

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Кемеровский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского федерального научного центра агробιοтехнологий Российской академии наук

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ КОЛЛЕКЦИИ

Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН

Кемерово 2017

## ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Название коллекции - Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН (Сорта и гибриды картофеля селекционные исследования).

Держатель коллекции – Кемеровский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского федерального научного центра агробιοтехнологий Российской академии наук (Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН).

Цели и задачи - Выделение источников хозяйственно-ценных признаков, формирование рабочих коллекций для создания нового селекционного материала картофеля и зерновых культур (яровая мягкая пшеница, пленчатые и голозерные формы ячменя и овса).

Объем коллекции - Всего 1070 образцов, в том числе картофеля – 170.

Адрес: 650510 Кемеровская область, Кемеровский район, п. Новостройка, ул. Центральная 47.

Адрес WEB-сайта <http://sfnca.sorashn.ru>

Коллекция зарегистрирована на сайте ЦКП Минобрнауки <http://www.skrf.ru/skrf/506118>, регистрационный номер 506118.

Руководитель коллекции: Куликова Валентина Ивановна, канд. с.-х. наук (тел. (3842)60-41-30; сот. 903-984-38-72; e-mail:kulikova.potato@yandex.ru).

Контактное лицо: Исачкова Ольга Александровна, канд. с.-х. наук (тел. (3842)60-42-37; сот. 904-991-09-31, e-mail:isachkova2410@mail.ru).

#### Перечень ключевых СОПов:

- СОП по оздоровлению и введению образцов картофеля в культуру *in vitro*;
- СОП по хранению и браковке пробирочных растений;
- СОП по черенкованию пробирочных растений;
- СОП по хранению клубневого материала, полученного из пробирочных растений;
- СОП по клубневому анализу и браковке в период хранения;
- СОП по ИФА-диагностике на вирусные и бактериальные болезни перед микроклональным размножением;
- СОП по фенологическому анализу вегетирующих растений;
- СОП по анализу растений по хозяйственно-ценным признакам;
- СОП по мониторингу фенологического состояния и прочистке от засорения;
- СОП по ИФА-диагностике на вирусные и бактериальные болезни клубневого материала;
- СОП по ИФА-диагностике на вирусные и бактериальные болезни вегетирующих растений;
- СОП по определению количественных характеристик опушения листьев растений для фенотипирования сортов и гибридов картофеля.

#### Инфраструктура:

- Растильные комнаты (выращивание растений картофеля в культуре *in vitro*, *in vivo*)
- Лаборатория приготовления питательных сред
- Ламинарный бокс
- Лаборатория диагностики
- Комната для проращивания
- Комната для хранения

## ПОЛНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Стандартная операционная процедура

#### «Оздоровление и введение образцов картофеля в культуру *in vitro*»

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Рябцева Т.В., канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол оздоровления и введения образцов картофеля в культуру *in vitro*

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Оздоровление и введение образцов картофеля в культуру *in vitro*» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

#### *Перечень необходимого оборудования*

Оздоровление и введение образцов картофеля в культуру *in vitro* осуществляется с использованием следующего оборудования (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования):

- Ламинар бокс «Ламинар С – 1,5» (Ламинарные системы),
- Вошер «Stat Fax 2600» (Stat Fax),
- Весы аналитические (Pioneer PA 512; ЗАО «СОРТОГОСМ» ЛВ – 120 А; METLER),

- Вальцовый пресс (Поллене),
- Фотометр лабораторный Stat Fax 4300 (Stat Fax),
- Термостат (ТВЗ-25),
- Дистиллятор АЭ-25 МО («Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»),
- Иономер Эксперт -001-1 (НПП Эконикс – Экспер);
- Персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом ChroMate Manager;
- Стерилизатор паровой ВК-75-01 (АО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»);
- Микроскоп Primo Star 2600 (ZEISS);
- Шкаф сушильный ШС 80-01(ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»);
- Флакон-диспенсор ВЮНИТ Prospenser 50 мл;
- комплект общелабораторного оборудования и посуды: колбы стеклянные, стаканы химические стеклянные, пробирки стеклянные биологические, наборы пипеток, холодильники и др.

Оздоровление и введение образцов картофеля в культуру *in vitro* в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» состоит из ряда последовательных операций:

- отбор базовых клонов;
- термотерапия;
- проращивание;
- вычленение меристем;
- выращивание растений из меристем в пробирках на искусственной питательной среде с добавлением ингибиторов вирусов;
- диагностика микрорастений на наличие вирусной инфекции методом ИФА;
- маркировка безвирусных растений в культуре *in vitro* как родоначальников меристемных линий.

#### *Отбор базовых клонов*

1) Для оздоровления сортов и гибридов картофеля ведется поиск базовых клонов в полевых условиях. В период бутонизации и начале цветения визуальной оценке подвергается индивидуально каждое растение. Каждое из визуально отобранных растений проверяют на наличие патогенов методом ИФА по листовым пробам (СОП «ИФА диагностика на вирусные и бактериальные болезни вегетирующих растений»).

2) Оценивают растения и клубни картофеля при уборке. Требования, предъявляемые к растению, намеченному к отбору: растение – типичное по морфологическому строению для

данного сорта, абсолютно здоровое по внешнему виду, нормально развитое, с характерным для сорта количеством стеблей; клубни – типичные по морфологическим признакам для данного сорта без признаков веретеновидности, совершенно здоровые по визуальной оценке, характерное для сорта количество стандартных по размеру клубней и переход от крупных к мелким. Урожай каждого отобранного клона помещают в отдельный пакет и доставляют автотранспортом в хранилище лабораторного корпуса. После прекращения лечебного периода проводят термотерапию.

#### *Термотерапия*

3) Клубни картофеля, предназначенные для термотерапии, переносят в лабораторию, моют и просушивают на фильтровальной бумаге. Клубни, помещаемые на термотерапию, должны быть свободны от инфекции, фитофтороза, склероциев ризоктонии. Просушенные клубни осматривают и из намеченного на оздоровление клона отбирают 4-5 штук, закладывают в термостат на термотерапию при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ , в течение 40 дней.

#### *Проращивание*

4) После термотерапии клубни проращивают для получения этилированных ростков размером 2-3 см. Концентрация вирусов в этилированных ростках значительно ниже и, вероятно, зона верхушечной меристемы больше, чем в ростках, выросших на свету. Клубни помещают в кюветы на стеллажах в темном месте, при температуре  $18-22^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности воздуха в пределах 75 %. Продолжительность периода проращивания различна и зависит от сортовых особенностей. Для получения этилированных ростков 2-3 см требуется 30 - 60 дней.

#### *Вычленение верхушечных меристем*

5) Приготавливают питательную среду. Для этого используют лабораторную посуду (колбы, химические стаканы) и биологические пробирки, предварительно тщательно промытые и прожаренные в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре  $+200^{\circ}\text{C}$ . При оздоровлении картофеля применяют питательную среду для выращивания меристем модификации ВНИИКХ. В качестве основных ингредиентов питательных сред используют макро- и микросоли, витамины, органические вещества, регуляторы роста а так же ингибиторы вирусов. Дистиллированную воду стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при давлении пара в камере 2 Атм.

6) На аналитических весах с точностью 0,1 г в коническую колбу берут навеску агара, затем заливают стерилизованной холодной водой и помещают на водяную баню до полного растворения.

7) На аналитических весах с точностью 0,0001 г берут навески реактивов входящих в состав питательной среды. Отдельно в колбы объемом 250 мл количественно переносят

навески солей, которые могут при растворении с другими компонентами выпасть в осадок, оставшиеся в общую колбу объемом 2000 мл. Навески растворяют в стерилизованной холодной воде, смешивают. Замеряют рН полученного раствора, доводя до оптимального значения для роста меристем – 5,7. В бутылки для флакон-диспенсора (объемом 2000 мл) смешивают солевой раствор с раствором агар-агара и доводят горячей стерилизованной водой до метки. Флакон-диспенсором разливают питательную среду по 10 мл в стеклянные биологические пробирки. Пробирки с питательной средой закрывают ватно-марлевыми пробками, устанавливают в медицинские боксы и стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при давлении пара в камере 2 Атм. После чего стерильную питательную среду переносят в бокс.

8) Вычленение верхушечных меристем проводят в стерилизованном с помощью ртутно-кварцевых или бактерицидных ламп микробиологическом боксе. Перед началом работы рабочее место (стол, бинокулярный микроскоп) и штативы для пробирок протирают 96 %-ным этиловым спиртом. Инструменты, используемые для вычленения (пинцеты, скальпели, иглы), стерилизуют перед каждым вычленением, погружая в 96 %-ный этиловый спирт с последующим обжигом.

9) Ростки перед вычленением меристем стерилизуют в 96 %-ном этиловом спирте. Ростки помещают в химический стакан, наливают спирт и стерилизуют в течение 5-ти минут, затем трижды промывают в стерильной дистиллированной воде. Дезинфицированные ростки перекладывают в стерильную чашку Петри и добавляют несколько капель автоклавированной воды для предупреждения их подсыхания.

10) С верхушки ростка удаляют верхние покровные листочки под бинокулярным микроскопом при 30-50-кратном увеличении. Меристему, включающую кусочек ткани размером 100-300 мкм без листовых зачатков (примордиев), вычленяют кусочком тонкого лезвия зажатого в цанговый держатель. Каждую операцию по удалению листочков и вычленению меристемы проводят отдельным простерилизованным инструментом.

11) После вычленения меристему иглой аккуратно переносят на поверхность питательной среды в пробирку. Затем пробирку закрывают пробкой над пламенем горелки и ставят в штатив. Во избежание подсыхания питательной среды пробку заворачивают специальной пленкой.

12) Пробирку с посаженной на питательную среду меристемой переносят в специальную комнату с постоянным световым и влаготемпературным режимами. Температуру необходимо поддерживать 20-24<sup>0</sup>С, освещенность 8 ± 2 тыс. люкс, фотопериод 16 часов, влажность 70 %. Важное условие хорошей регенерации растений из меристем – сокращение периода между их выделением и помещением в комнату с постоянным режимом.

*Выращивание растений из меристем в пробирках на искусственной питательной сре-*

*де с добавлением ингибиторов вирусов*

13) В течение периода регенерации проростки из меристем пересаживают в микробиологическом боксе на новую порцию питательной среды такого же состава через 25-28 дней до получения растения с 5-6 листочками, затем его расчеренковывают. Первый черенок высаживают в пробирки на питательную среду, оставшуюся часть растения диагностируют методом ИФА.

*Диагностика микрорастений на наличие вирусной инфекции методом ИФА*

14) Работы проводят в соответствии с СОП «ИФА-диагностика пробирочных растений картофеля перед микроклональным размножением на вирусные и бактериальные болезни».

*Маркировка безвирусных растений в культуре in vitro как родоначальников меристемных линий*

15) Растения регенеранты, свободные от вирусной инфекции получают условные обозначения и их включают в размножение в культуре *in vitro*.



## Стандартная операционная процедура «Хранение и браковка пробирочных растений картофеля»

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Рябцева Т.В., канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., Ходаева В.П., науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол хранения и браковки пробирочных растений картофеля

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Хранение и браковка пробирочных растений картофеля» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля. Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

### *Перечень необходимого оборудования*

Микроклональное черенкование пробирочных растений картофеля осуществляется с использованием следующего оборудования (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования):

- Ламинар бокс «Ламинар С – 1,5» (Ламинарные системы);
- Весы аналитические (Pioneer PA 512; ЗАО «СОРТОГОСМ» ЛВ – 120 А; METLER);
- Дистиллятор АЭ-25 МО («Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»)
- Аквадистиллятор LISTON A 1210 (ООО «Листон»);
- Иономер Эксперт -001-1 (НПП Эконикс – Экспер);
- Стерилизатор паровой ВК-75-01 (АО «Тюменский завод медицинского оборудования и ин-

струментов»);

- Шкаф сушильный ШС 80-01(ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»);
- Флакон-диспенсор ВЮНИТ Prospenser 50 мл;
- Вошер «Stat Fax 2600» (Stat Fax);
- Вальцовый пресс (Поллене);
- Фотометр лабораторный Stat Fax 4300 (Stat Fax);
- Термостат (ТВЗ-25);
- Персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом ChroMate Manager;
- Комплект общелабораторного оборудования и посуды: колбы стеклянные, стаканы химические стеклянные, пробирки стеклянные биологические, холодильники и др.

Хранение и браковка пробирочных растений коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» состоит из ряда последовательных операций:

- браковка по визуальной оценке растений картофеля в культуре *in vitro*;
- браковка по результатам диагностики методами ИФА и ПЦР;
- микрклональное черенкование растений картофеля в культуре *in vitro* на искусственной питательной среде через 18-20 дней.

#### *Браковка по визуальной оценке растений картофеля в культуре in vitro*

1) Микрорастения, предназначенные для клонового микроразмножения в культуре *in vitro*, должны быть зеленой окраски с хорошо развитой корневой системой и листовым аппаратом, с числом междоузлий не менее четырех (ГОСТ 3 53136-2008). Перед проведением микрклонального черенкования осматриваются все растения поддерживаемых в коллекции образцов. Не допускается использование нетипичных для сорта растений, а так же слабо развитых (отстающих в росте, имеющих несколько стеблей, мелкие листочки, с искривленным стеблем) или пересохших.

#### *Браковка по результатам диагностики методами ИФА и ПЦР*

2) Пробирочные растения диагностируют на наличие патогенов в скрытой форме методом ИФА 1 раз в 4 месяца, методом ПЦР 1 раз в год, по результатам анализа образцы, имеющие положительную реакцию на патогены, выбраковываются.

*Микрклональное черенкование растений картофеля в культуре in vitro на искусственной питательной среде через 18-20 дней*

3) Приготавливают питательную среду. Для этого используют лабораторную посуду (колбы, химические стаканы) и биологические пробирки, предварительно тщательно промытые и прожаренные в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре + 200 °С. При микрклональном черенковании картофеля применяют питательную среду для выращивания

растений модификации КемНИИСХ (с минеральной основой по Мурасиге-Скуга). В качестве основных ингредиентов питательных сред используют макро- и микросоли, витамины, органические вещества, регуляторы роста. Дистиллированную воду стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при давлении пара в камере 2 Атм.

4) На аналитических весах с точностью 0,1 г в коническую колбу берут навеску агар-агара, затем заливают стерилизованной холодной водой и помещают на водяную баню до полного растворения.

5) На аналитических весах с точностью 0,0001 г берут навески реактивов входящих в состав питательной среды. Отдельно в колбы объемом 250 мл количественно переносят навески солей, которые могут при растворении с другими компонентами выпасть в осадок, оставшиеся в общую колбу объемом 2000 мл. Навески растворяют в стерилизованной холодной воде, смешивают. Замеряют рН полученного раствора, доводя до оптимального значения для роста меристем – 5,7. В бутылки для флакон-диспенсора (объемом 2000 мл) смешивают солевой раствор с раствором агар-агара и доводят горячей стерилизованной водой до метки. Флакон-диспенсором разливают питательную среду по 10 мл в стеклянные биологические пробирки. Пробирки с питательной средой закрывают ватно-марлевыми пробками, устанавливают в медицинские боксы и стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при давлении пара в камере 2 Атм. После чего стерильную питательную среду переносят в бокс.

6) Проводят микроклональное черенкование растений картофеля в культуре *in vitro* на искусственной питательной среде в стерилизованном с помощью ртутно-кварцевых или бактерицидных ламп микробиологическом боксе. Перед началом работы рабочее место (стол, бинокулярный микроскопом) и штативы для пробирок протирают 96 %-ным этиловым спиртом. Инструменты, используемые для микроклонального черенкования (пинцеты, металлические ножницы), стерилизуют перед каждым растением, погружая в 96 %-ный этиловый спирт с последующим обжигом. Микрорастения предназначенные для клонального микроразмножения должны быть зеленой окраски с хорошо развитой корневой системой и листовым аппаратом, с числом междоузлий не менее четырех. Не допускается использование растений нетипичных для сорта, слаборазвитых, ветвистых, пересохших.

7) Растения картофеля, образовавшие 5-6 листочков, осторожно пинцетом извлекают из пробирки и ножницами разрезают на черенки включающие часть стебля с одним листочком, которые складывают в простерилизованные чашки Петри. Черенки сажают в пробирки с питательной средой на глубину междоузлия (3-5 мм). Пробирки с посаженными растениями ставят в штативы, предварительно промаркировав, и помещают в специальное помещение с постоянным световым и влаготемпературным режимами. Температуру необходимо поддерживать 20-24<sup>0</sup>С, освещенность 8 ± 2 тыс. люкс, фотопериод 16 часов, влажность 70 %.

## Стандартная операционная процедура «Микроклональное черенкование пробирочных растений картофеля»

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Рябцева Т.В., канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., Ходаева В.П., науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол черенкования пробирочных растений картофеля

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Микроклональное черенкование пробирочных растений картофеля» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

### *Перечень необходимого оборудования*

Микроклональное черенкование пробирочных растений осуществляется с использованием следующего оборудования (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования):

- Ламинар бокс «Ламинар С – 1,5» (Ламинарные системы);
- Весы аналитические (Pioneer PA 512; ЗАО «СОРТОГОСМ» ЛВ – 120 А; METLER);
- Дистиллятор АЭ-25 МО («Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»);
- Аквадистиллятор LISTON A 1210 (ООО «Листон»);

- Ионномер Эксперт -001-1 (НПП Эконикс – Экспер);
- Стерилизатор паровой ВК-75-01 (АО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»);
- Шкаф сушильный ШС 80-01(ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»);
- Флакон-диспенсор ВЮНИТ Prospenser 50 мл;
- Комплект общелабораторного оборудования и посуды: колбы стеклянные, стаканы химические стеклянные, пробирки стеклянные биологические, холодильники и др.

Микроклональное черенкование пробирочных растений в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» осуществляется следующим образом и состоит из ряда последовательных операций:

- приготовление питательной среды;
- микроклональное черенкование растений картофеля в культуре *in vitro* на искусственной питательной среде.

#### *Приготовление питательной среды*

1) Для приготовления питательной среды используют лабораторную посуду (колбы, химические стаканы) и биологические пробирки, предварительно тщательно промытые и прожаренные в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре + 200 °С. При микроклональном черенковании картофеля применяют питательную среду для выращивания растений модификации КемНИИСХ (с минеральной основой по Мурасиге-Скуга). В качестве основных ингредиентов питательных сред используют макро- и микросоли, витамины, органические вещества, регуляторы роста. Дистиллированную воду стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при давлении пара в камере 2 Атм.

2) На аналитических весах с точностью 0,1 г в коническую колбу берут навеску агар-агара, затем заливают стерилизованной холодной водой и помещают на водяную баню до полного растворения.

3) На аналитических весах с точностью 0,0001 г берут навески реактивов входящих в состав питательной среды. Отдельно в колбы объемом 250 мл количественно переносят навески солей, которые могут при растворении с другими компонентами выпасть в осадок, оставшиеся в общую колбу объемом 2000 мл. Навески растворяют в стерилизованной холодной воде, смешивают. Замеряют рН полученного раствора, доводя до оптимального значения для роста меристем – 5,7. В бутылки для флакон-диспенсора (объемом 2000 мл) смешивают солевой раствор с раствором агар-агара и доводят горячей стерилизованной водой до метки. Флакон-диспенсором разливают питательную среду по 10 мл в стеклянные биологические пробирки. Пробирки с питательной средой закрывают ватно-марлевыми пробками, устанавливают в медицинские боксы и стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при давлении

пара в камере 2 Атм. После чего стерильную питательную среду переносят в бокс.

*Микроклональное черенкование растений картофеля в культуре in vitro на искусственной питательной среде*

4) Микроклональное черенкование растений картофеля проводят в стерилизованном с помощью ртутно-кварцевых или бактерицидных ламп микробиологическом боксе. Перед началом работы рабочее место (стол, бинокулярный микроскопом) и штативы для пробирок протирают 96 %-ным этиловым спиртом. Инструменты, используемые для микроклонального черенкования (пинцеты, металлические ножницы), стерилизуют перед каждым растением, погружая в 96 %-ный этиловый спирт с последующим обжигом. Микрорастения предназначенные для клонального микроразмножения должны быть зеленой окраски с хорошо развитой корневой системой и листовым аппаратом, с числом междоузлий не менее четырех. Не допускается использование растений нетипичных для сорта, слаборазвитых, ветвистых, пересохших.

5) Растения картофеля, образовавшие 5-6 листочков, осторожно пинцетом извлекают из пробирки и ножницами разрезают на черенки включающие часть стебля с одним листочком, которые складывают в простерилизованные чашки Петри. Черенки сажают в пробирки с питательной средой на глубину междоузлия (3-5 мм). Пробирки с посаженными растениями ставят в штативы, предварительно промаркировав, и помещают в специальное помещение с постоянным световым и влаготемпературным режимами. Температуру необходимо поддерживать 20-24<sup>0</sup>С, освещенность 8 ± 2 тыс. люкс, фотопериод 16 часов, влажность 70 %.

**Стандартная операционная процедура**  
**«Хранение исходного клубневого материала картофеля, полученного из пробирочных растений»**

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Ходаева В.П., науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол хранения исходного клубневого материала картофеля, полученного из пробирочных растений

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Хранение исходного клубневого материала картофеля, полученного из пробирочных растений» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые при хранении исходного клубневого материала картофеля, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

*Перечень необходимого оборудования*

Хранение клубневой коллекции, полученной из полевого материала, осуществляется с использованием следующего оборудования:

- кондиционер;
- термометры;
- овощные контейнеры.

Хранение клубневой коллекции, полученной из полевого материала в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» осуществляется следующим образом:

- 1) Каждый образец из коллекции картофеля складывают отдельно в контейнер, мар-

кируют и помещают в специальное хранилище, оборудованное системой контроля за температурой. Хранилище предварительно обеззараживают от вредителей, болезней (побелка раствором извести с добавлением медного купороса).

2) Ежедневно осуществляется контроль за хранением картофеля:

- визуально осматриваются контейнеры с образцами;
- температурный режим в основной период хранения поддерживается  $+2...+3^{\circ}\text{C}$  с помощью кондиционера работающего в двух режимах (охлаждение, нагрев).



## **Стандартная операционная процедура «Клубневой анализ и браковка образцов картофеля в период хранения»**

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Гантамирова А.Н., науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол клубневого анализа и браковки образцов картофеля в период хранения

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Клубневой анализ и браковка образцов картофеля в период хранения» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Клубневой анализ и браковка в период хранения в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» коллекционных образцов проводят в следующей последовательности:

- определение наличия клубней других сортов;
- определение клубней с внешними признаками поражения болезнями и повреждениями во время хранения;
- описание ростков.

### *Определение наличия клубней других сортов*

1) Наличие клубней других ботанических сортов определяют визуально по форме и окраске клубня, глубине залегания и цвету глазков и сразу выбраковывают из общей массы.

*Определение клубней с внешними признаками поражения болезнями, повреждениями и дефектами после уборки*

2) При визуальной оценке клубней картофеля учитывают степень поражения болезнями (парша обыкновенная, ризоктониоз, фитофтороз) и вредителями (проволочник, совка,

мышы), дефекты клубней (неправильная форма, ростовые трещины, наросты). При учете болезней клубней картофеля определяют вид заболевания и степень поражения по 9-ти бальной шкале устойчивости.

Парша обыкновенная (*Steptomysca scabies* (Thaxt) Waksman et Henrici) поражение клубней картофеля.

- 9 – очень высокая устойчивость – поражение клубней паршой отсутствует;
- 8 – высокая устойчивость – единичные язвы парши на отдельных клубнях (не более 5 % клубней в образце);
- 7 – относительно высокая устойчивость – единичные язвы парши на небольшом количестве клубней (не более 10 % клубней);
- 5 – средняя устойчивость – площадь поражения язвами парши составляет от 10 до 25 % поверхности большинства клубней в образце;
- 3 – низкая устойчивость – площадь поражения составляет от 25 до 50 % поверхности большинства клубней в образце;
- 1 – очень низкая устойчивость – язвы парши составляют более 50 % поверхности большинства клубней.

Ризоктониоз (*Rhizoktonia solani* Kuhn) поражение клубней картофеля.

- 9 – очень высокая устойчивость – склерозии отсутствуют;
- 7 – высокая устойчивость – единичные склерозии занимают не более 1 % на отдельных клубнях;
- 5 – средняя устойчивость – склерозии занимают до 5 % поверхности большинства клубней;
- 3 – низкая устойчивость – площадь поражения составляет от 5 до 10 % поверхности большинства клубней;
- 1 – очень низкая устойчивость – склерозии занимают более 15 % поверхности большинства клубней.

Фитофтороз (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) учитывают по проценту пораженных клубней этим заболеванием. Учет проводят сразу после уборки и через два месяца после уборки.

- 9 – высокая устойчивость – симптомы поражения отсутствуют;
- 5 – средняя устойчивость – поражено менее 3 % клубней;
- 3 – низкая устойчивость – наличие пораженных клубней более 3 %.

Дефекты клубней (поверхность клубня).

- 9 – гладкая;
- 5 – единичные наросты, угловатая;
- 1 – уродливая.

3) Поражение физиологическими трещинами определяют в процентах к общему количеству клубней. После хранения все клубни каждого образца просматривают, отбраковывают больные и поврежденные, отмечают вид болезни (фомоз, фитофтороз, сухая гниль) и число больных клубней.

*Описание ростков*

4) После хранения все клубни каждого образца просматривают, отмечают характер и степень прорастания и расположения ростков (верхушечное или по всему клубню), длину их в сантиметрах или отсутствие ростков. Также, определяют окраска теневых ростков (красные, синие и т. д.) и её распределение по ростку (основание, листочки и т.д.).

**Стандартная операционная процедура**  
**«ИФА-диагностика растений регенерантов и растений *in vitro* при микроклональным**  
**размножении картофеля на вирусные и бактериальные болезни»**

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Рябцева Т.В., канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол ИФА-диагностики растений регенерантов и растений *in vitro* при микроклональным размножении картофеля на вирусные и бактериальные болезни

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «ИФА-диагностика растений регенерантов и растений *in vitro* при микроклональным размножении картофеля на вирусные и бактериальные болезни» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

*Перечень необходимого оборудования*

ИФА диагностика на вирусные и бактериальные болезни осуществляется с использованием следующего оборудования (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования):

- Вошер «Stat Fax 2600» (Stat Fax);
- Весы аналитические (Pioneer PA 512; ЗАО «СОРТОГОСМ» ЛВ – 120 А; METLER);

- Вальцовый пресс (Поллене);
- Фотометр лабораторный Stat Fax 4300 (Stat Fax);
- Термостат (ТВЗ-25);
- Дистиллятор АЭ-25 МО («Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»);
- Иономер Эксперт -001-1 (НПП Эконикс – Экспер);
- Персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом ChroMate Manager;
- Комплект общелабораторного оборудования: наборы пипеток, холодильники и др;
- При приготовлении растворов необходимо пользоваться дистиллированной водой и промаркированной мерной посудой для каждого специфического раствора (антитела X, S, M, A; Y; L; КГ; ЧН), (конъюгаты X, S, M, A; Y; L; ЧН; КГ). Для растворения субстрата и приготовления субстратного буфера нужна темная посуда.

ИФА-диагностика растений регенерантов и растений *in vitro* при микроклональным размножении картофеля на вирусные и бактериальные болезни в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» осуществляется следующим образом.

Для получения достоверных результатов зараженности растений из верхушечных меристем необходимо провести не менее чем трехкратную их проверку в процессе микрочеренкования. Первую проверку проводят во время черенкования первого растения-регенеранта с 5-6 листочками, полученного из верхушечной меристемы. Верхушку высаживают в пробирку, а остальную часть растения используют для получения сока. Линии, полученные при черенковании здоровых растений-регенерантов тестируют повторно. При микроклональном черенковании растений *in vitro* проводят двух-, трехкратное тестирование.

Проведение ИФА диагностики состоит из ряда последовательных операций:

- приготовление покровного буфера «А» и полистироловых планшетов;
- приготовление буфера «В»;
- приготовление буфера «С» для проб и конъюгатов и образцов;
- приготовление и нанесение конъюгатов;
- подготовка и нанесение субстрата;
- оценка результатов.

*Приготовление покровного буфера «А» и полистироловых плат*

1) Покровный буфер «А» применяется для разведения антител. На аналитических весах (точность 0,01 г) взять навески солей:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 1,59 г,  $\text{NaHCO}_3$  - 2,93 г. Растворить в дистиллированной воде, довести объем до 1000 мл в мерной колбе, замерить рН - 9,6.

2) Приготовить рабочий раствор антител и подготовить планшеты. На полистироловом планшете поставить дату проведения анализа, название вируса и порядковый номер (н-р: 16. 02. 04. № 1. S, X, M, Y, A, L, ЧН, КГ). Рабочий раствор антител получают разведением 100 мкл концентрированного раствора антител в 10 мл покровного буфера, данное количество достаточно для 100 анализов. Для другого количества анализов объемы пересчитывают соответствующим образом. Рабочий раствор антител хранят не более 7 дней при температуре +4 °С.

3) Восьмиканальной пипеткой точно по 110 мкл внести рабочий раствор антител в лунки планшета. Накрыть планшет пленкой, крышкой, обернуть фольгой типа «Саянская» и инкубировать 12 часов в холодильнике при температуре +4 °С или 2 часа в термостате при температуре +37 °С.

4) Промыть полистироловые планшеты. Промывку планшетов проводят одним из приемлемых способов:

*1-й способ.* Резким движением руки вытряхнуть содержимое лунок плат и хорошо промыть с помощью машины «Washer» для промывки плат.

*2-й способ.* Вытряхнуть содержимое лунок, прополоскать под струей проточной воды, дважды промыть в емкостях с раствором из расчета 20 мкл детергента ТВИН-20 на 1 л дистиллированной воды и затем в чистой дистиллированной воде. Легким поколачиванием планшета о чистую фильтровальную бумагу или льняную ткань удалить остатки воды из лунок. Просушить планшеты, уложив их вверх дном на чистую фильтровальную бумагу или ткань.

#### *Приготовление буфера «В»*

5) На аналитических весах (точность 0,1 г) взять навески солей: NaCl - 8 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2 г;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  - 2,9 г; KCl - 0,2 г. Навески объединить и растворить в мерной посуде, довести до объема 1000 мл, pH - 7,4; добавить 500 мкл детергента «TWEEN-20». Раствор готовится в двойном объеме. Один для промывки полистироловых плат, другой - для буфера «С».

#### *Приготовление буфера «С» для проб и конъюгатов и образцов*

6) Буфер «С» - для проб и конъюгатов готовить из буфера «В». В буфер «В» добавить бычий сывороточный альбумин из расчета 1,0 г на 250 мл буфера. Размешать до полного растворения. Раствор «С» использовать свежеприготовленным.

7) Приготовить образцы. Оставшуюся часть после черенкования растения-регенеранта поместить в пресс для получения сока, полученный сок собрать в полипропиленовые крышечки, из которых пипеткой отобрать аликвоту 100 мкл и количественно перенести в полипропиленовые пробирки объемом 1,5-2,0 мл с предварительно нанесенным

раствором «С» 1000 мкл. Для каждого образца использовать индивидуальный полипропиленовый наконечник.

8) Приготовить положительный контроль. Содержимое флакона с этикеткой «положительный контроль» растворить в 1 мл буфера «С». Внести по 100 мкл в лунку полистиролового планшета Н1.

9) Внести в лунки планшета положительный контроль в объеме 0,1 мл (100 мкл). В качестве отрицательного контроля использовать заведомо здоровый материал. Если нет в наличии отрицательного контроля, то внести 100 мкл буфера «С». Пробы наносить одноканальной пипеткой по 100 мкл. Для каждого образца использовать индивидуальный полипропиленовый наконечник.

10) Планшеты с нанесенными пробами закрыть пленкой, крышкой, обернуть фольгой и инкубировать 12 часов в холодильнике при температуре +4 °С либо 1 час в термостате при температуре +37 °С.

11) Промыть планшеты в соответствии с пунктом 4.

*Приготовление и нанесение конъюгатов*

12) Для приготовления конъюгатов использовать буфер «С». Для приготовления рабочего раствора взять 10 мкл концентрированного раствора конъюгата и смешать с 10 мл буфера «С». 10 мл конъюгата достаточно для 100 анализов (1 полистироловый планшет). Для другого количества анализов объемы увеличиваются соответствующим образом.

13) Внести конъюгат по 100 мкл в лунки планшета многоканальной пипеткой, настроенной на 100 мкл. Накрыть пленкой, обернуть фольгой, закрыть крышкой. Инкубировать 1 час при температуре +37 °С в термостате.

14) Промыть платы в соответствии с пунктом 4.

*Подготовка и нанесение субстрата*

15) Подготовить субстрат. Рассчитать количество субстрата из расчета 10 мл на 100 анализов (один полистироловый планшет). На аналитических весах (точность 0,01 г) взять навески компонентов буфера «Д»:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  - 9,16 г (100 мл субстрата); лимонная кислота - 2,53 г (100 мл субстрата). Навески растворить отдельно, затем смешать в колбе и замерить рН – 5,0.

16) На аналитических весах (точность 0,0001 г) взять навеску субстрата (ортофенилен-диамин) - 4 мг на 100 анализов, растворить в 5 мл воды.

17) Отмерить цилиндром 3 %-ный раствор перекиси водорода, из расчета 0,5 мл на 10 мл готового субстрата.

18) Субстрат и перекись водорода вносить в буфер «Д» непосредственно перед нанесением на планшеты. Для проверки рабочего раствора субстрата в чистый флакончик одноканальной пипеткой внести по 100 мкл буфера «Д» и перекиси водорода.

нальной пипеткой внести 100 мкл рабочего раствора конъюгата и добавить 100 мкл готового субстрата. Раствор должен приобрести ярко-оранжевую окраску.

19) Свежеприготовленный субстрат внести многоканальной пипеткой во все лунки планшета по 100 мкл. Инкубировать при комнатной температуре 5-10 мин (до появления окраски).

*Оценка результатов*

20) Оценку результатов ИФА провести с помощью фотометра при длине волны 450 нм и визуально. При визуальной оценке результатов анализа, дающей информацию «да» или «нет», применяют следующую шкалу: растение здорово - едва заметное окрашивание, как в отрицательном контроле; растение заражено – хорошо заметное окрашивание, отличное от отрицательного контроля.



## **Стандартная операционная процедура «Фенологический анализ вегетирующих растений картофеля»**

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Гантимурова А.Н., науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол фенологического анализа вегетирующих растений картофеля

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Фенологический анализ вегетирующих растений картофеля» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Фенологический анализ вегетирующих растений в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» проводится в полевых условиях путем визуального осмотра растений. В течение вегетационного периода учитывают фазы:

- начало всходов (10 % взошедших растений),
- массовые всходы (75 % взошедших растений),
- начало бутонизации (10 % растений с бутонами),
- полная бутонизация (75 % растений на делянке с бутонами)
- начало цветения (10 % растений на делянке зацвело),
- массовое цветение (75 % растений на делянке зацвело),
- ягодообразование (обильное – много ягод на растении, среднее – среднее количество ягод на растении, слабое – мало ягод на растении),
- отмирание ботвы.

Отмечают окраску венчика цветка. Сотрудник осматривает каждое растение на делянке и фиксирует результаты в журнал.

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Стандартная операционная процедура  
«Анализ растений картофеля по хозяйственно-ценным признакам»

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Гантимурова А.Н. науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол анализа растений картофеля по хозяйственно-ценным признакам

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Анализ растений картофеля по хозяйственно-ценным признакам» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые в полевых и лабораторных условиях, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

*Перечень необходимого оборудования*

Анализ растений по хозяйственно-ценным признакам осуществляется с использованием следующего оборудования:

- Весы аналитические;
- Штангенциркуль;
- Комплект общелабораторного оборудования: электрическая плита, холодильник и др.

Анализ растений по хозяйственно-ценным признакам в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» проводят в следующей последовательности:

- определение скороспелости образцов картофеля;
- определение устойчивости ботвы картофеля к болезням;

- определение продуктивности сортов и гибридов коллекции картофеля;
- определение устойчивости клубней картофеля к болезням;
- морфологические признаки клубней картофеля;
- определение сухого вещества и крахмала по удельному весу;
- определение кулинарных качеств клубней картофеля.

#### *Определение скороспелости образцов картофеля*

- 1) Скороспелость определяют на 60 день после посадки.
- 2) Выкапывают по 4 куста каждого образца картофеля в полиэтиленовые мешочки с отверстиями для вентиляции, каждый мешочек маркируют, в соответствии с номером делянки.
- 3) Затем мешочки собирают в корзины и грузят в телегу трактора или грузовой автомобиль и увозят с поля.
- 4) Клубни каждого образца разбирают на две фракции: не товарные (меньше 30 г), товарные (больше 30 г) и взвешивают на весах, данные заносят в полевой журнал.
- 5) Данные пересчитывают на один куст, определяют товарность, среднюю массу товарного клубня, количество клубней на один куст (товарных, не товарных, общее).

#### *Определение устойчивости ботвы картофеля к болезням*

6) Сотрудник внимательно осматривает каждое растение на делянке и данные осмотра заносит в полевой журнал. Степень поражения растения вирусными (обыкновенная, морщинистая, полосчатая мозаики, крапчатость, скручивание листьев) и грибными болезнями (фитофтороз (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary), ризоктониоз (*Rhizoktonia solani* Kuhn), фузариозное увядание (*Fusarium oxysporum*) и альтернариоз (*Alternaria solani* Sor)) в полевых условиях в период вегетации оценивают по 9-ти балльной шкале устойчивости:

9 – очень высокая устойчивость – симптомы поражения отсутствуют;

8 – высокая устойчивость – поражение может составлять от 1 до 10% поверхности листьев в виде единичных пятен на отдельных растениях;

7 – относительно высокая устойчивость – поражается от 10 до 25% поверхности листьев;

5 – средняя устойчивость – поражается от 25 до 50% поверхности листьев растений;

3 – низкая устойчивость – поражается более 50% площади листовой поверхности всех растений;

1 – очень низкая устойчивость – все листья и стебли растений полностью поразились.

#### *Определение продуктивности сортов и гибридов коллекции картофеля*

7) После уборки проводят учет продуктивности образцов картофеля. Клубни каждого образца разбирают на две фракции: не товарные (меньше 30 г), товарные (больше 30 г) и взвешивают на весах, данные записывают в полевой журнал.

8) Данные пересчитывают на один куст, определяют товарность, среднюю массу товарного клубня, количество клубней на один куст (товарных, не товарных и общее).

*Определение устойчивости клубней картофеля к болезням*

9) Клубни визуально оцениваются по степени поражения болезнями (парша обыкновенная, ризоктониоз, фитофтороз), дефектам клубней (неправильная форма, ростовые трещины, наросты). При учете болезней клубней картофеля определяют вид заболевания, и степень поражения.

Парша обыкновенная (*Steptomyscea scabies* (Thaxt) Waksman et Henrici).

9 - очень высокая устойчивость - поражение клубней паршой отсутствует;

8 - высокая устойчивость - единичные язвы парши на отдельных клубнях (не более 5% клубней в образце);

7 - относительно высокая устойчивость - единичные язвы парши на небольшом количестве клубней (не более 10% клубней);

5 - средняя устойчивость - площадь поражения язвами парши составляет от 10 до 25% поверхности большинства клубней в образце;

3 - низкая устойчивость - площадь поражения составляет от 25 до 50% поверхности большинства клубней в образце;

1 - очень низкая устойчивость - язвы парши составляют более 50% поверхности большинства клубней.

Ризоктониоз (*Rhizoktonia solani* Kuhn).

9 - очень высокая устойчивость - склероции отсутствуют;

7 - высокая устойчивость - единичные склероции занимают не более 1% на отдельных клубнях;

5 - средняя устойчивость - склероции занимают до 5 % поверхности большинства клубней;

3 - низкая устойчивость - площадь поражения составляет от 5 до 10 % поверхности большинства клубней;

1 - очень низкая устойчивость - склероции занимают более 15 % поверхности большинства клубней.

Фитофтороз (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) учитывают по проценту пораженных клубней этим заболеванием. Учет проводится дважды: сразу после уборки и через два месяца.

9 – высокая устойчивость – симптомы поражения отсутствуют;

5 – средняя устойчивость – поражено менее 3 % клубней;

3 – низкая устойчивость – наличие пораженных клубней более 3 %.

Дефекты клубней. Поверхность клубня (балл):

- 9 – гладкая;
- 5 – единичные наросты, угловатая;
- 1 – уродливая.

10) Поражение физиологическими трещинами определяют в процентах от общего количеству клубней.

*Морфологические признаки клубней картофеля*

11) В картофелехранилище после учета урожайности отбирают пробы по 10 клубней разного размера в полиэтиленовые мешочки с отверстиями для вентиляции, каждый мешочек маркируют с номером образца.

12) Мешочки с отобранными образцами картофеля укладывают в корзины и автомобильным транспортом доставляют в лабораторию.

13) В лаборатории клубни тщательно моют, выкладывают на стеллажи и подсушивают.

14) Чистые сухие клубни измеряют штангенциркулем. Для определения коэффициента формы клубня измеряют его длину и ширину и вычисляют отношение первой величины ко второй. Форму клубня оценивают в баллах.

- 1 – коэффициент формы менее 1,09 – форма клубней округлая;
- 2 – коэффициент формы 1,10-1,29 – форма клубней округло-овальная;
- 3 – коэффициент формы 1,30-1,39 – форма клубней овальная;
- 4 – коэффициент формы 1,40-1,69 – форма клубней удлиненно-овальная;
- 5 – коэффициент формы 1,70-1,99 – форма клубней удлиненная;
- 6 – коэффициент формы 2,00 и более – форма клубней очень длинная.

15) Глубину залегания глазков определяют с помощью штангенциркуля и оценивают в баллах.

- 9 – очень глубокие – глубина глазков 2,0 мм и более;
- 7 – глубокие – глубина глазков 1,7-1,9 мм;
- 5 – средние – глубина глазков 1,4-1,6 мм;
- 3 – мелкие – глубина глазков 1,1-1,3 мм;
- 1 – очень мелкие – глубина глазков 1,0 мм и менее;

16) Количество глазков на клубне определяют простым подсчетом:

- 9 – менее 5 глазков;
- 8 – до 6 глазков;
- 6 – до 8 глазков;
- 5 – 8-9 глазков;
- 4 – 9 глазков;

- 3 – 11 глазков;
- 2 – 12 глазков;
- 1 – более 12 глазков;

17) Окраску кожуры клубня определяют визуально по цветовой шкале:

- 7 – красновато-коричневая;
- 6 – частично синяя;
- 5 – синяя;
- 4 – частично красная;
- 3 – красная;
- 2 – жёлтая;
- 1 – светло-бежевая.

18) Окраску основания глазков определяют визуально по цветовой шкале:

- 3 – красная;
- 2 – желтая;
- 1 – белая.

19) Окраску мякоти определяют визуально при разрезании клубня картофеля по цветовой шкале:

- 9 – частично-синяя;
- 8 – синяя;
- 7 – частично-красная;
- 6 – красная;
- 5 – тёмно-жёлтая;
- 4 – желтая синяя;
- 3 – светло-желтая;
- 2 – кремовая;
- 1 – белая.

20) Качество поверхности клубней оценивают визуально в баллах по следующей шкале:

- 9 – идеально ровная;
- 7 – гладкая и ровная;
- 5 – с незначительными (до 2 – 5 мм) углублениями и неровностями;
- 3 – с мелкими неровностями и ростовыми трещинами глубиной до 5 мм;
- 1 – с крупными наростами и ростовыми трещинами более 5 мм.

*Определение сухого вещества и крахмала по удельному весу*

21) Содержание сухого вещества и крахмала в клубнях определяют весовым методом (по удельной массе) путем расчета разницы массы клубней в воздухе и в воде. Выбирают из пробы три клубня разной величины: большой – массой примерно 100 г, средний – 60 г и маленький – 30 г, все клубни должны быть здоровые, без механических повреждений и не позеленевшие.

22) Чисто вымытые, обсушенные клубни взвешивают на аналитических весах с точностью 0,01 г в воздухе. Затем их укладывают в сетку, которую погружают в воду температурой 17-18<sup>0</sup> С и вновь взвешивают. Для удаления пузырьков воздуха сетку следует покачать.

23) Определение удельной массы клубней проводят по формуле:

$$Y = A / (A - B),$$

где, Y – удельная масса клубней;

A – масса клубней на воздухе, г;

B – масса клубней в воде, г.

Полученную удельную массу переводят в процентное содержание сухих веществ и крахмалистости согласно таблице определения содержания сухих веществ и крахмала в клубнях по их удельной массе методических указаний по технологии селекционного процесса картофеля [1]. Точность определения ± 1 %.

*Определение кулинарных качеств клубней картофеля*

24) Берут по 6 вымытых клубней из пробы, чистят.

25) Три очищенных клубня режут пополам от столонного следа к макушке и выкладывают для определения потемнения сырой мякоти за 24 часа, записывают дату и время выкладки и номер образца.

26) Через 24 часа отмечают потемнение сырой мякоти клубней в баллах по следующей шкале:

9 – не темнеет;

7 – слабое потемнение;

5 – умеренное потемнение;

3 – темнеет сильно по всей поверхности;

1 – темнеет очень сильно.

Данные записывают в ведомость.

27) Оставшиеся три очищенных клубня помещают в марлевый мешочек и опускают в кипящую воду, варят 20 минут. Затем сливают воду, выкладывают из мешочков вареный картофель и проводят дегустацию в соответствии с методикой определения столовых качеств картофеля [1]:

### Разваримость

9 – очень сильно разваривается;  
3 – слабо разваривается;  
1 – не разваривается.

### Мучнистость

9 – очень мучнистая, зернистая, иногда с блеском;  
7 – мучнистая, мелкозернистая;  
5 – умеренно мучнистая;  
3 – слабо мучнистая;  
1 – не мучнистая.

### Водянистость

1 – очень водянистая;  
3 – водянистая;  
5 – умеренно водянистая;  
7 – слабо водянистая;  
9 – не водянистая.

### Потемнение мякоти (через 20 мин и через 2 часа)

9 – не темнеет;  
7 – слабое потемнение;  
5 – умеренное потемнение;  
3 – темнеет сильно по всей поверхности;  
1 – темнеет очень сильно.

### Консистенция (плотность)

7 – мягкая;  
5 – умеренно плотная;  
3 – плотная;  
1 – волокнистая.

### Запах

9 – очень приятный;  
7 – приятный;  
5 – удовлетворительный;  
3 – неприятный;  
1 – очень неприятный.

### Вкус

1 – плохой (горький, неприятный);  
3 – невкусный, пресный;  
5 – удовлетворительный;  
7 – хороший;  
9 – отличный.

28) Дегустационную оценку проводят не менее 3 человек, все данные записывают в ведомость. После дегустации определяют средний показатель по каждому признаку.

При подготовке СОП «Анализ растений картофеля по хозяйственно-ценным признакам» использованы следующие литературные источники:

Симаков, Е.А. Методические указания по технологии селекционного процесса картофеля / Е.А. Симаков, Н.П. Складорова, И.М. Яшина. – М.: Редакция журнала «Достижения Науки и техники АПК», 2006. – 72 с.



**Стандартная операционная процедура**  
**«Мониторинг фенотипического соответствия образцов картофеля и прочистке от засорения»**

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Гантимурова А.Н. науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол мониторинга фенотипического состояния образцов картофеля и прочистке от засорения

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Мониторинг фенотипического соответствия образцов картофеля и прочистке от засорения» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые в полевых условиях, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Мониторинг фенотипического соответствия и прочистки от засорения в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» проводят для сохранения сортовой чистоты и оздоровления от болезней.

1) Первая фитосанитарная прочистка проводится при высоте растений 15-20 см, вторая – в фазу цветения и третья – перед скашиванием ботвы.

2) При проведении фитосортовых прочисток визуально осматривается каждое растение на делянке образца коллекции, и удаляются растения: не типичные для данного сорта или гибрида, имеющие признаки вирусных болезней (удаляют всё растение вместе с клубнями).

3) Выбракованные растения картофеля вместе с клубнями удаляются за пределы поля трактором, во избежание распространения инфекции.

## Стандартная операционная процедура

### «ИФА-диагностика клубневого материала картофеля на вирусные и бактериальные болезни»

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Рябцева Т.В., канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., Ходаева В.П. науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол ИФА-диагностики клубневого материала картофеля на вирусные и бактериальные болезни

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «ИФА-диагностика клубневого материала картофеля на вирусные и бактериальные болезни» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

#### *Перечень необходимого оборудования*

ИФА диагностика на вирусные и бактериальные болезни осуществляется с использованием следующего оборудования (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования):

- Вошер «Stat Fax 2600» (Stat Fax);
- Весы аналитические (Pioneer PA 512; ЗАО «СОРТОГОСМ» ЛВ – 120 А; METLER);
- Вальцовый пресс (Поллене);
- Фотометр лабораторный Stat Fax 4300 (Stat Fax);

- Термостат (ТВЗ-25);
- Дистиллятор АЭ-25 МО («Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»);
- Ионномер Эксперт -001-1 (НПП Эконикс – Экспер);
- Персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом Chromate Manager;
- Комплект общелабораторного оборудования: наборы пипеток, холодильники и др.;
- Специально оборудованное помещение для выращивания растений картофеля.

ИФА диагностика на вирусные и бактериальные болезни растений картофеля клубневого материала в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» осуществляется следующим образом:

- набор образцов картофеля;
- выращивание растений картофеля из индексов в лабораторных условиях;
- приготовление покровного буфера «А» и полистироловых планшетов;
- приготовление буфера «В»;
- приготовление буфера «С» для проб и конъюгатов и образцов;
- приготовление и нанесение конъюгатов;
- подготовка и нанесение субстрата;
- оценка результатов.

#### *Набор образцов картофеля*

1) Отбор клубней для анализа проводят в соответствии с ГОСТ Р 55329-2012. После окончания лечебного периода от партии клубней упакованной в ящики объёмом до 10 штук, отбирают 2 точечные пробы по 25 клубней в каждой и соединяют в объединенную пробу. Клубни отобранного образца помещают в пакет и маркируют. Автотранспортом доставляют в лабораторию.

#### *Выращивание растений картофеля из индексов в лабораторных условиях*

2) В лабораторных условиях клубни картофеля, отобранные для анализа моют, и помещают на стеллажи в темное место для проращивания при температуре + 15-18 °С и относительной влажности воздуха в пределах 75 %. Для поддержания влажности воздуха 2 раза в неделю клубни опрыскивают водой. Продолжительность периода проращивания составляет 40-45 дней.

3) Подготовку субстрата проводят за один день до посадки индексов. В качестве субстрата для выращивания индексов используют верховой торф с низкой степенью разложения и зольностью 11-20 %, рН 5,3-5,5 и вермикулит фракции 2-4 мм, в соотношении 3:1. Готовый

субстрат помещают в овощные контейнеры (размер контейнера 47 см х 38 см х 20 см) заполняя  $\frac{1}{4}$  объема.

4) В день посадки от каждого клубня картофеля ножом или ложечкой для взятия индексов вырезают глазки диаметром 2,5 см с мякотью и высаживают в торфяной субстрат, по одной объединенной пробе в контейнер так же промаркированный как проба. Сверху насыпают 1-2 см почвы таким образом, чтобы глазки имели хороший контакт с почвой. Контейнеры помещают на стеллажи в оборудованные помещения с оптимальным режимом для выращивания растений: температура воздуха 18-24<sup>0</sup>С, освещенность 3-5 тыс. люкс, светопериод 16 часов, влажность воздуха 85 %. После посадки почву увлажняют и укрывают пленкой, чтобы поддержать высокую влажность в течение первых 3-5 дней (сухая почва задерживает прорастание глазков), затем растения поливают два раза в неделю. При соблюдении технологии растения развиваются в течение 3-4 недель. Растения для анализа должны быть с полностью развитыми и развернутыми листьями.

5) В день проведения анализа растения срезают ножницами, стерилизуя после каждого 96-ти % этиловым спиртом, и помещают в кармашки планшетов изготовленных из полиэтилена, предварительно на каждом планшете подписывается название образца картофеля. Растительные образцы картофеля переносят в лабораторию диагностики.

6) При приготовлении растворов необходимо пользоваться дистиллированной водой и промаркированной мерной посудой для каждого специфического раствора (антитела X, S, M, A; Y; L; КГ; ЧН), (конъюгаты X, S, M, A; Y; L; ЧН; КГ). Для растворения субстрата и приготовления субстратного буфера нужна темная посуда.

*Приготовление покровного буфера «А» и полистироловых плат*

7) Покровный буфер «А» применяется для разведения антител. На аналитических весах (точность 0,01 г) взять навески солей: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 1,59 г, NaHCO<sub>3</sub> - 2,93 г. Растворить в дистиллированной воде, довести объем до 1000 мл в мерной колбе, измерить рН - 9,6.

8) Приготавливают рабочий раствор антител и подготавливают планшеты. На полистироловом планшете ставят дату проведения анализа, название вируса и порядковый номер (н-р: 16. 02. 04. № 1. S, X, M, Y, A, L, ЧН, КГ).

9) Рабочий раствор антител получают разведением 100 мкл концентрированного раствора антител в 10 мл покровного буфера, данное количество достаточно для 100 анализов. Для другого количества анализов объемы пересчитывают соответствующим образом. Рабочий раствор антител хранят не более 7 дней при температуре +4 °С.

10) Внести восьмиканальной пипеткой точно по 110 мкл рабочего раствора антител в лунки планшета. Накрывать планшет пленкой, крышкой, обернуть фольгой типа «Саянская» и

инкубировать ночь в холодильнике при температуре +4 °С или 2 часа в термостате при температуре +37 °С.

11) Промыть полистироловые планшеты. Промывку плат проводить одним из приемлемых способов:

*1-й способ.* Резким движением руки вытряхнуть содержимое лунок плат и хорошо промыть с помощью машины «Washer» для промывки плат.

*2-й способ.* Вытряхнуть содержимое лунок, прополоскать под струей проточной воды, дважды промыть в емкостях с раствором из расчета 20 мкл детергента ТВИН-20 на 1 л дистиллированной воды и затем в чистой дистиллированной воде. Легким поколачиванием планшета о чистую фильтровальную бумагу или льняную ткань удалить остатки воды из лунок. Просушить планшеты, уложив их вверх дном на чистую фильтровальную бумагу или ткань.

#### *Приготовление буфера «В»*

12) На аналитических весах (точность 0,1 г) взять навески солей: NaCl - 8 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2 г;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  - 2,9 г; KCl - 0,2 г. Навески объединить и растворить в мерной посуде, довести до объема 1000 мл, pH - 7,4; добавить 500 мкл детергента «TWEEN-20». Раствор готовится в двойном объеме. Один для промывки полистироловых плат, другой - для буфера «С».

#### *Приготовление буфера «С» для проб и конъюгатов и образцов*

13) Буфер «С» - для проб и конъюгатов готовить из буфера «В». В буфер «В» добавить бычий сывороточный альбумин из расчета 1,0 г на 250 мл буфера. Размешать до полного растворения. Раствор «С» использовать свежеприготовленным.

14) Листовые образцы растений картофеля помещают в пресс для получения сока, полученный сок собирают в полипропиленовые крышечки, из которых пипеткой отбирают аликвоту 100 мкл и количественно переносят в полипропиленовые пробирки объемом 1,5-2,0 мл с предварительно нанесенным раствором «С» 1000 мкл. Для каждого образца используется индивидуальный полипропиленовый наконечник.

15) Приготовить положительный контроль. Содержимое флакона с этикеткой «положительный контроль» растворить в 1 мл буфера «С». Вносить по 100 мкл в лунку полистиролового планшета Н1.

16) Внести в лунки планшета положительный контроль в объеме 0,1 мл (100 мкл). В качестве отрицательного контроля использовать заведомо здоровый материал. Если нет в наличии отрицательного контроля, то внести 100 мкл буфера «С». Пробы наносить одноканальной пипеткой по 100 мкл. Для каждого образца используется индивидуальный полипропиленовый наконечник.

Планшеты с нанесенными пробами закрыть пленкой, крышкой, обернуть фольгой и инкубировать 12 часов в холодильнике при температуре +4°C либо 1 час в термостате при температуре +37 °C.

17) Промыть планшеты в соответствии с пунктом 11.

*Приготовление и нанесение конъюгатов*

18) Для приготовления конъюгатов используют буфер «С». Для приготовления рабочего раствора берется 10 мкл концентрированного раствора конъюгата и смешивается с 10 мл буфера «С». 10 мл конъюгата достаточно для 100 анализов (1 полистироловый планшет). Для другого количества анализов объемы увеличиваются соответствующим образом.

19) Конъюгат вносится по 100 мкл в лунки планшета многоканальной пипеткой, настроенной на 100 мкл. Накрыть пленкой, обернуть фольгой, закрыть крышкой. Инкубировать 1 час при температуре +37 °C в термостате.

20) Промыть платы в соответствии с пунктом 11.

*Подготовка и нанесение субстрата*

20) Рассчитать количество субстрата из расчета 10 мл на 100 анализов (один полистироловый планшет). На аналитических весах (точность 0,01 г) взять навески компонентов буфера «Д»:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  - 9,16 г (100 мл субстрата); лимонная кислота - 2,53 г (100 мл субстрата). Навески растворить отдельно, затем смешать в колбе и замерить pH – 5,0.

21) На аналитических весах (точность 0,0001 г) взять навеску субстрата (ортофенилен-диамин) - 4 мг на 100 анализов, растворить в 5 мл воды.

22) Отмерить цилиндром 3 %-ный раствор перекиси водорода, из расчета 0,5 мл на 10 мл готового субстрата.

23) Субстрат и перекись водорода вносят в буфер «Д» непосредственно перед нанесением на планшеты. Для проверки рабочего раствора субстрата в чистый флакончик одноканальной пипеткой внести 100 мкл рабочего раствора конъюгата и добавить 100 мкл готового субстрата. Раствор должен приобрести ярко-оранжевую окраску.

24) Свежеприготовленный субстрат вносят многоканальной пипеткой во все лунки планшета по 100 мкл. Инкубировать при комнатной температуре 5-10 мин (до появления окраски).

*Оценка результатов*

25) Оценку результатов ИФА проводят с помощью фотометра при длине волны 450 нм и визуально. При визуальной оценке результатов анализа, дающей информацию «да» или «нет», применяют следующую шкалу: растение здорово - едва заметное окрашивание, как в отрицательном контроле; растение заражено – хорошо заметное окрашивание, отличное от отрицательного контроля.

**Стандартная операционная процедура**  
**«ИФА-диагностика вегетирующих растений картофеля на вирусные и бактериальные**  
**болезни»**

Составлено: Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Рябцева Т.В., канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол ИФА-диагностики вегетирующих растений картофеля на вирусные и бактериальные болезни

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «ИФА-диагностика вегетирующих растений картофеля на вирусные и бактериальные болезни» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

*Перечень необходимого оборудования*

ИФА диагностика на вирусные и бактериальные болезни осуществляется с использованием следующего оборудования (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования):

- Вошер «Stat Fax 2600» (Stat Fax);
- Весы аналитические (Pioneer PA 512; ЗАО «СОРТОГОСМ» ЛВ – 120 А; METLER);
- Вальцовый пресс (Поллене);

- Фотометр лабораторный Stat Fax 4300 (Stat Fax);
- Термостат (ТВЗ-25);
- Дистиллятор АЭ-25 МО («Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов»);
- Ионномер Эксперт -001-1 (НПП Эконикс – Эксперт);
- Персональный компьютер, работающий под управлением Windows XP с установленным программным пакетом ChromaMate Manager;
- Комплект общелабораторного оборудования: наборы пипеток, холодильники и др.

ИФА диагностика на вирусные и бактериальные болезни растений картофеля вегетирующих растений в коллекции «Сорта и гибриды картофеля, селекционные исследования» осуществляется следующим образом:

- отбор образцов вегетирующих растений картофеля в полевых условиях;
- приготовление покровного буфера «А» и полистироловых планшетов;
- приготовление буфера «В»;
- приготовление буфера «С» для проб и конъюгатов и образцов;
- приготовление и нанесение конъюгатов;
- подготовка и нанесение субстрата;
- оценка результатов.

*Отбор образцов вегетирующих растений картофеля в полевых условиях*

1) В сухую погоду с растений картофеля находящихся в полевых условиях отбирают образцы листьев с верхнего, среднего и нижнего яруса и складывают в кармашки планшетов изготовленных из полиэтилена, предварительно на каждом планшете подписывается название образца картофеля. Образцы автотранспортом доставляются в лабораторию, анализ проводят в тот же день либо хранят в холодильнике при температуре +4 °С не более двух суток.

2) При приготовлении растворов необходимо пользоваться дистиллированной водой и промаркированной мерной посудой для каждого специфического раствора (антитела X, S, M, A; Y; L; КГ; ЧН), (конъюгаты X, S, M, A; Y; L; ЧН; КГ). Для растворения субстрата и приготовления субстратного буфера нужна темная посуда.

*Приготовление покровного буфера «А» и полистироловых плат*

3) Покровный буфер «А» применяется для разведения антител. На аналитических весах (точность 0,01 г) взять навески солей: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 1,59 г, NaHCO<sub>3</sub> - 2,93 г. Растворить в дистиллированной воде, довести объем до 1000 мл в мерной колбе, измерить рН - 9,6.



4) Приготовить рабочий раствор антител и подготовить планшеты. На полистироловом планшете поставить дату проведения анализа, название вируса и порядковый номер (н-р: 16. 02. 04. № 1. S, X, M, Y, A, L, ЧН, КГ).

5) Рабочий раствор антител получают разведением 100 мкл концентрированного раствора антител в 10 мл покровного буфера, данное количество достаточно для 100 анализов. Для другого количества анализов объемы пересчитывают соответствующим образом. Рабочий раствор антител хранят не более 7 дней при температуре +4 °С.

б) Внести восьмиканальной пипеткой точно по 110 мкл рабочего раствора антител в лунки планшета. Накрыть планшет пленкой, крышкой, обернуть фольгой типа «Саянская» и инкубировать ночь в холодильнике при температуре +4 °С или 2 часа в термостате при температуре +37 °С.

7) Промыть полистироловые планшеты. Промывку планшетов проводят одним из приемлемых способов:

*1-й способ.* Резким движением руки вытряхнуть содержимое лунок планшетов и хорошо промыть с помощью машины «Washer» для промывки планшетов.

*2-й способ.* Вытряхнуть содержимое лунок, прополоскать под струей проточной воды, дважды промыть в емкостях с раствором из расчета 20 мкл детергента ТВИН-20 на 1 л дистиллированной воды и затем в чистой дистиллированной воде. Легким поколачиванием планшета о чистую фильтровальную бумагу или льняную ткань удалить остатки воды из лунок. Просушить планшеты, уложив их вверх дном на чистую фильтровальную бумагу или ткань.

#### *Приготовление буфера «В»*

8) На аналитических весах (точность 0,1 г) взять навески солей: NaCl - 8 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2 г;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  - 2,9 г; KCl - 0,2 г. Навески объединить и растворить в мерной посуде, довести до объема 1000 мл, pH - 7,4; добавить 500 мкл детергента «TWEEN-20». Раствор готовится в двойном объеме. Один для промывки полистироловых плат, другой - для буфера «С».

#### *Приготовление буфера «С» для проб и конъюгатов и образцов*

9) Буфер «С» - для проб и конъюгатов готовить из буфера «В». В буфер «В» добавить бычий сывороточный альбумин из расчета 1,0 г на 250 мл буфера. Размешать до полного растворения. Раствор «С» использовать свежеприготовленным.

10) Приготовить образцы. Листовые образцы растений картофеля доставленные с поля помещают в пресс для получения сока, полученный сок собирают в полипропиленовые крышечки, из которых пипеткой отбирают аликвоту 100 мкл и количественно переносят в полипропиленовые пробирки объемом 1,5-2,0 мл с предварительно нанесенным рас-

твором «С» 1000 мкл. Для каждого образца используется индивидуальный полипропиленовый наконечник.

11) Приготовить положительный контроль. Содержимое флакона с этикеткой «положительный контроль» растворить в 1 мл буфера «С». Вносить по 100 мкл в лунку полистиролового планшета Н1.

12) Внести в лунки планшета положительный контроль в объеме 0,1 мл (100 мкл). В качестве отрицательного контроля использовать заведомо здоровый материал. Если нет в наличии отрицательного контроля, то внести 100 мкл буфера «С». Пробы наносить одноканальной пипеткой по 100 мкл. Для каждого образца используется индивидуальный полипропиленовый наконечник.

13) Планшеты с нанесенными пробами закрыть пленкой, крышкой, обернуть фольгой и инкубировать 12 часов в холодильнике при температуре +4°C либо 1 час в термостате при температуре +37 °C.

14) Промыть планшеты в соответствии с пунктом 7.

*Приготовление и нанесение конъюгатов*

15) Для приготовления конъюгатов используют буфер «С». Для приготовления рабочего раствора берется 10 мкл концентрированного раствора конъюгата и смешивается с 10 мл буфера «С». 10 мл конъюгата достаточно для 100 анализов (1 полистироловый планшет). Для другого количества анализов объемы увеличиваются соответствующим образом.

16) Конъюгат вносят по 100 мкл в лунки планшета многоканальной пипеткой, настроенной на 100 мкл. Накрывать пленкой, обернуть фольгой, закрыть крышкой. Инкубировать 1 час при температуре +37 °C в термостате.

17) Промыть планшеты в соответствии с пунктом 7.

*Подготовка и нанесение субстрата*

18) Подготовить субстрат. Рассчитать количество субстрата из расчета 10 мл на 100 анализов (один полистироловый планшет). На аналитических весах (точность 0,01 г) взять навески компонентов буфера «Д»:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  - 9,16 г (100 мл субстрата); лимонная кислота - 2,53 г (100 мл субстрата). Навески растворить отдельно, затем смешать в колбе и замерить рН – 5,0.

19) На аналитических весах (точность 0,0001 г) взять навеску субстрата (ортофенилен-диамин) - 4 мг на 100 анализов, растворить в 5 мл воды.

20) Отмерить цилиндром 3 %-ный раствор перекиси водорода, из расчета 0,5 мл на 10 мл готового субстрата.

21) Субстрат и перекись водорода вносят в буфер «Д» непосредственно перед нанесением на планшеты. Для проверки рабочего раствора субстрата в чистый флакончик одноканальной пипеткой внести 100 мкл рабочего раствора конъюгата и добавить 100 мкл готового субстрата. Раствор должен приобрести ярко-оранжевую окраску.

22) Свежеприготовленный субстрат вносят многоканальной пипеткой во все лунки планшета по 100 мкл. Инкубировать при комнатной температуре 5-10 мин (до появления окраски).

*Оценка результатов*

23) Оценку результатов ИФА проводят с помощью фотометра при длине волны 450 нм и визуально. При визуальной оценке результатов анализа, дающей информацию «да» или «нет», применяют следующую шкалу: растение здорово - едва заметное окрашивание, как в отрицательном контроле; растение заражено – хорошо заметное окрашивание, отличное от отрицательного контроля.

**Стандартная операционная процедура**  
**«Определение количественных характеристик опушения листьев растений для фенотипирования сортов и гибридов картофеля»**

Составлено: Ходаева В.П., науч. сотр., Куликова В.И., канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., Лапшинов Н.А., д-р с.-х. наук

Содержание и назначение: определяет протокол определения количественных характеристик опушения листьев растений для фенотипирования сортов и гибридов картофеля

Местонахождение: Кемеровский НИИСХ – филиал СФНЦА РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Определение количественных характеристик опушения листьев растений для фенотипирования сортов и гибридов картофеля» разработана с целью обеспечения качественного процесса поддержания и сохранения коллекции картофеля для ЦКП «Биоресурсная коллекция сельскохозяйственных растений Кемеровского НИИСХ – филиала СФНЦА РАН».

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с коллекциями картофеля.

Все работы, проводимые при определении количественных характеристик опушения листьев растений, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

*Перечень необходимого оборудования*

Определение количественных характеристик опушения листьев растений картофеля осуществляется с использованием следующего оборудования:

- персональный компьютер (ПК);
- оптический микроскоп (Zeiss Primo Star),
- цифровая камера (для микроскопа Zeiss Primo Star),
- липкая лента,
- покровные стекла,
- ножницы,

- сеть Интернет.

Определение количественных характеристик опушения листьев растений сортов и гибридов картофеля состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования «Стандартной операционной процедуры по определению количественных характеристик опушения листьев растений картофеля (морфология опушения листа) на основе анализа цифровых микроизображений их сгибов», разработанной в ИЦиГ СО РАН:

- пробоподготовка (в культуре *in vitro*, *in vivo*, питомниках мини-клубней и супер-суперэлиты);
- подготовка микропрепаратов сгиба листа;
- получение изображений;
- компьютерная обработка изображений.

*Пробоподготовка (в культуре in vitro, in vivo, питомниках мини-клубней и супер-суперэлиты)*

1) Отбор проб в культуре *in vitro* листьев пятого порядка, начиная с верхушки, вместе с черешком.

2) Отбор проб в культуре *in vivo* листьев пятого порядка, начиная с верхушки, вместе с черешком.

3) Отбор проб в период цветения картофеля в питомниках мини-клубней и супер-суперэлиты листьев пятого порядка 4-6 см в длину, начиная с верхушки, вместе с черешком в пятикратной повторности.

4) Образцы (черешки с листьями) опустить в воду для поддержания тургора.

5) Доставка образцов автотранспортом в лабораторию в течение не более 5 часов.

*Подготовка микропрепаратов сгиба листа*

6) Из листьев вырезать фрагменты, заключенные между жилок размером 10 x 20 мм по три для каждого листа.

7) Фрагмент согнуть пополам, анализируемой поверхностью листа наружу.

8) Зафиксировать фрагмент на предметном стекле липкой лентой с отступом от сгиба 2-3 мм.

*Получение изображений*

9) Образцы последовательно поместить под оптический микроскоп (с установленной на нём цифровой камерой) так, чтобы область листа (темная) располагалась справа, а область фона – слева.

10) Настроить интенсивность света микроскопа и экспозиции камеры для контрастности изображения границы сгиба и трихом.

11) Сделать цифровые микроизображения образцов размеры в пикселях 1300 x 1030 (размер одного пикселя 2,1 x 2,1 мкм) по два снимка каждого сгиба.

12) Обозначить файлы образцов на латинице.

*Компьютерная обработка изображений*

13) Компьютерной программой LHDetect2 доступной в web - сервисе (распознает на стандартном изображении вершины и основания трихом и измеряет их длину) автоматически проанализировать образцы.