**Стандартная операционная процедура**

**«Микроклональное размножение растений (черенкование)»**

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН – СибНИИРС

Пересмотр через: 1 год

|  |  |
| --- | --- |
| СибНИИРС-филиал ИЦиГ СОРАН | |
| СОП №2 от 17.10.2017 | Стандартная операционная процедура «Микроклональное размножение растений (черенкование)» |
| Цель СОП | Размножить исходные растения сорта до необходимого количества путем деления пробирочного растения на черенки (стебель с листом) |
| Разработчик | Мызгина Г.Х., Колошина К.А. |
| Рабочее место | Группа биотехнологии картофеля |
| Утверждено | ФАНО России. |
| Разработано на основании: | Методические рекомендации по микроклональному размножение растений картофеля в культуре *in vitro*. М., 1980, ВНИИКХ |

Таблица – СОП «Микроклональное размножение растений (черенкование)» (из расчёта 280 сортообразцов)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Описание операции | Время выпол-нения | Используемые материалы и приборы |
| 1  2  3  4  5  6  7  8  9 | Подготовка бокса: протирают внутреннюю поверхность ламинар-бокса 70% спиртом  Приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга для культивирования  черенков: на 1 л. маточного раствора  Приготовление макросолей: в емкость 1 л, добавляем отвешенные на техничес ких весах навески в мг. NH4NO3-1650, KNO3-1900, (CaCl2х2H2O-440 пред внесением нагревается до кипения), (MgSO4х2H2O-370 вносят последним без нагревания для предотвращения выпадения осадка), KH2PO4-170, -----  Приготовление микросолей: MnSO4х4H2O-22,3, CoCL2х6H2O-0,025, ZnSO4х7H2O-8,6, СuSO4х5H2O-0,025, Na2MoO4х2H2O-0,25, KI-0,83, (Fe2SO4х7H2O-557 – следует нагреть до кипения).  Добавление витаминов, гормонов. ростовых веществ: необходимые компонента, витамины. горморны, ростовые вещества: Трилон В-33,7-нагревать ло кипения), тиамин-0,1, пирилоксин-0,5, никотиновая кислота-0,5, мезо-инозит-100, глицерин2,0, ИУК-2,0, кинетин-2,0, сахароза-30,0. Полученные растворы сливают в банки с притертой крышками, этикируют и ставят в холодильник. Хелат железа хранить в темной склянке, берется 5 мл маточного р-ра. Концентрированные р-ры витаминов, каждого в отдельности хранть во флакончиках. Для приготовления растворов их берут пипеткой 1/10 часть р-ра и растворяем в 10 мл воды, в 1 мл этого раствора содержится порция витамина для 1 л среды.  Смешивание компонентов среды. Берут колбу 1 л помещают в нее 30 г сахарозы, доливают до половины емкости дистиллированной водой, нагревают. После растворения добавляют 50 мл маточного раствора макросолей, 1 мл микросолей, по 1 мл витаминов и доводят объем до 1 л дистиллированной водой.  Контроль за pH среды. Доводят pH среды до 5,5-5,6 раствором стерильной щелочи. В пробирку наливают щелочи из расчета на 1,0 ед. pH 0,3 мл и добавляют к среде.  Специфика добавления в среду компонентов. Растворы гормонов, ростовых веществ добавляют: ауксины (100 мг. растворяют в 0,5-2 мл спирта, подогревают на спиртовке, и добавляют дистиллированную воду до 100 мл, берут 2 мл, остужают, стерилизуют через фильтр «Милипор» 0,05 и выливают в среду, кинетин-растворяем 0,5 мг в 1 мл HCl добавляют дистиллированную воду до 100 мл, стерилизуем через фильтр «Милипор» и добавляют к среде 0,5 мл.  Стерилизация среды. Берут колбу емкостью 0,5 л, делают навеску 50 г агар-агара замачивают в воде, ставят на электроплитку, нагревают до растворения слегка помешивая, сливают с приготовленной средой доводят до 1 л дистиллированной водой. Колбу со средой закрываем ватной пробкой (фольгой) и стерилизуют в автоклаве 40 мин при давлении 1 атм.  Стерилизация разлитой среды в пробирках: берут штатив с пробирками наливают в каждую 1/3 пробирки среды, закрывают ватными пробками, завязывают в бумагу штатив с пробирками и стерилизуют в автоклаве 40 мин при 1 атм.  Проавтоклавированные штативы вытаскивают, охлаждают и переносят в ламинар бокс. | 10 мин  1 час  3 часа  5 часов  30 мин  30 мин  2,5 часа  2 часа  1,5 часа | 100 мл. спирта, протирочные салфетки  Химреактивы в соответствии с прописями по Мурасиге-Скуга, колбы или химические стаканы на 2, 1 л, банки с притертыми пробками для хранения маточных растворов на 1 л. 100 мл, баночки на 20-50 мл, мерные пипетки на 10 и 1 мл, весы технические, торзионные, электроплитка, холодильник для хранения маточных растворов, стерильные растворы щелочи, морозильная камера для хранения витаминов и наборов ИФА  PH метр «Анион 4100», набор стерильных щелочей, пробирки.  фильтры Зейца, Милипор с диаметром пор 0,4 мкм, HCL, 96% спирт, ауксин, кинетин,  Автоклав, весы аналитические (Adveturer AX 124), дистиллированная вода, агар-агар, спиртовка, колба на 1 л, фольга  Штатив, пробирки, пит. среда, пробки ватные, бумага упаковочная, автоклав. |
| 10 | Стерилизация посуды и питательной среды:посуду моют в растворе бихромата калия в серной кислоте, затем 8 раз проточной водой; чистую посуду и матрасики помещают в сушильный шкаф на 1 ч при температуре 100–130 ºС.Для хранения емкости закрывают ватными пробками или фольгой, или заворачивают в бумагу. Металлические предметы, чашки Петри, завернутые в бумагу, помещают в сушильный шкаф на 2 ч при температуре 160 ºС. Штативы с пробирками, заполненные питательной средой и закрытые пробками, заворачивают в бумагу, автоклавируют в течение 40 мин при 1 атм., дистиллированную воду в стеклянной емкости автоклавируют в таком же режиме. Простерилизованные предметы переносят в ламинар-бокс. | 6 часов | колбы, баночки, Чашки Петри, матрасики, сушильный шкаф, двухромовокистый калий, серная кислота для приготовления препарата хромпик, стекла, скальпели. Иглы, ватные пробки, фольга  штативы с пробирками заполненные пит. средой, упаковочная бумага, колба с дистилированной водой, автоклав. |
| 11 | Черенкование (микроклональное размножение:  -переносят из растильни, где хранится коллекция оздоровленных растений *in vitro,* в ламинар-бокс штативы (пробирочные растения) с асептическими растениями нужного для размножения сорта;  -протирают руки в перчатках спиртом;  -берут пинцет, обжигают его на спиртовке, предварительно окунув его в спирт;  -берут пробирку, снимают пробку;  -вынимают растение пинцетом и кладут на бумажный матрасик;  -кладут пинцет, берут в одну руку пробирку;  -края пробирки обжигают над пламенем, второй рукой обжигают пробку, закрывают пробирку и отсьавляют в сторону;  -берут пинцет в одну руку и, придерживая растение второй рукой, стерильным скальпелем разрезают его на части, содержащие отрезок стебля с листком и пазушной почкой;  -берут в одну руку пробирку с проавтоклавированной средой, второй рукой берут при помощи простерилизованного в спирте пинцета черенок и высаживают его на питательную среду так, чтобы нижняя часть черенка находилась на 0,8–1,0 см в среде  -пробирки ставят в штатив и при заполнении последнего переносят на световую установку с коллекционным материалом. | Расче-ренко-вать 1 расте-ние 5 мин, штатив (30 раст.) 2,5 часа | пробирки с асептическими рас тениями, пинцет, скальпель, резиновые перчатки, спиртовка, 96% спирт, пробирки со стерилизованной средой, ватные пробки, бумажные матрасики, штатив, светоустановка |
| 12 | Хранение расчеренкованного материала | 20 дней, 6 раз | Световая установка |