

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ
УНИКАЛЬНОЙ НАУЧНОЙ УСТАНОВКИ
«КРИОБАНК ИФР РАН»
Института физиологии растений РАН
(УНУ КБР ИФР РАН)

Москва, 2018 г.

**Ключевые стандартные операционные процедуры
(СОП)
УНУ «КБР ИФР РАН»**

Оглавление

СОП № 1. Получение дистиллированной воды с помощью аквадистиллятора	6
<i>1.1. Устройство и принцип работы аквадистиллятора ДЭ-4 ТЗМОИ</i>	<i>6</i>
<i>1.2. Принцип работы ДЭ</i>	<i>7</i>
<i>1.3. Подготовка к работе и порядок работы ДЭ</i>	<i>8</i>
<i>1.4. Техническое обслуживание ДЭ</i>	<i>9</i>
<i>1.5. Меры безопасности</i>	<i>9</i>
СОП № 2. Измерение рН водных растворов для приготовления питательных сред	10
<i>2.1. Измерение рН с помощью ЭВ-74</i>	<i>10</i>
<i>2.2. Измерение рН с помощью портативного рН метра Hanna</i>	<i>10</i>
СОП № 3. Подготовка питательных сред для культивирования растительного материала <i>in vitro</i>	12
<i>3.1. Материалы и информация для приготовления питательных сред</i>	<i>12</i>
<i>3.2. Оборудование для приготовления питательных сред</i>	<i>13</i>
<i>3.3. Процедура приготовления питательных сред</i>	<i>13</i>
СОП № 4. Подготовка сосудов для культивирования растительного материала <i>in vitro</i>	13
<i>4.1. Основные требования к сосудам для культивирования растительного материала <i>in vitro</i>:</i>	<i>13</i>
<i>4.2. Виды сосудов для культивирования <i>in vitro</i> растительного материала</i>	<i>14</i>
<i>4.3. Подготовка новой стеклянной посуды для культивирования растительного материала:</i>	<i>14</i>
<i>4.4. Обработка многоразовых сосудов после использования для культивирования растительного материала</i>	<i>14</i>
<i>4.5. Стерилизация сосудов для культивирования растительного материала:</i>	<i>14</i>
<i>4.6. Заполнение сосудов питательной средой:</i>	<i>14</i>
<i>4.7. Хранение культивационных сосудов с питательной средой:</i>	<i>15</i>
<i>4.8. Особенности культивирования растительного материала в асептических условиях:</i>	<i>15</i>
СОП № 5. Определение влажности семян орхидей	15
<i>5.1. Содержание и назначение:</i>	<i>15</i>
<i>5.2. Подготовительные процедуры взвешивания образцов семян</i>	<i>16</i>
<i>5.3. Определение сухого веса семян</i>	<i>16</i>
<i>5.4. Определение влажности семян.</i>	<i>16</i>

СОП № 6. Асептическая обработка семян орхидей для получения культуры <i>in vitro</i>	16
6.1. Содержание и назначение:	16
6.2. Оборудование и материалы:.....	16
6.3. Реактивы:	17
6.4. Подготовка 5% водного раствора гипохлорита кальция для асептической обработки семян орхидей	17
6.5. Асептическая обработка поверхности семян орхидей.	17
СОП № 7. Оценка жизнеспособности семян орхидей Криобанка ИФР РАН с помощью окрашивания с помощью хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия.....	18
7.1. Содержание и назначение: протокол окрашивания семян орхидей с помощью хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия.....	18
7.2. Оборудование и материалы:.....	18
7.3. Реактивы:	18
7.4. Приготовление 0,5% водного раствора ТТХ.....	18
7.5. Окрашивание раствором 0,5% раствором ТТХ семян орхидей.....	18
СОП № 8. Оценка жизнеспособности семян орхидей с помощью проращивания <i>in vitro</i> на искусственных питательных средах.....	19
8.1. Содержание и назначение: определение жизнеспособности семян орхидей по всхожести на агаризованной питательной среде <i>in vitro</i>	19
8.2. Оборудование и материалы:.....	19
8.3. Реактивы:	19
8.4. Подготовка питательных сред для культивирования растительного материала орхидей	19
8.5. Посев и проращивание семян орхидей:	20
8.6. Учёт всхожести семян орхидей для оценки их жизнеспособности	20
СОП № 9. Получение асептических культур из семенного растительного материала.....	20
9.1. Оборудование и материалы:.....	20
9.2. Подготовка семян для культивирования <i>in vitro</i> :	21
9.3. Обработка семенного материала стерилизующими растворами	21
9.4. Посев семян на питательную среду для культивирования <i>in vitro</i>	22
СОП № 10. Получение асептических культур растительного материала из вегетативных тканей растений.....	22
10.1. Оборудование и материалы:.....	22
10.2. Подготовка вегетативного растительного материала к культивированию <i>in vitro</i>	23
10.3. Обработка стерилизующими растворами образцов растительного материала для введения в культуру <i>in vitro</i>	23

10.4. Размещение эксплантов растительного материала на питательной среде для культивирования <i>in vitro</i>	24
10.5. Тестирование <i>in vitro</i> асептичности эксплантов растительного материала	24
10.6. Клонирование растительного материала для культивирования <i>in vitro</i>	24
СОП № 11. Высадка в грунт растений, размноженных <i>in vitro</i> для культивирования <i>ex vitro</i>	25
11.1. Отбор растений для высадки в грунт.	25
11.2. Процедура подготовки к высадке в грунт.	25
11.3. Высадка в грунт.	25
СОП № 12. Сохранение растительного материала <i>in vitro</i> в режиме ингибирования роста	25
12.1. Подготовка растений для сохранения <i>in vitro</i>	25
12.2. Мониторинг состояния растительного материала, сохраняемого <i>in vitro</i>	26
СОП № 13. Криосохранение устойчивых к замораживанию семян.....	26
13.1. Материалы и оборудование	26
13.2. Составление описания семенного образца для регистрации в коллекции КБР ИФР РАН	27
13.3. Определение влажности семенного материала термобарометрическим методом	27
13.4. Оценка жизнеспособности семенного материала.....	27
13.5. Оценка криоустойчивости семенного материала	28
13.6. Размещение криоампул с семенами в криохранилище для долговременного хранения	28
13.7. Регистрация нового коллекционного образца в каталоге КБР ИФР РАН и мониторинг жизнеспособности семян в ходе долговременного криосохранения	28
СОП № 14. Криосохранение вегетативного растительного материала, устойчивого к замораживанию.....	29
14.1. Материалы и оборудование	29
14.2. Составление описания образца растительного материала для регистрации в коллекции КБР ИФР РАН.....	29
14.3. Размножение растительного материала <i>in vitro</i>	30
14.4. Подготовка образцов растительного материала к замораживанию в жидком азоте	30
14.5. Оценка криоустойчивости культивируемого <i>in vitro</i> растительного материала..	30
14.6. Размещение криоампул с образцами криоустойчивого растительного материала в криохранилище для долговременного хранения.....	31
14.7. Мониторинг жизнеспособности растительного материала в ходе долговременного криосохранения	31

СОП № 15. Криосохранение образцов клеток суспензионных культур растений, устойчивых к замораживанию	32
<i>15.1. Материалы и оборудование</i>	<i>32</i>
<i>15.2. Составление паспорта образца для культуры клеток растений при регистрации в коллекции КБР ИФР РАН</i>	<i>32</i>
<i>15.3. Подготовка образцов клеток суспензионных культур растений к замораживанию в жидком азоте</i>	<i>32</i>
<i>15.4. Оценка криоустойчивости образцов клеток суспензионных и каллусных культур растений.....</i>	<i>33</i>
<i>15.5. Размещение криоампул с образцами клеток суспензионных и каллусных культур растений в криохранилище для длительного хранения.....</i>	<i>33</i>
<i>15.6. Мониторинг жизнеспособности клеток суспензионных и каллусных культур растений в ходе длительного криосохранения.....</i>	<i>33</i>

1.1.3. **Сепаратор** выполнен в виде двух, соединенных между собой конусов, имеющих щелевое пространство для прохода очищенного пара.

Камера конденсации (1) состоит из: **змеевика** (14), **отбойника** (15), **крышки** (17).

При работе аквадистиллятора водяной пар, образованный в камере испарения, поступает в камеру конденсации, конденсируется на змеевике и каплями стекает в нижнюю коническую часть камеры, из которой через штуцер вытекает из камеры без напора в холодильник.

Из холодильника дополнительно охлажденная вода вытекает через **штуцер** (13). Через отверстия крышки (17) аквадистиллятора происходит частичная дегазация в атмосферу растворенных в воде газов. Дегазация происходит вместе с выделением небольшого количества пара, поэтому небольшое парение является нормальным признаком.

1.1.4. **Холодильник** (11) аквадистиллятора предназначен для охлаждения производимого дистиллята до температуры ниже 40°C (данная температура регулируется с помощью изменения количества подаваемой исходной воды).

Холодильник имеет два штуцера: **вода исходной воды** (12) и **слив конденсата** (13).

Слив дистиллированной воды в приемную емкость осуществляется по силиконовой трубке из комплекта поставки (силикон - индифферентный и термостойкий материал), которая не загрязняет полученный дистиллят. Свободное стекание дистиллированной воды по данной трубке необходимо обеспечить, устраняя её перегибы и размещая конец трубки ниже уровня холодильника.

1.1.5. Заполнение аквадистиллятора исходной водой возможно через холодильник, когда для потребления нужен охлажденный дистиллят или напрямую (при снятом холодильнике) к штуцеру змеевика камеры конденсации, когда нужен горячий дистиллят.

1.1.6. Электрооборудование аквадистиллятора расположено в **электроблоке** (3), закрепленном на камере испарения. На крышку электроблока выведены сигнальные лампы «СЕТЬ», «НАГРЕВ», «НЕТ ВОДЫ» и ручка выключателя.

1.2. Принцип работы ДЭ

1.2.1. При работе ДЭ все загрязняющие исходную воду вещества остаются камере испарения.

1.2.2. Для обеспечения качества производимой дистиллированной воды соответствующего указанным в паспорте требованиям и предупреждения интенсивного образования накипи в камере испарения, необходимо не реже одного раза через 8 часов работы производить слив воды из камеры испарения через кран №9.

1.2.3. На аквадистиллятор подается напряжение питания переводом ручки вводного аппарата, установленного в соответствии в положение «ВКЛ». Загорается лампа «СЕТЬ».

Кран №9 слива воды из камеры испарения должен быть закрыт.

Из открытого крана подачи исходная вода поступает через штуцер (12) в холодильник, а после него в змеевик (14). При этом (когда в аквадистилляторе закипит вода) через стенки труб происходит охлаждение дистиллята и, как следствие, подогрев исходной воды. Подогретая таким образом исходная вода через трубку перелива (10) поступает в уравниватель (5) и далее поступает в камеру испарения (2), заполняя ее до рабочего уровня. После этого, уровень воды поддерживается автоматически, за счет частичного пополнения воды в камере испарения и частичного перелива воды в сливную трубу (6).

При наличии достаточного уровня воды в камере испарения напряжение питания подается к электронагревателям (ТЕН) 4. Загорается лампа «НАГРЕВ».

При отсутствие воды в камере испарения загорается лампа «ВОДЫ НЕТ».

1.2.4. При проведении пропаривания аквадистиллятора необходимо закрыть кран подачи исходной воды. Время пропаривания 0,5 до 1 минуты. После этого уровень воды в камере испарения опускается ниже допустимого и происходит отключение нагрева ТЕН.

1.2.5. Включение аквадистиллятора в сеть производится с помощью вводного аппарата-рубильника или автоматического выключателя, установленного потребителем.

После включения загорается сигнальная лампа «СЕТЬ», а при наличии достаточного уровня исходной воды электронный датчик уровня включает в работу электронагреватели, при этом загорается лампа «НАГРЕВ».

Контроль минимально допустимого уровня исходной воды в камере испарения осуществляется электронным датчиком уровня, который при снижении уровня воды отключает электронагреватель и включает лампу «НЕТ ВОДЫ».

1.3. Подготовка к работе и порядок работы ДЭ

1.3.1. Перед использованием ДЭ должен находиться не менее суток в теплом помещении для естественной просушки токоведущих частей.

1.3.2. Дезинфицировать наружные поверхности аквадистиллятора 3% раствором перекиси водорода с добавлением 0,5% моющего средства типа «Астра», «Лотос», а также 1% раствором хлорамина.

1.3.3. Закрыть вентиль слива воды (9) из камеры испарения (2).

1.3.4. Открыть вентиль подачи исходной воды в аквадистиллятор.

1.3.5. После заполнения ДЭ водой подать напряжение питания на аквадистиллятор переводом ручки вводного аппарата в положение «ВКЛ».

1.3.6. Включить выключатель электроблока (свет ламп сигнальных индикаторов: «СЕТЬ» И «НАГРЕВ»).

1.3.7. При первоначальном пуске ДЭ в работу, после длительного перерыва в работе и после ремонтно-профилактических работ необходимо провести **пропаривание**.

- Для этого **закрыть вентиль подачи воды в аквадистиллятор**. Примерно через 0,5-1 минуты после включения аквадистиллятора индикатор «НАГРЕВ» погаснет и загорится индикатор «НЕТ ВОДЫ». **Это сигнализирует об окончании пропаривания.**
- Полученную в результате воду из трубки выхода дистиллированной воды - **не используют**.
- После завершения пропаривания - **выключить выключатель электроблока**.
- Затем, открыть вентиль подачи исходной воды в аквадистиллятор.
- После заполнения аквадистиллятора водой, включить выключатель электроблока.
- Затем, аквадистиллятор может работать в обычном режиме.

1.3.8. Для достижения **максимальной производительности ДЭ**, оптимального расхода исходной воды и достижения максимально возможного показателей качества производимой воды необходимо отрегулировать краном **минимально возможную подачу исходной воды**, при котором испарение аквадистиллятора минимально. Данная регулировка необходима, так как давление и температура исходной воды в водопроводе могут быть различными. Можно так же выполнить регулировку аквадистиллятора при помощи термометра опущенного в ёмкость уравнивателя (5). Температура воды в уравниателе, при правильно отрегулированном ДЭ, составит: 45-50°C.

1.3.9. По окончании работы **отключить ДЭ от электросети**, для чего перевести ручку вводного аппарата в положение «ВЫКЛ». При этом лампы «СЕТЬ» и «НАГРЕВ» должны погаснуть.

1.3.10. Закрыть вентиль подачи исходной воды в аквадистиллятор.

1.3.11. Слить воду из камеры испарения и уравнивателя, открыв сливной вентиль (9).

1.4. Техническое обслуживание ДЭ

1.4.1. **Ежедневное обслуживание** при использовании аквадистиллятора заключается во внешнем визуальном осмотре аппарата, удалении пыли и обязательном **сливе воды из камеры испарения в конце работы**.

1.4.2. Один раз в месяц необходимо **очищать** камеру испарения, электронагревателя, электрод и изолятор датчика уровня **от накипи** и загрязняющих отложения механическим или иным способом, не разрушающим корпус и ТЕНы: очистка выполняется с помощью водного раствора лимонной кислоты (100-200 г/л):

- **снять камеру конденсации (1), отбойник (1)5 и сепаратор (8),**
- залить очищающий раствор лимонной кислоты в камеру испарения так, чтобы уровень раствора скрывал ТЕНы,
- довести до кипения и кипятить 10-20 минут,
- промыть емкость водой и затем залить на 5 минут раствором пищевой соды (NaHCO_3 , 10 г/л),
- слить раствор соды и 3-4 раза промыть большим количеством воды.
- проверить качество получаемого дистиллята (рН) и **при необходимости повторить обработку.**

В случае, если обнаружено неудовлетворительное качество исходной или производимой воды, полностью сливают воду из ДЭ и тщательно очистить внутренние поверхности камер испарения и конденсации с помощью промывания раствором пищевой соды (10 г на литр), затем протереть части дистиллятора сухой тканью без ворса (особенно в местах развальцовки камер) до исчезновения посторонних пятен. После сборки ДЭ выполнить **тремякратное** пропаривание. Очень важно следить за тем, чтобы внутри ДЭ не осталось никаких посторонних предметов.

1.5. Меры безопасности

1.5.1 Лица, не усвоившие принцип действия аквадистиллятора, порядок работы с ним и правила его эксплуатации, изложенные в настоящем паспорте, а также не прошедшие инструктажа в соответствии с «Правилами технической эксплуатации электроустановок потребителей» и «Правила техники безопасности при эксплуатации электроустановок потребителей» Госэнергонадзора, к работе с ДЭ **не допускаются**.

1.5.2. Для обеспечения безопасной работы на аквадистилляторе необходимо подключить заземляющий контакт розетки к контуру заземления медным гибким проводом сечением не менее 2,5 мм.

1.5.3. Воспрещается:

- оставлять без присмотра ДЭ, подключённый к электросети;
- устранять неисправности и производить ремонт ДЭ, включенного в электросеть;
- открывать ДЭ во время его работы.

Открывать электроблок разрешается только специалисту — электрику, ответственному за обслуживание электрической части аквадистиллятора.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 1. подготовлены в соответствии с инструкцией пользования аквадистиллятором к.б.н., ст.н.с. О.Н.Высоцкой и м.н.с. А.Ю. Балекиным.

СОП № 2. Измерение рН водных растворов для приготовления питательных сред

2.1. Измерение рН с помощью ЭВ-74

Прибор должен быть предварительно откалиброван, в соответствии с заводской инструкцией, и подготовлен к работе. Электроды прибора всегда должны находиться в дистиллированной воде (СОП №1). Все манипуляции с электродами проводить осторожно.

2.1.1. Подготовка ЭВ-74 к измерениям

Проверку готовности **ЭВ-74** к работе, а именно соответствие показаний прибора значениям рН контрольных буферных растворов, проводят при комнатной температуре:

- включить прибор в электрическую сеть;
- прогреть 30 минут;
- электроды промыть свежей дистиллированной водой, налитой в чистый стаканчик или из флакона с дозатором;
- налить в чистый стаканчик буферный раствор, погрузить в него электроды и включить кнопку t° ;
- определить температуру раствора (нажата кнопка «температура» и любая кнопка диапазонов рН кроме кнопки «грубой» шкалы: «-1 – 19») по температурной шкале от 0° до 100° (при наличии термо-компенсатора температура раствора определяется автоматически и показания рН, прибор корректирует автоматически);
- измерить рН контрольного буферного раствора №1 с использованием «грубой» шкалы («-1 – 19») и одного из диапазонов «тонкой» шкалы (-1-4; 4-9; 9-14; 14-19);
- после измерения электроды промывают дистиллированной водой и подсушиваются фильтровальной бумагой;
- измерить рН контрольного буферного раствора №2 с использованием «грубой» шкалы («-1 – 19») и одного из диапазонов «тонкой» шкалы (-1-4; 4-9; 9-14; 14-19);
- прибор готов к работе, если показания рН соответствуют характеристикам контрольных буферов.

2.1.2. Измерения рН водных растворов для приготовления питательных сред

- электроды промыть свежей дистиллированной водой, налитой в чистый стаканчик или из флакона с дозатором;
- погрузить электроды в тестируемый раствор и включить кнопку t° ;
- определить температуру раствора, как указано выше;
- включить режим: «анионы/катионы»; «рХ» и кнопку «-1 – 19»;
- определить по «грубой» шкале (-1 – 19) рН тестируемого раствора;
- переключить кнопку измерений рН в соответствии с полученным значением рН на соответствующий диапазон «тонкой» шкалы и определить точное значение рН;
- для коррекции рН тестируемого раствора используют 0,1н HCl и/или 0,1н NaOH, добавляя эти растворы по каплям в тестируемый раствор;
- после коррекции рН переключить прибор в режим покоя (нажаты кнопки: «температура» и «-1 – 19»);
- электроды промыть дистиллированной водой, обсушить фильтровальной бумагой и погрузить в свежую дистиллированную воду в чистом стаканчике;
- выключить прибор из сети (нажаты кнопки «температура» и «-1 – 19»).

2.2. Измерение рН с помощью портативного рН метра Hanna

Портативный рН метр *Hanna* предназначен для оперативного измерения рН в водных растворах и может быть использован в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

2.2.1. Материалы и оборудование

- портативный рН метр *Hanna*;
- инструкция по эксплуатации рН метра *Hanna*;
- стандартные буферы: рН – 7, 9 или 10;
- вода дистиллированная;
- лист проверок калибровки и точности;
- анализируемые растворы;
- фильтровальная бумага;
- 0,1н HCl и/или 0,1н NaOH.

2.2.2. Обслуживание и хранение портативного рН метра *Hanna*

- хранить электрод исключительно в вертикальном положении при выключенном дисплее;
- долговременное хранение: высушить электрод и плотно закрыть крышку;
- кратковременное хранение: измерительные электроды в дистиллированной воде (внутри крышки несколько капель);
- воздушный пузырь внутри наконечника электрода может привести к неустойчивым показаниям из-за нарушения контакта с измеряемым раствором;
- если на электроде образовался солевой налёт – необходимо очистить его в соответствии с инструкциями производителя;
- для нормального функционирования прибора необходимо использовать элементы питания, аналогичные тем, которые были поставлены с прибором.

2.2.3. Калибровка портативного рН метра *Hanna*

- подготовить калибровочные буфера в небольших количествах (около 1 столовой ложки или 15 мл) в отдельных ёмкостях;
- после кратковременного хранения электродов рН метра в дистиллированной воде перед каждым началом работы проводят калибровку (регуляция выходного сигнала) буфером рН 7 в соответствии с инструкциями производителя;
- один раз в месяц проводят плановую калибровку рН метра *Hanna* (регуляция выходного сигнала) с использованием буферов: рН 7 и рН 10, в соответствии с инструкциями производителя;
- после плановой калибровки буфером рН 10, проводят калибровку буфером 7;
- после каждой смены раствора (буфера), электрод тщательно ополаскивают дистиллированной водой;
- все калибровочные действия, а также показания прибора до и после калибровки, обязательно регистрируют в «калибровочной форме» (Excel) с указанием даты и времени действия;
- калибровочные растворы (буферы) выливают в контейнер для жидких отходов с последующей утилизацией их в канализацию;
- категорически воспрещается выливать использованный буфер из чашки в оригинальную стандартную ёмкость.

2.2.4 Измерения кислотности водных растворов с помощью портативного рН метра *Hanna*

- снять защитный колпачок с электрода;
- поместить электрод в чистую ёмкость и заполнить её дистиллированной водой так, чтобы наконечник был погружён в воду приблизительно на 3-5 см за 20 минут перед измерением;
- перенести прибор в ёмкость со стандартным буферным раствором и погрузить электроды на 3-5 см в буфер (рН=7);
- включить прибор и проверить показания прибора на соответствие рН=7;
- в ходе измерения кислотности буферный раствор необходимо перемешивать пока не стабилизируются показания на экране рН метра *Hanna*;

- записать показания в «калибровочной форме» рН метра *Hanna*, проверив, что идентификатор инструмента введен правильно;
- выключить рН-метр;
- извлечь рН-метр из тестируемого раствора;
- промыть наконечник дистиллированной водой, а использованную воду вылить в контейнер для жидких отходов;
- промыть электрод дистиллированной водой над контейнером для жидких отходов;
- поместить электрод для измерения и коррекции рН в сосуд с питательной средой не глубину 3-5 см;
- включить прибор и измерить рН и записать полученные показания;
- при необходимости кислотность питательной среды корректировать с помощью 0,1н HCl и/или 0,1н NaOH;
- после приведения измерений и коррекции кислотности питательной среды прибор выключить, а электроды тщательно промыть дистиллированной водой;
- прибор поместить на хранение в вертикальном положении.

2.2.5. Возможные проблемы при эксплуатации портативного рН метра *Hanna*

- Пузырь воздуха внутри геля, перемещается вверх и вниз по электроду и соприкасается с электрическими контактами (для предотвращения данной ситуации счетчик должен храниться и использоваться исключительно в вертикальном положении).
- В результате длительного хранения на поверхности электрода может сформироваться сухая минеральная корка (перед калибровкой или использованием электрода для освобождения от минеральных отложений необходимо обработать его поверхность дистиллированной водой).
- Медленная реакция электрода на низко буферные воды (для стабилизации результатов провести дополнительную процедуру калибровки с регистрацией результатов измерений при случайных перемешиваниях измеряемого раствора (буфера) в течение нескольких минут).

При составлении СОП №2 использованы: инструкции к приборам для измерения рН.

Исполнители: младший научный сотрудник, научный сотрудник, старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 2. Подготовлены:

к.б.н., ст.н.с. О.Н. Высоцкой и м.н.с. А.Ю. Балекиным.

СОП № 3. Подготовка питательных сред для культивирования растительного материала *in vitro*

3.1. Материалы и информация для приготовления питательных сред

- Перечень компонентов питательной среды с указанием их концентрации в рабочем растворе, в соответствии с опубликованной информацией о составе среды или с оригинальным описанием, разработанным сотрудниками КБР РАН.
- Компоненты питательной среды: минеральные соли и органические вещества
- Концентрированные «маточные» растворы компонентов питательных сред в сосудах для продолжительного хранения.
- Плёнка термоусадочная пищевая или плёнка Parafilm.
- Вата и салфетки бумажные.
- Мерная лабораторная посуда, в соответствии с ГОСТ 29044-91.
- Дистиллированная вода (СОП№1)

3.2. Оборудование для приготовления питательных сред

- Весы лабораторные.
- Весы аналитические.
- Иономер или рН-метр.
- Плитка лабораторная или нагревательный прибор.
- Автоклав.
- Холодильник бытовой с морозильной камерой.
- Магнитная мешалка.
- Ламинар-бокс.
- Дистиллятор.
- Спиртовая горелка.
- Микропипетки.
- Тяга.
- Маркеры перманентные

3.3. Процедура приготовления питательных сред

- Подготовка концентрированных «маточных» растворов для компонентов питательных сред в сосудах для продолжительного хранения в соответствии с инструкцией, принятой в «КБР ИФР РАН».
- Подготовка мерной посуды для приготовления «рабочих» растворов для культивирования растительного материала.
- Приготовление «рабочих» растворов для культивирования растительного материала путём постепенного добавления компонентов в дистиллированную воду (СОП №1), помещённую в мерный сосуд.
- Определение и доведение до определённого рН (СОП №2) приготовленного питательного раствора без добавления агар-агара.
- Разделение приготовленной питательной среды на порции в отдельные сосуды.
- Добавление необходимых добавок в определённую порцию среды в термостойком сосуде перед стерилизацией в автоклаве.
- Стерилизация питательной среды в автоклаве (0,7-1,0 атм) 15+15 мин.
- Разделение стерилизованной питательной среды по стерильным сосудам для культивирования растительного материала в асептических условиях ламинар-бокса.
- Закупоривание и маркирование сосудов, подготовленных для культивирования растительного материала.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 3. подготовлены к.б.н., ст.н.с. О.Н.Высоцкой.

СОП № 4. Подготовка сосудов для культивирования растительного материала *in vitro*

4.1. Основные требования к сосудам для культивирования растительного материала *in vitro*:

- поверхности культивационных сосудов должны быть чистыми и не иметь повреждений,
- материал культивационных сосудов не должен выделять в питательную среду биологически активные соединения, существенно влияющих на растительный материал,

- асептические условия должны сохраняться на протяжении всего периода культивирования растительного материала внутри используемых сосудов.

4.2. Виды сосудов для культивирования *in vitro* растительного материала

(банки, колбы, чашки Петри и т.п.):

- сосуды стеклянные, термостойкие, пригодные для многократного использования;
- сосуды пластиковые, пригодные для многократного использования, устойчивые к нагреванию в автоклаве;
- сосуды пластиковые, стерильные, пригодные для однократного использования.

4.3. Подготовка новой стеклянной посуды для культивирования растительного материала:

- обработка моющими средствами, например, 15 минут в горячем растворе;
- промывание проточной водопроводной водой;
- замачивание и автоклавирование в дистиллированной воде в течение 1 часа или нагрев и 10 минутное кипячение в 2% растворе соляной кислоты для нейтрализации избытка щелочи на внутренних поверхностях посуды;
- 10-кратное ополаскивание проточной водопроводной водой;
- 3-кратное ополаскивание дистиллированной водой;
- сушка чистой посуды - холодная (на воздухе или в специальных устройствах) или горячая (нагретым воздухом или в сухожаровом шкафу).

4.4. Обработка многоразовых сосудов после использования для культивирования растительного материала

- культивационные сосуды очищают от загрязнений (питательная среда, остатки растительного материала или контаминация) путём 30 мин автоклавирования в 1-2% растворе жидкого моющего средства или детергента;
- очистка и обработка ёршиком обезвреженных культивационных сосудов с помощью моющих средств;
- 10-кратное ополаскивание проточной водопроводной водой;
- 3-кратное ополаскивание дистиллированной водой;
- сушка чистой посуды - холодная (на воздухе или в специальных устройствах) или горячая (нагретым воздухом или в сухожаровом шкафу).

4.5. Стерилизация сосудов для культивирования растительного материала:

- чистые стеклянные сосуды, подготовленные для культивирования растительного материала, покрывают фольгой и стерилизуют сухим жаром при 180°C в течение 1 часа или в автоклаве в течение 1 часа при давлении в 2 атм;
- чистые пластиковые сосуды стерилизуют либо горячим способом (автоклавирование для термо-стабильных материалов) либо холодным (газ, β или γ излучение).

4.6. Заполнение сосудов питательной средой:

- стерильные культивационные сосуды размещают в ламинар-боксе;
- стерильную питательную среду в асептических условиях ламинар-бокса разливают по культивационным сосудам с помощью стерильного дозатора (мерный стакан или пипетка);
- культивационные сосуды закрывают стерильными крышками (фольга, пластик или иное);

- сосуды с агаризованной питательной средой закупоривают только после полного охлаждения для предотвращения формирования конденсата на внутренних поверхностях;
- подготовленные к работе культивационные сосуды маркируют в соответствии с составом использованной питательной среды.

4.7. Хранение культивационных сосудов с питательной средой:

- сосуды, подготовленные к культивированию растительного материала, хранят в темноте, при температуре 4-20°C;
- подготовленные для культивирования растительного материала сосуды должны быть использованы по назначению в предельно короткие сроки для предотвращения изменений питательной среды в результате хранения.

4.8. Особенности культивирования растительного материала в асептических условиях:

- известно, что абсолютно надежного способа доказательства отсутствия живых микроорганизмов в любом из исследуемых объектов не существует, поскольку число микроорганизмов, которые выживают после процесса стерилизации, может быть снижена до очень малого значения, но никогда не может быть снижена до нуля (ГОСТ Р ИСО 13408-1-2000);
- одним из качественных характеристик культивируемого *in vitro* растительного материала можно считать отсутствие в культивационном сосуде визуально различимых признаков присутствия микроорганизмов: колоний и т.п.);
- оценки качества и стоимости образцов культивируемого *in vitro* растительного материала, могут быть основаны на требованиях действующих, а также утративших силу стандартов (ГОСТ Р 53044—2008; ГОСТ 29105.2—91; ГОСТ Р ИСО 9001-2001; ГОСТ 29268-91; ГОСТ Р 54051—2010; ГОСТ 34231—2017).

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 4. подготовлены к.б.н., ст.н.с. О.Н.Высоцкой.

СОП № 5. Определение влажности семян орхидей

5.1. Содержание и назначение:

протокол работ для определения влажности семян орхидей гравиметрическим методом, основные этапы которого соответствуют отдельным этапам методов определения влажности по ГОСТ 13586.5-93, ГОСТ 29144-91(ИСО 711-85), ГОСТ 29143-91 (ИСО 712-85).

5.2. Оборудование и материалы:

- шкаф сушильный электрический с терморегулятором;
- весы электронные аналитические;
- весы лабораторные;
- халат лабораторный;
- перчатки латексные;
- шпатель медицинский;
- бюксы стеклянные, СВ 19x9 мм;
- салфетка фланелевая;
- тетрадь;
- ручка;
- карандаш.

5.2. Подготовительные процедуры взвешивания образцов семян

- взвешивание проводят с использованием аналитических весов, значения всех взвешиваний регистрируют в тетради с точностью 0,1 мг;
- чистые бюксы маркируют простым карандашом;
- пустые бюксы взвешивают, результаты регистрируют в тетради;
- пустые бюксы подсушивают до постоянного веса в термостате при температуре 100°C, результаты регистрируют в тетради после каждого цикла подсушивания.

5.3. Определение сухого веса семян

- навески семян (не менее 60 мг) помещают в маркированные бюксы, подсушенные до постоянного веса (минимальная повторность измерений для каждого образца: двукратная);
- производят взвешивание навесок в закрытых бюксах и регистрируют результаты в тетради;
- открытые бюксы с навесками помещают в сушильный шкаф на 1 час и подсушивают при температуре 90°C;
- через 1 час сушки бюксы достают из сушильного шкафа, закрывают их крышками и охлаждают в эксикаторе с хлористым кальцием в течение 10-15 мин;
- охлаждённые бюксы с навесками образцов взвешивают, а результаты регистрируют в тетради;
- процедуру высушивания-взвешивания повторяют несколько раз, пока вес навески не стабилизируется (показатели взвешивания у каждой из навесок в двух последовательных измерениях не должны различаться более чем на 0,2 %);

5.4. Определение влажности семян.

- влажность семян определяют по данным взвешиваний (в миллиграммах), минимум с двумя повторностями;
- регистрируют: вес пустого подсушенного бюкса, вес бюкса с навеской семян до подсушивания, вес бюкса с навеской семян после подсушивания до постоянного веса
- вычисляют влажность по формуле: $W = (M - M_1) \times 100 / (M - M_2)$,

где: W - влажность, M - масса бюкса с навеской до высушивания; M₁ - масса бюкса с навеской после высушивания; M₂ - масса пустого бюкса.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов взвешиваний для каждого образца семян, полученное в двух или более повторностях.

Исполнители: младший научный сотрудник, научный сотрудник

Материалы для СОП № 5. подготовлены н.с., к.б.н. Т.В. Никишиной.

СОП № 6. Асептическая обработка семян орхидей для получения культуры *in vitro*

6.1. Содержание и назначение:

протокол асептической обработки семян орхидей для получения растительного материала, пригодного для культивирования *in vitro* на искусственных питательных средах.

6.2. Оборудование и материалы:

- шкаф вытяжной лабораторный;
- ламинарный бокс абактериальной воздушной среды;
- горелка спиртовая лабораторная;
- плитка электрическая настольная;
- универсальная насадка для фильтрации фирмы Merck;
- весы электронные лабораторные;
- секундомер или часы;

- фильтры обеззоленные круглой формы (диаметром 5,5 см —15,0 см), вырубленные из лабораторной фильтровальной бумаги (марки ФБ, ФС, ФМ по ГОСТ 12026-76);
- цилиндр мерный, стеклянный на 100 мл;
- стакан стеклянный на 200 мл;
- колба плоскодонная на 300 мл;
- воронка лабораторная стеклянная, диаметр 60 мм.
- чашки Петри пластиковые, стерильные диаметр 60 мм, 90 мм;
- вата медицинская хлопковая;
- шпатель медицинский;
- шприц медицинский на 10 мл, стерильный;
- пинцет анатомический, 200 мм, стерильный;
- стакан лабораторный, стеклянный, на 100 или 200 мл, стерильный;
- баночки стеклянные на 100 мл;
- халат лабораторный;
- перчатки латексные;
- спички или зажигалка газовая;

6.3. Реактивы:

- спирт медицинский 96%, 70%, детергент жидкий, Tween-40; вода дистиллированная стерильная, раствор гипохлорита Ca (СОП №6).

6.4. Подготовка 5% водного раствора гипохлорита кальция для асептической обработки семян орхидей

- гипохлорит кальция растворяют в воде при нагревании в закрытой колбе под тягой, поскольку этом образуется газообразный хлор;
- гипохлорит кальция (5 грамм) добавляют в 100 мл H_2O , доводят до кипения и кипятят 5-10 минут на «медленном огне» электрической плитки.
- в процессе кипячения раствор $Ca(ClO)_2$ постепенно приобретает розоватый оттенок;
- после кипячения раствор $Ca(ClO)_2$ остужают и фильтруют (один или два раза через ватный фильтр);
- к остывшему раствору $Ca(ClO)_2$ добавляют несколько капель детергента;
- стерилизующий раствор $Ca(ClO)_2$, готовый к применению хранят не более 2-х суток в холодильнике при 4-10°C.

6.5. Асептическая обработка поверхности семян орхидей.

- образцы семян и все необходимые материалы размещают на столе ламинар-бокса, предварительно подготовленного для выполнения работы со стерильным материалом;
- семена помещают на стерильный бумажный фильтр, накрывают вторым бумажным фильтром и полученный «сэндвич» помещают в специальную герметичную насадку для фильтрации;
- с помощью стерильного шприца без иглы в специальное отверстие в данной насадке подают стерилизующий раствор (5-6 мл) и оставляют на 10-30 минут;
- после обработки $Ca(ClO)_2$ фильтр с семенами, с помощью шприца, промывают 3-4 раза стерильной дистиллированной водой по 2-3 минуты;
- после промывания насадку открывают и стерильным пинцетом переносят «сэндвич» с семенами на чистую стерильную поверхность, например, стерильную чашку Петри;
- после этого, обработанные $Ca(ClO)_2$ промытые водой семена переносят с фильтра на питательную среду для проращивания.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 5. подготовлены н.с., к.б.н. Т.В. Никишиной.

СОП № 7. Оценка жизнеспособности семян орхидей Криобанка ИФР РАН с помощью окрашивания с помощью хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия**7.1. Содержание и назначение: протокол окрашивания семян орхидей с помощью хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия**

Данный метод основан на реакции восстановления живыми, активно дышащими тканями молекул хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТХ) с образованием ярко красного формазана. Этот метод используют для оценки дыхательной активности светло окрашенных семян с прозрачной кожурой.

Семена, у которых зародыш не виден из-за сильно пигментированных покровов, необходимо перед окрашиванием подвергать процедуре осветления, идентичной СОП №5.

7.2. Оборудование и материалы:

- шкаф вытяжной лабораторный;
- рН-метр лабораторный;
- термостат лабораторный;
- бинокулярный микроскоп лабораторный;
- весы электронные лабораторные;
- шпатель медицинский;
- цилиндр стеклянный мерный, на 100 мл;
- 1-канальная автоматическая пипетка, Pipetman, на 1-5 мл;
- пробирка коническая, стеклянная, на 10 мл;
- халат лабораторный;
- перчатки латексные.

7.3. Реактивы:

- хлорида 2,3,5-трифенилтетразолий (ТТХ);
- Tween-40;
- дистиллированная вода;
- раствор HCl - 0,1N;
- раствор NaOH - 0,1N.

7.4. Приготовление 0,5% водного раствора ТТХ

- в мерной колбе (200 мл) в 100 мл дистиллированной воды растворяют 500 мг ТТХ при комнатной температуре с помощью интенсивного перемешивания;
- после полного растворения ТТХ к раствору добавляют несколько капель детергента (Tween-40, 0,01%);
- рН полученного раствора доводят с помощью 0,1N раствора NaOH - до 7,5;
- готовый раствор может хранить в холодильнике 2-3-х суток.

7.5. Окрашивание раствором 0,5% раствором ТТХ семян орхидей

- в коническую пробирку с семенами добавляют рабочий раствор ТТХ;
- пробирку закрывают крышкой и помещают в термостат (темнота, t=30-40°C) на 4-24 часа;
- учёт результатов витального окрашивания проводят с помощью бинокулярного микроскопа: обычно, только зародыши, которые имеют маленькие размеры (в

среднем до 0,2 мм) восстанавливают ТТХ до формазана, и окрашиваются в красный цвет;

- семена с окрашенными зародышами считают жизнеспособными и их долю (% от учтённых в поле зрения микроскопа семян) регистрируют как один из показателей жизнеспособности анализируемого образца.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник

Материалы для СОП № 7. подготовлены н.с., к.б.н. Т.В. Никишиной.

СОП № 8. Оценка жизнеспособности семян орхидей с помощью проращивания *in vitro* на искусственных питательных средах

8.1. Содержание и назначение: определение жизнеспособности семян орхидей по всхожести на агаризованной питательной среде *in vitro*

8.2. Оборудование и материалы:

- шкаф вытяжной лабораторный;
- ламинарный бокс абактериальной воздушной среды;
- горелка спиртовая лабораторная;
- плитка электрическая настольная;
- цилиндр стеклянный мерный, на 100 мл;
- стакан стеклянный на 200 мл;
- воронка лабораторная стеклянная, диаметр 60 мм;
- чашки Петри пластиковые или стеклянные, стерильные диаметр 60 мм, 90 мм;
- вата медицинская хлопковая;
- шпатель медицинский;
- шприц медицинский, 10 мл;
- пинцет анатомический, 200 мм;
- игла секционная;
- халат лабораторный;
- перчатки латексные;
- стакан керамический, на 200мл;
- пищевая стрейч-пленка, PARAFILM;
- спички.

8.3. Реактивы:

- спирт медицинский 96%, 70%;
- среда питательная ½ МС, агаризованная безгормональная, стерильная, *in vitro*;
- пропись состава питательной среды в соответствии с публикацией: Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissues Cultures //Physiol. Plant. 1962. V.15. 473-497;
- среда питательная агаризованная ВМ₁, безгормональная, стерильная *in vitro*;
- пропись состава питательной среды в соответствии с публикацией: Van Waes JM, Deberg PC. *In vitro* germination of some Western European orchids// Physiologia Plantarum 1986. V.67: 253–261.

8.4. Подготовка питательных сред для культивирования растительного материала орхидей

- стерилизованные в автоклаве (СОП№1) питательные агаризованные среды в стеклянных термостойких колбах разогревают на электрической плитке до жидкого состояния;

- сосуды со средами переносят в ламинар-бокс, подготовленный для работы в асептических условиях, разливают по чашкам Петри и дают среде застыть;
- чашки с застывшей средой закрывают крышками, которые при необходимости закрепляют на доннышке с помощью термо-усадочной плёнки или плёнки PARAFILM.

8.5. Посев и проращивание семян орхидей:

- бумажный фильтр с семенами орхидей, асептически обработанными согласно СОП №2, с помощью стерильного пинцета переносят на агаровую питательную среду в чашку Петри (семенами вниз);
- чашки Петри с семенами на агар-агаровой питательной среде закрывают крышками, которые закрепляют с помощью стрейч-пленки;
- чашки Петри с семенами маркируют и помещают в климатическую камеру для культивирования при стабильных условиях, необходимых для конкретного вида орхидей;

8.6. Учёт всхожести семян орхидей для оценки их жизнеспособности

- количество проросших семян учитывают после 2 месяцев культивирования;
- проросшими считают семена, у которых зародыш увеличился в размере более чем в 2-2,5 раза и разорвал семенную оболочку, образовав “протокорм”, аналог проростка двудольных растений;
- показателем жизнеспособности считают долю (%) проросших семян от количества посеянных семян.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 8. подготовлены н.с., к.б.н. Т.В. Никишиной.

СОП № 9. Получение асептических культур из семенного растительного материала

9.1. Оборудование и материалы:

- халат лабораторный;
- перчатки латексные;
- вата медицинская хлопковая;
- стакан керамический, на 200мл;
- спиртовая горелка, лабораторная;
- 2-4 стерильных набора (пинцет, скальпель медицинский и др.) металлических инструментов: (ГОСТ 21240-89 - СТ СЭВ 4898-84);
- водные растворы стерилизующих веществ, в соответствии с образцом растительного материала (10% гипохлорит кальция; 5% гипохлорит натрия; 3-12% перекись водорода; этиловый спирт 75-95%; 0,1% сулема; 0,01-0,1% диацид);
- растворы фунгицидов (0,1 - 1% фундазол);
- растворы антибиотиков (2-50% клафоран, меропенем, меронем и др.);
- стаканы или другие широко-горлые ёмкости, стеклянные на 200 мл: 4 шт.;
- ламинар-бокс;
- шкаф вытяжной лабораторный;
- электрическая плитка;
- чашки Петри пластиковые или стеклянные, стерильные: диаметр 40, 60 или 90 мм;
- пищевая стрейч-пленка, PARAFILM;
- спички;

- спирт этиловый, медицинский 96%, 70%;
- стерилизованная среда питательная (состав оригинальный, в зависимости от вида растительного материала), агаризованная, стерильная, *in vitro*;
- мешочки из марли или х/б ткани, стерильные;
- семена.

9.2. Подготовка семян для культивирования *in vitro*:

ГОСТ 12038-66; ГОСТ 12038-84; ГОСТ 13857-95; ГОСТ 20290-74 и др.

9.2.1. Отбор семян для культуры *in vitro*:

- растения для сбора семенных образцов отбирают заранее в период цветения;
- выбранные растения, маркируют, фотографируют, регистрируют их местоположение с помощью навигационных приборов и составляют геоботаническое описание местообитания;
- образцы семенного материала собирают с визуально здоровых растений, имеющих ярко выраженные признаки принадлежности к конкретному виду, сорту или селекционной форме в период их созревания;
- выбирают наиболее крупные закрытые плоды с семенами разной степени зрелости или зрелые сухие семена без видимых механических и патогенных повреждений;
- семена из собранных образцов освобождают от мусора и остатков вегетативных тканей;
- сортируют семена методом флотации и/или визуально, разделяя их по качеству;
- для получения асептических культур используют семена из партии с максимально высоким качеством.

9.2.2. Обработка мелких семян перед стерилизацией в зависимости от физиологических особенностей растительного материала:

- стратификация,
- скарификация (химическое или механическое нарушение покровов),
- регидратация и замачивание (вода и/или растворы фунгицидов, микроэлементов и др.)
- обработка растворами регуляторов роста (гибберелловая кислота, гумат, зола, циркон, эпин, и т.п.).

9.2.3. Методы обработки крупных семян перед стерилизацией в зависимости от физиологических особенностей растительного материала:

- стратификация,
- скарификация (химическое или механическое нарушение покровов),
- регидратация и замачивание (вода и/или растворы фунгицидов, микроэлементов и др.)
- обработка растворами регуляторов роста (гибберелловая кислота, гумат, зола, циркон, эпин, и т.п.)
- полное освобождение от твёрдых покровов.
- 9.3. Обработка стерилизующими растворами поверхности семян для введения в культуру *in vitro*

9.3. Обработка семенного материала стерилизующими растворами

9.3.1. Подготовка к стерилизации:

- семена обрабатывают раствором детергента;
- семена или изолированные из них зародыши помещают в марлевые мешочки для стерилизации;
- мешочки маркируют в зависимости от семенного образца;

- семена в мешочках промывают холодной водопроводной водой в течение от 20 мин до 1 часа.

9.3.2. Обработка стерилизующими растворами (в зависимости от качества семенных образцов схема обработки может быть упрощена или изменена):

- семена или изолированные зародыши в мешочках обрабатывают раствором гипохлорита в течение 5-20 мин под тягой;
- переносят материал в ламинар-бокс в поток стерильного воздуха;
- образцы промывают стерильной дистиллированной водой 3 раза, последовательно перемещая мешочек с материалом из ёмкости в ёмкость (2/3 объема заполнены водой);
- семена в мешочках погружают в 75% раствор этанола на 1 мин или в 3-12% раствор перекиси водорода на 5-15 мин;
- промывают образцы стерильной дистиллированной водой 3 раза, последовательно перемещая мешочек с материалом из ёмкости в ёмкость (2/3 объема заполнены водой);
- семена в мешочках обрабатывают 8-10 мин 0,1% раствором сулемы или 0,01% раствором диацита в течение 5-20 мин;
- промывают образцы стерильной дистиллированной водой 3 раза, последовательно перемещая мешочек с материалом из ёмкости в ёмкость (2/3 объема заполнены водой);
- мешочки с семенами, обработанными стерилизующими растворами и промытыми дистиллированной водой, выкладывают в стерильные чашки Петри;
- мешочки раскрывают с использованием стерильных пинцетов.

9.4. Посев семян на питательную среду для культивирования *in vitro*

- обработанные стерилизующими растворами семена из мешочков переносят в стерильные чашки Петри или пробирки (СОП№4) на агаризованную питательную среду (СОП№3) для проращивания;
- чашки Петри или пробирки закрывают стерильными крышками или пробками и переносят в климатическую камеру для проращивания в условиях, необходимых для конкретных видов растений;
- учёт всхожести и наблюдения динамики прорастания семян выполняют с использованием цифрового оборудования и/или микроскопов;
- данные, полученные в результате наблюдений за прорастанием семян, регистрируют в таблицах журналов экспериментов, в том числе и с использованием программного обеспечения (Excel, Power Point, Paint и др.).

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 9 подготовлены:

**н.с., к.б.н. Е.К. Спринчану и
ст.н.с., к.б.н. О.Н.Высоцкой.**

СОП № 10. Получение асептических культур растительного материала из вегетативных тканей растений

10.1. Оборудование и материалы:

- халат лабораторный;

- перчатки латексные;
- вата медицинская хлопковая;
- стакан керамический, на 200мл;
- спиртовая горелка, лабораторная;
- 2-4 стерильных набора (пинцет, скальпель медицинский и др.) металлических инструментов: (ГОСТ 21240-89 - СТ СЭВ 4898-84);
- водные растворы стерилизующих веществ, в соответствии с образцом растительного материала (10% гипохлорит кальция; 5% гипохлорит натрия; 3-12% перекись водорода; этиловый спирт 75-95%; 0,1% сулема; 0,01-0,1% диацид);
- растворы фунгицидов (0,1 - 1% фундазол);
- растворы антибиотиков (2-50% клафоран, меропенем, меронем и др.);
- стаканы или другие стеклянные широко-горлые ёмкости, на 200 мл: 4 шт.;
- ламинар-бокс;
- шкаф вытяжной лабораторный;
- электрическая плитка;
- чашки Петри пластиковые или стеклянные, стерильные: диаметр 40, 60 или 90 мм;
- пищевая стрейч-пленка, PARAFILM;
- спички;
- спирт этиловый, медицинский 96%, 70%;
- среда питательная (состав оригинальный, в зависимости от вида растительного материала), агаризованная, стерильная, *in vitro* (СОПы №3,4);
- мешочки из марли или х/б ткани, стерильные;
- образцы вегетативных тканей растений.

10.2. Подготовка вегетативного растительного материала к культивированию *in vitro*

(ГОСТ 29268-91; ГОСТ 34231-2017; ГОСТ Р 54051-2010 и др.)

- растительный материал для введения в культуру *in vitro* собирают с наиболее здоровых и сильных растений, визуально сортируя по качеству;
- побеги с апикальными меристемами или другие виды вегетативного растительного материала из собранных образцов промывают с детергентом, освобождают от мусора, разделяют на отдельные части и помещают в марлевые мешочки;
- марлевые мешочки с образцами растительного материала маркируют и помещают в сосуды для обработки фунгицидами и/или для промывания проточной водопроводной водой.

10.3. Обработка стерилизующими растворами образцов растительного материала для введения в культуру *in vitro*

- образцы растительного материала в маркированных мешочках обрабатывают раствором гипохлорита в течение 5-20 мин под тягой;
- переносят образцы в ламинар-бокс в поток стерильного воздуха;
- промывают стерильной дистиллированной водой 3 раза, последовательно перемещая мешочек с материалом из ёмкости в ёмкость (2/3 объема заполнены водой);
- семена в мешочках погружают в 75% раствор этанола на 1 мин или в 3-12% раствор перекиси водорода на 5-15 мин;
- промывают стерильной дистиллированной водой 3 раза, последовательно перемещая мешочек с материалом из ёмкости в ёмкость (2/3 объема заполнены водой);
- семена в мешочках обрабатывают 8-10 мин 0,1% раствором сулемы или 0,01% раствором диацида в течение 5-20 мин;

- промывают стерильной дистиллированной водой 3 раза, последовательно перемещая мешочек с материалом из ёмкости в ёмкость (2/3 объема заполнены водой);
- мешочки с растительным материалом, обработанным стерилизующими растворами и промытым дистиллированной водой, выкладывают в стерильные чашки Петри и раскрывают с использованием стерильных пинцетов.

10.4. Размещение эксплантов растительного материала на питательной среде для культивирования *in vitro*

- обработанный стерилизующими растворами растительный материал из мешочков переносят на стерильные чашки Петри или на стерильную бумажную подложку для изолирования эксплантов с помощью скальпеля и пинцета;
- полученные экспланты помещают на агаризованную питательную среду (СОП№3) в чашки Петри или пробирки (СОП№4) для культивирования;
- чашки Петри или пробирки закрывают стерильными крышками или пробками и переносят в климатическую камеру для культивирования в условиях, необходимых для конкретных видов растений;
- учёт особенностей роста эксплантов и регенерации растений, а также наблюдения за динамикой формирования дифференцированных и/или недифференцированных тканей выполняют с использованием цифрового оборудования и/или микроскопов;
- данные, полученные в результате наблюдений за формообразованием растительных образцов, регистрируют в таблицах журналов экспериментов, в том числе и с использованием программного обеспечения (Excel, Power Point, Paint и др.).

10.5. Тестирование *in vitro* асептичности эксплантов растительного материала

- растительный материал в сосудах культивирования регулярно, раз в 3-5 дней, осматривают с помощью микроскопа, с целью выявления заражённых эксплантов;
- инфицированный материал – отбраковывают и уничтожают с использованием автоклава или сухожарового шкафа.

10.6. Клонирование растительного материала для культивирования *in vitro*

Растительный материал, полученный из одной меристемы в результате вегетативного размножения, относят к одному «клон» или «мериклону». Культивирование клонированного растительного материала связано с обязательным его учётом:

- клоны растений, культивируемых *in vitro*, регистрируют с использованием специальных коллекционных шифров;
- присвоенный клону шифр используют для идентификации образцов растительного материала при пересадках, размножении, тестировании на присутствие микроорганизмов, оздоровлении, депонировании и долговременном криосохранении;
- клоны вегетативно размножаемого растительного материала, восстановленные после криосохранения, могут быть позиционированы как «криоклоны»
- для культивирования и размножения растительного материала *in vitro* отбирают оздоровленные клоны, отличающиеся высоким коэффициентом размножения и без морфологических признаков, свойственных уклоняющимся формам и склонности к формированию каллусных и витрифицированных (излишне оводнённых) тканей.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 10. подготовлены ст.н.с., к.б.н. О.Н. Высоцкой.

СОП № 11. Высадка в грунт растений, размноженных *in vitro* для культивирования *ex vitro*

11.1. Отбор растений для высадки в грунт.

Растения, размноженные *in vitro*, отбирают для высадки в нестерильные условия по следующим признакам:

- растеньица должны быть сформированы полностью (листья и корни)
- 3-5 листьев с тёмно-зелёными листовыми пластинками;
- длина корней не более 3 см.

11.2. Процедура подготовки к высадке в грунт.

- отобранные растеньица высаживают на специальную питательную среду для подготовки к высадке в грунт, например, в соответствии с патентом РФ № 2302106;
- культивируют *in vitro* сначала в тёплой камере, до начала формирования корней;
- с появлением первых признаков корнеобразования растительный материал переносят в камеру с пониженной температурой (0-15°C и световой режим в соответствии с видовыми особенностями) на срок не менее 10 дней.
- после культивирования при пониженной температуре растения извлекают из культивационных сосудов и освобождают от остатков агаризованной питательной среды с помощью ополаскивания в воде комнатной температуры;
- растения *ex vitro* иногда дополнительно обрабатывают фунгицидами и/или специальными веществами, стимулирующими их рост перед помещением в грунт.

11.3. Высадка в грунт.

- растения, размноженные и/или культивированные *in vitro* (СОП № 10), высаживают в грунт после специальной подготовки, разработанной в соответствии с видовыми особенностями растительного материала (патент РФ № 2302106);
- первые 1-4 недели *ex vitro* растения культивируют в контролируемых условиях при $25\pm 2^\circ\text{C}$, постепенном снижении влажности воздуха (от 98 до 70%) и без воздействия прямых солнечных лучей ($30\text{--}90\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ интенсивности света);
- в частных случаях растения определённых видов обрабатывают перед высадкой в грунт специальными веществами (флороглюцин, АБК, ИМК, униказол и др.) для поддержания их водного баланса и стимуляции корнеобразования *ex vitro*.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 11. подготовлены ст.н.с., к.б.н. О.Н. Высоцкой.

СОП № 12. Сохранение растительного материала *in vitro* в режиме ингибирования роста

12.1. Подготовка растений для сохранения *in vitro*

- растительный материал, размноженный *in vitro*, разделяют на отдельные побеги и подращивают на специальной питательной среде до начала корнеобразования;

- растения с зачатками корней помещают в отдельные сосуды (пробирки, флаконы, и др.) на специальную питательную среду для долговременного депонирования (патент РФ № 2564565) в условиях ингибирования роста;
- сосуды с растениями закрывают герметичными крышками для предотвращения подсушивания питательной среды в процессе хранения;
- сосуды маркируют и регистрируют в документах коллекции;
- сосуды с коллекционным материалом помещают в холодную камеру ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$; освещение в соответствии с видовыми особенностями растений).

12.2. Мониторинг состояния растительного материала, сохраняемого in vitro

- состояние депонируемого растительного материала регулярно проверяют, оценивают и регистрируют в коллекционных журналах;
- для каждого коллекционного растения можно учитывать такие показатели как: наличие инфекции, количество листьев, количество корней и уровень жизнеспособности;
- уровень жизнеспособности депонируемых растений можно оценивать визуально (Патент РФ № 2564565), регистрируя показатели в журнале наблюдений;
- инфицированные образцы удаляют из коллекции;
- если срок гарантированного сохранения коллекционного клона закончен или растительный материал существенно пострадал при хранении, оставшиеся экземпляры срочно восстанавливают в условиях активного роста и размножают для восстановления коллекционного образца.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 12. подготовлены ст.н.с., к.б.н. О.Н. Высоцкой.

СОП № 13. Криосохранение устойчивых к замораживанию семян

13.1. Материалы и оборудование

- хранилище биологическое или сосуд Дьюара, дополненное оборудованием для размещения и перемещения этажерок с коллекционными образцами;
- сосуды Дьюара для перемещения коллекционных образцов;
- водяная баня для размораживания коллекционных образцов;
- этажерки металлические со специальными штативами для размещения пробирок с коллекционными образцами;
- криопробирки;
- маркеры специальные;
- маркировочные плёнки;
- пинцеты, скальпели;
- чашки Петри;
- фильтры бумажные (90, 50 мм в диаметре);
- бинокулярный микроскоп;
- фото и компьютерное оборудование для регистрации коллекционных образцов;
- программное обеспечение для учёта коллекционных образцов;
- другое оборудование и материалы, необходимые для определения жизнеспособности семян и для восстановления сохраняемого в криобанке растительного материала (СОПы №№1,2,3,4,5,6,7,8,9);

- семенные образцы.

13.2. Составление описания семенного образца для регистрации в коллекции КБР ИФР РАН

- взвешиваем семена из образца;
- регистрируем вес образца в учётных документах;
- подсчитываем количество семян в единице веса, соответствующей объёму образца (г, мг);
- регистрируем средний вес семени в данном образце;
- в учётных документах отмечаем видовую принадлежность образца, откуда образец поступил, кем и когда передан.

13.3. Определение влажности семенного материала термогравиметрическим методом

- семена из коллекционного образца взвешивают в бюксах;
- регистрируют их вес (ВО) в учётных документах;
- подсушивают навеску семян в сушильном шкафу в соответствии с ГОСТ 13586.5-93, ГОСТ 29144-91(ИСО 711-85), ГОСТ 29143-91 (ИСО 712-85) до постоянного веса (СВ);
- взвешиваем навеску в бюксах (СВ), вычисляем % влажности семенного материала в образце ($ВО-СВ/ВО*100=$ % влажности) и регистрируем полученные показатели в учётных документах.

13.4. Оценка жизнеспособности семенного материала

Жизнеспособность семян оценивают с помощью окрашивания витальными красителями (ТТХ: трифенилтетразолий хлоридом, ФДА: флюоресцеин-диацетатом и др.) или по всхожести семян в грунте, в лабораторных условиях нестерильно (фильтровальная бумага и водные растворы стимуляторов роста) или в стерильных условиях *in vitro* (жидкая или агаризованная питательная среда, дополненная биологически активными веществами).

13.4.1. Оценка всхожести семян после посева в почву (теплица или открытый грунт)

- семена из анализируемого образца после специальной обработки (стратификация и т.п.) высевают в почву с учётом видовых особенностей семенного материала;
- результаты проращивания семян и наблюдений за динамикой развития сеянцев регистрируют в учётных документах и с помощью фотографии.

13.4.2. Оценка всхожести семян на фильтровальной бумаге

- семена из анализируемого образца после специальной обработки помещают во влажные условия для набухания и проращивания (режим температуры и света устанавливают в зависимости от видовых особенностей семенного материала);
- результаты проращивания семян и наблюдений за динамикой развития сеянцев регистрируют в учётных документах и с помощью фотографии.

13.4.3. Оценка всхожести семян в асептических условиях (на жидкой или на агаризованной питательной среде)

- семена из анализируемого образца подготавливают и обрабатывают стерилизующими растворами в соответствии с СОП №9;
- после асептической обработки семена высевают на искусственную питательную среду (жидкую или агаризованную) и культивируют *in vitro* с использованием

световых и температурных режимов в соответствии с видовыми особенностями семенного материала;

- результаты проращивания семян и наблюдений за динамикой развития сеянцев регистрируют в учётных документах и с помощью фотографии.

13.4.4. Оценка активности ферментов дыхания (дегидрогеназ) семян с помощью ТТХ-теста

- семена после набухания погружают в раствор ТТХ (трифенилтетразолий хлорид) в фосфатном буфере (рН=7,5) и помещают в темноту при 25-28°C;
- регистрируют результаты ТТХ-теста (интенсивность окрашивания семян в красный цвет формазаном, который получается из трифенилтетразолий хлорида в результате реакции восстановления катализируемой дегидрогеназами);
- результаты теста, используют для предварительной оценки жизнеспособности семенного материала.

13.4.5. Оценка активности эстераз в тканях семян с помощью флуоресцеин диацетата

- семена после набухания погружают в 0,2-0,25% раствор ФДА (флуоресцеин диацетат) на 10-30 мин при 23±2°C;
- регистрируют результаты ФДА-теста с помощью флуоресцентного микроскопа (зелёное свечение живых тканей семян в синих лучах: 450–490 нм, которое образуется в результате реакции ФДА и эстераз);
- результаты теста, используют для оценки жизнеспособности семенного материала.

13.5. Оценка криоустойчивости семенного материала

- подготовленные для криосохранения семена из анализируемого образца помещают в маркированные криоампулы и замораживают быстро (погружением в жидкий азот) или медленно с использованием программируемого оборудования (режимы охлаждения в зависимости от особенностей коллекционных образцов);
- после процедуры замораживания криоампулы с тестируемым семенным материалом размещают в штативах и этажерках для кратковременного тестового сохранения в жидком азоте или его парах (биологические криохранилища) на срок не менее 1 часа;
- схема размещения анализируемого материала регистрируется в учётных документах;
- после кратковременного криосохранения проводят тестирование жизнеспособности семенного материала в соответствии с инструкцией (раздел 13.14.).

13.6. Размещение криоампул с семенами в криохранилище для долговременного хранения

- маркированные ампулы с образцами семян, уровень криоустойчивости которых превышает 30%, размещают в специализированных криогенных хранилищах (криобанк) для долговременного сохранения;
- размещение в хранилище и характеристики семян из протестированных образцов регистрируют в учётных документах криобанка;
- в ходе долговременного криосохранения жизнеспособность образцов периодически проверяют, используя методы, указанные в паспорте образца.

13.7. Регистрация нового коллекционного образца в каталоге КБР ИФР РАН и мониторинг жизнеспособности семян в ходе долговременного криосохранения

- для образца семян, уровень криоустойчивости которых достаточен для долговременного хранения в криобанке, составляют коллекционный паспорт в соответствии с принятой формой;
- в учётных электронных документах регистрируют размещение криоампул с новым коллекционным образцом, систематическую принадлежность материала, место и дату сбора семенного материала, дату замораживания, влажность и данные теста жизнеспособности;
- в электронных документах и паспорте образца регистрируют все возможные перемещения образца, а также данные мониторинга жизнеспособности в ходе криосохранения и библиографические данные публикаций с информацией о данном коллекционном образце.

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 13. подготовлены ст.н.с., к.б.н. О.Н. Высоцкой.

СОП № 14. Криосохранение вегетативного растительного материала, устойчивого к замораживанию

14.1. Материалы и оборудование

- хранилище биологическое или сосуд Дьюара, дополненное оборудованием для размещения и перемещения этажерок с коллекционными образцами;
- сосуды Дьюара для перемещения коллекционных образцов;
- водяная баня для размораживания коллекционных образцов;
- этажерки металлические и штативы для размещения пробирок с коллекционными образцами;
- криопробирки;
- маркеры специальные;
- маркировочные плёнки;
- пинцеты, скальпели;
- чашки Петри;
- фильтры бумажные (90, 50 мм в диаметре);
- бинокулярный микроскоп;
- питательные среды для подготовки и восстановления растительного материала;
- криопротекторы;
- верифицированный протокол криосохранения специфичный для каждого вида растительного материала (патенты РФ №№ 2220563; 2248121; 2302107);
- фото и компьютерное оборудование для регистрации коллекционных образцов;
- программное обеспечение для учёта коллекционных образцов;
- другое оборудование и материалы, необходимые для определения жизнеспособности и для восстановления сохраняемого в криобанке растительного материала (СОПы №№ 1,2,3,4,5,6,7,8,9);
- образцы растительного материала клонированного *in vitro*.

14.2. Составление описания образца растительного материала для регистрации в коллекции КБР ИФР РАН

- образец регистрируют в учётных документах криобанка после оценки его криоустойчивости с помощью методов разработанных ранее и специфичных для данного вида растительного материала;
- в паспорте криобанка указывают информацию о систематической принадлежности данного коллекционного образца, происхождении, дате и месте сбора, дате введения в культуру *in vitro*, методе и дате замораживания, данные теста криоустойчивости и шифр размещения в криохранилище;
- информацию о перемещениях коллекционных образцов и манипуляциях с ним, а также операторах выполнявших работу с образцом, указывают в электронных материалах учёта.

14.3. Размножение растительного материала *in vitro*

- растительный материал, перед криосохранением размножают *in vitro* для получения активно растущей культуры без визуальных признаков присутствия микроорганизмов;
- клоны растительного материала, отличающиеся активным ростом, отбирают для криосохранения.

14.4. Подготовка образцов растительного материала к замораживанию в жидком азоте

- растительный материал, отобранный для криосохранения, подготавливают к замораживанию с помощью разработанных и проверенных ранее методов;
- после подготовки к замораживанию, определяют влажность растительного материала с помощью термогравиметрического метода;
- подготовленный к замораживанию материал в асептических условиях помещают в маркированные криопробирки и замораживают тестированным ранее методом, в соответствии технологией криосохранения выбранной ранее для данного образца растительного материала;
- образцы растительного материала в пробирках размещают в криогенном хранилище биологического материала для кратковременного хранения.

14.5. Оценка криоустойчивости культивируемого *in vitro* растительного материала

Жизнеспособность культивируемого *in vitro* растительного материала после криогенного воздействия оценивают с помощью специальных методов (ТТХ, ФДА, контрастное окрашивание и др.) или по данным посткриогенного восстановления роста и развития.

14.5.1. Оценка жизнеспособности меристематических тканей культивируемого *in vitro* растительного материала по активности ферментов дыхания (дегидрогеназ) с помощью ТТХ–теста

- участки растительного материала содержащие меристематические ткани погружают в раствор ТТХ (трифенилтетразолий хлорид) в фосфатном буфере (рН=7,5) и помещают в темноту при 25-28°C;
- регистрируют результаты ТТХ-теста (интенсивность окрашивания меристематических тканей в красный цвет формазаном, который получается из трифенилтетразолий хлорида в результате реакции восстановления катализируемой дегидрогеназами);
- результаты теста, используют для предварительной оценки жизнеспособности растительного материала.

14.5.2. Оценка жизнеспособности растительного материала методом с помощью окрашивания флуоресцеиндиацетатом (ФДА)

- анализируемые ткани растений погружают в 0,005-0,01% раствор ФДА (флуоресцеин диацетат, приготовленный с использованием ацетона) на 10-30 мин при 23±2°C;

- регистрируют результаты ФДА-теста с помощью флуоресцентного микроскопа (зелёное свечение клеток живых тканей в синих лучах: 450–490 нм, которое образуется в результате реакции ФДА и эстераз);
- результаты теста, используют для оценки жизнеспособности растительного материала.

14.5.3. Оценка жизнеспособности методом наблюдения за восстановлением роста и развития *in vitro*

- растительный материал помещают на питательную среду и культивируют в течение 7-10 дней *in vitro* в соответствии с видовыми особенностями анализируемых образцов, но при пониженном уровне освещённости (0,5 клк) и температуре 20±2°C;
- после 7-10 дней растительный материал можно переносить в обычные для данного образца условия культивирования;
- в ходе визуального наблюдения за анализируемыми образцами регистрируют все изменения, которые происходят с растительным материалом в процессе культивирования, в том числе с использованием микроскопического, фото и видео оборудования;
- результаты наблюдений регистрируют в учётных документах.

14.6. Размещение криоампул с образцами криоустойчивого растительного материала в криохранилище для длительного хранения

- криоампулы с растительным материалом, криоустойчивость которого была подтверждена экспериментально ранее (раздел 14.5), из кратковременного хранения переводят в режим длительного хранения;
- в учётных документах (электронном каталоге и паспорте образца) криобанка отмечают место постоянного хранения, шифр образца, результаты теста на жизнеспособность и указывают условия необходимые для восстановления роста и развития данного растительного материала.

14.7. Мониторинг жизнеспособности растительного материала в ходе длительного криосохранения

- растительный материал для проверки жизнеспособности извлекают из тестируемого образца в криохранилище (из одной ампулы или из каждой ампулы с коллекционным образцом);
- растительный материал оттаивают в соответствии с требованиями, предусмотренными конкретной технологией замораживания для данного коллекционного образца;
- жизнеспособность растительного материала из анализируемого образца оценивают предварительно с помощью методов окрашивания или с помощью метода восстановления роста и развития *in vitro* (14.5 раздел);
- дату и результаты тестирования регистрируют в учётных документах криобанка (каталог и паспорт).

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 14. подготовлены ст.н.с., к.б.н. О.Н. Высоцкой.

СОП № 15. Криосохранение образцов клеток суспензионных культур растений, устойчивых к замораживанию

15.1. Материалы и оборудование

- хранилище биологическое или сосуд Дьюара, дополненное оборудованием для размещения и перемещения этажерок с коллекционными образцами;
- сосуды Дьюара для перемещения коллекционных образцов;
- водяная баня для размораживания коллекционных образцов;
- этажерки металлические и штативы для размещения пробирок с коллекционными образцами;
- криопробирки;
- маркеры специальные;
- маркировочные плёнки;
- пинцеты, скальпели;
- чашки Петри;
- фильтры бумажные (90, 50 мм в диаметре);
- биноклярный микроскоп;
- питательные среды для подготовки и восстановления растительного материала;
- криопротекторы;
- верифицированный протокол криосохранения специфичный для каждого вида растительного материала (А.С. СССР №№ 865245, 1097875, 114673, 1440137, 1522006);
- фото и компьютерное оборудование для регистрации коллекционных образцов;
- программное обеспечение для учёта коллекционных образцов;
- другое оборудование и материалы, необходимые для определения жизнеспособности и для восстановления сохраняемого в криобанке растительного материала (СОПы №№ 1,2,3,4,5,6,7,8,9);
- образцы растительного материала: культуры клеток или каллусов.

15.2. Составление паспорта образца для культуры клеток растений при регистрации в коллекции КБР ИФР РАН

- регистрируют в учётных документах криобанка основные характеристики растительного материала: систематическая принадлежность, морфологические и физиологические особенности и происхождение;
- описывают условия и методы культивирования образца суспензионной или каллусной культуры клеток;
- подробно описывают метод криосохранения, который был использован для данного растительного материала;
- указывают результаты теста на криоустойчивость данного образца;
- описывают условия восстановления роста конкретного образца растительного материала.

15.3. Подготовка образцов клеток суспензионных культур растений к замораживанию в жидком азоте

- для криосохранения отбирают растительный материал, отличающийся высокой жизнеспособностью;
- при необходимости растительный материал фракционируют, отбирая для замораживания мелкие эмбрионные клетки;
- обрабатывают растительный материал криопротекторами в соответствии с протоколом замораживания, разработанного для данного образца;
- помещают подготовленные к замораживанию образцы в маркированные криоампулы;

- охлаждают растительный материал в криоампулах до ультранизких температур: медленно (программируемое оборудование) или быстро погружая в жидкий азот.

15.4. Оценка криоустойчивости образцов клеток суспензионных и каллусных культур растений

15.4.1. Предварительная оценка криоустойчивости:

- ТГХ тест,
- ФДА тест,
- окрашивание феносафранином;
- окрашивание метиленовой синью;
- метод контрастного окрашивания
- другие методы с использованием окрашивания живых и/или мёртвых клеток.

15.4.1. Заключительная оценка криоустойчивости

- оценка жизнеспособности методом восстановления роста *in vitro* после криогенного замораживания и кратковременного криосохранения;
- оценка жизнеспособности методом восстановления роста *in vitro* после криогенного замораживания и длительного криосохранения.

15.5. Размещение криоампул с образцами клеток суспензионных и каллусных культур растений в криохранилище для длительного хранения

- криоампулы с растительным материалом, криоустойчивость которого была подтверждена экспериментально ранее (раздел 14.5), из кратковременного хранения переводят в режим длительного хранения;
- в учётных документах (электронном каталоге и паспорте образца) криобанка отмечают место постоянного хранения, шифр образца, результаты теста на жизнеспособность и указывают условия необходимые для восстановления роста и развития данного растительного материала.

15.6. Мониторинг жизнеспособности клеток суспензионных и каллусных культур растений в ходе длительного криосохранения

- растительный материал для проверки жизнеспособности извлекают из тестируемого образца в криохранилище (одна ампула из каждого коллекционного образца);
- растительный материал оттаивают в соответствии с требованиями, предусмотренными конкретной технологией замораживания для данного коллекционного образца;
- жизнеспособность растительного материала из анализируемого образца оценивают предварительно с помощью методов окрашивания или с помощью метода восстановления роста и развития *in vitro*;
- дату и результаты тестирования регистрируют в учётных документах криобанка (каталог и паспорт).

Исполнители:

- младший научный сотрудник,
- научный сотрудник,
- старший научный сотрудник

Материалы для СОП № 15. подготовлены н.с. С.В. Евсюковым; ст.н.с., к.б.н. О.Н. Высоцкой.
