

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР ИМЕНИ В.С. ПУСТОВОЙТА»
(ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК)

УДК 633.853.494:631.52
ГРНТИ 68.35.37

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК,
канд. с.-х. наук



К.Г. Баблюев
2025 г.

«МЕТОДЫ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЙ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ
РАПСА ОЗИМОГО (*B. NAPUS L.*)»

Краснодар 2025

РАЗРАБОТЧИКИ

Заведующий кафедрой
молекулярной селекции,
клеточных технологий и
семеноводства
ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени
К.А. Тимирязева, д.с.-х.н.,
профессор РАН



С.Г. Монахов

Ассистент кафедры молекулярной
селекции, клеточных технологий
и семеноводства
ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени
К.А. Тимирязева



М.А. Никитин

Ведущий научный сотрудник,
заведующий отделом селекции
рапса и горчицы ФГБНУ ФНЦ
ВНИИМК им. В.С. Пустовойта,
к.б.н.



Л.А. Горлова

РЕФЕРАТ

Работа содержит: 72 страницы, 1 рисунок, 31 источник литературы.

Ключевые слова: рапс озимый, фенотипирование, методики, селекция, оценка признаков, урожайность, качество семян, устойчивость к стрессам, инокуляция.

Цель работы: систематизация и описание стандартизированных методик инструментальной фенотипической оценки озимого рапса (*B. napus L.*) для применения в селекционных программах и научно-исследовательской деятельности.

Методы: в работе представлены унифицированные протоколы оценки более 24 ключевых селекционно-значимых признаков, включая:

- методы определения элементов структуры урожая (количество стручков, число семян в стручке, масса 1000 семян);
- инструментальные методы анализа качества семян (масличность, содержание белка, глюкозинолатов, жирно-кислотный состав масла семян);
- методики оценки устойчивости к абиотическим стрессам (полегание, осыпание, мороз, засуха, гербициды);
- методы оценки устойчивости к болезням (кила, склеротиниоз, фомоз, фузариоз, альтернариоз);
- стандартизированные подходы к измерению морфометрических показателей (высота растения, число ветвей, длина стручка и носика, продолжительность межфазных периодов).

Результаты работы: разработан комплекс взаимодополняющих методик, обеспечивающих точную, воспроизводимую и сравнительную оценку фенотипических признаков рапса ярового. Методики включают детальное описание необходимого оборудования, инструментов, реактивов, пошаговых процедур проведения измерений и формул для расчёта итоговых показателей. Представленные протоколы позволяют стандартизировать процесс фенотипирования в селекционных питомниках и исследовательских опытах, что способствует повышению эффективности отбора перспективных генотипов.

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ.....	3
1. УРОЖАЙНОСТЬ	5
2. ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЯ	8
3. СОДЕРЖАНИЕ ЖИРА В СЕМЕНАХ (МАСЛИЧНОСТЬ СЕМЯН).....	11
4. СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА	15
5. СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗИНОЛАТОВ	19
6. СОДЕРЖАНИЕ ОЛЕИНОВОЙ, ЛИНОЛЕВОЙ, ЛИНОЛЕНОВОЙ И ЭРУКОВОЙ КИСЛОТЫ	24
7. УСТОЙЧИВОСТЬ К ПОЛЕГАНИЮ	27
8. УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСЫПАНИЮ	29
9. УСТОЙЧИВОСТЬ К МОРОЗУ	30
10. УСТОЙЧИВОСТЬ К ЗАСУХЕ	33
11. ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА «ВСХОДЫ – НАЧАЛО ЦВЕТЕНИЯ»...36	
12. ВЫСОТА РАСТЕНИЯ	39
13. ЧИСЛО ВЕТВЕЙ НА РАСТЕНИИ	41
14. КОЛИЧЕСТВО СТРУЧКОВ НА РАСТЕНИИ.....	43
15. ДЛИНА СТРУЧКА.....	46
16. ЧИСЛО СЕМЯН В СТРУЧКЕ	48
17. МАССА 1000 СЕМЯН.....	51
18. ДЛИНА НОСИКА СТРУЧКА	53
19. ГЕРБИЦИДОУСТОЙЧИВОСТЬ.....	55
20. УСТОЙЧИВОСТИ К КИЛЕ	57
21. УСТОЙЧИВОСТЬ К СКЛЕРОТИНИОЗУ	60
22. УСТОЙЧИВОСТЬ К ФОМОЗУ	62
23. УСТОЙЧИВОСТЬ К ФУЗАРИОЗУ	64
24. УСТОЙЧИВОСТЬ К АЛЬТЕРНАРИОЗУ.....	66
СПИСОК АББРЕВИАТУР И СОКРАЩЕНИЙ.....	68
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	70

1. УРОЖАЙНОСТЬ

Перед уборкой рапса озимого необходимо точно определить и маркировать учетную площадь делянки, границы делянки должны быть четко обозначены. Уборку урожая на учётной площади делянки проводят после удаления по одному крайнему растению с концов учетных рядов в фазе образования зелёного стручка раздельным способом или прямым комбайнированием. Удаление краевых растений является обязательной операцией для исключения «краевого эффекта», который приводит к завышению данных. Рекомендуется удалять не менее 0,5 м с каждого конца ряда на делянках пропашного типа. Точная длина и ширина учетной площади, или количество рядков и расстояние между ними, должны быть зафиксированы в полевом журнале. Площадь вычисляется в квадратных метрах (м²) с точностью до сотых долей, что необходимо для последующего пересчета урожая с делянки на гектары. Уборку следует проводить в сухую погоду. Если растения влажные от росы или дождя, необходимо дождаться их высыхания, так как повышенная влажность вегетативной массы значительно искажает данные о массе семян (А.А. Лященко, 2010).

При раздельной уборке растения срезают при образовании 50 % жёлто-зелёных стручков при влажности семян 30–33 %. Растения срезают на высоте 10-15 см от поверхности почвы. Для обеспечения чистоты опыта необходимо использовать острый и чистый инструмент (серп, садовый нож, мелкоделяночную жатку), чтобы избежать потерь семян из-за растрескиваемости стручков. Скошенную массу укладывают в компактные валки на специально подготовленные поддоны или брезент для предотвращения потерь и загрязнения почвой. Продолжительность дозревания в валках зависит от погодных условий и обычно составляет 5-10 дней. Контроль готовности проводится периодическим отбором проб семян из стручков для определения влажности. К обмолоту приступают, когда влажность семян достигнет 10-12% (оптимально для минимизации механических повреждений при обмолоте).

При прямом комбайнировании перед уборкой проводят десикацию посевов при влажности семян 38-40 %. Уборку проводят через 7-14 дней после обработки, когда влажность семян достигнет оптимальных для прямого комбайнирования 10-12%. Семена с учётной площади каждой делянки взвешивают и после взвешивания отбирают три навески семян: две массой по 5,0 г, для определения чистоты и отходов семян по ГОСТ 12037-81, третья – 15,0 г для определения влажности семян, которую определяют по ГОСТ 12041-82. Для определения содержания семян основной культуры, сорной примеси и семян других культурных растений две навески по 5,0 г анализируются

для получения двух параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать допустимого предела, указанного в стандарте. Для определения влажности навеску массой 15,0 г измельчают и высушивают в сушильном шкафу при температуре $(130 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 40 минут. Допускается использование влагомеров, но с обязательной периодической поверкой их показаний по термостатно-весовому методу.

Урожайность рассчитывают по формуле:

$$Y = \frac{M \cdot 10 \cdot (100 - B) \cdot (100 - C)}{S \cdot (100 - B_{ст.}) \cdot 100}$$

где Y – урожайность при стандартной влажности семян, т/га;

M – масса семян с делянки, кг;

S – учётная площадь делянки, м^2 ;

B – влажность семян при взвешивании урожая, %; $B_{ст.}$

– стандартная влажность семян (10 %), %;

C – отход примеси, %.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Мелкоделяночная жатка или комбайн с системой сбора урожая с учетной площади; аналитические весы с точностью взвешивания не менее $\pm 0,01$ г; сушильный шкаф лабораторный с терморегулятором для определения влажности семян; влагомер портативный для оперативного контроля влажности семян; оборудование для десикации (опрыскиватель); поддоны или брезент для размещения валков; оборудование для очистки и сортировки семян (аспирационная колонка, набор сит); измельчитель семян для подготовки проб к определению влажности.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Серпы, садовые ножи или другой острый режущий инструмент для раздельной уборки; мерные ленты и рулетки для определения учетной площади делянок; маркировочные средства (таблички, краска) для обозначения границ делянок; мешки или контейнеры для сбора и временного хранения семян с каждой делянки; полевой журнал для записи данных; этикетки влагостойкие для маркировки образцов; совки и лопатки для отбора проб семян; лабораторная посуда: бюксы, чашки Петри, стаканы мерные.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Препараты для десикации посевов (регламентированные для использования на рапсе); стандартные образцы для калибровки влагомера; дезинфици-

рующие средства для обработки оборудования (70% этанол); реактивы для определения чистоты семян (при необходимости).

Определение признака «урожайность» проводят все исполнители проекта

2. ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЯ

Отбор растений рапса озимого проводится на типичном для данного участка или опыта месте. Растения должны быть выбраны из средней части делянки для исключения «краевого эффекта». Запрещается отбирать угнетенные, поврежденные вредителями или болезнями, атипичные растения, если целью не является их специальное изучение.

Согласно общепринятой практике, отбор проводится методом случайной повторной выборки. Для получения статистически достоверных данных необходимо отобрать 20 индивидуальных растений с каждой повторности по варианту опыта. В полевом журнале обязательно отмечаются: дата отбора, фаза развития растения, погодные условия, номер делянки/варианта опыта, исходная влажность семян определяется с помощью портативного влагомера (В.А. Федотов, 2009).

В фазу физиологической спелости (влажность семян 25-35 %) индивидуальные растения срезаются серпом или секатором на уровне корневой шейки, проводятся измерения основных элементов продуктивности. Внешние признаки физиологической спелости: основная масса стручков на центральном побеге первого порядка приобретает желто-зеленую или лимонно-желтую окраску; семена в стручках становятся твердыми, при сдавливании не разделяются на половинки, а приобретают характерную для сорта окраску (коричневую или черную); нижние листья полностью отмершие, в средней части растения – желтеют. Точное определение влажности на момент отбора является критически важным. Для этого случайным образом отбирают 3-5 стручков с разных ярусов растения, обмолачивают их вручную и оперативно измеряют влажность семян с помощью калиброванного портативного влагомера или методом высушивания (ГОСТ 12041-82).

Срезанные растения помещаются в сухое, хорошо проветриваемое помещение (например, в бумажные или матерчатые мешки с этикетками) для дозаривания и равномерного подсушивания. Растения не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей. При достижении семян 8-10 % влажности, индивидуальное растение обмолачивается вручную или на специальной вальцовой молотилки, затем на аспирационной колонке проводится очистка семян от примесей. Визуальные признаки достижения важности в 8 -10 %: растение полностью сухое, стебли и стручки ломкие, семена в стручках свободно пересыпаются. При ручном обмолоте растение

помещается в плотный бумажный пакет или на лист плотной бумаги, и стручки аккуратно обмолачиваются. Это щадящий метод, минимизирующий потери. При механическом обмолоте используют лабораторную вальцовую или барабанную молотилку. Перед обработкой каждого нового растения молотилка должна быть тщательно очищена от остатков семян предыдущего растения. Необходимо подобрать щадящий режим (минимальные обороты барабана), чтобы не дробить семена (В.В. Пыльнев, 2004).

Полученная после обмолота масса представляет собой смесь семян, частиц стручков, стеблей и прочего сора. Очистка проводится в два этапа: первичная очистка и окончательная очистка. Первичную очистку проводят путем просеивания через набор сит с разным диаметром ячеек для отделения крупного и мелкого сора. Окончательную очистку проводят на лабораторной аспирационной колонке (например, типа ОСМ-1 или аналог). Принцип действия основан на разделении фракций по аэродинамическим свойствам. Путем регулировки потока воздуха достигается полное отделение легких примесей (пыль, мякина) и щуплых семян от полноценных семян основной культуры. Процесс проводится до получения навески чистой фракции. Чистота полученной навески должна соответствовать требованиям ГОСТ 12037-81.

Далее определяется масса семян с растения путём взвешивания на аналитических весах с точностью не менее $\pm 0,01$ г.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Аналитические весы с точностью взвешивания не менее $\pm 0,01$ г; портативный влагомер для семян (типа Wile-55 или аналоги); лабораторная сушильная установка (шкаф) для определения влажности семян; лабораторная вальцовая или барабанная молотилка с регулируемой скоростью; лабораторная аспирационная колонка (типа ОСМ-1); набор стандартных сит с различным диаметром ячеек; климатическая камера или помещение с контролируемой температурой и влажностью для дозаривания растений; термостат для высушивания проб при определении влажности.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Секатор или серп для срезания растений; бумажные мешки размером 40×60 см для сбора и дозаривания растений; матерчатые мешки из дышащего материала; плотные бумажные пакеты для ручного обмолота; этикетки влагостойкие для маркировки образцов; полевой журнал для записи данных; образцовая мерная посуда (цилиндры, мензурки); щетки для очистки

молотилки; совки и лопатки для пересыпания семян; лабораторная посуда: чашки Петри, бюксы, стаканы.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Стандартные образцы для калибровки влагомера; дезинфицирующие средства для обработки оборудования (70% этанол, хлорамин); сиккативы для хранения образцов (силикагель).

Определение признака «продуктивность растения» проводят все исполнители проекта

3. СОДЕРЖАНИЕ ЖИРА В СЕМЕНАХ (МАСЛИЧНОСТЬ СЕМЯН)

Масличность семян определяется на ИК-спектрометре Matrix-I в среднем образце семян с каждой делянки в двукратной повторности по ГОСТ 33749-2014. Данный стандарт устанавливает общие принципы использования NIR-спектрометрии для анализа кормов и зерна, которые применимы и для анализа масличности семян рапса.

Метод основан на корреляции между спектром поглощения (или отражения) анализируемого образца в ближней ИК-области (780–2500 нм) и содержанием в нем химических компонентов. Связи О-Н, N-H и C-H, входящие в состав органических молекул (масла, белка, воды), поглощают излучение в этом диапазоне на характерных для них длинах волн. Регистрируя спектр отражения пробы, анализатор с помощью заранее разработанной калибровочной (градуировочной) модели рассчитывает содержание целевого компонента – в данном случае, сырого жира.

Масса пробы семян рапса, отобранной для анализа, составляла 10 г. Проба выдерживается в течение 1 часа при температуре выполнения измерения. Измерения проводятся сразу после заполнения кюветы в соответствии с инструкцией по эксплуатации ИК-анализатора по три измерения на каждой пробе. Обработка результатов измерений производится автоматически.

2. Подготовка пробы и условия проведения анализа

2.1. Отбор и подготовка средней пробы: Исходным материалом для анализа является **средняя лабораторная проба**, отобранная из семян каждой делянки в соответствии с ГОСТ 12042-80 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы отбора проб». Проба должна быть репрезентативной и однородной.

- **Подготовка:** Перед анализом среднюю пробу необходимо очистить от сорных и механических примесей и довести до кондиционной влажности (8-10%). Семена не должны быть нагретыми или поврежденными.

- **Измельчение (опционально):** Для повышения точности анализа и обеспечения однородности часть лабораторий практикует измельчение семян на лабораторной мельнице до определенной крупности (например, согласно ГОСТ 31640-2012 «Корма. Методы определения содержания сырого жира»). Однако современные NIR-анализаторы, такие как Matrix-I, часто позволяют анализировать целые семена, что является большим преимуществом.

2.2. Кондиционирование пробы: Масса пробы семян рапса, отобранной для анализа, составляет **10 г**. Это количество является стандартным для обеспечения оптимального заполнения измерительной кюветы прибора.

- **Выдерживание:** Перед измерением проба должна быть выдержана в течение **1 часа в помещении (лаборатории)**, где установлен анализатор. Это критически важное условие, позволяющее привести температуру пробы к температуре проведения измерения (**ГОСТ 31663-2012, п. 7.2**). Игнорирование этого этапа приводит к значительным погрешностям из-за влияния температуры на ИК-спектр.

3. Проведение измерений на ИК-спектрометре

3.1. Калибровка и проверка прибора: перед началом серии измерений производится проверка работы спектрометра с использованием эталонных образцов (стандартов), предоставленных производителем.

- **Градуировочные модели:** Расчет значений производится по заранее созданным калибровочным моделям. Эти модели разрабатываются производителем прибора или научной организацией с использованием эталонных методов (например, экстракции жира по Сокслету в соответствии с **ГОСТ 31640-2012**) для большого набора образцов с широким и известным диапазоном содержания масличности. Модель является «мозгом» анализатора и должна периодически валидироваться и обновляться.

- **Контроль дрейфа:** Для контроля стабильности работы прибора периодически (например, в начале каждой смены) измеряют стандартный образец. Если показания выходят за допустимые пределы, требуется юстировка прибора.

3.2. Процедура измерения:

- **Заполнение кюветы:** Измерительная кювета заполняется всей подготовленной пробой массой **10 г**. Необходимо обеспечить ее равномерное и плотное заполнение без пустот и перепадов плотности, так как это влияет на оптическую плотность слоя.

- **Проведение замеров:** Измерения проводятся **немедленно после заполнения кюветы** для исключения влияния изменения влажности пробы на воздухе. В соответствии с инструкцией по эксплуатации и для обеспечения статистической достоверности на **каждой пробе проводят три последовательных измерения**. Кювету между измерениями следует

высыпать, встряхнуть и заполнить заново для исключения ошибки, связанной с уплотнением пробы и неоднородностью укладки.

- **Двукратная повторность:** Анализ проводится в **двукратной повторности**, то есть с подготовкой и измерением двух независимых проб от одной и той же средней лабораторной пробы делянки. Это позволяет оценить погрешность отбора и подготовки пробы.

4. Обработка и представление результатов

4.1. Расчет результата: обработка результатов измерений производится автоматически программным обеспечением спектрометра. Программа усредняет три измерения для одной кюветы, а затем вычисляет среднее арифметическое значение по двум повторностям (двум независимым пробам по 10 г). Результат выводится на экран и/или печать в процентах (%) с точностью до **0,1%**.

4.2. Оценка достоверности результата:

- **Сходимость результатов:** Расхождение между результатами двух параллельных определений (двух проб по 10 г) не должно превышать допустимое расхождение, указанное в методике поверки прибора или калибровочной модели (обычно не более 0,5 %).

- **Статистическая обработка:** Для всего массива данных по деланкам опыта (с учетом повторностей) проводится статистическая обработка: вычисляется среднее арифметическое значение по варианту опыта (M), стандартная ошибка среднего (m) и коэффициент вариации (CV).

5. Валидация метода и контроль качества

Метод NIR является косвенным, поэтому требует периодической проверки его точности путем сравнения с данными, полученными эталонным методом (например, экстракционным – **ГОСТ 31640-2012**). Не реже одного раза в год или при анализе семян нового урожая следует проводить валидацию калибровочной модели, измеряя эталонным методом не менее 20-30 выборочных проб из анализируемой партии и сравнивая результаты.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

ИК-спектрометр ближнего диапазона (NIR-анализатор) модель "Matrix-I" или аналогичный, предназначенный для анализа целых семян или сыпучих материалов, с измерительной кюветой соответствующего объема; весы лабораторные аналитические точностью $\pm 0,01$ г, поверенные в установленном порядке; лабораторная мельница обеспечивающая измельчение семян до заданной и воспроизводимой крупности; сушильный

шкаф или климатическая камера для доведения проб до кондиционной влажности (5-7 %), если исходная влажность выходит за допустимые пределы.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Измерительная кювета (ячейка) спектрометра; емкости для проб с герметичными крышками для хранения и кондиционирования средних проб и навесок; стеклянные или пластиковые воронки; шпатель или ложка; щеточка для очистки кюветы.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Эталонные образцы (стандарты) для контроля работы спектрометра; этиловый спирт или изопропиловый спирт ректифицированный, не менее чем квалификации "Ч" (чистый для анализа).

Признак «содержание жира в семенах (масличность семян)» для всех соисполнителей определяется в учреждении ответственном за культуру – ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

4. СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА

Определяется по ГОСТу 10846-91 Зерно и продукты его переработки.
Метод определения белка.

Методика определения белка предназначена для определения массовой доли общего белка в семенах озимого рапса. Метод является арбитражным. Метод основан на методе Кьельдаля, который включает три основных этапа:

1. Минерализация навески семян концентрированной серной кислотой при нагревании в присутствии катализатора. При этом азот органических соединений переходит в сульфат аммония $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$.

2. Дистилляция: образовавшийся сульфат аммония при нагревании со щелочью выделяет аммиак (NH_3) , который отгоняется в приемную колбу с борной кислотой.

3. Титрование: выделенный аммиак, связанный с борной кислотой, количественно оттитровывается раствором соляной кислоты. По количеству кислоты, пошедшей на титрование, рассчитывают массовую долю азота, а затем – белка, с использованием пересчетного коэффициента.

Для анализа используется следующее лабораторное оборудование: весы лабораторные аналитические с точностью взвешивания не менее 0,0001 г; установка для перегонки с паром (установка Кьельдаля) или автоматический анализатор (Кьельдаль-автомат); колбы Кьельдаля на 250-500 мл; колбы мерные на 1000 мл и 100 мл; пипетки; бюретка на 25 или 50 мл с ценой деления 0,1 мл; электроплитка с закрытой спиралью или блок для разложения проб; сито с отверстиями диаметром 1 мм; мельница лабораторная циклонного типа.

Реактивы, необходимые для анализа: кислота серная, $\rho = 1,84 \text{ г/см}^3$, ч.д.а., без азота; натрия гидроксид (NaOH) , раствор 400 г/л (40%) без азота; кислота борная (H_3BO_3) , раствор 20 г/л (2%); кислота соляная (HCl) , раствор концентрации с $(\text{HCl}) = 0,1 \text{ моль/л}$ (0,1 н.) – титрант; смесь Кьельдаля; смесь метилового красного и метиленового синего (индикатор TASHIRO).

Подготовка пробы к анализу начинается с отбора средней пробы. Из партии семян рапса отбирают среднюю пробу по ГОСТ 12026-86. Пробу очищают от посторонних примесей, таких как семена сорняков, пыль, поврежденные семена. Очищенные семена измельчают на лабораторной мельнице до однородной массы, проходящей через сито с отверстиями 1 мм. Анализ следует проводить сразу после измельчения. Измельченную пробу тщательно перемешивают и помещают в герметичную банку.

Проведение анализа начинают с минерализации. Для этого в сухую чистую колбу Кьельдаля отвешивают на аналитических весах навеску измельченного рапса массой около 0,7-1,0 г. В колбу добавляют катализатор (около 1,5-2,0 г твердой смеси или 1-2 таблетки). Осторожно, небольшими порциями, доливают 15-20 мл концентрированной серной кислоты. Колбу помещают на электроплитку в вытяжном шкафу. Первые 10-15 минут нагревают осторожно, во избежание сильного вспенивания из-за жира и органики. Затем нагревание усиливают и кипятят содержимое до полного просветления раствора. Раствор становится прозрачным, голубовато-зеленым. Дистилляцию начинают в охлажденной колбе с минерализатом. В приемную колбу отгонного аппарата отмеривают 20-25 мл 2% раствора борной кислоты и добавляют 2-3 капли индикатора (раствор станет розовато-красным или другого цвета в зависимости от индикатора). Конец холодильника погружают в раствор борной кислоты. В перегонную колбу аккуратно, по стенке, приливают 60-70 мл 40% раствора NaOH (избыток) для создания щелочной среды. Немедленно начинают перегонку с паром. Перегоняют до тех пор, пока в приемной колбе не соберется около 150-200 мл дистиллята. Титрование начинают с конца холодильника промывают над приемной колбой небольшим количеством дистиллированной воды. Содержимое приемной колбы титруют раствором соляной кислоты (0,1 моль/л) до изменения цвета. Для индикатора TASHIRO (метилоранж + метиленовый синий): цвет изменяется от зеленого через серый до бледно-розового. Фиксируют объем (V) пошедшей на титрование кислоты, мл. Затем проводят холостой опыт со всеми реактивами, но без навески рапса. Фиксируют объем кислоты (V₀), пошедший на титрование в холостом опыте.

Массовую долю азота в процентах вычисляют по формуле:

$$X_1 = [(V - V_0) * K * 0,0014 * 100] / m \text{ где:}$$

V – объем раствора соляной кислоты концентрацией точно 0,1 моль/л, пошедший на титрование опытной пробы, мл;

V₀ – объем раствора соляной кислоты концентрацией точно 0,1 моль/л, пошедший на титрование в холостом опыте, мл;

K – поправочный коэффициент к точной концентрации раствора соляной кислоты 0,1 моль/л (если концентрация не точно 0,1M);

0,0014 – количество азота, соответствующее 1 мл раствора соляной кислоты точной концентрации 0,1 моль/л, г;

m – масса навески продукта, г;

100 – коэффициент для перевода в проценты. Массовую долю белка вычисляют по формуле:

$X_2 = X_1 * K_p$ где:

X_1 – массовая доля азота, %;

K_p – пересчетный коэффициент. Для семян рапса, согласно международным и отраслевым стандартам, принимается коэффициент 6.25.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допустимое расхождение между которыми не должно превышать 0,2%.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные аналитические с точностью взвешивания не менее 0,0001 г; установка для перегонки с паром (установка Кьельдаля) или автоматический анализатор (Кьельдаль-автомат); электроплитка с закрытой спиралью или специализированный блок для разложения проб; мельница лабораторная циклонного типа или ножевая, обеспечивающая измельчение до частиц, проходящих через сито с отверстиями 1 мм; вытяжной шкаф химический с высокой производительностью для работы с концентрированными кислотами и щелочами.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Колбы Кьельдаля на 250–500 мл; мерные колбы на 1000 мл, 100 мл; мерные пипетки различной вместимости; бюретка на 25 или 50 мл с ценой деления 0,1 мл; приемные колбы (конические Эрленмейера) на 250–500 мл для сбора дистиллята; сито лабораторное с диаметром отверстий 1 мм; парафиновые гранулы или кипелки для предотвращения выброса при минерализации; стеклянные стаканы, воронки, шпатели.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Кислота серная (H_2SO_4), $\rho = 1,84$ г/см³, ч.д.а., без азота; гидроксид натрия (NaOH), ч.д.а., раствор 400 г/л (40%) без азота; кислота борная (H_3BO_3), ч.д.а., раствор 20 г/л (2%); кислота соляная (HCl), ч.д.а., раствор с точной концентрацией с (HCl) = 0,1 моль/л (0,1 н.) – рабочий титрант; катализатор для минерализации (смесь Кьельдаля): смесь солей, например, сульфата калия (K_2SO_4) и сульфата меди ($CuSO_4$) в соотношении 9:1, или селената натрия

(Na_2SeO_4), ч.д.а.; индикатор TASHIRO: спиртовой раствор смеси метилового красного и метиленового синего.

Признак «содержание белка» для всех соисполнителей определяется в учреждении ответственном за культуру – ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

5. СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗИНОЛАТОВ

Метод 1

Метод определения массовой доли глюкозинолатов в семенах рапса предусматривает проведение инактивации фермента мирозиназы в измельчённых семенах, гидролиз глюкозинолатов водой и осаждение белковых компонентов, фильтрации экстракта, получения окрашенного комплекса глюкозинолатов – хлорпаллада натрия и фотоэлектроколориметрическое определение содержания глюкозинолатов в окрашенном комплексе на спектрофотометре В-1200.

Данный метод определения массовой доли глюкозинолатов в семенах рапса является стандартным спектрофотометрическим подходом, основанным на реакции с хлорпалладатом натрия. Его фундаментальный принцип заключается в количественном учёте глюкозы, которая высвобождается из тиоглюкозидной группы каждой молекулы глюкозинолата в процессе строго контролируемого ферментативного гидролиза (Thies, W., 1979). Поскольку каждый глюкозинолат, независимо от структуры его боковой цепи, содержит одну молекулу глюкозы, измерение её количества позволяет точно определить общее содержание этих соединений в пробе.

Первым и критически важным этапом является подготовка пробы. Семена рапса измельчают в тонкую муку с использованием лабораторной мельницы. Это необходимо для немедленной инактивации эндогенного фермента мирозиназы, присутствующего в семенах, который при контакте с глюкозинолатами при разрушении клеток запускает их быстрый гидролиз. Если инактивация будет неполной, результаты анализа окажутся значительно заниженными. Для надёжной инактивации измельчённую навеску семян обрабатывают горячим буферным раствором (при температуре около 70 °С) в течение 10 минут, что гарантирует полную потерю активности собственных ферментов пробы без разрушения самих глюкозинолатов.

После инактивации эндогенных ферментов проводится непосредственно ферментативный гидролиз. Для этого к охлаждённому экстракту добавляют точно отмеренный объем стандартизированного препарата фермента мирозиназы. Мирозиназа в контролируемых условиях полностью расщепляет все глюкозинолаты, присутствующие в образце. Продуктами гидролиза являются глюкоза, сульфат-ион и нестабильные агликоны, которые далее спонтанно преобразуются в стабильные продукты, такие как изотиоцианаты или нитрилы.

Следующий шаг – очистка полученного гидролизата от посторонних примесей. Поскольку растительный экстракт содержит большое количество белков, пептидов и других соединений, которые могут распадаться с последующей цветной реакцией, их необходимо удалить. Для этого проводится осаждение добавлением сульфата бария. Смесь тщательно встряхивают, а затем центрифугируют или фильтруют для получения идеально прозрачного раствора, содержащего только продукты гидролиза, в том числе и высвобождённую глюкозу.

Ключевая аналитическая стадия – проведение цветной реакции. Порцию очищенного фильтрата переносят в мерную колбу, куда добавляют раствор хлорпалладата натрия и ледяную уксусную кислоту для создания необходимой кислой среды. В этих условиях глюкоза взаимодействует с реактивом, образуя стабильный комплекс жёлто-коричневого цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы, а значит, и исходной концентрации глюкозинолатов в пробе. Раствор выдерживают для полного развития окраски.

Финальный этап – количественное измерение оптической плотности окрашенного комплекса, измеряемое на спектрофотометре при длине волны 430 нм на спектрофотометре В-1200. Для построения калибровочной зависимости и перевода единиц оптической плотности в концентрации готовят серию стандартных растворов синтетического глюкозинолата (синальбина) или сульфата калия и проводят с ними всю процедуру анализа. Расчёт содержания глюкозинолатов, выраженного в микромолях на грамм (мкмоль/г) сухого вещества, проводят по формуле, учитывающей массу навески, все разведения и данные калибровочного графика. Таким образом, метод обеспечивает точное и воспроизводимое определение общего содержания этих антипитательных соединений в семенах рапса.

Метод 2

Определение глюкозинолатов по ГОСТ ISO 9167-1-2015.

Глюкозинолаты экстрагируют метанолом, затем проводят их очистку и ферментативную десульфатацию на ионнообменных смолах. Содержание глюкозинолатов определяют методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с градиентным элюированием и ультрафиолетовым детектированием.

Рапс измельчают на размольнице в течение 20 секунд. Перемешивают муку и затем дополнительно перемалывают в течение 5 секунд.

В пробирку на 10 мл помещают 200 мг подготовленной анализируемой пробы, взвешенной с точностью до 0.1 мг.

Пробирку помещают в водяную баню при температуре 75 градусов и оставляют на 1 минуту.

Вносят 2 мл кипящего раствора метанол (70% метанол+30% вода) и незамедлительно вносят 200мкл внутреннего стандарта (синегрин) с концентрацией 5 ммоль/л. Продолжают нагревать при температуре 75 градусов в течение 10 минут, встряхивая пробирку через определенные интервалы времени. Затем центрифугируют при ускорении 5000g в течение 3 минут. Сливают надосадочную жидкость в новую пробирку на 10 мл. В пробирку, содержащую сухой остаток добавляют 2 мл кипящего раствора метанола и повторно нагревают в течение 10 минут. Снова центрифугируют в течение 3 минут и приливают надосадочную жидкость к ранее отобранной жидкости. Доводят объем объединенных экстрактов водой до 5 мл.

Подготовка ионообменных колонок.

Используем пипетки Пастера .

Размещаем на штативе вертикально, закрываем отверстие стекловатой.

Наносим 0,6 мл суспензии ионообменной смолы, даем отстояться.

Далее на смолу промываем 2 мл раствора имидазола формиата и затем 2 мл воды.

Потом наносим на смолу ранее приготовленный 1 мл экстракта. И промываем 2 мл ацетата натрия, даем стечь.

Далее наносим на смолу 75 мкл разведенного раствора очищенной сульфатазы и оставляем на ночь при комнатной температуре.

На следующий день смываем со смолы 2 мл воды. Элюат тщательно перемешиваем.

Далее производим деление и идентификацию на жидкостном хроматографе SHIMADZU LC-2030C 3D PLUS Prominence-i, используем колонку Mastro2 PFP 3.0 150L*2.0

Хроматограф настраивают таким образом, чтобы расход подвижных фаз был не более 1мл/минуту. Температура колонки - 30 градусов. Рабочая длина волны 229 нм.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Для спектрофотометрического метода необходимы лабораторная мельница для измельчения семян в тонкую муку; спектрофотометр В-1200 или аналогичный с возможностью измерений в видимой области (длина волны ~430 нм); аналитические весы с точностью не менее 0,1 мг; водяная баня с терморегулятором для поддержания температуры около 70–75 °С; центрифуга лабораторная с возможностью достижения ускорения 5000g; шейкер или вортекс для перемешивания проб; мерная посуда (колбы, цилиндры) и пипетки различного объема; пробирки центрифужные на 10 мл.

Для хроматографического метода по ГОСТ ISO 9167-1-2015 используется высокоэффективная жидкостная хроматографическая система, такая как SHIMADZU LC-2030C 3D PLUS Prominence-i или аналоги, состоящая из насоса для градиентного элюирования, термостата колонок, ультрафиолетового детектора и рабочей станции с программным обеспечением для сбора и обработки данных; аналитическая хроматографическая колонка с обращенной фазой, например, Mastro2 PFP 3.0 150L*2.0; микромельница для быстрого и тонкого измельчения семян; центрифуга лабораторная; водяная баня; пипетки дозаторы, включая микропипетки для точного дозирования микролитровых объемов (200 мкл, 75 мкл); пипетки Пастера; штатив для пробирок; ионообменные; пробирки, мерная посуда и аналитические весы.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Для проведения анализа требуются следующие инструменты и принадлежности: лабораторная мельница для измельчения семян; спектрофотометр В-1200; аналитические весы с точностью 0,1 мг; водяная баня с терморегулятором; центрифуга лабораторная; шейкер или вортекс; пипетки Пастера; штатив для пробирок; стекловата; мерные колбы на 5 мл и другие объемы; мерные цилиндры; центрифужные пробирки на 10 мл; пипетки дозаторы, включая микропипетки для объемов 200 мкл и 75 мкл; автоматические пипетки переменного объема; пробирки для проведения реакций; держатели для колонок; секундомер; парафильм или крышки для пробирок.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Для проведения анализа требуются следующие химические реактивы: метанол, ч.д.а.; вода дистиллированная деионизированная; внутренний стандарт (синегрин гидросульфат), концентрация 5 ммоль/л; сульфатаза очищенная (ферментный препарат); имидазол, ч.д.а.; кислота муравьиная,

ч.д.а.; кислота уксусная ледяная, ч.д.а.; ацетат натрия, ч.д.а.; формиат имидазола, раствор для промывки; суспензия анионообменной смолы (например, DEAE-Sephadex A-25); синальбин (для калибровки в спектрофотометрическом методе); хлорпалладат натрия (для спектрофотометрического метода); сульфат бария, ч.д.а. (для спектрофотометрического метода).

Признак «содержание глюкозинолатов» для всех соисполнителей определяется в учреждении ответственном за культуру – ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

6. СОДЕРЖАНИЕ ОЛЕИНОВОЙ, ЛИНОЛЕВОЙ, ЛИНОЛЕНОВОЙ И ЭРУКОВОЙ КИСЛОТЫ

Хроматографический анализ для определения жирно-кислотного состава масла проводится на газовом хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000» с автоматическим дозатором ДАЖ на капиллярной колонке SolGelWax 30 × 0,25 мм × 0,5 мкм в токе газаносителя гелия, со скоростью 22 см/с, с программированием температуры в пределах 185-240 °С. Для анализа получают масло, выделяя среднюю пробу около 3-4 г образца. Из средней лабораторной пробы семян рапса отбирают навеску для получения масла. Выделение масла проводится методом холодного прессования на гидравлическом лабораторном прессе. Полученную пробу масла отстаивают для отделения взвешенных частиц или фильтруют через беззольный складчатый фильтр для получения чистого прозрачного масла, готового к дальнейшим химическим преобразованиям.

На гидравлическом лабораторном прессе полученную пробу масла, отстаивают или фильтруют на складчатом фильтре, после чего проводят метилирование в соответствии с протоколом. Полученные метиловые эфиры жирных кислот масла семян помещаются в виалы дозатора. Получение метиловых эфиров и их хроматографирование выполняются в соответствии с нормативными методами ГОСТ Р 51486-99 «Масла растительные и жиры животные». В колбу с круглым дном или пробирку с притертой пробой отвешивают примерно 0.1 г очищенного масла. К навеске добавляют 2-4 мл гексана и 2-4 мл 0.5 М раствора метилата натрия (NaOCH_3) в метаноле. Смесь интенсивно встряхивают в течение 1-2 минут и нагревают на водяной бане при 50-60°С в течение 10-15 минут. После реакции смесь охлаждают и при необходимости нейтрализуют избыток щелочи. Для количественного расчета в пробу на этапе подготовки обязательно вводится внутренний стандарт (например, метиловый эфир гептадекановой кислоты (C17:0) или тридеcanoиновой кислоты (C13:0)), масса которого известна. Это позволяет учесть потери на всех этапах подготовки и вносит поправку на неточность дозирования при вводе пробы в хроматограф. Фазу, содержащую МЭЖК в гексане, отделяют, переносят в виалу хроматографического автосамплера и герметично укупоривают (Christie, W.W., 1989).

Получение метиловых эфиров жирных кислот ГОСТ Р 51483-99. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме. В автоматический дозатор (ДАЖ) устанавливаются виалы с подготовленными пробами МЭЖК и стандартными смесями.

Калибровка перед анализом проб проводится хроматографирование стандартной смеси МЭЖК с известным качественным и количественным составом. На основе хроматограммы стандартной смеси строится калибровочная зависимость и определяются времена удерживания для идентификации пиков в анализируемых пробах. Хроматографирование анализируемой пробы: проба вводится в хроматограф автоматически. Производится разделение компонентов и регистрация хроматограммы. Идентификация индивидуальных МЭЖК проводится по времени удерживания в сравнении со стандартной смесью. Массовая доля каждой индивидуальной жирной кислоты в процентах от суммы всех кислот рассчитывается методом нормировки площадей пиков с использованием поправочных коэффициентов, определенных по стандартной смеси, и с учетом внутреннего стандарта для коррекции потерь.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Для проведения полного анализа жирно-кислотного состава масла методом газовой хроматографии требуется следующее оборудование: газовый хроматограф «Хроматэк-Кристалл 5000» с пламенно-ионизационным детектором; капиллярная хроматографическая колонка SolGelWax 30 м × 0,25 мм × 0,5 мкм; автоматический дозатор ДАЖ для ввода проб; гидравлический лабораторный пресс для отжима масла из семян; аналитические весы с точностью 0,0001 г для взвешивания навесок; водяная баня с терморегулятором для проведения метилирования; лабораторная центрифуга для разделения фаз после реакции; шейкер или вортекс для перемешивания реакционных смесей; микропипетки и дозаторы переменного объема для точного отмеривания реактивов; набор мерной посуды (мерные колбы, цилиндры); химические стаканы и пробирки; виалы для автосамплера хроматографа; устройство для упаковки колонок в хроматограф; система подачи газов (гелий высокой чистоты, водород, воздух) с редукторами; вытяжной шкаф для работы с летучими органическими растворителями и реактивами.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Для проведения анализа требуются следующие инструменты и принадлежности: аналитические весы с точностью 0,0001 г; гидравлический лабораторный пресс; водяная баня с терморегулятором; лабораторная центрифуга; шейкер или вортекс; микропипетки и дозаторы переменного объема; мерные колбы на 50-100 мл; мерные цилиндры; химические стаканы; пробирки с притёртыми пробками; виалы для автосамплера хроматографа;

крышки и септы для виал; штатив для пробирок; складчатые фильтры; пипетки Пастера; шпатели; промывалки с растворителями; перчатки нитриловые.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Для проведения анализа требуются следующие химические реактивы: гексан; метанол ; метилат натрия в метаноле (0,5 М раствор); гидроксид натрия; хлорид натрия; гелий высокой чистоты (газ-носитель); водород высокой чистоты (для ПИД); воздух технический (для ПИД); стандартная смесь метиловых эфиров жирных кислот (37 компонентов); внутренний стандарт (метиловый эфир гептадекановой кислоты C17:0 или тридекановой кислоты C13:0); диэтиловый эфир; изооктан; ледяная уксусная кислота; бидистиллированная вода; серная кислота концентрированная; бортрифторид метанольный комплекс 14% BF_3 .

Признак «содержание олеиновой кислоты», «содержание ленолевой кислоты», «содержание линоленовой кислоты», «содержание эруковой кислоты» для всех соисполнителей определяется в учреждении ответственном за культуру – ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

7. УСТОЙЧИВОСТЬ К ПОЛЕГАНИЮ

Общую устойчивость линии рапса озимого к полеганию определяли по 9-ти балльной шкале в фазу физиологической спелости, когда стебли и стручки теряют зелёную окраску, становятся жёлтыми или светло-коричневыми, а семена приобретают характерную окраску и твёрдость в двукратной повторности. Для каждого оцениваемого генотипа в полевом опыте выбирают 20 типичных, неповреждённых растений. Растения должны быть выбраны случайным образом в пределах деланки, для исключения краевого эффекта. Степень устойчивости растений каждой линии к полеганию определяется на 20 растениях с использованием коэффициента полегания растения. Измерение общей высоты растения (H , см): измеряют расстояние от поверхности почвы у основания стебля до верхней точки главного соцветия (верхушки кисти).

Измерение высоты до места перегиба (h , см): находят точку на стебле, где происходит его изгиб (чаще всего это нижнее или среднее междоузлие). Измеряют расстояние от поверхности почвы у основания стебля до этой точки перегиба. Отношение высоты растений до перегиба к общей высоте растения называется коэффициентом полегания (K).

Соответствие балла полегания величине коэффициента при разной степени полегания:

1-3 балла – $K=0,8-0,9$;

4-6 баллов – $K=0,7-0,5$;

7-9 баллов – $K=0,4-0,2$.

Обработка результатов и оценка устойчивости: для каждого растения по рассчитанному коэффициенту K присваивают балл полегания. Сначала для каждого из 40 растений по значению K определяют балл, если $K=0,85$, растению присваивается балл 2; если $K=0,60$ – балл 5; если $K=0,35$ – балл 8). Затем вычисляют среднее арифметическое значение балла по всем 40 растениям. Округление среднего балла проводят до десятых долей. Чем ниже средний балл, тем выше общая устойчивость линии к полеганию.

Оценку необходимо проводить в утренние часы. Нельзя оценивать растения после дождя или сильного ветра, которые могут временно изменить их габитус (Санин С.С., 2013). Важно учитывать общие условия выращивания (густота стояния, обеспеченность влагой и азотом), так как они сильно влияют на склонность к полеганию.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Не требуется.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Жесткая линейка или рулетка, полевой планшет, бланки для записей, карандаш, маркировочные бирки, секатор, фотоаппарат.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Не требуются.

Признак «устойчивость к полеганию» определяют все исполнители проекта

8. УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСЫПАНИЮ

Оценку устойчивости стручков рапса озимого к растрескиванию проводится в полевых условиях в фазу полной зрелости. Отбор стручков осуществляется с нижней части центральной кисти разных растений по два полностью созревших стручка (5-й и 6-й). Отбирается по 10 стручков с каждой делянки. Затем стручки помещаются в контейнер с резиновыми шарами (по 10 шаров), контейнер закрывается крышкой и производится 10 энергичных возвратно-поступательных движений в горизонтальной плоскости. После чего крышки открываются, и проводится подсчёт свободных прозрачных створок. Количество створок соответствовало числу раскрывшихся стручков ГОСТ 12045-97.

Для оценки растрескивания стручков используется 10-ти балльная градация от 0 до 10. Все стручки целые, нет свободных створок – 0 баллов, 10 баллов – все стручки раскрыты (10 свободных створок):

0,0-2,0 балла – растрескиваемость стручков отсутствует или очень слабая;

2,1-4,0 балла – слабая растрескиваемость стручков;

4,1-6,0 баллов – средняя растрескиваемость стручков;

6,1-8,0 баллов – сильная растрескиваемость стручков;

8,1-10,0 баллов – очень сильная растрескиваемость стручков.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Не требуется.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Контейнеры с крышками, резиновые шары (10 шт/контейнер), полевой планшет, пинцеты анатомические, лабораторные лотки, линейки, бланки протоколов, перманентные маркеры, пакеты для образцов

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Не требуются.

Признак «устойчивость к осыпанию» определяют все исполнители проекта

9. УСТОЙЧИВОСТЬ К МОРОЗУ

В камере искусственного климата в вегетативных горшочках выращивают растения рапса озимого до фазы 4-5 настоящих листьев. Затем растения проходят фазу закалки 5-7 суток при температуре 0-3 °С, и далее промораживают при температуре -14 °С одни сутки, после чего переносят в теплицу на отрастание при температуре +18–20°С. Спустя 8–10 дней оценивают состояние растений и на основании этого присваивают балл устойчивости к морозу.

Методика позволяет моделировать критические температурные стрессы, характерные для зимнего периода в регионах возделывания озимого рапса, и проводить сравнительную оценку различных генотипов в стандартизированных условиях, независимо от погодных колебаний. Метод основан на моделировании естественного процесса закаливания растений с последующим воздействием экстремально низких температур и оценкой их способности к восстановлению после стресса. Процедура включает три последовательные фазы: выращивание растений до оптимальной стадии развития, этап закаливания для активации физиологических механизмов устойчивости, непосредственно промораживание при заданной критической температуре и последующую оценку выживаемости и регенерационной способности растений в период отрастания. Такой подход позволяет стандартизировать условия оценки и получить воспроизводимые результаты, не зависящие от полевых условий.

Для проведения исследования используют стандартные вегетационные сосуды объемом 2-3 литра, заполненные стерилизованной почвенной смесью оптимального гранулометрического состава с рН 6,0-6,5. Посев проводят предварительно откалиброванными семенами с высокой всхожестью (не менее 95%) по 10-15 семян на сосуд с последующим прореживанием до 5-7 равномерно развитых растений после появления всходов. Растения выращивают в условиях контролируемой среды при температуре $18 \pm 2^\circ\text{C}$, фотопериоде 16/8 часов (день/ночь) и интенсивности фотосинтетически активной радиации 300-350 мкмоль/м²/с до достижения фазы 4-5 настоящих листьев, что обычно занимает 3-4 недели. За три дня до начала закаливания проводят унификацию растений, удаляя сильно опережающие и отстающие в развитии экземпляры (Полевой В.В., 2018).

Фаза закаливания длится 5-7 суток и проводится в камере с регулируемым микроклиматом при постоянной температуре 0-3°С,

относительной влажности воздуха 70-80% и фотопериоде 10/14 часов (день/ночь) с пониженной интенсивностью света 150-200 мкмоль/м²/с. В течение этого периода растения поливают минимально, поддерживая влажность почвы на уровне 40-50% от полной влагоемкости, что имитирует естественные условия осеннего закаливания. Данный этап критически важен для активации физиологических и биохимических механизмов морозоустойчивости, включая накопление растворимых углеводов, дегидринов и других криопротекторных соединений (Трускинов Э.В., 1987).

После завершения фазы закаливания горшки с растениями подвергают воздействию отрицательной температуры - 14°C в течение 24 часов. Охлаждение проводят с заданной скоростью 2°C/час до достижения целевой температуры, что предотвращает тепловой шок. Для обеспечения равномерного промораживания всей почвенной массы температуру субстрата контролируют с помощью почвенных термомпар, размещенных на разной глубине. Влажность воздуха в камере в этот период поддерживают на уровне 60-70% для предотвращения дополнительного обезвоживания растений. После завершения экспозиции температуру плавно повышают со скоростью 3°C/час до +2°C.

После промораживания растения переносят в теплицу с температурой 18-20°C, относительной влажностью воздуха 65-75% и естественным или искусственным освещением (фотопериод 14 часов, интенсивность ФАР 250- 300 мкмоль/м²/с). В течение 8-10 дней наблюдают за процессом отрастания, поддерживая оптимальную влажность почвы (70-80% от полной влагоемкости) ГОСТ 24847-81.

Оценку проводят на 8-10 день после промораживания по визуальной шкале повреждений, учитывая следующие параметры: сохранность апикальной меристемы, степень повреждения листового аппарата, наличие признаков регенерации и отрастания новых листьев, общую жизнеспособность растений.

Устойчивость растений оценивают по 9-балльной шкале, где:

9 баллов - растения полностью сохранили жизнеспособность, наблюдается активное отрастание новых листьев, повреждения отсутствуют или минимальны (погибло менее 10% растений)

7 баллов - слабые повреждения (некроз краев листьев), сохранена апикальная почка, хорошая регенерационная способность (погибло 10-25% растений)

5 баллов - средние повреждения (значительный некроз листовых пластинок), но точки роста сохранены, отмечается отрастание (погибло 25- 50% растений)

3 балла - сильные повреждения, точки роста частично повреждены, слабая регенерация (погибло 50-75% растений)

1 балл - растения полностью погибли или имеют необратимые повреждения (погибло более 75% растений)

Для каждого генотипа оценивают не менее 30-50 растений (6-10 сосудов по 5 растений). Рассчитывают средний балл морозоустойчивости, процент выживаемости растений.

Критически важными для получения воспроизводимых результатов являются: стандартизация исходного материала (качество семян, однородность развития растений), точный контроль температурных режимов на всех этапах исследования, равномерность промораживания почвенного субстрата, поддержание постоянных условий в период отрастания.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Камера искусственного климата (фитотрон), климатическая камера для промораживания, теплица с контролируемыми условиями, вегетационные сосуды 2-3 л, система освещения с регулируемой ФАР, система контроля температуры и влажности, почвенные термодары, ламинарный бокс.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Вегетационные сосуды 2-3 л, почвенные смеси, калиброванные семена, термометры, гигрометры, фотометр, пинцеты, мерные цилиндры, лабораторные весы, этикетки, маркеры, планшеты для записей, лупы, таймеры, лабораторные перчатки, совки.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Дистиллированная вода, этиловый спирт 70%, гипохлорит натрия, питательные растворы, реактивы для рН-метрии, дезинфицирующие средства.

Признак «устойчивость к морозу» проводят исполнители проекта, имеющие в распоряжении учреждения камеры искусственного климата и теплицы: ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева

10. УСТОЙЧИВОСТЬ К ЗАСУХЕ

Методика предназначена для оценки засухоустойчивости рапса в контролируемых условиях вегетационного опыта. Метод основан на создании контролируемого водного дефицита и оценке физиологических и морфологических реакций растений.

Вегетационные сосуды объемом 5-10 литров заполняются стандартизированной почвенной смесью, состоящей из торфа, песка и почвы в соотношении 2:1:1. Предварительно почвенная смесь стерилизуется при температуре 105°C в течение 2 часов для исключения влияния патогенов. За 24 часа до посева проводится насыщение почвы влагой до 100% полной влагоемкости (ПВ) методом подтопления с последующим свободным стоком избыточной воды.

Посев проводится калиброванными семенами с лабораторной всхожестью не менее 95%. Семена предварительно протравливаются фунгицидом и замачиваются в дистиллированной воде на 2 часа для синхронизации прорастания. Глубина заделки семян составляет 1,5-2 см. После посева сосуды размещаются в вегетационных камерах с автоматической регуляцией условий среды.

В течение 5-7 дней после посева поддерживаются оптимальные условия для прорастания: температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$, влажность воздуха 70-75%, непрерывное освещение интенсивностью 200 мкмоль/м²/с. После появления всходов условия постепенно изменяются до стандартных: температура 25°C днем/18°C ночью, фотопериод 16/8 часов, интенсивность фотосинтетически активной радиации (ФАР) 350-400 мкмоль/м²/с.

На 10-й день после всходов проводится прореживание, оставляя 5 наиболее развитых и однородных растений в каждом сосуде. Ежедневно проводится взвешивание сосудов для поддержания оптимальной влажности почвы (70-80% ПВ).

На 45-50 день вегетации, когда растения достигают фазы бутонизации - начала цветения, начинается фаза индукции водного стресса. За 24 часа до начала стрессового воздействия все сосуды доводятся до 100% ПВ. Затем опытные варианты полностью изолируются от полива, в то время как контрольные варианты продолжают поливаться для поддержания оптимальной влажности (70-80% ПВ).

В течение всего периода стрессового воздействия ежедневно проводятся измерения:

- В 8:00 и 14:00 - водный потенциал листьев с помощью психрометра
- В 9:00-11:00 - интенсивность фотосинтеза и транспирации порометром
- Ежечасно - температура листьев инфракрасным термометром
- Каждые 4 часа - тургорное давление

Развитие водного стресса контролируется по следующим критическим точкам:

Первая критическая точка (обычно 3-4 день стресса): снижение водного потенциала листьев до -1,2...-1,5 МПа. Наблюдается начало устьичного регулирования - закрытие устьиц в дневные часы.

Вторая критическая точка (5-7 день): водный потенциал достигает -2,0...-2,5 МПа. Происходит значительное снижение фотосинтетической активности (на 50-70% от контроля), начинается дегидратация тканей.

Третья критическая точка (10-14 день): водный потенциал ниже -3,0 МПа. Наблюдается необратимое повреждение фотосинтетического аппарата, массовый некроз листьев, потеря тургора.

Оценка ответных реакций растений на стрессовый фактор недостатка влаги:

9 баллов - растения без видимых признаков повреждения, тургор полный, цвет листьев интенсивно-зеленый

7 баллов - незначительная потеря тургора в самые жаркие часы дня, легкое поникание нижних листьев

5 баллов - заметное увядание средней ярусности листьев, начало пожелтения краев нижних листьев

3 балла - сильное общее увядание, некроз 30-50% листовой поверхности, скручивание листьев

1 балл - полная гибель надземной массы, потеря хлорофилла, некроз более 80% листьев

После достижения 50% растений критической точки стресса (обычно 10-14 дней) проводится возобновление полива. Восстановительный полив проводится в два этапа: сначала вносится 50% дефицита влаги, через 6 часов - остальные 50%. В течение последующих 7 дней оценивается способность растений к восстановлению. Высокоустойчивые генотипы: сохранение 80-

100% продуктивности; среднеустойчивые: сохранение 60-79% продуктивности; чувствительные: сохранение менее 60% продуктивности.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Вегетационные камеры с климат-контролем, сушильные шкафы для стерилизации почвы, аналитические весы, климатические камеры для поддержания заданных температурно-влажностных режимов, системы фитотронного освещения с регулируемой интенсивностью ФАР 200-400 мкмоль/м²/с, системы автоматического полива и контроля влажности почвы.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Вегетационные сосуды объемом 5-10 литров, психрометр для измерения водного потенциала листьев, порометр для определения интенсивности фотосинтеза и транспирации, инфракрасный термометр для измерения температуры листьев, прибор для измерения тургорного давления, мерные цилиндры и мензурки, пинцеты для прореживания растений, этикетки и маркеры для маркировки, планшеты для записей и бланки протоколов, лабораторная посуда для приготовления растворов, совки и лопатки для работы с почвой, термометры и гигрометры, фотометр для контроля освещенности.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Фунгициды для протравливания семян, дистиллированная вода, этиловый спирт для дезинфекции оборудования, стандартные буферные растворы для калибровки измерительных приборов.

Оценку на признак «устойчивость к засухе» проводят исполнители проекта, имеющие в распоряжении учреждения камеры искусственного климата и теплицы: ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева

11. ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА «ВСХОДЫ – НАЧАЛО ЦВЕТЕНИЯ»

Продолжительность межфазного периода «всходы-начало цветения» рассчитывается от даты появления полных всходов до раскрытия 1-3 цветков на центральной кисти у 75 % растений.

Данная методика предназначена для точного определения продолжительности критического этапа онтогенеза растений рапса, который охватывает период от появления полных всходов до перехода растения в репродуктивную фазу развития, маркируемую началом цветения. Этот показатель является ключевым для характеристики скороспелости сорта или гибрида, его адаптации к конкретным почвенно-климатическим условиям, а также для планирования агротехнических мероприятий, таких как защита растений и подкормки. Учет продолжительности этого периода имеет фундаментальное значение в селекционном процессе, так как позволяет отбирать генотипы с желаемым типом развития – от ультраранних, уходящих от летней засухи, до более поздних, максимально использующих вегетационный сезон. Точность оценки обеспечивается строгим соблюдением критериев определения как начальной, так и конечной фазы наблюдений.

Делянки должны быть репрезентативными и исключать краевой эффект. Для получения достоверных результатов необходимо ежедневное, а в периоды, близкие к ожидаемому цветению, даже двукратное (утреннее и вечернее) визуальное обследование растений. На каждом объекте исследования (сорта, гибриде, линии) постоянному наблюдению подлежит фиксированная группа из не менее чем 50 растений, отобранных и промаркированных на делянке методом случайного повторного отбора. Это позволяет нивелировать индивидуальные колебания в развитии отдельных растений и получить статистически значимые данные (Федоров А.К., 2020).

Начальной точкой отсчета межфазного периода является дата появления полных всходов. Данная фаза фиксируется не в момент появления единичных проростков, а когда на поверхности почвы четко видны семядольные листья у не менее чем 75% растений от общего числа ожидаемых всходов на контролируемой площади. Для рапса всходы считаются полными, когда семядоли развернуты и приобрели зеленую окраску. Очень важно проводить наблюдения в утренние часы, так как именно в это время легче всего заметить появление новых проростков. Фиксация точной календарной даты достижения

фазы полных всходов является обязательным условием для последующих расчетов.

Конечной фазой периода служит начало цветения. Определение этой фазы требует особой тщательности. У рапса цветение начинается на главном соцветии (центральной кисти). Фаза «начала цветения» для конкретного растения регистрируется в тот день, когда на его центральной кисти раскрываются первые 1-3 цветка. Лепестки должны быть полностью расправлены, цветок функционально активен. Однако для характеристики группы растений в целом используется популяционный критерий. Датой наступления фазы «начала цветения» для всей изучаемой группы считается день, когда указанный признак наблюдается у 75% от общего числа промаркированных для наблюдения растений. Такой подход позволяет учесть неоднородность развития внутри популяции и зафиксировать момент, когда большинство растений перешло в генеративную стадию (Драгавцева В.А., 2018).

Непосредственный расчет продолжительности межфазного периода «всходы – начало цветения» выполняется простым арифметическим действием: путем вычитания из календарной даты наступления фазы «начала цветения» даты наступления фазы «полных всходов». Результат выражается в целых календарных днях. Для повышения точности и возможности сравнения данных, полученных в разные годы, целесообразно также рассчитывать продолжительность периода в сумме активных температур.

Для каждой изучаемой группы растений рассчитывается средняя продолжительность периода, а также стандартное отклонение, которое показывает вариабельность признака внутри популяции.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Фенологическая площадка с постоянными учетными деланками; метеостанция для регистрации температуры и осадков; фоторегистрирующая аппаратура; система точного позиционирования растений; лабораторный компьютер для обработки данных.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Разметочные вешки и этикетки для маркировки растений; измерительные ленты и рулетки; полевые журналы для регистрации наблюдений; пинцеты для осторожного раздвигания цветков; лупы полевые 10x для точной идентификации фаз развития; гербарные прессы для документации фенофаз.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Фиксатор для гербарных образцов.

Признак «продолжительность периода всходы-начало цветения» определяют все исполнители проекта

12. ВЫСОТА РАСТЕНИЯ

Высоту растения рапса измеряют в фазу зелёного стручка, прикладывая измерительную линейку от уровня корневой шейки до места прикрепления последнего стручка на центральной кисти.

Методика регламентирует процедуру измерения высоты растений рапса в фазу зеленого стручка. Высота растения - вертикальное расстояние от уровня корневой шейки до точки прикрепления последнего развитого стручка на центральной кисти. Корневая шейка - переходная зона между гипокотилем и эпикотилем, расположенная на уровне поверхности почвы. Центральная кисть - главный репродуктивный побег, сформированный из апикальной меристемы основного стебля. Фаза зеленого стручка - стадия развития, характеризующаяся полностью сформированными стручками, достигшими типичного размера, но еще не начавшими процесс пожелтения.

Отбор растений проводят в фазу зеленого стручка, когда стручки достигли максимального размера, но сохраняют зеленую окраску и тургор. Из генеральной совокупности методом стратифицированной выборки отбирают 20 типичных растений, визуально соответствующих сортовому стандарту. Исключаются растения с признаками патологических изменений, механических повреждений или атипичного развития (Пустовойт В.С., 2019).

Каждое растение подвергают последовательному измерению. Определяют уровень корневой шейки путем аккуратного удаления поверхностного слоя почвы. Идентифицируют последний развитый стручок на центральной кисти (стручок с длиной не менее 1,5 см). Приложение измерительной линейки строго вертикально от уровня корневой шейки до точки прикрепления идентифицированного стручка. Показания снимают с точностью до 0,5 см.

Результаты фиксируют в электронной базе данных с обязательным указанием: абсолютного значения высоты растения (Н, см); номера растения и повторности; фенологической стадии развития; погодных условий во время измерений.

Учет погрешностей измерения включает: естественную изменчивость высоты растений в популяции; погрешность визуального определения точки измерения; влияние ветра на точность измерений в полевых условиях; вариативность уровня поверхности почвы.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Полевая лаборатория для обработки проб; электронные весы для определения биометрических показателей; сушильный шкаф для доведения образцов до постоянной массы; система калибровки измерительных инструментов.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Металлическая линейка длиной 100 см с ценой деления 0,1 см; мерный цилиндр высотный для контроля вертикальности измерений; почвенный нож для аккуратного обнажения корневой шейки; маркировочные ленты для нумерации растений; электронный термогигрометр для регистрации погодных условий.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Раствор этилового спирта 70% для дезинфекции инструмента; фиксатор растительного материала для сохранения образцов; дистиллированная вода для очистки оборудования.

Признак «высота растения» определяют все исполнители проекта

13. ЧИСЛО ВЕТВЕЙ НА РАСТЕНИИ

Определение архитектоники растения через оценку ветвления представляет существенный интерес для селекционных программ, направленных на повышение урожайности, и агроэкологических исследований, изучающих адаптационный потенциал генотипов. Методика базируется на принципах морфометрического анализа репродуктивных структур высших растений с учетом особенностей морфогенеза крестоцветных культур.

Продуктивная ветвь - боковой побег, несущий не менее одного репродуктивного органа (стручка) с визуально определяемыми выполненными семенами. Ветвь первого порядка - боковой побег, отходящий непосредственно от апикальной меристемы главного побега. Ветвь второго порядка - боковой побег, образовавшийся из пазушных почек ветвей первого порядка. Критерием отнесения к продуктивным ветвям служит наличие хотя бы одного стручка длиной $\geq 1,5$ см с семенами, достигшими физиологической зрелости.

Фенологический мониторинг и отбор растений проводят в фазу полной физиологической спелости, когда завершено накопление запасных веществ в семенах, но не начался процесс массового растрескивания стручков. Из генеральной совокупности методом систематической выборки отбирают 20 типичных растений, визуально соответствующих сортовому стандарту. Исключаются растения с признаками патологических изменений, механических повреждений или атипичного развития.

Процедура идентификации и подсчета проводят, начиная с главного побега. Поочередный анализ пазушных почек главного побега с подсчетом ветвей первого порядка, несущих репродуктивные органы. Последовательный анализ ветвей первого порядка с идентификацией и подсчетом продуктивных ветвей второго порядка (Хржановский В.Г., 2018).

Результаты фиксируют в электронной базе данных с обязательным указанием: количества продуктивных ветвей первого порядка (N_1); количества продуктивных ветвей второго порядка (N_2); общего индекса ветвления ($I_v = N_1 + N_2$); коэффициента продуктивного ветвления ($K_v = N_2 / N_1$).

Учет погрешностей измерения включает внутрипопуляционную изменчивость морфологических признаков, субъективность визуальной оценки продуктивности ветвей, влияние погодных условий на точность измерений, вариабельность пространственного распределения растений.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Фенологическая площадка с постоянными учетными делянками; лабораторные весы аналитические с точностью 0,001 г; система цифровой фотографии для документирования архитектоники растений; климатическая камера для контроля условий проведения измерений.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

маркировочные этикетки из влагостойкого материала; планшеты для полевых записей; контейнеры для транспортировки образцов; штативы для фиксации растений.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Не требуются

Признак «число ветвей на растении» определяют все исполнители проекта

14. КОЛИЧЕСТВО СТРУЧКОВ НА РАСТЕНИИ

Данная методика предназначена для определения общего количества стручков на растении рапса озимого с дифференциацией по типам ветвления. Количество стручков является ключевым компонентом структуры урожая и одним из основных элементов, определяющих потенциальную продуктивность растения. Методика применима в селекционной работе при оценке и отборе высокопродуктивных генотипов, в научных исследованиях при изучении влияния агротехнических приемов и условий окружающей среды на формирование репродуктивных органов, а также в семеноводстве для характеристики сортовых особенностей.

Методика разработана в соответствии с общебиологическими принципами морфометрического анализа с требованиями ГОСТ 12042-80.

Принцип метода заключается в визуальном подсчете количества стручков на растении с разделением по порядку ветвления: на центральной ветви, ветвях первого порядка (боковые ветви, отходящие непосредственно от главного стебля) и ветвях второго порядка (боковые ветви, отходящие от ветвей первого порядка). Такой дифференцированный подход позволяет не только получить общую оценку продуктивности растения, но и проанализировать ее структуру, что имеет важное значение для понимания компенсаторных механизмов формирования урожая.

Полевое оборудование: этикетки и маркеры для маркировки растений, полевой журнал или планшет для записи данных, при необходимости - фотоаппарат для фиксации общего вида растения, цветные ленточки или нити для маркировки уже подсчитанных ветвей, секатор для аккуратного разведения и отделения густо расположенных ветвей, лупа (2х-4х увеличения) для идентификации мелких и недоразвитых стручков.

Перед проведением подсчета стручков проводят подготовку и отбор проб. В первую очередь надо учитывать сроки проведения учета. Учет количества стручков проводят в фазу полной физиологической спелости рапса, когда стручки приобрели характерную окраску (желтую или светло-коричневую), но еще не начали интенсивно растрескиваться. Учет до наступления полной спелости приводит к недооценке результата из-за неучета части стручков. Выбор растений проводят в пределах опытной делянки или поля методом случайного повторного отбора выбирают 20 типичных, здоровых растений, равномерно распределенных по площади (Купцов А.И., 2021). Растения с признаками болезней, повреждений вредителями или

атипичным габитусом исключаются из выборки. Растения не должны быть краевыми.

Подготовку к подсчету стручков осуществляют путем осмотра выбранного растения. При сильном переплетении ветвей их можно осторожно развести в стороны для облегчения подсчета, стараясь не повредить стручки. Важно заранее определить иерархию ветвления: идентифицировать главный побег, ветви первого и второго порядка.

Проведение подсчета стручков начинают с главного побега. Визуально подсчитывают и записывают количество стручков на главном побеге растения от основания до верхушки. Последовательно, ветвь за ветвью, подсчитывают количество стручков на каждой боковой ветви, отходящей непосредственно от главного побега. Результаты записывают отдельно для каждой ветви или суммируют. Последовательно подсчитывают количество стручков на боковых ветвях, отходящих от ветвей первого порядка. Подсчитывают все стручки, включая мелкие и недоразвитые, но имеющие сформированные семена, видимые через стенку стручка или при легком нажатии. Полностью пустые, редуцированные стручки могут не учитываться, но этот момент должен быть оговорен в условиях методики заранее.

Данные учетов вносят в таблицу, где для каждого растения указано количество стручков на главном побеге, суммарно на ветвях 1-го порядка, суммарно на ветвях 2-го порядка и общее количество стручков на растении.

Для каждого растения вычисляют общее количество стручков суммированием показателей по всем типам ветвей. Для выборки рассчитывают средние арифметические значения: среднее количество стручков на главном побеге, на ветвях 1-го порядка, на ветвях 2-го порядка и общее среднее количество стручков на растении.

Анализ структуры продуктивности проводят путем расчёта доли стручков каждого типа ветвления от общего их количества на растении. Это показывает, вносит ли основной вклад в урожай главный побег или боковые ветви. Рассчитывают стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV) для каждого показателя для оценки изменчивости признака. Для сравнения средних значений между разными группами применяют дисперсионный анализ. Перед анализом проверяют данные на нормальность распределения (критерий Шапиро-Уилка) и однородность дисперсий (критерий Левена). Для выявления однородных групп применяют тест Тьюки.

Количество стручков сильно зависит от густоты стояния растений, обеспеченности влагой и питанием. Ранний учет приводит к недооценке, так

как часть стручков может еще не сформироваться визуально; поздний учет чреват потерями из-за растрескивания и осыпания. Для получения репрезентативных данных рекомендуется анализировать не менее 20.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Полевая лаборатория для обработки данных; весы аналитические для определения массы стручков; сушильный шкаф для доведения образцов до постоянной массы.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Этикетки и маркеры для маркировки растений; полевой журнал или планшет для записи данных; фотоаппарат с макрообъективом; цветные ленточки для маркировки подсчитанных ветвей; секатор садовый; лупа 2х-4х; пинцет ботанический; линейка измерительная; контейнеры для сбора образцов.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Раствор этилового спирта 70% для дезинфекции инструментов; фиксатор растительного материала; дистиллированная вода.

Признак «количество стручков на растении» определяют все исполнители проекта

15. ДЛИНА СТРУЧКА

Длина стручка соответствует длине створки стручка без носика. Измеряется линейкой или штангенциркулем.

Данная методика предназначена для определения длины стручка у растений рапса. Длина стручка является важным селекционно-генетическим признаком, напрямую коррелирующим с потенциальной семенной продуктивностью растения. Методика применяется в селекционной практике для оценки и отбора перспективных генотипов, в научных исследованиях для изучения влияния генотипических и средовых факторов на формирование репродуктивных органов, а также в семеноводстве для контроля качества исходного материала.

Методика разработана в соответствии с требованиями таких стандартов, как ГОСТ 12042-80 и ГОСТ 30621-98.

Принцип метода заключается в отборе репрезентативной выборки типичных стручков с определенной морфологической части растения (нижняя и средняя часть центральной ветви), измерении их длины с помощью штангенциркуля и статистической обработке полученных данных для вычисления средних значений и показателей вариабельности. Выбор зоны нижнего и среднего яруса центральной ветви обусловлен наибольшей физиологической зрелостью и типичностью стручков в этой части растения, что обеспечивает объективность и воспроизводимость результатов.

Отбор стручков проводят в фазу полной физиологической спелости рапса, когда стручки приобретают характерную желтую или светло-коричневую окраску, а семена достигают твердости и типичной окраски. Измерения не проводят в дождливую погоду или при высокой относительной влажности воздуха, когда стручки гигроскопичны.

В пределах опытной делянки методом случайного повторного отбора выбирают 20 типичных, здоровых растений, равномерно распределенных по площади. Растения с признаками болезней, повреждений вредителями или атипичным габитусом исключаются из выборки.

На каждом отобранном растении идентифицируют центральную ветвь. На центральной ветви выделяют зону нижнего и среднего яруса, обычно на высоте 20-50 см от основания растения. С данного участка аккуратно срезают 5 полностью развитых, неповрежденных, типичных стручков, достигших максимального для своего яруса размера, без деформаций и видимых повреждений. Каждую группу из 5 стручков с одного растения помещают в отдельный подписанный бумажный конверт. На этикетке указывают номер

делянки, номер растения, дату отбора. Стручки транспортируют в лабораторию в жесткой таре, предотвращающей их деформацию.

Перед измерением стручки выдерживают в лабораторных условиях (температура 20-22°C, влажность 50-60%) в течение 2-3 часов для стабилизации влажности и формы. Определение границ измерения: длину стручка измеряют как расстояние от точки прикрепления цветоножки (основания стручка) до верхушки носика.

Стручок размещают на матовой поверхности планшета. Штангенциркуль аккуратно подводят к основанию и верхушке стручка без нажима, чтобы не вызвать деформацию. Измерение проводят с точностью до 0,1 мм. Для изогнутых стручков допускается измерение по хорде с обязательной пометкой в журнале.

Для каждого растения вычисляют среднюю длину стручка на основе измерения 5 стручков: $L_{\text{растения}} = (\sum L_{\text{стручка}}) / 5$

Для всей выборки рассчитывают общее среднее арифметическое значение: $L_{\text{общее}} = (\sum L_{\text{растения}}) / N$, где N – количество растений.

Следует учитывать, что фенотипическая пластичность стручка сильно зависит от условий опыления, влагообеспеченности и плотности стояния растений. Измерения необходимо проводить в сжатые сроки в фазе полной спелости до растрескивания стручков. Для получения репрезентативных данных рекомендуется измерять не менее 100 стручков (20 растений по 5 стручков) на каждый генотип.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Лабораторный стол с искусственным освещением; климатическая камера для стабилизации образцов; аналитические весы; сушильный шкаф; система хранения образцов.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Штангенциркуль цифровой с точностью 0,1 мм; металлическая линейка с миллиметровыми делениями; лупа 2х-4х; препаровальные иглы; ножницы или секатор; бумажные пакеты для сбора образцов; пластиковый планшет с матовой поверхностью; маркировочные этикетки; перманентные маркеры; пинцет анатомический; лабораторный пресс для фиксации изогнутых стручков.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Не требуются.

Признак «длина стручка» определяют все исполнители проекта

16. ЧИСЛО СЕМЯН В СТРУЧКЕ

Данная методика предназначена для определения среднего числа семян в стручке у растений рапса (*Brassica napus* L.). Этот показатель является ключевым элементом структуры урожая и напрямую влияет на потенциальную продуктивность растений. Методика может использоваться в селекционной работе при оценке перспективных линий и гибридов, в семеноводстве для контроля качества семенного материала, а также в научно-исследовательской деятельности при изучении влияния агротехнических приемов и условий окружающей среды на формирование репродуктивных органов растения.

Хотя строго регламентированного ГОСТа, посвященного исключительно подсчету семян в стручке рапса, не существует, данная методика основывается на общебиологических принципах отбора проб и статистической обработки данных, соответствующих требованиям таких стандартов, как ГОСТ 12042-80 (на методы отбора проб) и ГОСТ 12038-84 (на методы определения посевных качеств семян, адаптированные для морфометрических исследований).

Принцип метода заключается в отборе репрезентативной выборки стручков с характерной для растения части, ручном вскрытии каждого стручка, подсчете количества полноценных семян и расчете среднего арифметического значения по выборке. Выбор именно стручков с нижней части центральной ветви обусловлен их типичностью: они формируются в более стабильных условиях и менее подвержены влиянию погодных стрессов по сравнению с верхними, а также являются более зрелыми и сформированными по сравнению с боковыми ветвями, что обеспечивает большую точность и воспроизводимость результатов.

Отбор стручков проводят в фазу полной физиологической спелости рапса. Критерии спелости: стручки приобретают светло-желтую или соломенно-желтую окраску, становятся жесткими и при легком сжатии начинают растрескиваться по шву. Семена внутри становятся твердыми и приобретают характерную для сорта окраску (от темно-коричневой до черной).

В пределах опытной делянки или поля выбирают 20 типичных, здоровых растений, равномерно распределенных по площади. Растения с признаками болезней, повреждений вредителями или атипичным развитием исключаются из выборки.

Отбор стручков: на каждом отобранном растении идентифицируют центральную ветвь, на центральной ветви находят зону нижнего и среднего яруса, обычно это участок, расположенный на высоте от 20-30 см от основания растения; с данного участка аккуратно срезают 5 полностью развитых, неповрежденных стручков. Предпочтение отдается стручкам, достигшим максимального для своего яруса размера, без видимых деформаций и пятен. Каждую группу из 5 стручков с одного растения помещают в отдельный подписанный бумажный пакет. На этикетке указывают номер деланки, номер растения, дату отбора.

Анализ начинают с подготовки стручков. Стручки перед анализом можно слегка подсушить при комнатной температуре в течение 12-24 часов (если они были отобраны с повышенной влажностью), чтобы облегчить вскрытие и предотвратить подсчет невызревших семян. Каждый стручок аккуратно вскрывают с помощью препаровальной иглы или скальпеля по линии шва. Важно не повредить и не потерять семена. Содержимое стручка высыпают на чашку Петри или белый лист бумаги. С помощью пинцета или иглы отделяют и подсчитывают все полноценные, выполненные семена. Щуплые, недоразвитые, поврежденные и сильно деформированные семена не учитывают.

Для каждого из 10-20 растений вычисляют среднее арифметическое число семян в стручке на основе подсчета его 5-ти стручков.

$$X_{\text{растения}} = (\Sigma \text{семян в 5 стручках}) / 5$$

Рассчитывают среднее арифметическое значение по всем растениям в выборке. Это число и является средним числом семян в стручке для данной линии, сорта или опытной деланки.

$$X_{\text{общее}} = (\Sigma X_{\text{растения}}) / N, \text{ где } N - \text{количество растений в выборке.}$$

Ранний отбор приводит к учету невызревших семян, поздний – к потере семян из-за растрескивания стручков. Крайне важно отбирать стручки из одинаковой морфологической зоны растения. Размер выборки: для повышения точности рекомендуется анализировать не менее 50-100 стручков (10 растений по 5 стручков) на каждый генотип.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Лабораторный стол с искусственным освещением; сушильный шкаф для доведения образцов до постоянной массы; аналитические весы; бинокулярный микроскоп.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Пинцет анатомический; препаровальные иглы; лупа 2х-4х; чашки Петри стеклянные; бумажные пакеты для сбора образцов; секатор полевой; маркировочные этикетки; перманентные маркеры.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Не требуются.

Признак «число семян в стручке» определяют все исполнители проекта

17. МАССА 1000 СЕМЯН

Метод определения массы 1000 семян рапса регламентирован ГОСТ 12042-80 и является важным показателем для оценки посевных качеств семенного материала. Данный показатель позволяет определить крупность и выполненность семян, что напрямую влияет на расчет норм высева и прогнозирование урожайности.

Принцип метода основан на определении массы 1000 семян, отобранных из средней пробы семян рапса без применения разделения на фракции. Массу устанавливают путем взвешивания навесок и пересчета на 1000 семян с учетом их фактического количества в каждой навеске.

Подготовка к анализу начинается с выделения средней пробы семян рапса массой не менее 500 грамм. Из средней пробы методом ручного выделения или с использованием пневматического сепаратора удаляют все примеси: семена других культур, сорные растения, поврежденные и щуплые семена рапса. Особое внимание уделяют очистке от мелких семян сорняков, которые могут исказить результаты анализа.

Определение влажности проводят перед анализом, так как масса семян должна определяться при стандартной влажности. Для рапса кондиционная влажность составляет 8-10%. Если влажность семян превышает этот показатель, их предварительно подсушивают до кондиционной влажности в сушильном шкафу при температуре не выше 40°C.

Отбор навесок производят после тщательного перемешивания очищенных семян. Для рапса, как мелкосемянной культуры, отбирают две навески массой по 5 грамм каждая с точностью взвешивания $\pm 0,01$ г. Отбор проводят методом квадрата: семена рапса рассыпают тонким слоем на гладкой поверхности, перемешивают и делят на четыре равные части, из которых отбирают противоположные секторы.

Проведение анализа включает несколько этапов. Каждую отобранную навеску взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,01 г. Подсчет количества семян в каждой навеске проводят с помощью семясчетного аппарата или вручную с использованием счетной камеры и увеличительного стекла. Для ручного подсчета семена рапса размещают на стеклянной пластине с углублениями или на листе темной бумаги для лучшей видимости.

Расчет массы 1000 семян выполняют по формуле: $M = (m \times 1000)/n$, где M - масса 1000 семян, г; m - масса навески, г; n - количество семян в навеске. Для каждой из двух навесок рассчитывают отдельное значение, затем

определяют среднее арифметическое. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 3,0% от среднего значения для рапса.

Оформление результатов включает запись массы 1000 семян в граммах с точностью до 0,01 г. В протоколе испытаний указывают: наименование культуры и сорта, номер партии, дату анализа, результаты взвешиваний и подсчетов, конечный результат.

Особенности метода для рапса учитывают его специфические характеристики: мелкий размер семян, склонность к слипанию из-за высокого содержания масла, необходимость тщательной очистки от примесей. Для получения достоверных результатов важно обеспечить однородность температуры и влажности в помещении, где проводят анализ, а также использовать калиброванные весы и счетное оборудование.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Аналитические весы с точностью 0,01 г; сушильный шкаф с терморегулятором; пневматический сепаратор для очистки семян; автоматический счетчик семян; климатическая камера для кондиционирования проб.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Шпатель лабораторный; пинцет; набор сит для очистки семян; делитель проб; бумажные пакеты для хранения образцов; маркировочные этикетки; перманентные маркеры; счетная камера; увеличительное стекло; темная фильтровальная бумага.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Не требуются.

Признак «масса 1000 семян» определяют все исполнители проекта

18. ДЛИНА НОСИКА СТРУЧКА

Методика предназначена для точного определения длины носика стручка у растений рапса в научно-исследовательских, селекционных и семеноводческих целях. Длина носика является важным морфологическим признаком, который характеризует сортовые особенности и может влиять на технологические качества стручка, включая устойчивость к растрескиванию и равномерность созревания.

Принцип метода основан на точном измерении расстояния от места сужения стручка (границы зоны расположения семян) до верхушки носика с использованием прецизионных измерительных инструментов. Метод предполагает отбор репрезентативной выборки стручков из характерной для растения зоны (центральная кисть, средний ярус), их стандартизованную подготовку и проведение измерений в контролируемых лабораторных условиях с последующей статистической обработкой полученных данных для вычисления средних значений и показателей variability признака.

Подготовка к анализу и отбор проб начинается с определением сроков отбора образцов. Отбор стручков проводят в фазу полной физиологической спелости рапса, когда стручки приобретают характерную желтую или светло-коричневую окраску, а семена становятся твердыми. Важно проводить отбор до момента растрескивания перезревших стручков. Выбор растений проводят в пределах опытной делянки или поля, где выбирают 20 типичных, здоровых растений, равномерно распределенных по площади. Растения с признаками болезней, повреждений вредителями или атипичным развитием исключаются из выборки. Отбор стручков проводят на каждом отобранном растении идентифицируют главный побег. На главном побеге выделяют зону среднего яруса. С данного участка аккуратно срезают 5 полностью развитых, неповрежденных стручков, достигших максимального для своего яруса размера, без деформаций. Каждую группу из 5 стручков с одного растения помещают в отдельный подписанный бумажный конверт. На этикетке указывают номер делянки, номер растения, дату отбора. Стручки транспортируют в лабораторию в жесткой таре, предотвращающей их деформацию.

Стручки перед измерением выдерживают в лабораторных условиях (температура 20-22°C, влажность 50-60%) в течение 2-3 часов для стабилизации влажности. Нижняя граница носика определяется как место явного сужения стручка, где заканчивается зона, содержащая семена, и начинается сужающаяся бессемянная часть. Для точного определения можно

использовать лупу. Верхняя граница носика – это самая дистальная точка стручка, включая остаток столбика, если он сохранился.

Стручок размещают на матовой поверхности планшета. Штангенциркуль аккуратно подводят к определенным границам носика без нажима. Измерение проводят с точностью до 0,1 мм. Для стручков с изогнутым носиком допускается измерение по хорде с обязательной пометкой в журнале. Результат измерения каждого стручка записывают в журнал с указанием номера растения и порядкового номера стручка.

Для каждого растения вычисляют среднюю длину носика на основе измерения 5 стручков: $L_{\text{растения}} = (\sum L_{\text{носика}}) / 5$. Для всей выборки рассчитывают общее среднее арифметическое значение: $L_{\text{общее}} = (\sum L_{\text{растения}}) / N$, где N – количество растений.

Результаты представляются в виде таблицы, содержащей для каждой изученной группы (сорт, линия) следующие данные: среднюю длину носика стручка (мм), стандартную ошибку, минимальное и максимальное значение, коэффициент вариации.

Некоторые факторы, влияют на точность метода, а именно: стадия зрелости, единообразие выборки, размер выборки. Так длина носика может незначительно изменяться в процессе созревания, поэтому важна стандартизация стадии отбора. Крайне важно отбирать стручки из одинаковой морфологической зоны растения. Для получения репрезентативных данных рекомендуется измерять не менее 100 стручков (20 растений по 5 стручков) на каждую изучаемую группу.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Аналитические весы; сушильный шкаф; стереоскопический микроскоп; климатическая камера; лабораторный стол с регулируемым освещением.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Штангенциркуль цифровой с точностью 0,01 мм; лупа 4x; препаровальные иглы; пинцет анатомический; секатор; бумажные пакеты; маркировочные этикетки; перманентные маркеры; чашки Петри, белый пластиковый или стеклянный планшет с матовой поверхностью для размещения стручков при измерении.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Не требуются.

Признак «длина носика стручка» определяют все исполнители проекта

19. ГЕРБИЦИДОУСТОЙЧИВОСТЬ

(устойчивость к имидазолиноновым гербицидам)

Оценку селекционного материала на устойчивость к гербицидам можно проводить как в контролируемых условиях климатической камеры или теплицы, так и в полевых условиях.

Методика предназначенная для оценки селекционного материала, сортов, гибридов и родительских линий рапса в условиях фитотронно-тепличного комплекса заключается в выращивании растений в сосудах объёмом 10 литров, заполненных почво-торфяной смесью по 4-5 растений/сосуд. Используются лампы, обеспечивающие освещённость 25 килोलюкс при фотопериоде день/ночь 16/8.

Для выявления устойчивости рапса к имидазолинонам, на стадии 2-3-х настоящих листьев проводится обработка растений гербицидом Нопасаран (д.в. имазамокс 25 г/л и метазахлор 375 г/л, компания-производитель BASF) в дозировке 1,2 л/га с прилипателем ДАШ 1,2 л/га в соотношении 1:1. Оценка проводится по шкале фитотоксичности на 10 день после обработки. Шкала представляет собой девятибалльную систему, где: 0 - растения без признаков повреждения; от 0 до 3 – хлороз листьев; от 4 до 6 – морфологические аномалии; 7 – появление некрозов; 8 – гибель точки роста; 9 - полный некроз апекса и гибель растения.

Оценку на устойчивость к гербицидам можно проводить и в полевых условиях с использованием ручного пневматического или ранцевого электрического опрыскивателя с рабочим давлением 0,6 МПа. Опрыскивание проводили в утренние часы при наиболее благоприятных погодных условиях. Сопло опрыскивателя удерживается на расстоянии около 20 см от точки роста растения, при этом создаётся мелкодисперсное облако рабочего раствора, которое равномерно покрывает растение. Оценка воздействия гербицида на растения проводилась на 10-е и 20-е сутки после обработки (Перстенёва А.А., 2009).

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Фитотрон с климатическим контролем.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Ручной пневматический или ранцевый электрический опрыскиватель, вегетационные сосуды объёмом 10-15 л; почвосмесь; шпатели; пинцеты; маркировочные этикетки; полевые журналы; планшеты для записей, средства индивидуальной защиты.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Гербицид имидазолиноновой группы, прилипатель, дистиллированная вода.

Признак «гербицидоустойчивость» определяется в учреждении ответственном за культуру – ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

20. УСТОЙЧИВОСТИ К КИЛЕ

Для точной дифференциации восприимчивых и устойчивых генотипов с целью последующего отбора необходима эффективная система оценки устойчивости на искусственном инфекционном фоне.

Приготовление суспензии спор

Для приготовления суспензии спор килы (*Plasmiodiophora brassicae*) можно использовать как свежие, так и хранившиеся в морозильной камере при температуре - 20°C. Хранение желваков в морозильной камере позволяет иметь источник инфекции в любое время, однако для инокуляции рекомендуется использовать свежие желваки сильно пораженного растения.

Суспензию спор для инокуляции получают следующим путем:

- желваки сильно пораженного растения измельчают на терке или с помощью бытового блендера;
- полученную гомогенную массу разводят в чистой воде (использование хлорированной водопроводной воды нежелательно);
- интенсивно размешивают и настаивают несколько минут;
- полученный инокулюм фильтруют через четырехслойную марлю;
- определяют концентрацию спор в суспензии с использованием камеры Горяева;
- и разведением чистой водой доводят до необходимой концентрации.

Опытным путем установлено, что оптимальная для инокуляции концентрация достигается при использовании 5 г свежих желваков на 10 л воды.

Для инокуляции используют свежеприготовленную суспензию спор патогена. Плотность суспензии покоящихся спор 3×10^6 спор/мл (Заставнюк А. Д., 2022).

Оптимальная влажность почвы (субстрата) для развития возбудителя составляет 70-90 % от полной полевой влагоемкости. При уменьшении влажности почвы до 45 % заражение растений сильно снижается, а при 30 % прекращается. Повышение влажности почвы до 98-100 % также препятствует нормальному развитию патогена. Оптимальная температура воздуха 20-25° С, максимальная – 30-35° С.

Учет устойчивости/восприимчивости растений

Учет устойчивости/восприимчивости растений проводят глазомерно. Через 40-45 дней после инокуляции растения извлекают из субстрата, их корни отмывают. Оценку проводят по четырех-бальной шкале: 0-3 балла (рис. 1) (Buczacki et al., 1975).

Распространенность болезни (частота встречаемости) - количество пораженных растений, выраженное в процентах. Вычисляют эту величину по формуле:

$$P = n/N \times 100\%,$$

где P - распространенность болезни, N

- общее число растений в пробах,

n - количество больных растений в пробах.

Развитие (индекс) болезни рассчитывают по формуле:

$$R = \frac{\sum(a \times b)}{N \times K} \times 100\%,$$

где R- развитие болезни,

$\Sigma(a \times b)$ - сумма произведений числа растений на соответствующий им балл поражения,

N - общее количество учтенных растений, K

- высший балл шкалы учета.



Рис. 1. Шкала симптомов поражения килой:

0 баллов - нет поражения;

1 балл - некрупные галлы на боковых корнях;

2 балла - сильное поражение боковых корней и слабое главного корня;

3 балла - сильное поражение главного и боковых корней.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Лабораторный блендер для измельчения желваков; микроскоп с камерой Горяева; климатическая камера с регулируемой температурой и влажностью; автоклав для стерилизации инструментов; центрифуга лабораторная; весы аналитические; сушильный шкаф; система капельного орошения.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Мерные колбы и цилиндры; пипетки автоматические; марля четырехслойная; терка лабораторная; шпатели; скальпели; пинцеты; контейнеры для сбора образцов; этикетки влагостойкие; перчатки одноразовые; фотоаппарат с макрообъективом для фиксации симптомов; блокнот для записей.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Дистиллированная вода; этанол 70% для дезинфекции; гипохлорит натрия для поверхностной стерилизации.

Признак «устойчивость к киле» определяется в учреждении, где имеются камеры искусственного климата и источник инфекции (килы): РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева

21. УСТОЙЧИВОСТЬ К СКЛЕРОТИНИОЗУ

Методика предназначена для комплексной оценки устойчивости сортов и гибридов рапса к возбудителю склеротиниоза (*Sclerotinia sclerotiorum*) в контролируемых условиях. Метод основан на искусственном заражении растений рапса активными культурами *S. sclerotiorum* с последующей оценкой развития заболевания по визуальным симптомам и измерению степени поражения тканей. Изолят *Sclerotinia sclerotiorum* размножают на твёрдой питательной среде PDA, препаровальной иглой в стерильных условиях отбирают мицелий из исходного материала и помещают в центр чашки Петри со средой PDA, не травмируя саму среду, чтобы добиться обильного спороношения на её поверхности. в термостате на +25°C. Перед инокуляцией культуру пересеживают на автоклавированное и пропаренное зерно пшеницы (Соколова Л.М., 2022). Для этого в коническую колбу Эрленмейера засыпают 30 грамм зерна пшеницы и вдвое больший объём дистиллированной воды. После этого смесь герметично закрывают и помещают в автоклав на 121°C на 15 минут. В остывшее пропаренное зерно вносят кусочек среды PDA с активно растущим на ней мицелием и тщательно перемешивают содержимое, затем ставят в термостат +25°C на 3 дня. Дважды в день производят активное встряхивание колбы для равномерного разрастания мицелия по всему объёму. Инокуляцию *Sclerotinia sclerotiorum* проводят размещением зерновок с растущим на них мицелием в пазухе листа (Li, 2007). В качестве контроля используют стерильные зерновки без растущего на них патогена. Инокуляцию проводят в пленочных укрытиях. Первые 3 дня поддерживают высокую влажность путем опрыскивания растений водой и установки емкостей с водой.

На 7 день с начала инокуляции проводят учёты поражения по следующей бальной шкале: 0 – растение не поражено; 1 - поражение на листе; 3 - поражение на листе и стебле; 5 - поражены несколько листьев и точка роста/стебель на волоске.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Ламинарный бокс; автоклав для стерилизации сред и материалов; термостат с регулировкой температуры (+25°C); инокуляционная камера или пленочные укрытия; климатическая камера с контролем влажности; микроскоп для анализа мицелия; аналитические весы; стерильные конические колбы Эрленмейера; чашки Петри.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Препаровальные иглы; бактериологические петли; шпатели; пинцеты; мерные цилиндры и колбы; пипетки автоматические; стерильные перчатки и

маски; маркеры для маркировки; распылители для поддержания влажности; емкости для воды; фотоаппарат для фиксации симптомов; блокнот для записей.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Питательная среда PDA (картофельно-декстрозный агар); зерно пшеницы; дистиллированная вода; этанол 70% для стерилизации; гипохлорит натрия для дезинфекции.

Оценку признака «устойчивость к склеротиниозу» проводят исполнители проекта, имеющие в распоряжении учреждения камеры искусственного климата, источник инфекции (склеротинии) и специалистов фитопатологов: ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева

22. УСТОЙЧИВОСТЬ К ФОМОЗУ

Методика предназначена для оценки устойчивости сортов и гибридов рапса к возбудителю *Leptosphaeria maculans* в контролируемых условиях. Метод основан на искусственном заражении растений в ранней фазе развития с последующей оценкой патогенеза по двухбалльной шкале. Методика включает этапы подготовки инфекционного материала, инокуляции растений и оценки развития заболевания. Под инокуляцию *Leptosphaeria maculans* растительный материал доращивали до состояния двух семядольных листьев и начала появления первого настоящего листа. Патоген размножают на твёрдой питательной среде PDA (картофельный агар) со следующим составом: картофель – 200 г, агар – 20 г, глюкоза – 20 г, 1 литр дистиллированной воды (Gomzhina M.M., 2022). Для этого препаровальной иглой в стерильных условиях отбирают мицелий из исходного материала и помещают в центр чашки Петри со средой PDA, не травмируя саму среду, чтобы добиться обильного спороношения на её поверхности. Чашки-Петри с введённым в культуру грибом помещают в термостат на +25°C. Перед инокуляцией *Leptosphaeria* sp. пересаживают на жидкую питательную среду с соевой мукой следующего состава: KH_2PO_4 – 2 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 г, MgSO_4 – 1 г, глюкоза – 20 г, соевая мука – 10 г, дистиллированная вода – 1 литр, pH=6 (Gomzhina M.M., 2022). В ней культуру *Leptosphaeria* культивировали в течении 4 дней перед инокуляцией при непрерывном перемешивании на шейкере при 100 оборотах в минуту, температура +22°C.

Перед инокуляцией мицелий отделяют от остатков питательной среды фильтрованием через марлю и затем высушивают на фильтровальной бумаге. Инокулюм готовят в соотношении 100 мг мицелия на 1 мл дистиллированной воды (Соколова Л., 2022). Инокуляцию проводят через нанесение капли инокулюма объёмом 10 мкл на прокол семядольного листа. После инокуляции растения укрывают непрозрачной зеркальной плёнкой и не открывают её первые два дня, затем раз в день на 8 часов проводят разукрытие плёнкой. Учёты поражения проводят на третий день после инокуляции по двухбалльной шкале: 0 – растение не поражилось, 1 – растение засохло и погибло (Вишнякова А.В., 2025).

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Ламинарный бокс; автоклав вертикальный лабораторный; термостаты с регулировкой температуры (+25±0,1°C); климатические камеры с контролем влажности и освещенности; микроскоп биологический с увеличением 100-400x; аналитические весы с точностью 0,01 г; pH-метр лабораторный;

магнитные мешалки с подогревом; стерилизаторы воздушные; холодильники для хранения культур и сред.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Чашки Петри стеклянные и пластиковые; конические колбы Эрленмейера на 100-250 мл; мерные цилиндры и колбы; пипетки автоматические переменного объема; препаровальные иглы и скальпели; бактериологические петли; шпатели дюралевые; пинцеты анатомические; перчатки нитриловые стерильные; маски медицинские; маркеры спиртоустойчивые; распылители для растений; емкости для воды; фотоаппарат с макрообъективом; термогигрометры портативные.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Питательная среда PDA (картофельный экстракт - 200 г/л, декстроза - 20 г/л, агар - 15 г/л); зерно пшеницы продовольственное; вода дистиллированная; этанол 70% для стерилизации; гипохлорит натрия 1% раствор для дезинфекции; хлорид натрия химически чистый; питательный агар для контроля стерильности; растворы антибиотиков (стрептомицин, тетрациклин) для подавления сопутствующей микрофлоры.

Оценку признака «устойчивость к фомозу» проводят исполнители проекта, имеющие в распоряжении учреждения камеры искусственного климата, источник инфекции (фомоза), специалистов фитопатологов: ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева

23. УСТОЙЧИВОСТЬ К ФУЗАРИОЗУ

Методика предназначена для оценки устойчивости сортов и гибридов рапса к почвенным патогенам рода *Fusarium* в контролируемых условиях. Метод основан на искусственном заражении растений через корневую систему с последующей оценкой развития заболевания по двухбалльной шкале. Методика включает этапы подготовки инфекционного материала, инокуляции растений и оценки устойчивости. Растения выращивают в пластиковых кассетах на 64 ячейки (4×4 см) в торфяном субстрате верхового происхождения. Продолжительность предварительного выращивания составляет 30 дней до момента инокуляции. Условия выращивания: температура 22±2°С, влажность 70-75%, фотопериод 16/8 часов. Изоляты патогена культивируют на стандартной среде Чапека со следующим составом: сахароза – 30 г, NaNO₃ – 2 г, KН₂РО₄ – 1 г, MgSO₄ * 7H₂O – 0,5 г, KCl – 0,5 г, FeSO₄ * 7H₂O – 0,01 г, агар-агар – 20 г, вода дистиллированная 1 л.

Инокуляцию растений изолятами *Fusarium* начинают с приготовления суспензии спор фитопатогена. Для этого делают смывы с разросшихся колоний патогена, возрастом две-три недели, при помощи шпателя Дригальского. Общий объём суспензии, получаемой с одной чашки-Петри – 40 мл. Инокулюм фильтруют в общую для одного изолята емкость через вдвое сложенную марлю. Затем в камере Фукса-Розенталя подсчитывают среднее количество конидий и доводят концентрацию инокулюма до 10⁶ конидий/мл. Для проведения инокуляции корневую систему растений очищают от субстрата, подрезают, чтобы травмировать корни и обеспечить патогену доступ в проводящую систему и замачивают в инокулюме на 15 минут (Соколова Л., 2022). По прошествии времени растения пересаживают в стерильный очищенный речной песок и оставляют до проведения учётов на 21 день с поливами дважды в неделю. Оценку проводят по двухбалльной шкале: 0 – растение не поражилось, 1 – погибло.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Ламинар-бокс класс II для стерильных работ; термостат с регулировкой температуры (+25±0,5°С); климатическая камера с контролем температуры, влажности и освещенности; микроскоп с камерой Фукса-Розенталя; аналитические весы с точностью 0,01 г; автоклав вертикальный; рН-метр лабораторный; шейкер-инкубатор; холодильник для хранения культур.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Пластиковые кассеты на 64 ячейки (4×4 см); чашки Петри стерильные; конические колбы Эрленмейера; мерные колбы и цилиндры; шпатель

Дригальского; пипетки автоматические; марля медицинская стерильная; скальпели хирургические; ножницы для подрезки корней; пинцеты анатомические; емкости для инокуляции; перчатки нитриловые; контейнеры для выращивания; фотоаппарат для документирования.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Среда Чапека: сахароза 30 г/л, NaNO_3 2 г/л, KH_2PO_4 1 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 г/л, KCl 0,5 г/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 г/л, агар-агар 20 г/л; торфяной субстрат верховой; речной песок стерильный; вода дистиллированная; этанол 70% для стерилизации.

Оценку признака «устойчивость к фузариозу» проводят исполнители проекта, имеющие в распоряжении учреждения камеры искусственного климата, источник инфекции (фузариоза) и специалиста фитопатолога: ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева

24. УСТОЙЧИВОСТЬ К АЛЬТЕРНАРИОЗУ

Чистая культура *Alternaria brassicicola*, выращенная на среде PDA, получают из маточной культуры для искусственной инокуляции. Конидии 10-дневных культур собирают путем промывки чистой культуры *A. brassicicola* дважды дистиллированной водой и фильтрования через хлопчатобумажную ткань. Концентрацию суспензии конидий определяют с помощью гемоцитометра и доводят до 5×10^4 мл-1 конидий.

Инокуляцию растений проводят в возрасте 30 дней, распыляя суспензию патогена на листья. Растения содержат в теплице при температуре 20-25 °С, накрыв полиэтиленовыми пакетами для сохранения влаги. Симптомы поражения учитывают через 72 ч. после инокуляции. Симптомы поражения учитывают на 3 и 4-м листе по шкале.

Шкала оценки

- 1 - на листьях нет пятен и хлороза,
- 2 - несколько точечных пятен, но без хлороза,
- 3 - несколько пятен, но без крупных поражений и без хлороза,
- 4 - несколько пятен с небольшим количеством поражений, окруженных легким хлорозом,
- 5– 9 - увеличение числа и размера поражений и хлороза на листьях,
- 10 - поражения с хлорозом более чем на 90% листа.

Образцы с баллом поражения 1-3 относят к высокоустойчивым, образцы с баллом 3,1–4 относят к умеренно устойчивым, образцы с баллом поражения 4,1–10 относят к восприимчивым.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Ламинарный бокс; автоклав для стерилизации сред и материалов; термостат с регулировкой температуры (+25°C); инокуляционная камера или пленочные укрытия; климатическая камера с контролем влажности; микроскоп для анализа мицелия; аналитические весы; стерильные конические колбы Эрленмейера; чашки Петри.

НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Препаровальные иглы; бактериологические петли; шпатели; пинцеты; мерные цилиндры и колбы; пипетки автоматические; стерильные перчатки и

маски; маркеры для маркировки; распылители для поддержания влажности; емкости для воды; фотоаппарат для фиксации симптомов; блокнот для записей.

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

Питательная среда PDA (картофельно-декстрозный агар); дистиллированная вода; этанол 70% для стерилизации; гипохлорит натрия для дезинфекции.

Оценку признака «устойчивость к альтернариозу» проводят исполнители проекта, имеющие в распоряжении учреждения камеры искусственного климата, источник инфекции (альтернарии) и специалистов фитопатологов: ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева

СПИСОК АББРЕВИАТУР И СОКРАЩЕНИЙ

NIR – Ближняя инфракрасная спектроскопия (Near-Infrared Spectroscopy)

ИК-спектрометр – Инфракрасный спектрометр

НМ – нанометр

МКМОЛЬ/Г – микромоль на 1 грамм

МЭЖК – Метилловые эфиры жирных кислот

МПа – мегапаскаль

ДАШ – прилипатель для гербицидов

ГОСТ – Государственный стандарт

ФАР – Фотосинтетически активная радиация

ПВ – Полная влагоёмкость

НВ – Наименьшая влагоёмкость

SI – Индекс стресса (Stress Index)

TOL – Индекс толерантности (Tolerance Index)

ДАЖ – дозатор для автоматического ввода жидких проб в испаритель газового хроматографа

SSI – Индекс восприимчивости к стрессу (Stress Susceptibility Index)

GMP – Геометрическая средняя продуктивность (Geometric Mean Productivity)

PDA – Картофельно-декстрозный агар (Potato Dextrose Agar)

Ч.Д.А. – чистый для анализа (повышенная степень чистоты)

IRGA – Инфракрасный газоанализатор (Infrared Gas Analyzer) **CV**

– Коэффициент вариации (Coefficient of Variation)

SD – Стандартное отклонение (Standard Deviation)

BF₃ – Трифторид бора (катализатор при метилировании)

NaOCH₃ – Метилат натрия

H₃BO₃ – Борная кислота

HCl – Соляная кислота

NaOH – Гидроксид натрия

H₂ SO₄ – Серная кислота

CuSO₄ – Сульфат меди

K₂ SO₄ – Сульфат калия

DEAE-Sephadex A-25 – Диэтиламиноэтил-сефадекс (анионообменная смола)

ФАА – Фиксатор (смесь формалина, уксусной кислоты и спирта)

B. napus L. – *Brassica napus* Linnaeus (рапс)

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. ГОСТ 12037-81 "Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения чистоты и отхода семян".
2. ГОСТ 12041-82 "Семена сельскохозяйственных культур. Метод определения влажности".
3. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. - М., 1985.
4. Практикум по селекции и семеноводству полевых культур / Под ред. В.В. Пыльнева. - М.: Колос, 2004.
5. Семеноводство полевых культур / В.А. Федотов. - М.: Агропромиздат, 2009.
6. Современные методы оценки качества семян сельскохозяйственных культур / А.А. Лященко. - М.: ФГНУ "Росинформагротех", 2010.
7. ГОСТ 12042-80. Семена сельскохозяйственных культур. Методы отбора проб. — Введ. 1981-07-01. — М. : Издательство стандартов, 1980. — 55 с.
8. ГОСТ 31640-2012. Корма. Методы определения содержания сырого жира. — Введ. 2014-01-01. — М. : Стандартиформ, 2013. — 12 с.
9. ГОСТ 31663-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения содержания сырого протеина, сырого жира, сырой клетчатки и влаги с применением ближней инфракрасной спектromетрии. Общие требования. — Введ. 2014-01-01. — М. : Стандартиформ, 2013. — 9 с.
10. ГОСТ 33749-2014. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения содержания сырого протеина, сырого жира, сырой клетчатки и влаги с применением ближней инфракрасной спектromетрии. — Введ. 2016-01-01. — М. : Стандартиформ, 2015. — 16 с.
11. ГОСТ ISO 20483-2015. Зерно злаковых и бобовых культур. Определение содержания азота и вычисление содержания сырого протеина методом Кьельдаля. — Введ. 2016-07-01. — М. : Стандартиформ, 2015. — 12 с.
12. Thies, W. Determination of the glucosinolate content in commercial rapeseed loads with the help of the glucose test / W. Thies // Fette, Seifen, Anstrichmittel. — 1979. — Vol. 81, No. 2. — P. 390–394.

13. ГОСТ ISO 9167-1-2015. Рапс. Определение содержания глюкозинолатов. Часть 1. Метод с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. — Введ. 2017-01-01. — М. : Стандартинформ, 2016.
14. ГОСТ Р 51483-99. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме. — Введ. 2000-07-01. — М. : Издательство стандартов, 1999. — 15 с.
15. ГОСТ Р 51486-99. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. — Введ. 2000-07-01. — М. : Издательство стандартов, 1999. — 10 с.
16. Санин, С.С. Методика полевого опыта в селекции растений: учебное пособие / С.С. Санин. — М.: РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2013. — 120 с.
17. ГОСТ 12045-97 "Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения посевных качеств".
18. ГОСТ 24847-81 "Растения сельскохозяйственные. Методы определения устойчивости к низким положительным температурам".
19. Полевой В.В. Оценка морозоустойчивости озимого рапса в искусственных климатических камерах // Масличные культуры. - 2018. - № 1. - С. 45-51.
20. Трускинов Э.В. Методы оценки морозоустойчивости озимых культур в контролируемых условиях // Сельскохозяйственная биология. - 1987. - № 4. - С. 78-84.
21. Федоров А.К. Методы полевого опыта / А.К. Федоров. - М.: Колос, 2020. - 336 с.
22. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. - М.: ФГБУ "Госсорткомиссия", 2019. - 240 с.
23. Фенологический мониторинг в селекции растений / под ред. В.А. Драгавцева. - СПб.: ВИР, 2018. - 204 с.
24. Методика полевого опыта с масличными культурами / под ред. В.С. Пустовойта. - Краснодар: ВНИИМК, 2019. - 215 с.
25. Методика морфометрического анализа растений / под ред. В.Г. Хржановского. - М.: Колос, 2018. - 284 с.

26. Морфометрический анализ растений: методы и подходы / А.И. Купцов. - М.: Колос, 2021. - 284 с.
27. Перстенёва А.А. Наследование устойчивости к имидазолиноновым гербицидам у подсолнечника // автореферат на соискание учёной степени к.б.н. – Краснодар. – 2009. – 25 с.
28. Заставнюк А. Д., Монахос Г. Ф., Вишнякова А. В., Миронов А. А., Монахос С. Г. Генотипирование устойчивости к киле и оценка комбинационной способности капусты Пекинской // Известия ТСХА. 2022. №5.
29. Соколова, Л. М. Система комплексного применения селекционно - иммунологических методов для создания сортов и гибридов моркови столовой с групповой устойчивостью к *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp: Методические рекомендации / Л. М. Соколова. – Москва: Федеральный научный центр овощеводств, 2022. – 56 с.
30. Gomzhina M.M., Gasich E.L. PLENODOMUS SPECIES INFECTING OILSEED RAPE IN RUSSIA // Вестник защиты растений. 2022. №3.
31. Агрессивные изоляты *Fusarium* spp. на овощных культурах Московской области: видовой состав и фитотоксичность / А. В. Вишнякова, М. А. Никитин, А. А. Александрова, Л. М. Соколова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2025. – № 1. – С. 108-123.