации целевого продукта. Если в одной из контрольных реакций происходит амплификация ДНК, необходимо заменить соответствующий праймер. Появление в реакции КСП1 или КСП2 низкомолекулярного продукта (не более 40-45 п.о.) может говорить о формировании димера праймера. Такая картина иногда наблюдается при превышении концентрации праймера в реакции. Как правило, это не оказывает существенного влияния на эффективность ПЦР.

3. Положительный контроль ПЦР Отсутствие продуктов ПЦР с экспериментальной ДНК-матрицы может объясняться как отсутствием целевого фрагмента ДНК в образце, так и порчей реактивов или деградацией ДНК-матрицы. Оценить эффективность работы реактивов можно с помощью положительного контроля ПЦР (ПКП) с использованием контрольной ДНК-матрицы.

3. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР и РАСШИФРОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ (180 мин)

Для визуализации продуктов ПЦР используется система капиллярного гель-электрофореза "QIAxcel Advanced System" и электрофорез в 2 % агарозном геле.

Методика электрофореза в агарозном геле

1. Подготовка к проведению анализа (20 мин.)

На ровную поверхность, устанавливают форму для заливки геля. Не касаясь дна формы (1-2 мм) помещают гребенки на расстоянии 5 см друг от друга.

Приготовление буферных растворов.

Для приготовления буферных растворов обычно используют готовые составы, входящие в комплекты реагентов для метода электрофореза в агарозном геле.

Для приготовления буферных растворов для электрофореза в агарозном геле, как правило, используют трис-боратный - ЭДТА (ТВЕ) или трис-ацетатный буферный раствор (ТАЕ) в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при температуре (18 – 25) °С в течение 1 недели или при температуре (2 - 8) °С в течение 1 мес.

В буферный раствор для образцов добавляют специально подобранный краситель. Присутствие красителя облегчает внесение образцов в лунки и позволяет в режиме реального времени наблюдать продвижение в геле фрагментов ДНК. Однако, избыточное количество красителя может мешать наблюдению фрагментов при ультрафиолетовом исследовании. В качестве красителей используют: бромфеноловый синий, ксиленцианол, крезоловый красный или OrangeG. Для каждой концентрации агарозного геля подбирается определенный краситель и его концентрация для оптимальных условий проведения электрофореза.

2. Приготовление геля (30 мин.)

Для приготовления агарозного геля в СВЧ-печи или на водяной бане расплавляют до прозрачного состояния необходимое количество смеси агарозы, буферного раствора и воды, не допуская закипания геля (в течение 15-20 мин). Расплавленную смесь охлаждают до температуры 50 - 60 °С, далее с помощью автоматического дозатора добавляют бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, тщательно перемешивают и смесь тонким слоем (до 5 мм) заливают на пластинку так, чтобы зубцы гребенки были погружены не менее, чем на 3 мм, не допуская образования пузырьков воздуха. После полного застывания геля в течение 30 – 60 мин при температуре 18 -25 °С осторожно извлекают гребенки плавным движением вверх, избегая повреждения образовавшихся лунок.

3. Проведение электрофореза (120 мин.)

Камеру для электрофореза заполняют буфером раствором с бромистым этидием, помещают пластинку с агарозным гелем и осторожно извлекают гребенку плавным движением вверх, избегая повреждения образовавшихся лунок.

Буферный раствор должен полностью покрыть пластинку с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. Исследуемые образцы ДНК вносят в лунки агарозного геля под буферный раствор, камеру для электрофореза закрывают, электроды подсоединяют к источнику тока и включают напряжение. Молекулы ДНК одинакового размера (и одинакового заряда) движутся единым фронтом, образуя в геле дискретные невидимые полосы. Чем меньше размер молекул, тем быстрее они движутся от катода (-) к аноду (+). Постепенно исходный образец ДНК, состоящий из разных макромолекул, разделяется на зоны, распределенные по длине пластинки. Процесс электрофореза отслеживают по перемещению в геле красителя - заряженного низкомолекулярного вещества, которое вносят в каждую лунку перед началом электрофореза. Электрофорез останавливают, при приближении красителя к концу пластинки.

4. Регистрация результатов генотипирования (10 мин.)

Результаты электрофореза ДНК в агарозном геле регистрируют в присутствии бромистого этидия – интеркалирующего соединения, образующего с фрагментами ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в ультрафиолетовом свете при 290-330 нм в виде светящихся полос при облучении геля с помощью УФ-трансиллюминатора. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос.

Если образец представляет собой дискретный набор макромолекул разного размера, то после проведения электрофореза образуются четкие полосы, расположенные на пластинке одна под другой в соответствии с их размером. Для определения относительной молекулярной массы фрагментов ДНК, одновременно с исследуемым образцом проводят электрофорез маркеров макромолекул ДНК с известными молекулярными массами. Набор маркеров должен охватывать весь диапазон молекулярных масс ДНК полученных в результате ПЦР. Образец, содержащий маркеры ДНК, вносят в отдельную лунку. Логарифм относительной молекулярной массы маркера линейно связан с его электрофоретической подвижностью R_f — величиной, равной отношению расстояний, пройденных маркером и красителем (фронтом растворителя). По калибровочному графику зависимости логарифма относительных молекулярных масс маркеров от R_f , находят относительную молекулярную массу каждого компонента образца

ДНК. Относительная молекулярная масса двухцепочечных нуклеиновых кислот измеряется в числе пар нуклеотидов, одноцепочечных — в числе нуклеотидов.

Полученные результаты фиксируются в журнале «Результаты ПЦР анализа» по форме в Приложении 2.

5. Разделение линейных молекул

Для разделения линейных двухцепочечных молекул ДНК используют гели с различной концентрацией агарозы, от 0,3 % до 2 %, соответствующей определенному размеру молекул ДНК (табл.1).

Таблица 1 - Соотношение гелей с различной концентрацией агарозы и размеров, разделяемых ДНК.

% агарозы	0.3	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.2	1.5	2.0
Размер ДНК [kbp]	5-60	1-30	1-20	0.8-12	0.6-10	0.5-8	0.5-7	0.4-6	0.2-3	0.1-2

[kbp] – 1000 пар оснований ДНК

Нижний предел размеров ДНК определяется (в основном) диффузией полосы в геле. В гелях с низкой концентрацией агарозы фрагменты небольших размеров ДНК разделяются, но четкость разделения полос невысокая.

Верхний предел размеров ДНК находится в прямой зависимости от напряженности поля, при которой проводится электрофорез. Чем меньше напряженность поля, тем более эффективно можно разделить длинные молекулы ДНК с большей молекулярной массой.

Реактивы для визуализации продуктов амплификации:

Приготовление трис-боратного буферного раствора pH. В мерную колбу вместимостью 1л вносят 10,8 г трис (гидроксиметил) аминометан, 5,5 г борной кислоты, 4 мл 0,05 М раствора ЭДТА pH 8.0 и 700 мл воды очищенной, перемешивают и доводят объем раствора водой очищенной до метки и вновь перемешивают.

Приготовление буферного раствора для внесения. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 1,25 мл 0,5 % раствора натрия додецилсульфата, 5 мл 0,1 М раствора ЭДТА pH 8.0, 12,5 мл глицерина, 6,25 мл воды очищенной и тщательно перемешивают. Перед использованием отбирают необходимое количество буферного раствора, разводят в 10 раз водой очищенной и добавляют выбранный краситель до необходимой концентрации, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Приготовление агарозного геля. Растворяют необходимое количество агарозы в трис-боратном буферном растворе, нагревая в СВЧ-печи или на водяной бане, не доводя до кипения, до полного растворения агарозы. Полученный раствор остужают до температуры 50-60 °С и добавляют водный раствор бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Раствор заливают в плашку для электрофореза и оставляют на 0,5 – 1 ч до полного застывания геля. Например, для приготовления 1,5 % раствора агарозного геля следует взять 1,5 г агарозы и растворить в 100 мл буферного раствора.

6. Визуализации продуктов ПЦР возможна с помощью системы капиллярного гель-электрофореза "QIAxcel Advanced System" (30 мин.)

Система QIAxcelAdvanced предназначена для проведения электрофореза в геле (в капиллярах) в автоматическом режиме. Визуализации продуктов ПЦР с помощью системы капиллярного гель-электрофореза "QIAxcelAdvancedSystem" производится согласно руководства по эксплуатации (QIAxcel Advanced UserManual 03/2016).

Результаты расшифровки результатов генотипирования образцов заносятся в лабораторный журнал.

Суммарная длительность выполнения СОП для 1 образца: 380 мин.

Нормативно-справочная документация и литература:

1. Великов В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство //Саратов: «Саратовский источник». –2013. –84 с. – 2013.
2. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – №. 4-2. – С. 1044-1054.
3. Murray, M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray // Genomt. 1980.V. 40. P. 379-378.
4. Bretting, P.K. &Widrechner, M.P. 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13:11–86.
5. De Vicente, M.C., Metz, T. &Alercia, A. 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. Rome, IPGRI. Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. & Hodgkin, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin No. 2. Rome, IPGRI.
6. Laucou, V., Lacombe, T., Dechesne, F., Siret, R., Bruno, J.P., Dessup, M., Dessup, P., Ortigosa, P., Parra, P., Roux, C., Santoni, S., Vares, D., Peros, J.P., Boursiquot, J.M. & This, P. 2011. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(6): 1233–1245.
7. Lidder, P. &Sonnino, A. 2011. *Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture*. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Background Paper No. 52. Rome, FAO.

Приложения:

Приложение 1

журнал «Экстракции ДНК»

№ п.п.	Дата поступления образца	Наименование образца	Примечание

Приложение 2

журнал «Результаты ПЦР анализа»

№ п.п.	Дата анализа	Ген	Маркер	Результат +/-	Примечание