

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ СЕЛЕКЦИОННО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР  
САДОВОДСТВА И ПИТОМНИКОВОДСТВА» (ФГБНУ ФНЦ Садоводства)



УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ ФНЦ Садоводства,  
академик РАН  
И.М. Куликов

*30 декабря 2022*

Стандартная операционная процедура по хранению растений в  
«Коллекции микрорастений плодовых и ягодных культур»

Москва - 2023

Хранение коллекций плодовых и ягодных культур с использованием метода клонального микроразмножения состоит из нескольких технологических этапов:

1. Введение – отбор образцов, выделение инициальных эксплантов и их изоляция.
2. Пролиферация – собственно микроразмножение растений, самый длительный этап, на котором можно поддерживать оздоровленные пролиферирующие культуры достаточно длительное время без контакта с внешней средой.
3. Элонгация – подготовка микрорастений к последующему укоренению.
4. Укоренения – укоренение микрочеренков.
5. Адаптация – адаптация микрорастений к нестерильным условиям.
6. Дорастивание – дорастивание адаптированных растений до необходимых размеров.

**1. Введение** – Отбор образцов, выделение инициальных эксплантов и их изоляция.

1.1 Отбор протестированных на наличие основных вредоносных вирусов и свободных от них образцов.

1.2 Обработка и подготовка образцов включает срезку почек, удаление кроющих чешуй, при необходимости обработку антиоксидантами, промывку водой для частичного удаления фенольных соединений в течение 30-40 мин.

1.3 Ступенчатая стерилизация: спиртом (1-2 мин), перекисью водорода 6% (3-5 мин) и 7%-ный раствором гипохлорита натрия (14-20 мин) или 5%-ным раствором лизоформина (или другие растворы на основе глутарового альдегида, 12-18 мин) эксплантов, с последующей промывкой стерильной дистиллированной водой 5-6 раз.

1.4 Вычленение инициальных эксплантов (апексы, мириستمатический купол с примордиями) при помощи микроскопа МБС – 10.

1.5 Посадка инициальных эксплантов на твердую агаризованную питательную среду (см п. 2.3 и п. 2.4) с добавлением 6-бензиламинопурина или регуляторов роста ряда дифенил-мочевины (тидиазурон, CPPU).

1.6 Размещение культивационных сосудов в светоконнате при освещенности 2000-2500 лк, температуре воздуха +20...+25<sup>0</sup>С.

1.7 Культивирование на протяжении 1-2 месяцев с выбраковкой инфицированных эксплантов и последующей пересадкой.

**2. Пролиферация** – собственно микроразмножение растений, самый длительный этап, на котором микрорастения поддерживаются достаточно длительное время без контакта с внешней средой.

2.1 Пересадка прижившихся мериклонов на свежую питательную среду после этапа введения, с обновлением среза в базальной части микрорастения.

2.2 Последующее культивирование включает несколько субкультивирований с выбором (подбором) необходимых питательных сред. В среднем в год осуществляется 6-8 субкультивирований. Для каждой культуры, а иногда и сорта подбирается оптимальная питательная среда (наиболее часто для ягодных культур используются среда Мурасиге-Скуга, для плодовых Кворина-Лепуавра). Для некоторых сортообразцов необходимо разбавлять минеральную часть или увеличивать концентрацию витаминов. Для всех образцов существуют оптимальные регуляторы роста с цитокининовой активностью (6-БАП, ТДЗ, CPPU, 2iP, кинетин и некоторые др.) и ауксиновой активностью и их оптимальные концентрации в среде, которые подбирают индивидуально.

2.3 Приготовление агаризованных питательных сред включает:

2.3.1 Смешивание необходимых макро-, микроэлементов, источников углерода, витаминов, регуляторов роста, агара.

2.3.2 Доведение pH до необходимого уровня (для ягодных 5,6-5,8, для плодовых 5,8-6,0).

2.3.3 Нагрев среды и плавление агара.

2.3.4 Разлив горячей питательной среды по сосудам (колбы, банки, пробирки различного объема).

2.3.5 Упаковка в подпергаментную бумагу и подготовка к последующей стерилизации.

2.3.6 Стерилизация при избыточном давлении (1,0-1,5 атм) и повышенной температуре (121...122<sup>0</sup>C) на протяжении 15-25 мин при помощи стерилизаторов паровых ВК 75, Tuttnauer 3870ELV.

2.3.7 Охлаждение стерильных питательных сред.

2.4 Подготовка рабочего места и расходных материалов.

2.4.1 Фильтровальная бумага и вата запаковываются в упаковочные материалы.

2.4.2 Стерилизация при избыточном давлении (1,5-2,0 атм) и повышенной температуре (126...128<sup>0</sup>C) на протяжении 60 мин при помощи стерилизаторов паровых ВК 75, Tuttnauer 3870ELV с последующим охлаждением.

2.4.3 Металлический инструмент (скальпели, пинцеты, препаровальные иглы, крючки и прочее) очищают от загрязнения, скальпели подтачивают, правятся или меняются лезвия. Непосредственно перед работой инструменты стерилизуются в сушильном шкафу при температуре 160-200<sup>0</sup>C на протяжении 90-120 мин. с последующим охлаждением.

2.4.4 Операционная перед работой обрабатывается хлорсодержащими моющими средствами и ультрафиолетовым облучением на протяжении 30-60 мин.

2.4.5 Рабочее место (ламинар-бокс) перед работой обрабатывается ультрафиолетом на протяжении 20-30 мин, затем каждые 1,5-2 часа работы обработку повторяют, все поверхности периодически протираются 96% этиловым спиртом (обработка хлорсодержащими моющими средствами не допускается).

2.4.6 Руки во время работы периодически обрабатываются 96% спиртом, по мере необходимости.

2.5 Во время работы культивируемые экспланты достают из сосуда на стерильную фильтровальную бумагу, где производится их деление на микрочеренки, удаление отмерших тканей при помощи пинцета и скальпеля.

2.6 Затем их помещают на свежую питательную среду, а культивационный сосуд закрывают стерильной термоусадочной (стрейч) пленкой. На поверхность культивационного сосуда наносят светостойким маркером или восковым карандашом надпись с обозначением сорта и клона, составом питательной среды и датой пересадки.

2.7 В последующем сосуды с микрорастениями ставятся на стеллажи в светокomнату с заданными условиями и культивируются при 2000-2500 лк, +20...24<sup>0</sup>C. Время краткосрочного хранения составляет от 3 недель до 6 месяцев (в зависимости от культуры и сорта, а также питательной среды). При длительном депонировании активность роста снижается при применении осмотически активных веществ (высокомолекулярные спирты), повышении концентрации источников углерода, добавлении различных регуляторов роста (абсцизовая или жасмоновая кислота) в питательные среды, а также культивируя при низких положительных температурах.

2.8 Процесс повторяется многократно, длительность поддержания образцов коллекции *in vitro* может составлять 10-15 лет и более.

2.9 После пересадки эксплантов загрязненную многоразовую стеклянную посуду тщательно моют, дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу при

температуре 140...160<sup>0</sup>С в течении 4-6 часов, после ее охлаждения убирают на хранение в сухое место и используют повторно.

**3. Элонгация** – этап, на котором проводится подготовка полученных эксплантов для последующего укоренения. Основная цель данного этапа – провести увеличение в длину микропобегов и снизить концентрацию цитокининов в их тканях.

3.1 На данном этапе проводятся все те же этапы, что и в разделе 2, отличие составляет в том, что снижается в разы концентрация регуляторов роста в среде или они полностью исключаются. Это позволяет увеличить выход микрочеренков, исключить витрификацию, уменьшить размер каллуса, улучшить в последующем ризогенез.

3.2 Также данный этап необходим при переводе микрорастений с одного регулятора роста на другой, поскольку часто имеет место антагонистический гербицидный эффект двух регуляторов роста. Также на данном этапе может отмечаться спонтанное укоренение земляники садовой и смородины черной, и их можно высаживать на адаптацию к нестерильным условиям минуя этап укоренения.

**4. Укоренение** – укоренение микрочеренков, является заключительным этапом микроразмножения растений.

4.1 На данном этапе проводятся те же операции, что и в разделе 2.3 и 2.4. Отличие состоит в том, что минеральная часть питательной среды разбавляется в 2 раза, а вместо цитокининов применяются только ауксины (ИМК, ИУК и др.) или среды без регуляторов роста.

4.2 После пересадки микрочеренки культивируют в светокорнате на протяжении 1-3 мес. до момента образования корней необходимой длины.

**5. Адаптация** – адаптация микрорастений к нестерильным условиям, этап, на котором производится подготовка растений к высадке в полевые условия. Кроме того, на этом этапе проводят апробацию, оценку на наличие уклоняющихся форм и тестирование на наличие основных вредоносных вирусов.

5.1 Готовят питательный субстрат.

5.1.1 Основу составляет раскисленный торф (рН 5,8-6,5) с добавлением минеральных питательных веществ 80-90% и добавлением речного песка 10-20%.

5.1.2 Субстрат стерилизуют в сушильном шкафу при 120...130<sup>0</sup>С в течении 4-5 часов, или автоклавированием в стерилизаторе паровом при 1,5-2 атм не менее 40-60 мин.

5.1.3 После охлаждения субстратом набиваются пластиковые контейнеры (0,25-0,9 л, в зависимости от культуры и размера или кассеты).

5.1.4 Субстрат уплотняется и проливается раствором марганцовокислого калия 1,0 г/л.

5.1.5 Затем в субстрат высаживаются микрорастения.

5.2 Укорененные микрорастения извлекают из сосуда, промывают водой, удаляют отмершие и пожелтевшие части растения (при наличии) и остатки питательной среды.

5.3 Микрорастения высаживаются в подготовленный субстрат по 1-2 шт. в контейнер или ячейку.

5.4 После этого контейнеры и кассеты выставляются на стеллажи в адаптационную комнату с искусственным освещением 3000-5000 лк, 16 ч фотопериод, температура +22...+26<sup>0</sup>С, влажностью воздуха 100% на 4-8 недель (в зависимости от культуры).

5.5 По прошествии определенного времени (2-8 недель, появление 3-6 новых листьев) влажность воздуха постепенно снижают, через 7-14 дней доводят до 60-70% и контейнеры с растениями переносят в теплицу.

5.6 В последующем, на протяжении 2-4 месяцев, растения поливают теплой водой, проводится их подкормка удобрениями, при необходимости – химическая обработка от патогенных организмов.

**6. Доращивание** – Доращивание адаптированных растений до необходимых размеров. На этом этапе также проводят апробацию, оценку на наличие уклоняющихся форм и тестирование на наличие основных вредоносных вирусов.

6.1 Растения в этот период поливают, при необходимости проводят подкормку удобрениями и химическую обработку от патогенных организмов.

6.2 После окончания вегетации растения помещают на низкую положительную температуру +2...+6<sup>0</sup>С для прохождения ими периода покоя и одревеснения, для семечковых 2,5-3 месяца, малина и смородина 1,5-2,5 месяца, земляники садовой 35-45 дней, других культур 2-3 мес.

6.3 После прохождения растениями периода покоя их высаживают в более крупные контейнеры (0,5-4 л) в специально подготовленный субстрат (5.1.1).

6.4 Полученные растения передаются в другие подразделения ФГБНУ ФНЦ Садоводства для их последующего изучения, использования в селекционном процессе, размножения или в производственные подразделения, а также при необходимости – в другие организации.

Процесс хранения генетических коллекций с использованием методов клонального микроразмножения проводится с использованием следующего основного оборудования:

ламинарные боксы LAMSYSTEMS: БАВнп-01-"Ламинар-С" и БМБ II-«Ламинар-С» (Россия) автоклавы: ВК-75-01 (Россия) и Tuttnauer 3870ELV-D (Израиль), спектрофотометр «ТКА-Спектр» (Россия), весы лабораторные (ВЛТК 500) и аналитические (Ohaus RV 214), дистиллятор (ДЭ 25), pH метры (Ohaus), микроскоп-бинокуляр (МБС 2 и 10), холодильники (бытовые и Liebherr FKv), компьютер.