ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВИНОГРАДАРСТВА И ВИНОДЕЛИЯ "МАГАРАЧ" РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН")

УДК 633/635:631.52
№ госрегистрации АААА-А17-117112340092-9
Инв. №

«УТВЕРЖДАЮ»
Врио директора ФГБУН
"ВННИИВиВ "Магарач"РАН"
доктор сельскохозяйственных
наук, профессор
_____М.Н.Борисенко
"26" декабря 2017 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013–2020 годы

148. Поиск, мобилизация и сохранение генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей в целях изучения, сохранения и использования биоразнообразия форм культурных растений.

ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ И РАЗВИТИЕ АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ МАГАРАЧ
(заключительный)

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0833-2017-0002

Протокол Ученого совета
№ 6 от 11.12.2017 г.

Зам. директора
по научно-организационной работе,
д-р с.-х. наук, ст. науч. сотр.
_____Н.В.Алейникова
«10» декабря 2017 г.

Научный руководитель
Гл. науч. сотр. отд. селекции,
генетики винограда и ампелографии,
д-р с.-х. наук, проф.
_____В.А. Волынкин
«10» декабря 2017 г.

Ялта – 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р с.-х. наук, проф.	10.12.2017 подпись, дата	В.А.Волынкин
Исполнители темы		
д-р с.-х. наук, проф.	10.12.2017 подпись, дата	А.А.Зармаев
вед. н. с., канд. с.-х. наук	10.12.2017 подпись, дата	А.А.Полулях
с. н. с., канд. с.-х. наук	И.Васылык 10.12.2017 подпись, дата	И.А.Васылык
н. с., канд. с.-х. наук	10.12.2017 подпись, дата	Я.А.Волков
зав. сектором МГИ, канд. биол. наук	10.12.2017 подпись, дата	С.М.Гориславец
вед. н. с., канд. биол. наук	10.12.2017 подпись, дата	В.И.Рисованная
вед. н. с., канд. биол. наук	10.12.2017 подпись, дата	И.А.Павлова
м.н.с., канд. с.-х. наук	10.12.2017 подпись, дата	В.А.Володин
м.н.с.	10.12.2017 подпись, дата	А.А.Колосова
агроном	10.12.2017 подпись, дата	А.М.Чижова
нормоконтролер	10.12.2017 подпись, дата	Е.В.Дерновая

РЕФЕРАТ

Отчет 113 с., 1 ч., 4 рис., 3 табл., 12 источников, 17 прил.

ВИНОГРАД, АМПЕЛОГРАФИЧЕСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ, ФЕНОТИПИРОВАНИЕ, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ПАТОГЕНЫ, ОЗДОРОВЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ, ГЕНИСТОЧНИКИ

Объект исследования – биоресурсная коллекция «Ампелографическая коллекция Магарач».

Цель работы – поддержание биоресурсной коллекции «Ампелографическая коллекция Магарач».

Результаты. В рамках выполнения государственного задания были проведены следующие работы: 1) Разработан технологический паспорт «Ампелографическая коллекция Магарач» (АК "Магарач") ФГБУН ВННИИВиВ "Магарач" РАН, содержащий: а) описание исчерпывающего набора СОПов для поддержания и развития коллекции; б) научно-техническое обоснование смет СОПов. 2) Технологический паспорт АК "Магарач" размещен на интернет-сайте АК "Магарач" ФГБУН ВННИИВиВ "Магарач" РАН. 3) Проведена экспериментальная верификация разработанных СОПов. 4) Результаты верификации СОПов записаны в электронной базе АК "Магарач" ФГБУН ВННИИВиВ "Магарач" РАН. 5) Выполнена фенотипическая и молекулярно-генетическая оценка образцов АК "Магарач" и выделены 6 новых генисточников хозяйственно-ценных признаков: а) получены ДНК профили 20 образцов винограда на основе анализа 6 микросателлитных локусов в соответствии с разработанными СОП, б) проанализировано молекулярными методами у 40 образцов наличие латентной формы бактериального рака (*Agrobacterium tumefaciens*) и фитоплазмы (*Bois noir*), из них 20 образцов проанализированы также по комплексу вирусных фитопатогенов и в образце сорта винограда Павло изюм были выявлены латентные формы вируса скручивание листьев винограда (*GLRaV-1*) и вируса ямчатости древесины Кобера (*GVA*), в) образец был оздоровлен по разработанной СОП. 6) Электронный каталог АК "Магарач" пополнен информацией по 50 сортам винограда. 7) Опубликованы на основе материалов коллекции три статьи в рецензируемых журналах (РИНЦ). 8) Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания. 9) Отчет о проделанной работе размещен на интернет-сайте АК "Магарач" ФГБУН ВННИИВиВ "Магарач" РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

Прогнозные предположения о развитии объекта исследования: в дальнейшем планируются работы по поддержанию коллекции, расширению фондов и оказание услуг по запросам.

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения 6
Введение 7
Основная часть 10
1 Общая информация о коллекции 10
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания 11
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование 11
4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания 12
Заключение 26
Список использованных источников 27
Приложение А. Характеристика изученных автохтонных сортов винограда Крыма 28
Приложение Б. Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы 41
Приложение В Технологический паспорт Ампелографической коллекции Магарач 44
Приложение Г Стандартная операционная процедура «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» (определение заполняемости коллекции и определение состояния жизнеспособности образцов) 48
Приложение Д Стандартная операционная процедура «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» (оценка по морфобиологическим признакам чистосортности или генетической идентичности растений, которыми представлены образцы коллекции) 52
Приложение Е Стандартная операционная процедура «Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам» 60
Приложение Ж Стандартная операционная процедура «Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков «Ампелографической коллекции «Магарач»…69
Приложение И Стандартная операционная процедура «Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач»… 77
Приложение К Стандартная операционная процедура «Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты ДНК)»……81
Приложение Л Стандартная операционная процедура «Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для тестирования Agrobacterium sp.»…… 85
Приложение М Стандартная операционная процедура «Экстракция рибонуклеиновой кислоты (РНК)»……...…… 89

Приложение Н Стандартная операционная процедура «Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК)»…….…….93
Приложение П Стандартная операционная процедура «Получение комплементарной ДНК (кДНК)»……..96
Приложение Р Стандартная операционная процедура «Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)»……..99
Приложение С Стандартная операционная процедура «Оценка нуклеиновых кислот и результатов ПЦР методом гель-электрофореза»……104
Приложение Т Стандартная операционная процедура «Идентификация сортов винограда методом фрагментного анализа»……..108
Приложение У Стандартная операционная процедура «Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием метода *in vitro*»……..111

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АК «Магарач» - Ампелографическая коллекция «Магарач»

Бактерии или вирусы, вызывающие заболевания растений, называются фитопатогенными.

кДНК –комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

ОТ ПЦР -полимеразная цепная реакция с обратной транкрипцией

ПЦР –полимеразная цепная реакция

РНК –рибонуклиотидная кислота

СОП – стандартная операционная процедура

ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН

EURISCO - The European Search Catalogue for Plant Genetic Resources (Европейский каталог генетических ресурсов растений).

GLRaV – вирус скручивания винограда

GVA–вирус А винограда (ямчатость древесины Кобера)

GVB–вирус В винограда (вирус опробковения коры)

RWC –комплекс бороздчатости древесины винограда

V. vinifera L. - *Vitis vinifera* L.

V.v. orientalis Negr. - *Vitis vinifera* convar. *orientalis* Negr.

V. v. sativa D.C. - *Vitis vinifera ssp. sativa* D.C.

ВВЕДЕНИЕ

Генетические ресурсы растений сохраняются в коллекциях различного типа, но наиболее традиционно генофонд винограда сохраняется в полевых ампелографических коллекциях [1]. Эти коллекции необходимо поддерживать в различных эколого-географических условиях, в связи с возможной реакцией растений винограда, различных геномов, на условия произрастания и возможностью потери генетически уникальных образцов в отдельных регионах мира [2].

Ампелографическая коллекция ВННИИВиВ "Магарач" находится в Крыму, который по ранее проведенным исследованиям может относиться к субочагам происхождения образцов винограда и на которой собраны автохтонные сорта винограда Крыма [3]. В связи со своей генетической и биологической уникальностью целесообразно изучать и сохранять на Ампелографической коллекции Магарач в первую очередь именно автохтонные сорта винограда Крыма, на что было направлено выполнение в 2017 году ДГЗ "Инвентаризация и развитие Ампелографической коллекции Магарач".

Общие подходы изучения генетических ресурсов винограда, строятся на фенотипировании по морфобиологическим признакам и генотипировании образцов по молекулярно-генетическим маркерам. Особенно опасна ситуация с распространением вирусных и фитоплазменных патогенов для ампелографических коллекций, которые являются не только уникальным хранилищем генетических ресурсов винограда, но и страховым фондом его биоразнообразия. В настоящее время выявление таких патогенов возможно с использованием молекулярных методов, таких как ПЦР. В России, как и в Европе выполнены широкие исследования по молекулярной диагностике фитопатогенов, однако на ампелографической коллекции «Магарач» подобные исследования не проводились [4, 5, 6]. Молекулярные методы на сегодняшний день занимают лидирующее положение и в области идентификации и сертификации сортов различных культур растений [7, 8]. В связи с изложенным выполнение исследований по ДНК типированию и молекулярной диагностике фитопатогенов на АК «Магарач» актуально.

Сохранение образцов винограда ампелографических коллекций предполагает не только дублирование за счет вегетативного размножения, но и предварительного оздоровления от фитопатогенной инфекции, которая может сохраняться в образцах винограда в латентной форме и может быть тестирована с помощью ПЦР анализа с целью диагностики.

Технология микроклонального размножения часто сопровождается оздоровлением растений. Небольшой размер первичного эксплантата, его поверхностная стерилизация, асептическое культивирование в условиях, исключающих повторное инфицирование,

оздоравливает получаемые растения от нематод и бактериальных патогенов. В сочетании с термо- и химиотерапией метод микроклонального размножения в большинстве случаев дает возможность избавиться и от вирусов, вироидов и микоплазм [9, 10, 11].

Наиболее эффективный для оздоровления от вирусов способ, основанный на культивировании апикальных меристем. Дистальная часть ее представлена апикальной меристемой, а дифференцирующие клетки, образующие проводящую систему расположены ниже. Такое строение исключает проникновение в меристематические клетки вируса за счет быстрого транспортирования по проводящей системе [12].

Цель работы – инвентаризация, идентификация и паспортизация генофонда винограда Ампелографической коллекции "Магарач" по комплексу морфобиологических признаков и молекулярно-генетическим маркерам; тестирование образцов на наличие фитопатогенов и их оздоровление; выделение исходного материала для селекции винограда.

Задачи:

1) Создать Технологический паспорт Ампелографической коллекции "Магарач", который включает в себя:

а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда;

б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур Ампелографической коллекции "Магарач".

2) Разместить Технологический паспорт Ампелографической коллекции "Магарач" на интернет-сайте ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

3) Экспериментально верифицировать разработанные СОПы:

1. Инвентаризация «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН (определение заполненности коллекции и определение состояния жизнеспособности образцов)

2. Инвентаризация «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» (оценка по морфобиологическим признакам чистосортности или генетической идентичности растений, которыми представлены образцы коллекции)

3. Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам.

4. Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков «Ампелографической коллекции «Магарач»

5. Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач».

6. Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

7. Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для тестирования *Agrobacterium*

8. Экстракция рибонуклеиновой кислоты (РНК).

9. Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК).

10. Получение комплементарной ДНК (кДНК).

11. Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР).

12. Оценка нуклеиновых кислот и результатов ПЦР методом гель-электрофореза.

13. Идентификация сортов винограда методом фрагментного анализа.

14. Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием методов *in vitro.*

4) Записать результаты верификации СОПов в электронной базе «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

5) Пополнить электронный каталог «Ампелографической коллекции «Магарач» паспортами 50 образцов винограда АК "Магарач" (по их генеалогии и географическому происхождению, видовой принадлежности, наличию синонимов).

6) Подготовить две статьи в рецензируемых журналах (РИНЦ), на основе материалов коллекции.

7) Подготовить календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

8) Разместить отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

В целом, поставленные цели и задачи дают необходимую базу для функционирования «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

Настоящий отчет является заключительным по теме «Инвентаризация и развитие «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» за 2017 год.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции: Ампелографическая коллекция «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

1.2 Наименование организации ФАНО России – держателя коллекции: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», 298600, Россия, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31.

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 833.00.В0215

1.4 Направление ФНИ: Растениеводство. 148. Поиск, мобилизация и сохранение генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей в целях изучения, сохранения и использования биоразнообразия форм культурных растений.

1.5 Руководитель коллекции, поддерживающий коллекцию:

Зармаев Али Алхазурович,

Начальник отдела селекции, генетики винограда и ампелографии,

доктор сельскохозяйственных наук, профессор

e-mail: ali5073@mail.ru; select_magarach@ukr.net; selectmagarach@mail.ru

тел. (3654)32-79-43; факс (3654)23-06-08; моб. тел. +7 978 217 33 24.

1.6 Назначение коллекции: сохранение генофонда винограда, ведение, пополнение и рациональное использование биологического разнообразия мирового генофонда винограда, который представляет научный и практический интерес для селекции, виноградарства и виноделия.

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП/УНУ «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации»: Есть.

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП/УНУ на сайте http://www.ckp-rf.ru: Ампелографическая коллекция «Магарач», реестровый номер 463400, http://ckp-rf.ru/ckp/463400/.

1.9 Дата образования коллекции: Дата образования коллекции: Формирование Ампелографической коллекции «Магарач» начинается в 1814 г. на землях Никитского ботанического сада, позднее в 1828 году была передана в ведение "Магарач", при его образовании, после чего последняя основная перезакладка коллекции осуществлялась в 1978-1988 гг. на землях опытного хозяйства "Магарач".

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: есть

1.11 Положение о коллекции, утверждено на Ученом совете ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН": протокол № 7 от 23.11.2016 г.

1.12 Адрес WEB-сайта ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН", на котором представлена информация о коллекции: http://magarach-institut.ru/institut/naczionalnaya-ampelograficheskaya-kollekcziya.html.

2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного госзадания

2.1 Текст Отчета представлен на:

а) WEB-сайте организации: http://magarach-institut.ru/institut/naczionalnaya-ampelograficheskaya-kollekcziya.html.

б) Информационном портале БРК:

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН: "Идентификация и паспортизация генофонда ампелографической коллекции по фенотипическим признакам и молекулярно-генетическим маркерам на основе оценки аллельного полиморфизма. Тестирование образцов коллекции на наличие бактериальных и вирусных фитопатогенов, выделенный исходный материал для селекции винограда.

3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0833-2017-0002

3.2 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе ЦИТИС: АААА-А17-117112340092-9

3.3 Отчет по дополнительному госзаданию 0833-2017-0002 подготовлен и загружен в систему Парус

3.4 Отчет по дополнительному госзаданию 0833-2017-0002 подготовлен и загружен в систему ЦИТИС

3.5 Объём финансирования, выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году *(Соглашение № 007-ГЗ/В0215/833/1)*

3.6 Объём финансирования, выделенного на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 г.

4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

4.1 Разработан Технологический паспорт Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» (Приложение В), содержащий:

а) описание полного набора ключевых стандартных операционных процедур (СОП), обеспечивающих развитие и поддержание коллекционного фонда Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»;

б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

Технологический паспорт размещен на интернет-сайте ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН", на котором представлена информация о коллекции: http://magarach-institut.ru/institut/naczionalnaya-ampelograficheskaya-kollekcziya.html. СОПы находятся в Приложениях Г – У, ниже приведены их названия:

- Приложение Г Стандартная операционная процедура «Инвентаризация «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН (определение заполненности коллекции и определение состояния жизнеспособности образцов)».

- Приложение Д Стандартная операционная процедура «Инвентаризация «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» (оценка по морфобиологическим признакам чистосортности или генетической идентичности растений, которыми представлены образцы коллекции)».

- Приложение Е Стандартная операционная процедура «Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам».

- Приложение Ж Стандартная операционная процедура «Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков «Ампелографической коллекции «Магарач»».

- Приложение И Стандартная операционная процедура «Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач».

- Приложение К Стандартная операционная процедура «Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)».

- Приложение Л Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для тестирования *Agrobacterium*

- Приложение М Стандартная операционная процедура «Экстракция рибонуклеиновой кислоты (РНК)».

- Приложение Н Стандартная операционная процедура «Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК)».
- Приложение П Стандартная операционная процедура «Получение комплементарной ДНК (кДНК)».
- Приложение Р Стандартная операционная процедура «Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

- Приложение С Стандартная операционная процедура «Оценка результатов ПЦР методом гель-электрофореза».

- Приложение Т Стандартная операционная процедура «Идентификация сортов винограда методом фрагментного анализа».

- Приложение У Стандартная операционная процедура «Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием методов *in vitro*».

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих развитие и поддержание Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН, были собраны данные об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ по перечисленным ниже направлениям деятельности коллекции:

1) Выполнение стандартных операционных процедур (СОП).
2) Выполнение научно-исследовательских работ.
3) Общее содержание коллекции.

Собранные данные были использованы для расчета стоимости выполнения 14 СОП, величины накладных расходов на содержание коллекции и необходимого годового объема финансирования.

Расчеты проводились в соответствии с моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций». Полный набор данных представлен на портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России».

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ, которые запланированы для выполнения работ по содержанию и развитию коллекции и запланированы для обеспечения накладных расходов на работу на коллекции.

4.2 Экспериментальная верификация СОПов

4.2.1 Проведена экспериментальная верификация СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» (определение заполняемости коллекции и определение состояния жизнеспособности образцов) (Приложение Г) на примере 500 образцов Ампелографической коллекции «Магарач». Установлено, что количество жизнеспособных растений (кустов) составляет 2790, количество отсутствующих растений (кустов) составляет 2210, полностью отсутствуют – 32 образца. Полученная информация для каждого из 500 образцов занесена в каталог учета образцов ампелографической коллекции «Магарач», где указывается название образца, его номер в коллекции, адрес расположения в полевой коллекции, количество жизнеспособных растений, которыми представлен образец.

4.2.2 Проведена экспериментальная верификация СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» (оценка по морфобиологическим признакам чистосортности или генетической идентичности растений, которыми представлены образцы коллекции) (Приложение Д) на примере 500 образцов Ампелографической коллекции «Магарач». В результате установлено:

- 13 образцов АК "Магарач", морфобиологические признаки которых, включающие признаки молодого и одревесневшего побега, молодого и сформировавшегося листа, цветка, соцветия, грозди, ягоды, семени, фенологические и агробиологические характеристики не соответствуют признакам, заявленным в их ампелографических описаниях;

- 25 растений у 25 образцов винограда по комплексу морфобиологических признаков не идентичны растениям, которыми представлен основной сорт;

- количество растений подвоя Кобер 5ББ составляет 125 кустов.

4.2.3 Проведена экспериментальная верификация СОП «Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам» (Приложение Е) на примере 40 автохтонных сортов винограда Крыма АК "Магарач". В результате получено описание 40 автохтонных сортов винограда Крыма АК "Магарач" по комплексу морфобиологических признаков (Приложение А, таблица А.1), и установлена их полная идентичность названиям и описанию, имеющемуся в ампелографии и каталогах сортов винограда.

4.2.4 Проведена экспериментальная верификация СОП «Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков «Ампелографической коллекции «Магарач» (Приложение Ж) на примере 40 автохтонных сортов винограда Крыма АК "Магарач".

Определены даты наступления основных фенологических 40 автохтонных сортах винограда Крыма АК "Магарач" (Приложение А, таблица А. 2).

Установлено, что по срокам созревания изученные сорта распределились следующим образом.

Сорта технического направления:

- сорта раннего срока созревания, вегетационный период у которых от начала распускания почек до технической зрелости ягод составил 143 дня: Фирский ранний;

- сорта среднего срока созревания, вегетационный период у которых от начала распускания почек до технической зрелости ягод составил 146-155 дней: Капитан Яни кара, Сары кокур, Сафта дурмаз, Солнечная долина 60, Демир кара, Павло изюм, Солнечная долина 16, Сых Дане, Морской 94, Сале аганын кара, Солнечная долина 31а, Тергульмек, Солнечная долина 41, Харко, Чивсиз Сары, Яных якуб, Хачадор, Чингине кара и Артин зерва;

- сорта среднепозднего срока созревания, вегетационный период у которых от начала распускания почек до технической зрелости ягод составил 156-158 дней: Солнечная долина 60, Джеват кара, Морской 19, Солнечная долина 71/7, Солнечнодолинский и Херсонесский.

Сорта столового направления:

- сорта среднего срока созревания, вегетационный период у которых от начала распускания почек до потребительской зрелости ягод составил 144-145 дней: Морской 75 и Дардаган;

- сорта среднепозднего срока созревания, вегетационный период у которых от начала распускания почек до потребительской зрелости ягод составил 153-155 дней: Манжил ал, Мускат крымский, Насурла, Аджем мискет и Яных зерва;

- сорта позднего срока созревания, вегетационный период у которых от начала распускания почек до потребительской зрелости ягод составил 157-161 день: Аксеит кара, Кирмизи сап судакский и Шабаш крупноягодный.

Сорта столово-винного направления:

- сорта среднего срока созревания, вегетационный период у которых от начала распускания почек до потребительской зрелости ягод составил 146-153 дней: Халиль изюм и Эмир Вейс;

- сорта среднепозднего срока созревания, вегетационный период у которых от начала распускания почек до потребительской зрелости ягод составил 157-158 дней: Черный крымский и Солнечная долина 40;

- сорт позднего срока созревания, вегетационный период у которого от начала распускания почек до потребительской зрелости ягод составил 161 день - Солнечная долина 58.

Определены показатели продуктивности 40 автохтонных сортах винограда Крыма АК "Магарач", которые приведены в Приложении А, таблице А. 3.

Дана оценка устойчивости 40 автохтонных сортах винограда Крыма АК "Магарач" к грибным болезням в условиях естественного инфекционного фона (Приложение А, таблица А. 4).

По результатам оценки 40 автохтонных сортов винограда Крыма АК "Магарач" по комплексу биолого-хозяйственных характеристик выделены 6 генисточников ценных признаков. Среди них столовые сорта: Дардаган, Кирмизи сап судакский; винные сорта: Солнечнодолинский, Капитан Яни кара и Фирский ранний; столово-винный сорт Черный крымский. Выделенные сорта рекомендуются для использования в селекционных программах как генисточники относительной устойчивости к грибным болезням винограда, способные давать стабильные урожаи в природно-климатических условиях Республики Крым.

4.2.5 Проведена экспериментальная верификация СОП «Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач» (Приложение И) на примере 50 образцов винограда Ампелографической коллекции "Магарач".

Для 50 образцов винограда заполнены паспортные данные, и в паспортной базе данных АК "Магарач" представлена информация по следующим полям:

- видовая принадлежность;
- синонимы;
- характеристика образца по происхождению – селекционный (родительские формы), местный и т.д.;
- характеристика образца по происхождению – учреждение - оригинатор (для селекционных сортов);
- характеристика образца по происхождению – авторы сорта (для селекционных сортов);
- происхождение образца, страна;
- происхождение образца, регион;
- год посадки в коллекцию (дата интродукции, реинтродукции, выбытия из коллекции).

Полученные паспорта 50 образцов винограда внесены в электронную паспортную базу данных АК «Магарач» размещенную на сайте: http://magarach-institut.ru/institut/naczionalnaya-ampelograficheskaya-kollekcziya.html.

4.2.6 Проведена экспериментальная верификация СОПов 6 – 13 по ДНК типированию (на 20 образцах) и молекулярной диагностики (не менее 40 образцов) фитопатогенов винограда.

Проведена экспериментальная верификация СОП идентификация сортов винограда методом фрагментного анализа на основе оценки полиморфизма микросателлитных локусов (nSSR) ssrVVS2, ssrVrZAG21, ssrVrZAG47, ssrVrZAG62, ssrVrZAG64, ssrVrZAG79, ssrVrZAG83, ssrVvUCH11, ssrVvUCH29 на примере 20 образцов. Полное название СОПов, на основе которых выполнена работа: «Стандартная операционная процедура по экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК») (Приложение К), Стандартная операционная процедура «Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК)» (Приложение Н), «Стандартная операционная процедура по выполнению полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Приложение Р)», «Стандартная операционная процедура по оценке нуклеиновых кислот и результатов ПЦР методом гель-электрофореза (Приложение С)» и «Стандартная операционная процедура по идентификации сортов винограда методом фрагментного анализа» (Приложение Т). Для верификации СОПов были использованы следующие сорта: Аджем мискет, Аксеит кара, Артин зерва, Дардаган, Демир кара, Капитан Яни кара, Насурла, Павло изюм, Сале аганын кара, Сары кокур, Сафта дурмаз, Солнечнодолинский, Сых дане, Тергульмек, Фирский ранний, Халиль изюм, Хачадор, Херсонесский, Черный крымский, Яных зерва. Для верификации СОПов ДНК экстрагирована из ткани листа без признаков патологии. Отношение А260/А280 для ДНК находится в пределах 1,6-1,9. ПЦР выполнена со специфическими праймерами (PR), при этом PR (F) вносится с флюорохромной меткой. Визуализация ПЦР-продуктов выполнена методом гель-электрофореза в 1.3% агарозном геле с использованием ПЦР – продуктов, контрольных образцов и маркера длин ДНК фрагментов (DNALadder 100 bp., DNALadder 1kb). Детекция положения и количественная оценка фрагментов ДНК выполнена на генетическом анализаторе ABI 3130. При оценке результатов фрагментного анализа изучаемых и референсных образцов установлены наличие и размер аллелей анализируемых локусов, на основе которых получены ДНК-профили образцов винограда (таблица 1).

Таблица 1 – ДНК профили сортов, включённых в исследования

№	Сорт	Микросателлитные локусы, п.н.											
		VVS2		ssrVrZAG 21		ssrVrZAG 47		ssrVrZAG 62		ssrVrZAG 64		ssrVrZAG 79	
1	Аджем мискет	144	146	190	200	165	167	193	203	141	159	242	250
2	Аксеит кара	136	142	190	198	157	163	187	199	139	143	246	250
3	Артин зерва	144	146	190	212	165	167	187	193	139	143	242	250
4	Дардаган	144	144	192	200	157	163	183	187	139	143	238	250
5	Демир кара	134	144	202	206	157	165	187	199	141	159	238	250
6	Капитан Яни кара	138	144	190	200	163	165	187	199	141	159	250	250
7	Насурла	132	142	190	202	157	159	187	203	141	159	254	258
8	Павло изюм	144	144	196	200	159	161	183	187	137	141	238	258
9	Сале аганын кара	138	138	190	200	157	163	183	187	159	163	242	258
10	Сары кокур	142	142	198	200	161	163	187	199	139	141	242	250
11	Сафта дурмаз	134	140	190	206	157	171	199	203	137	141	242	248
12	Солнечнодолинский	144	146	190	206	157	159	199	201	141	143	250	250
13	Сыхдане	144	146	198	206	159	165	199	201	143	159	250	258
14	Тергульмек	144	144	198	206	157	165	183	187	137	141	250	258
15	Фирский ранний	146	146	190	210	157	172	199	203	141	143	250	250
16	Халиль изюм	144	146	204	212	165	167	193	195	137	141	242	250
17	Хачадор	144	148	196	200	161	161	199	203	141	159	238	248
18	Херсонес-ский	142	144	190	200	159	165	187	193	137	163	250	250
19	Черный крымский	142	142	206	212	157	159	187	195	143	157	236	258
20	Яных зерва	144	146	198	206	163	163	187	203	159	159	242	250

На основе анализа матрицы генетических дистанций построена дендрограмма, отражающая дифференциацию изученной выборки 20 сортов (рисунок 1).

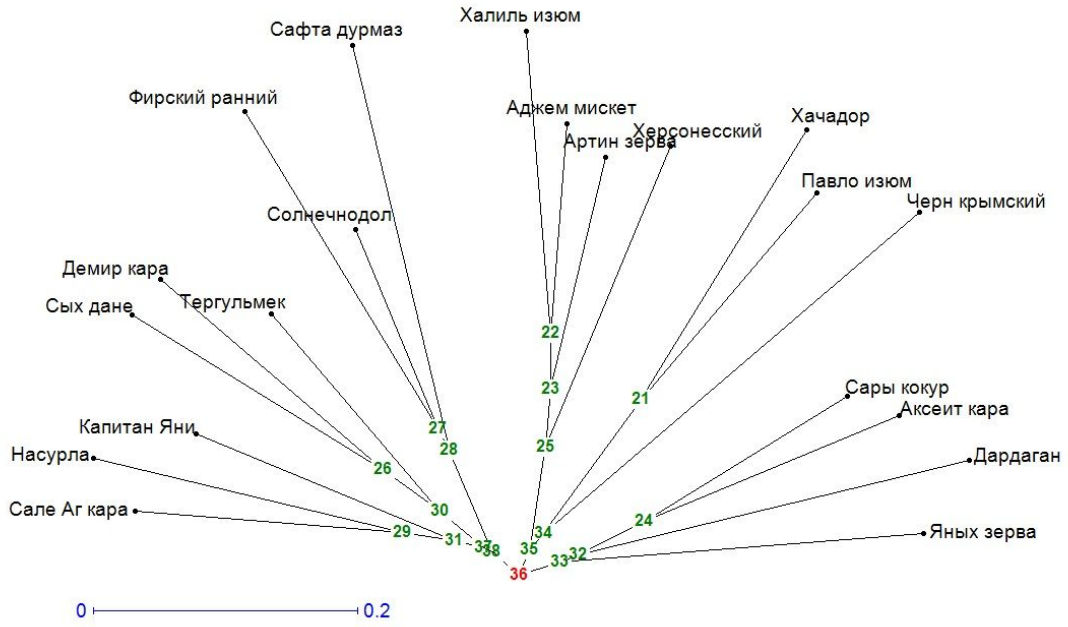

Рисунок 1 – Дендрограмма дифференциации 20 изученных автохтонных сортов винограда Крыма

Проведена экспериментальная верификация СОПов по диагностике вирусных и бактериальных фитопатогенов на примере 40 образцов сортов винограда. Полное название СОПов, на основе которых выполнена работа: «Стандартная операционная процедура по экстракции рибонуклеиновой кислоты (РНК)» (Приложение М), Стандартная операционная процедура «Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК)» (Приложение Н), «Стандартная операционная процедура по получению комплементарной ДНК (кДНК)» (Приложение П), «Стандартная операционная процедура по выполнению полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Приложение Р)», «Стандартная операционная процедура по оценке нуклеиновых кислот и результатов ПЦР методом гель-электрофореза (Приложение С)». Для верификации СОПов были использованы следующие сорта: Аджем мискет, Аксеит кара, Артин зерва, Дардаган, Демир кара, Капитан Яни кара, Насурла, Павло изюм, Сале аганын кара, Сары кокур, Сафта дурмаз, Солнечнодолинский, Сых дане, Тергульмек, Фирский ранний, Халиль изюм, Хачадор, Херсонесский, Черный крымский, Яных зерва, Джеват кара Кирмизи сап судакский, Манжил ал, Морской 19, Морской 75, Солнечная долина 16, Солнечная долина 31а, Солнечная долина 40, Солнечная долина 41, Солнечная долина 58,

Солнечная долина 60, Солнечная долина 71/7, Харко, Чивсиз сары, Чингине кара, Шабаш крупноягодный, Эмир Вейс, Яных якуб.

Экстракция РНК из растительной ткани 40 образцов выполнена с использованием экстрагирующего буфера Rottand Jelkman для последующего синтеза первой цепи кДНК и ПЦР в целях диагностики вирусных патогенов. Для последующей диагностики *Agrobacterium sp.* ДНК экстрагирована из бактериальной культуры, а для тестирования фитоплазмы из растительной ткани. Оценка качества выделенной РНК, ДНК определена на спектрофотометре «Biophotometerplus» в соответствии с рекомендациями СОП «Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК)» Отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм. ($A_{260/280}$) составило 1,8 – 2.0 для РНК и 1,6-1,9 для ДНК. Синтез первой цепи кДНК выполнен методом обратной транскрипции (ОТ). В результате синтезирована кДНК 40 образцов, которая была использована для проведения ПЦР со специфическими праймерами к вирусам комплекса скручивание листьев винограда *GLRaV-1, GLRaV-2 GLRaV-3*и комплекса бороздчатости *GVA*и *GVB.* Результаты визуализированны методом гель-электрофореза. В результате ПЦР-анализа в образце сорта винограда Павло изюм выявлены латентные формы вируса скручивание листьев винограда (*GLRaV-1*)и вируса ямчатости древесины Кобера (*GVA*).

В качестве примера ниже приведена электрофорегамма результата диагностики образцов на наличие латентной формы *GVA.* (рисунок 2).

12 34567 8 910 11 12 13 14 15 16 17 18 19(ПК) 20(НК)

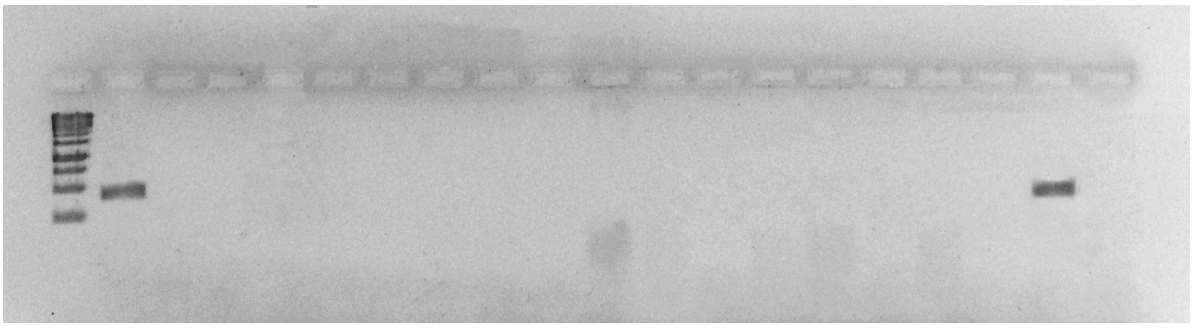

Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных к GVA: 1 – маркер молекулярной массы (1kbDNALadderMix, Fermentas); 20 – ОТ-ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы (негативный контроль); 19 –ОТ-ПЦР с ДНК-матрицей инфицированного растения (положительный контроль); 2-18 – ОТ-ПЦР с суммарной РНК, выделенной из исследуемых растений; 2 – образец сорта Павло изюм.

4.2.7 Проведена экспериментальная верификация СОП «Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием методов *in vitro*» (Приложение У) на примере 50 растений образца винограда сорта Павло изюм Ампелографической коллекции "Магарач".

Проведенное тестирование на поражение растительного материала автохтонных Крымских сортов вирусной инфекцией позволило выделить пораженный латентной формой скручивание листьев винограда-1 (*GLRaV-1*) и вируса ямчатости древесины Кобера (*GVA*) образец сорта винограда Павло изюм.

На Ампелографической коллекции «Магарач» заготовили зеленые пасынковые побеги с пораженного вирусной инфекцией куста сорта винограда Павло изюм в количестве 79 штук. В лабораторных условиях у побегов отделяли верхушки размером 2-2,5 см и помещали в стеклянные бюксы с крышкой. В условиях ламинарного бокса экспланты стерилизовали 70% этиловым спиртом 30-40 секунд и диоцидом 8-10 мин. Затем промывали дистиллированной водой 4-5 раз на протяжении 10-15 мин.

В стерильных условиях при помощи глазных пинцетов и скальпеля из побегов вычленяли апикальные меристемы с листовыми зачатками размером 0,5-0,8 мм, взятые с поля. Меристемы высаживали на мостики из фильтровальной бумаги в жидкую среду M_1 по одной меристеме (таблица 2). Культивировали при температуре 23-28 ^{0}С, в течение первой недели при освещенности 800-1000 лкс, а затем увеличивали освещение до 2-5 тыс. лкс.

Через 20-30 дней экспланты пересаживали на жидкую среду M_2. Через 14 дней в стерильных условиях верхнюю часть побега с 3-4 почкам образовавшиеся побеги отсекали и пересаживали на среду M_3. Процедуру повторяли 3-4 раза. Культивирование осуществляли на свету при 16-часовом фотопериоде интенсивностью 2-3тыс. люкс и температуре +27°С.

После нескольких пассажей материал отдали для повторного тестирования. Тестирование выявило образцы свободные от вирусной инфекции. Оздоровленные побеги в стерильных условиях высаживали на среду H_2 для укоренения. Культивирование осуществляли на свету при 16-часовом фотопериоде интенсивностью 2-3тыс. люкс и температуре +27°С.

Введено в условия *in vitro* 50 меристем размером 0,5-08 мм (таблица 3). Приживаемость по повторностям составила 54%. Частота множественного побегообразования была высокой, в среднем 5-6 побегов на эксплант (рисунок 3).

Таблица – 2 Прописи среды, использованных в процессе выполнения СОП

№ п\п	Компаненты среды	Варианты сред			
	Макроэлементы мг/дм^3	M_1	M_2	M_3	H_2
1.	NH_4NO_3	1650	1650	1650	212
2.	KNO_3	1900	1900	1900	717
3.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	370	370	233
4.	KH_2PO_4	170	170	170	68
5.	$CaCl_2$	331	331	331	356
	Fe-хелат (мг/	МС	МС	МС	$^{1\backslash 4}$МС
6.	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	27,8	27,8	7
7.	Na_2 ЭДТА $\cdot H_2O$	37,3	37,3	37,3	9,3
	Микроэлементы	МС	МС	МС	$^{1\backslash 4}$МС
8.	H_3BO_3	6,2	6,2	6,2	1,6
9.	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	24,1	24,1	24,1	6,0
10.	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	8,6	8,6	2,2
11.	KJ	0,83	0,83	0,83	0,21
12.	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,25	0,6
13.	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,006
14.	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,006
	Витамины				
15.	Мезо-инозит	75	75	75	50
16.	Тиамин-Cl	10	-	5,5	-
17.	Пиридоксин-Cl	-	5,8	5,8	-
18.	Никотиновая кислота	4	5,3	5,3	0,2
	Гормоны				
19.	6-бензиламинопурин (БАП)	1	2	1	-
20.	α-нафтилуксусная кислота (НУК)	-	-	-	0,1
	Аминокислоты				
21.	Глутамин	50	-	-	-
22.	Глицин	10			
	Другие вещества				
23.	Сахароза (г)	30	30	30	10
24.	Агар-агар(г)	-	-	-	7,5
25.	Гумат Na	-	-	-	-
	pH	5,0-5,2	5,0-5,2	5,0-5,2	5,6-5,8

*- Состав минеральных элементов по Мурасиге-Скугу (1962)

Таблица 3 – Результаты верификации СОП «Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием метода *in vitro.*

Повтор-ность	Кол-во первич-ных экспла н-тов, шт.	% инфи-цирования	Кол-во асептических мерис-тем, шт.	Размер мерис-темы, мм	% прижи-ваемо-сти меристем	Частота множест-венного побего-образова-ния, %	Частота укорене-ния побегов, %	% оздров-ленных растений
1.	34	32,4	23	0,5	47,8	90,9	89,9	21,7
2.	45	40,0	27	0,8	59,2	93,8	92,0	11,1
По повторностям	79	36,7	50	0,5-0,8	54,0	92,6	91,3	16,0

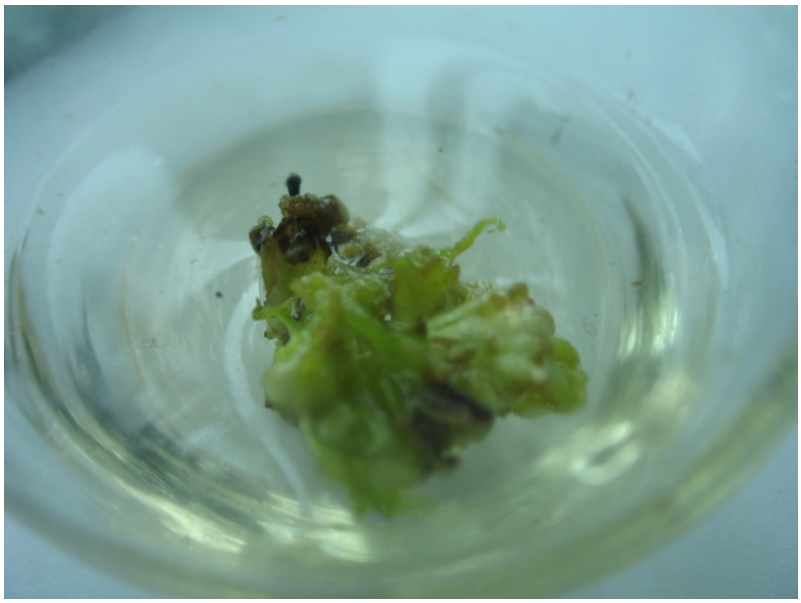

Рисунок 3 – Развитие побегов после второго пассажа на среде M_2

Повторное тестирование растений, полученных в результате стандартной операционной процедуры оздоровления, позволило выделить 7 образцов, не содержащих вирусной инфекции. Оздоровленные растения сорта Павло изюм поддерживаются в культуре тканей *in vitro* (рисунок 4).

Таким образом, в процессе верификации СОП проведено 7 пассажей, период операций занял 112 дней культивирования. В результате проведенной процедуры оздоровления растительного материала сорта винограда Павло изюм получен безвирусный материал данного сорта. Восемь оздоровленных растений поддерживаются в условиях *in vitro,* в дальнейшем растения будут размножены, адаптированы к условиям *in vivo* и высажены в полевые условия.

Рисунок 4 – Оздоровленное растение сорта Павло изюм

4.3 Запись результатов верификации СОПов в электронной базе ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН.

Результаты верификации СОПов внесены на сайт ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН", на котором представлена информация о коллекции: http://magarach-institut.ru/institut/naczionalnaya-ampelograficheskaya-kollekcziya.html.

4.4 Электронный каталог Ампелографической коллекции "Магарач" ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» пополнен информацией о 50 образцах коллекции. Обновленная версия каталога размещена на сайте ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН" http://magarach-institut.ru/institut/naczionalnaya-ampelograficheskaya-kollekcziya.html.

4.5 Подготовка статей в рецензируемых журналах

В соответствии с дополнительным государственным заданием на основе материалов коллекции подготовлены и напечатаны три статьи в рецензируемых журналах (РИНЦ):

1. Полулях А.А., Волынкин В.А., Зармаев А.А., Васылык И.А. Ампелографическая и агробиологическая характеристика автохтонного сорта винограда Крыма Крона // "Магарач". Виноградарство и виноделие. - 2017- N3. – С.12-15
2. Клименко В.П., Павлова И.А. Перспективы использования вегетирующей коллекции винограда in vitro для создания базисных маточников// "Магарач". Виноградарство и виноделие. - 2017- N3. – С.6-9.

3. Рисованная В.И., Володин В.А., Волков Я.А., Гориславец С.М. Оценка фитосанитарного состояния сортов винограда, поддерживаемых на ампелографической коллекции на основе анализа вирусных и бактериальных фитопатогенов // "Магарач". Виноградарство и виноделие. – 2017. - № 4. – С.16-18.

4.6 Подготовка календарного плана работ

Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания:

- Создание Технологического паспорта Ампелографической коллекции ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН», 30.09.2017;

- Экспериментальная верификация 14 СОПов, 30.09.2017;

- Промежуточный отчет о проделанной работе, 30.09.2017;

- Пополнение электронного каталога Ампелографической коллекции ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН дополненной информацией по 50 образцам, 15.12.2017;

- Направление в рецензируемые журналы (РИНЦ) не менее двух рукописей статей, подготовленных на основе материалов коллекции, 15.12.2017;

- Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания, 27.12.2017.

4.7 Размещение отчета.

Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте Ампелографической коллекции ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания (http://magarach-institut.ru/institut/naczionalnaya-ampelograficheskaya-kollekcziya.html).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ампелографическая коллекция Магарач ФГБУН ВННИИВиВ "Магарач" содержит 4120 образцов винограда. Представленная работа направлена на инвентаризацию, идентификацию, систематизацию и использование образцов винограда Ампелографической коллекции Магарач и на экспериментальную верификацию методик поддержания коллекции. В рамках работы создан технологический паспорт коллекции, включающий в себя описание полного набора ключевых СОПов и научно-техническое обоснование смет СОПов коллекции. Также проведена экспериментальная верификация ключевых СОПов, пополнен электронный каталог коллекции, находящийся на сайте ФГБУН ВННИИВиВ "Магарач" и требуемые документы размещены на интернет-сайте коллекции ФГБУН ВННИИВиВ "Магарач". По результатам опубликованы 3 статьи в журнале, входящем в базу данных РИНЦ.

Таким образом, проведенная в рамках государственного задания работа, позволяет решать на базе Ампелографическая коллекция Магарач задачи как исследовательские, так и прикладные, обеспечивая материалом пользователей России и других стран.

Поставленные задачи выполнены в полном объеме.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Maghradze D., Maletic E., Maul E., Faltus M., Failla O. Field genebank standards for grapevines. Vitis. 2015a;54:273-279.

2 FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Food Agric. Org. United Nations (FAO). Rome, 2014. URL: http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-siemap/theme/ seeds-pgr/gbs/en/.

3 Volynkin V., Polulyakh A., Chizhova A., Roshka N. Ukraine: native varieties of grapevine. Caucasus and Northern Black Sea Region Ampelography. COST. Vitis. 2012;405-473.

4 Kumar, S., L.Singh, L.Ferretti, M Barba, A.A.Zaidi, V. HallanEvidence of *Grapevine leafroll associated virus-1–3, Grapevine fleck virus* and *Grapevine virus B* Occurring in Himachal Pradesh, India// Indian J.Virol. – 2013.- V.24(1). – P. 66–69.

5 Hans J. Maree, Rodrigo P. P. Almeida et al. Grapevine leafroll-associated virus 3 // Front Microbiol. 2013; 4: 82.

6 Porotikova E. V. Occurrence of Grapevine Leafroll-Associated Viruses-1 and -3 in Crimea / E. V. Porotikova, V. I. Risovannaya, Y. A. Volkov, U. D. Dmitrenko, V. A. Volodin, S. M. Gorislavets, E. P. Stranishevskaya, A. A. Agranovsky, A. M. Kamionskaya, and S. V. Vinogradova // Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologiya. – 2016, N 2, – P. 13–16.

7 Lefort F. and K.A. Roubelakis-Angelakis Genetic comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by nuclear microsatellite profiling. Am. J. Enol. Vitic. − 2001. −V. 52.− P. 101–108.

8 Рисованная В.И., С.М.Гориславец Оценка чистосортности и тестирование по молекулярным маркерам основных вирусных инфекций для получения посадочного материала винограда. Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ – 2016. – Т.11. – С 165–169.

9 Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. Биотехнология растений и перспективы ее развития //Физиология растений и генетика 2014. Т. 46. № 1.- Стр.3-18

10 Дорошенко Н.П., Жукова Т.В. Создание и хранение коллекции винограда in vitro//Русский виноград. 2016. Т. 3. С. 8-14.

11 Celik, H., Soylemezoglu, G., Ertunc, F., Cakir,A., Dursunoglu,S., Akbas, B. Clonal micropropagation of main grape and rootstock varieties of Turkish viticulture for obtaining virus-free basic nursery stocks//Acta Horticulturae. 2009. 827, pp. 421–424.

12 Павлова И.А., Зленко В.А., Волынкин В.А. Применение методов биотехнологии для получения оздоровленного посадочного материала винограда// Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні: Наукові праці Південного філіалу «Кримський Агротехнологічний університет» Національного аграрного університету. – Сімферополь., 2008. – Вип. 107 – С. 161-164.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А. 1. Характеристика 40 автохтонных сортов винограда Крыма АК "Магарач" по морфобиологическим признакам

Название сорта	Тип цветка	Ягода: величина, форма, цвет, аромат	Гроздь: величина, форма, плотность	Лист: величина, форма, количество лопастей, рассеченность	Лист: тип и степень опушения	Сила роста кустов	Срок созрева-ния	Направ-ление	Устойчивость
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Аджем мискет	женский	средняя, овальная, желто-зеленая, слабый мускатный	мелкая, цилиндрическая, рыхлая	средний, округлый, пяти-, семилопастный, сильно рассеченный	паутинистое, слабое; щетинки - вдоль жилок	средняя	средне-поздний	столовый	
Аксеит кара	обоеполый	средняя, овальная, тёмно-фиолетовая	средняя, узкоконическая, среднеплотная	средний, округлый и вытянутый в длину, трёхлопастный, средне рассеченный	паутинистое, слабое	средняя	средне-поздний	столовый	
Артин зерва	обоеполый	средняя, округлая, желто-зеленая	средняя, цилиндрическая, крылатая, плотная	средний, округлый, несколько вытянутый в длину, пяти-, семилопастный, глубоко рассеченный	щетинисто-паутинистое, густое	средняя	средний	винный	
Дардаган	обоеполый	средняя, овальная, желто-зеленая	крупная, коническая, ветвистая, рыхлая	средний, округлый, трех-, пятилопастный, слабо и средне рассеченный	паутинистое, густое	средняя	средний	столовый	относительно засухоустой-чивый

Продолжение таблицы А.1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Демир кара	обоеполый	средняя, округлая, черная	средняя, коническая, крылатая, плотная	крупный, округлый, пятилопастный, глубоко рассеченный	паутинистое, слабое	средняя	средний	винный	относительно устойчивый к милдью, засухоустой-чивый
Джеват кара	обоеполый	средняя, округлая, черная	средняя, коническая, ветвистая, среднеплотная	средний и крупный, округлый, трёх-, пятилопастный, средне рассеченный	паутинистое густое, щетинистое по жилкам	средняя	средне-поздний	винный	
Капитан Яни кара	обоеполый	средняя, овальная, черная	крупная, цилиндро-коническая, плотная	средний, округлый, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	не опушенный	средняя	средне-поздний	винный	Засухоустой-чивый
Кирмизи сап судакский	женский	крупная, удлиненно-яйцевидная, желто-зеленая	средняя, цилиндро-коническая, варьирующей плотности	крупный, округлый, трех-, пятилопастной, от цельного до средне рассеченного	не опушенный	большая	поздний	столовый	Засухоустой-чивый
Манжил ал	обоеполый	крупная, овальная, светло-зеленая	средняя, цилиндрическая или цилиндро-коническая, среднеплотная	крупный, округлый, трех-, пятилопастный, средне и глубоко рассеченный	не опушенный	средняя	средне-поздний	столовый	
Морской 19	обоеполый	средняя, округлая, черная	средняя и крупная, цилиндрическая и цилиндро-коническая, плотная	средний, округлый, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	щетинисто-паутинистое, густое	средняя	средне-поздний	винный	

Продолжение таблицы А.1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Морской 75	обоеполый	средняя, округлая, черная	средняя, цилиндро-коническая, среднеплотная	средний, округлый, трех-, пятилопастный, средне и слабо рассеченный	паутинистое, слабое	большая	средний	столовый	
Морской 94	обоеполый	средняя, овальная, белая	средняя, цилиндро-коническая, среднеплотная	средний и крупный, округлый, пятилопастный, сильно рассеченный	щетинистое, густое	средняя	средний	винный	
Мускат крымский	обоеполый	средняя, широко-овальная, бело-желтая, мускатный	средняя, цилиндрическая, крылатая, плотная	средний и крупный, округлый, пятилопастный, средне рассеченный	не опушенный	средняя	средне-поздний	столово-винный	
Насурла	обоеполый	средняя, округлая, зеленовато-белая, мускатный	средняя, цилиндрическая и цилиндро-коническая, плотная	средний, округлый, трех-, реже пятилопастный, слабо и средне рассеченный	щетинистое	средняя	средне-поздний	столовый	
Павло изюм	обоеполый	средняя, округлая или слегка овальная, желто-зеленая	средняя, коническая, ветвистая, среднеплотная	средний, округлый, пятилопастный, глубоко рассеченный	щетинистое, густое	слабая	средний	винный	слабо повреждается милдью и гроздевой листоверткой, засухоустой-чивый
Сале аганын кара	обоеполый	средняя, округлая, темно-фиолетовая	средняя, цилиндро-коническая, плотная	средний, округлый, пяти-, семилопастный, глубоко рассеченный	щетинисто-паутинистое, густое	слабая	средний	винный	

Продолжение таблицы А.1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Сары кокур	обоеполый	средняя, овальная, зеленовато-желтая	средняя, цилиндро-коническая, ветвистая, плотная и среднеплотная	средний и крупный, округлый, пятилопастный, варьирующей рассеченности	не опушенный	средняя	средний	винный	
Сафта дурмаз	обоеполый	средняя, овальная, черная	средняя, широко-коническая, плотная	средний, округлый и клиновидный, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	не опушенный, редкое щетинистое по жилкам	выше средней	средне-поздний	винный	
Солнечная долина 16	обоеполый	средняя, округлая, темно-синяя	средняя, цилиндро-коническая, лопастная, плотная	средний, округлый, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	паутинистое, среднее	средняя	средний	винный	
Солнечная долина 31а	обоеполый	средняя, округлая, белая	средняя, цилиндро-коническая, с лопастями, среднеплотная	средний, с вытянутой центральной лопастью, трех-, пятилопастный, глубоко рассеченный	паутинистое, слабое	средняя	средний	винный	
Солнечная долина 40	обоеполый	средняя и крупная, овальная, белая	средняя, цилиндро-коническая и коническая, среднеплотная и плотная	крупный, с вытянутой центр.лопастью, пятилопастный, глубоко рассеченный	не опушенный	большая	средне-поздний	столово-винный	
Солнечная долина 41	обоеполый	крупная и средняя, слабо приплюснутая или округлая, белая	средняя и крупная, цилиндро-коническая, лопастная, среднеплотная	средний, округлый, пятилопастный, средне рассеченный	не опушенный	выше средней	средний	винный	

Продолжение таблицы А.1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Солнечная долина 58	женский	средняя, овальная, черная	крупная, цилиндрич., цилиндро-коническая, среднеплотная	крупный, округлый, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	не опушенный	большая	поздний	столово-винный	
Солнечная долина 60	женский	средняя, овальная, зеленая	средняя и крупная, цилиндро-коническая, среднеплотная	крупный, округлый, трех-, пятилопастный, слабо и средне рассеченный	паутинистое, среднее	большая	средне-поздний	винный	
Солнечная долина 71/7	обоеполый	средняя, округлая, белая	средняя, цилиндро-коническая и коническая, среднеплотная	средний, округлый, пятилопастный, средне и сильно рассеченный	щетинисто-паутинистое, густое	средняя	средне-поздний	винный	
Солнечнодолинский	обоеполый	средняя, овальная, желто-зеленая	крупная, коническая, плотная	средний, с вытянутой центр.лопастью, пятилопастный, средне и глубоко рассеченный	не опушенный	средняя	средне-поздний	винный	относительно устойчивый
Сых дане	обоеполый	средняя, округлая или слабо овальная, желто-зеленая	средняя, цилиндро-коническая, плотная	средний, округлый, пятилопастный, средне и сильно рассеченный	щетинисто-паутинистое, густое	средняя	средний	винный	
Тергульмек	обоеполый	средняя, слабо овальная, зеленая	средняя, цилиндрическая, цилиндро-коническая, плотная	средний, округлый, пятилопастный, слабо и средне рассеченный	щетинисто-паутинистое, густое	средняя	средний	винный	относительно устойчивый к грибным болезням и засухе
Фирский ранний	обоеполый	средняя, округлая, черная	средняя, цилиндрическая и цилиндро-коническая, плотная	крупный, округлый, пяти-, трехлопастный, глубоко рассеченный	щетинисто-паутинистое, среднее	выше средней	ранне-средний	винный	Засухоустой-чивый

Продолжение таблицы А.1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Халиль изюм	обоеполый	средняя, округлая, светло-зеленая	крупная и средняя, цилиндро-коническая, крылатая, среднеплотная	средний, округлый, пяти-, семилопастный, глубоко рассеченный	щетинисто-паутинистое, густое	средняя	средний	столово-винный	
Харко	обоеполый	средняя, слабо овальная, желто-зеленая	крупная, цилиндро-коническая, среднеплотная	крупный, округлый, трех-, пятилопастный, слабо и средне рассеченный	щетинисто-паутинистое, среднее	средняя	средний	винный	
Хачадор	обоеполый	средняя, округлая или слегка приплюснутая, желто-зеленая	средняя, цилиндро-коническая и коническая, крылатая, среднеплотная	средний и крупный, округлый, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	щетинистое, слабое	средняя	средний	винный	
Херсонесский	женский	мелкая, округлая, темно-синяя, сортовой	мелкая, цилиндрическая и цилиндро-коническая, рыхлая	средний, округлый или почковидный, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный или цельный	паутинистое, слабое	средняя	средне-поздний	винный	относительно устойчивый к грибным болезням
Эмир Вейс	обоеполый	крупная, округлая, желто-зеленая	крупная, цилиндрическая и цилиндро-коническая, плотная	средний, округлый, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	не опушенный	средняя	средний	столово-винный	слабо повреждается милдью и гроздевой листоверткой, засухоустой-чивый

Продолжение таблицы А.1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Яных зерва	обоеполый	средняя, удлиненная, ассиметричная, черная	средняя, цилиндрическая, ветвистая, рыхлая	средний, округлый или слабо клиновидный, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	не опушенный	средняя	средне-поздний	винный	
Яных якуб	обоеполый	средняя, округлая или овальная, зеленая	крупная, цилиндрическая и цилиндро-коническая, среднеплотная и плотная	крупный, округлый, трех-, пятилопастный, слабо рассеченный	не опушенный	средняя	средний	винный	Засухоустой-чивый

Таблица А.2. Характеристика основных фенологических фаз вегетационного периода 40 автохтонных сортов винограда Крыма АК "Магарач"

№ п\п	Название сорта	Начало сокодвижения, дата	Время распускания почек, дата	Число дней от даты распускания почек до начала цветения	Начало цветения, дата	Число дней от начала цветения до начала созревания ягод	Начало созревания ягод, дата	Число дней от начала созревания до промышленной зрелости ягод, дни	Промышленная зрелость, дата	Продолжительность периода: начало распускания почек – промышленная зрелость, дни	Сумма активных температур на дату промышленной зрелости, °С
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Технические сорта											
1.	Алиготе (контроль)	29.03	02.05	45	15.06	56	10.08	41	20.09	142	3307
2.	Фирский ранний	29.03	29.04	46	13.06	54	06.08	43	18.09	143	3255
3.	Демир кара	29.03	02.05	45	15.06	56	10.08	45	24.09	146	3394
4.	Павло изюм	29.03	28.04	44	10.06	56	05.08	46	20.09	146	3307
5.	Солнечная долина 16	29.03	02.05	45	15.06	56	10.08	45	24.09	146	3394
6.	Сых дане	29.03	02.05	45	15.06	56	10.08	45	24.09	146	3394
7.	Морской 94	29.03	27.04	47	12.06	55	06.08	45	20.09	147	3307
8.	Сале аганын кара	29.03	27.04	50	15.06	56	10.08	41	20.09	147	3307
9.	Солнечная долина 31а	29.03	27.04	47	12.06	55	06.08	45	20.09	147	3307
10.	Тергульмек	29.03	27.04	51	16.06	54	09.08	42	20.09	147	3307
11.	Солнечная долина 41	29.03	25.04	53	16.06	57	12.08	40	21.09	150	3331
12.	Харко	29.03	25.04	53	16.06	57	12.08	40	21.09	150	3331
13.	Чивсиз сары	29.03	25.04	53	16.06	57	12.08	40	21.09	150	3331
14.	Яных якуб	29.03	25.04	53	16.06	57	12.08	40	21.09	150	3331
15.	Хачадор	30.03	23.04	46	16.06	57	12.08	50	01.10	153	3511
16.	Чингине кара	30.03	23.04	46	16.06	57	12.08	50	01.10	153	3511
17.	Артин зерва	30.03	25.04	53	16.06	54	09.08	48	26.09	155	3436

Продолжение табл.А.2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
18.	Капитан Яни кара	30.03	25.04	53	16.06	54	09.08	48	26.09	155	3436
19.	Сары кокур	30.03	25.04	53	16.06	54	09.08	48	26.09	155	3436
20.	Сафта дурмаз	30.03	25.04	53	16.06	54	09.08	48	26.09	155	3436
21.	Солнечная долина 60	30.03	23.04	50	11.06	63	13.08	43	25.09	156	3415
22.	Джеват кара	30.03	24.04	50	10.06	57	06.08	50	25.09	157	3415
23.	Морской 19	30.03	28.04	45	11.06	55	05.08	57	01.10	157	3511
24.	Солнечная долина 71/7	30.03	24.04	50	10.06	57	06.08	50	25.09	157	3415
25.	Солнечнодолинский	31.03	23.04	50	11.06	58	08.08	50	27.09	158	3456
26.	Херсонесский	31.03	23.04	50	11.06	58	08.08	50	27.09	158	3456
Столовые сорта											
27.	Карабурну *(контроль)*	31.03	30.04	49	17.06	58	14.08	53	06.10	160	3581
28.	Морской 75	29.03	26.04	46	10.06	57	06.08	41	16.09	144	3205
29.	Дардаган	29.03	01.05	47	15.06	58	12.08	41	22.09	145	3353
30.	Манжил ал	29.03	23.04	46	16.06	57	12.08	50	01.10	153	3511
31.	Мускат крымский	29.03	23.04	46	16.06	57	12.08	50	01.10	153	3511
32.	Насурла	29.03	23.04	46	16.06	57	12.08	50	01.10	153	3511
33.	Аджем мискет	29.03	25.04	53	16.06	54	09.08	48	26.09	155	3436
34.	Яных зерва	30.03	25.04	53	16.06	54	09.08	48	26.09	155	3436
35.	Аксеит кара	30.03	24.04	50	10.06	57	06.08	50	25.09	157	3415
36.	Кирмизи сап судакский	31.03	30.04	49	17.06	58	14.08	53	06.10	160	3581
37.	Шабаш крупноягодный	31.03	01.05	46	16.06	61	16.08	54	09.10	161	3634
Столово-винные сорта											
38.	Антей Магарачский *(контроль)*	29.03	01.05	47	15.06	58	12.08	41	22.09	145	3353
39.	Халиль изюм	28.03	24.04	49	11.06	56	06.08	41	16.09	146	3205
40.	Эмир Вейс	29.03	23.04	46	16.06	57	12.08	50	01.10	153	3511
41.	Черный крымский	29.03	24.04	50	10.06	57	06.08	50	25.09	157	3415
42.	Солнечная долина 40	30.03	23.04	50	11.06	58	08.08	50	27.09	158	3456
43.	Солнечная долина 58	31.03	24.04	49	11.06	60	10.08	52	01.10	161	3511

Таблица А.3. Характеристика продуктивности 40 автохтонных сортов винограда Крыма АК "Магарач"

Название сорта	Развившихся побегов, %	Плодоносных побегов, %	Коэффициенты		Средняя масса грозди, г	Урожай с куста, кг	Содержание кислот в соке ягод, г/дм^3	Количество сахаров в соке ягод, г/100см^3	Сила роста побегов *
			Плодоношения, К1	Плодоносности, К2					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Технические сорта									
Алиготе (контроль)	85,5	82,0	1,85	1,95	120	4,5	7,2	22,5	5
Артин зерва	86,4	64,5	0,74	1,14	257	4,3	6,5	20,0	7
Джеват кара	61,4	79,0	0,87	1,10	235	3,7	6,6	21,2	5
Демир кара	88,5	77,0	0,85	1,10	330	4,3	6,5	22,0	7
Капитан Яни кара	95,4	85,8	0,15	1,34	340	6,5	6,7	22,5	7
Морской 19	94,3	84,7	1,06	1,26	343	2,4	7,1	20,2	5
Морской 94	74,3	71,7	0,94	1,26	200	1,4	6,3	21,0	5
Павло изюм	95,1	78,0	1,18	1,51	189	1,2	7,1	20,1	5
Сале аганын кара	92,1	68,4	0,99	1,45	246	3,0	7,2	21,0	5
Сары кокур	93,2	72,1	0,98	1,36	330	3,6	7,0	22,0	5
Сафта дурмаз	83,3	62,5	0,65	1,04	290	2,2	6,9	21,5	7
Солнечная долина 16	92,4	77,3	1,18	1,52	150	2,5	6,8	21,6	5
Солнечная долина 31а	99,1	75,3	0,99	1,31	165	3,7	6,5	21,0	5
Солнечная долина 41	92,3	50,5	0,53	1,05	165	3,4	6,6	22,0	5
Солнечная долина 60	92,1	76,4	0,85	1,11	190	4,0	6,5	22,0	5
Солнечная долина 71/7	97,7	89,5	1,15	1,29	305	3,7	6,7	22,3	5
Солнечнодолинский	88,2	75,5	0,79	1,05	340	5,4	6,9	22,6	5
Сых дане	84,6	73,4	0,76	1,03	161	2,5	7,0	20,9	7
Тергульмек	95,7	53,4	0,56	1,05	152	2,6	7,1	20,6	5
Фирский ранний	89,4	83,3	1,09	1,31	205	5,8	7,2	22,8	5
Харко	78,8	63,5	0,86	1,34	315	5,9	6,9	20,5	7
Хачадор	89,8	52,0	0,59	1,13	200	2,4	6,5	24,0	5
Херсонесский	100	94,7	1,59	1,68	115	5,0	6,3	20,5	7
Чивсиз сары	94,3	70,8	1,03	1,46	162	1,9	6,0	19,8	5
Чингине кара	93,5	81,7	1,13	1,38	174	3,5	6,2	21,5	7
Яных якуб	88,2	58,8	0,44	0,75	300	2,5	7,2	21,9	5
Столовые сорта									
Карабурну *(контроль)*	90,1	71,7	0,57	0,78	585	6,1	6,1	20,0	7
Аджем мискет	78,2	84,3	1,14	1,35	115	3,6	5,2	20,0	7
Аксеит кара	88,6	59,7	0,81	1,36	384	3,2	6,3	18,6	7
Дардаган	91,9	90,5	1,37	1,52	170	6,4	5,2	20,0	5
Кирмизи сап судакский	96,1	67,1	0,87	1,29	257	6,3	7,0	20,5	7
Манжил ал	95,2	71,5	0,92	1,29	297	3,5	6,0	18,5	5
Морской 75	74,9	72,3	1,17	1,61	122	4,4	6,2	19,0	5

Продолжение табл.А.3.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Мускат крымский	89,9	71,1	0,85	1,20	157	4,7	5,2	20,0	5
Насурла	89,1	95,9	1,83	1,91	185	2,2	5,3	20,5	5
Шабаш крупноягодный	94,0	16,2	0,19	1,18	364	2,2	5,3	17,0	7
Яных зерва	88,3	69,5	0,70	1,01	480	4,4	5,8	19,0	5
Столово-винные сорта									
Антей Магарачский *(контроль)*	82,5	61,6	0,94	1,44	205	5,8	7,3	20,5	7
Солнечная долина 40	87,4	67,9	0,81	1,20	305	3,2	5,9	20,0	7
Солнечная долина 58	88,5	55,8	0,59	1,05	179	3,0	6,1	20,3	7
Халиль изюм	93,2	92,3	1,48	1,60	130	4,0	5,9	21,6	5
Черный крымский	74,4	93,7	1,40	1,49	140	5,9	6,0	21,0	7
Эмир Вейс	88,1	61,1	0,74	1,22	540	4,5	5,9	19,5	7
НСР	2,3	4,5	0,1	0,07	34,4	0,4	0,2	0,4	0,3

* Примечание: сила роста побегов: 3 - слабая; 5 – средняя; 7 – большая; 9 – очень большая.

Таблица А.4. Устойчивость 40 автохтонных сортов винограда Крыма АК "Магарач" к грибным болезням в условиях естественного инфекционного фона (в баллах по шкале OIV, 2009).

Название сорта	Устойчивость к милдью, балл		Устойчивость к оидиуму, балл		Устойчивость к серой гнили ягод, балл
	листья	ягоды	листья	ягоды	
1	2	3	4	5	6
Технические сорта					
Алиготе (контроль)	7	5	7	5	7
Артин зерва	5	5	5	5	7
Джеват кара	5	5	5	5	7
Демир кара	5	5	5	5	7
Капитан Яни кара	7	5	7	5	7
Морской 19	5	5	5	5	5
Морской 94	5	5	5	5	5
Павло изюм	5	5	5	5	7
Сале аганын кара	5	5	5	5	7
Сары кокур	5	5	7	5	7
Сафта дурмаз	5	5	5	5	7
Солнечная долина 16	7	5	5	5	7
Солнечная долина 31а	5	5	7	5	5
Солнечная долина 41	5	5	5	5	7
Солнечная долина 60	5	5	5	5	7
Солнечная долина 71/7	5	5	5	5	7
Солнечнодолинский	7	5	7	5	7
Сых дане	5	5	5	5	7
Тергульмек	5	5	5	5	7
Фирский ранний	7	5	7	7	7
Харко	5	5	5	5	7
Хачадор	5	5	5	5	7
Херсонесский	7	7	7	5	7
Чивсиз сары	5	5	5	5	7
Чингине кара	5	5	5	5	7
Яных якуб	5	5	5	5	7
Столовые сорта					
Карабурну *(контроль)*	7	5	5	5	7
Аджем мискет	5	5	5	5	7
Аксеит кара	5	5	5	5	7
Дардаган	7	7	7	5	7
Кирмизи сап судакский	7	5	7	5	7
Манжил ал	5	5	5	5	7

Продолжение табл.А.4.

1	2	3	4	5	6
Морской 75	5	5	5	5	5
Мускат крымский	5	5	5	5	5
Насурла	5	5	5	5	5
Шабаш крупноягодный	7	5	7	5	7
Яных зерва	5	5	5	5	7
Столово-винные сорта					
Антей Магарачский *(контроль)*	7	7	7	7	7
Солнечная долина 40	5	5	5	5	5
Солнечная долина 58	5	5	5	5	7
Халиль изюм	5	5	5	5	5
Черный крымский	7	5	7	5	7
Эмир Вейс	5	5	5	5	7

Примечания. Оценка поражаемости грибними болезнями: 9 баллов – повреждений не выявлено; 7 – повреждено до 10% тканей или органов; 5 – до 25%; 3 - до 50%; 1 – более 50%.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Библиографический список публикаций, полученных
в результате выполнения научно-исследовательской работы

1 Полулях А.А., Волынкин В.А., Зармаев А.А., Васылык И.А. Ампелографическая и агробиологическая характеристика автохтонного сорта винограда Крыма Крона // "Магарач". Виноградарство и виноделие. - 2017- N3. – С.12-15

2 Клименко В.П., Павлова И.А. Перспективы использования вегетирующей коллекции винограда in vitro для создания базисных маточников// "Магарач". Виноградарство и виноделие. - 2017- N3. – С.6-9.

3 Рисованная В.И., Володин В.А., Волков Я.А., Гориславец С.М. Оценка фитосанитарного состояния сортов винограда, поддерживаемых на ампелографической коллекции на основе анализа вирусных и бактериальных фитопатогенов // "Магарач". Виноградарство и виноделие. – 2017. - № 4. – С.16-18.

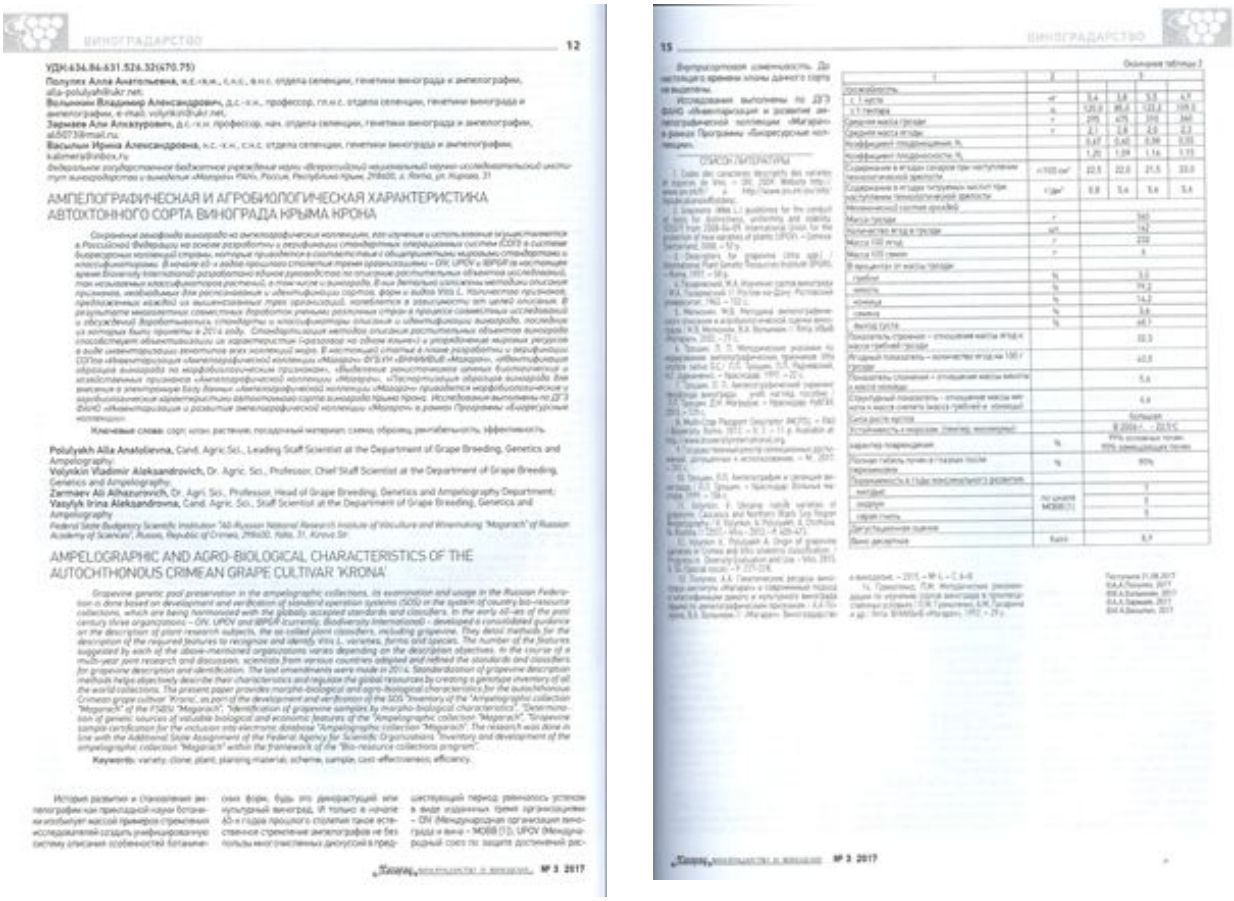

Рисунок Б. 1 – Страницы первая и с разделом «Благодарности» с указанием источника финансирования статьи Полулях А.А., Волынкин В.А., Зармаев А.А., Васылык И.А. Ампелографическая и агробиологическая характеристика автохтонного сорта винограда Крыма Крона // "Магарач". Виноградарство и виноделие. - 2017- N3. – С.12-15

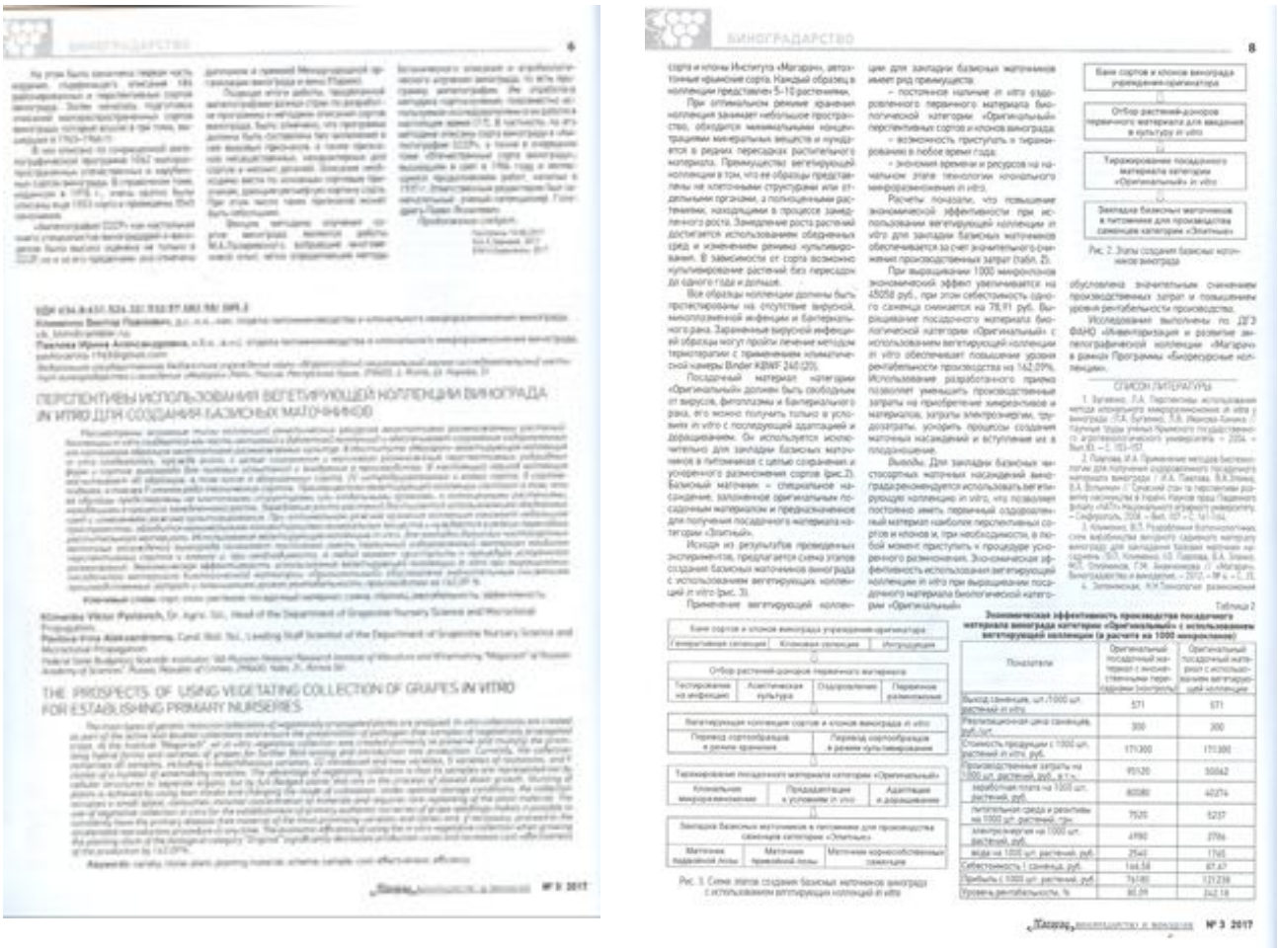

Рисунок Б.2 – Страницы первая и с разделом «Благодарности» с указанием источника финансирования статьи Клименко В.П., Павлова И.А. Перспективы использования вегетирующей коллекции винограда in vitro для создания базисных маточников// "Магарач". Виноградарство и виноделие. - 2017- N3. – С.6-9.

Рисунок Б.3 – Страницы первая и с разделом «Благодарности» с указанием источника финансирования статьи Рисованная В.И., Володин В.А., Волков Я.А., Гориславец С.М. Оценка фитосанитарного состояния сортов винограда, поддерживаемых на ампелографической коллекции на основе анализа вирусных и бактериальных фитопатогенов // "Магарач". Виноградарство и виноделие. – 2017. - № 4. – С.16-18.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Технологический паспорт «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»

Составлено:

Полулях А.А., к.с.-х.н., в.н.с.

Зармаев А.А., д.с.-х.н., профессор, начальник отдела селекции, генетики винограда и ампелографии

Волынкин В.А., д.с.-х.н., проф., гл.н.с.

Васылык И.А., к.с.-х.н., ст.н.с.

Рисованная В.И., к.б.н., в.н.с.

Гориславец С.М., к.б.н., зав. сектором молекулярно-генетических исследований.

Володин В.А., к.с.-х.н., м.н.с.

Павлова И.А., к.с.-х.н., в.н.с.

I. Общие сведения о коллекции

Базовая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»), 298600, Россия, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31.

Ведение коллекции осуществляет отдел селекции, генетики винограда и ампелографии ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН». Начальник отдела - Зармаев Али Алхазурович.

Структура коллекции: Базовая коллекция и Селекционная коллекция. Форма хранения - полевая. Общее количество сортообразцов – 4120.

Категория коллекции - базовая. Количество образцов 3357. Количество ботанических видов, представленных образцами коллекции: семейство Vitaceae Lindley.: род Ampelopsis Michaux. - три вида, род Partenocissus Planchon. – два вида, род Vitis Linn.– 22 вида. Образцы коллекции происходят из 41 страны различных центров происхождения культуры винограда (Европа, Восточная Азия, Средняя Азия, Ближний Восток, Северная Африка, Северная и Центральная Америка).

Категория коллекции селекционная. Количество образцов – 763. Содержит сорта и гибридные формы селекции ВННИИВиВ «Магарач».

Базовая коллекция винограда института «Магарач» находится в Западном предгорно-приморском природном виноградарском регионе Крыма (с. Вилино, Бахчисарайский р-н, АР

Крым). Коллекция заложена в 1978-1988 гг., привита на филлоксероустойчивом подвое Кобер 5ББ. Площадь составляет 15,6 га. Каждый образец в коллекции представлен 10 кустами.

Деятельность ампелографической коллекции института «Магарач» направлена на сохранение генофонда винограда, ведение, пополнение и рациональное использование биологического разнообразия мирового генофонда винограда, который представляет научный и практический интерес для селекции, виноградарства и виноделия.

II. Набор ключевых стандартных операционных процедур (СОП), обеспечивающих сохранение, поддержание и развитие «Ампелографической коллекции «Магарач», идентификацию, паспортизацию и оздоровление образцов коллекции, их использование в научных и производственных программах

1. Инвентаризация «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» (определение заполненности коллекции и определение состояния жизнеспособности образцов)

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок определения количества и состояния жизнеспособности образцов коллекции (растений, которыми они представлены) после перезимовки, воздействия экстремальных условий среды - морозы, весенние заморозки и т.д. Цель СОП - инвентаризация коллекции, учет жизнеспособности и сохранности образцов коллекции винограда.

2. Инвентаризация «Ампелографической коллекции «Магарач» ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» (оценка по морфобиологическим признакам чистосортности или генетической идентичности растений, которыми представлены образцы коллекции)

Стандартная операционная процедура разработана для определения чистосортности или генетической идентичности растений, которыми представлен каждый образец в коллекции по морфобиологическим признакам, выявление неидентифицированных образцов и подмесей, с занесением в каталог по кустоместам согласно плану коллекции. Цель СОП - поддержание генетической идентичности и качества образцов коллекции винограда, обеспечивает сохранение, управление и рациональное использование генетических ресурсов винограда.

3. Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам.

Стандартная операционная процедура устанавливает контроль генетической целостности и качества образцов полевой коллекции винограда. Рекомендована для использования в

ведении коллекции винограда для сохранения ее генетической целостности, поддержания и рационального использования.

4. Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков «Ампелографической коллекции «Магарач»

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выявления ценных хозяйственных и биологических характеристик образцов полевой коллекции винограда, с целью практического применения ценных образцов коллекции винограда в науке и производстве.

5. Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач».

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок учета, идентификации и систематизации образцов коллекции винограда, облегчает поиск и использование информации о генетических ресурсах винограда. СОП рекомендована для ведения, развития и эффективного управления генетическими ресурсами винограда.

6. Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для последующего ПЦР анализа в целях ДНК типирования сортов винограда и диагностики фитопатогенов (фитоплазмы).

7. Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для тестирования *Agrobacterium*

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), для последующего ПЦР анализа с целью диагностики *Agrobacterium*

8. Экстракция рибонуклеиновой кислоты (РНК).

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок экстракции рибонуклеиновой кислоты (РНК), для последующего выполнения синтеза первой цепи кДНК (комплементарной ДНК) методом обратной транскрипции (ОТ) в целях диагностики вирусных фитопатогенов

9. Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК).

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок оценки, на биофотометре, качества нуклеиновых кислот ДНК и РНК, предназначенных для выполнения ПЦР анализа при ДНК типировании сортов винограда, диагностике фитопатогенов и для синтеза первой цепи кДНК (комплементарной ДНК).

10. Получение комплементарной ДНК (кДНК).

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения, синтеза первой цепи кДНК (комплементарной ДНК) методом обратной транскрипции (ОТ) для последующего ПЦР анализа в целях диагностики вирусных фитопатогенов.

11. Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в целях последующего ДНК типирования сортов и молекулярной диагностики фитопатогенов.

12. Оценка нуклеиновых кислот и результатов ПЦР методом гель-электрофореза.

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения гель-электрофореза при визуализации продуктов ПЦР в целях молекулярной диагностики фитопатогенов разной этиологии.

13. Идентификация сортов винограда методом фрагментного анализа.

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения визуализации продуктов ПЦР реакции методом фрагментного анализа с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 и специального программного обеспечения Gene Mapper.

14. Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием методов *in vitro.*

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок проведения оздоровления растений образцов Ампелографической коллекции от вирусов посредством культуры апикальных меристем.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Стандартная операционная процедура

«Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач»

(определение заполняемости коллекции и определение состояния жизнеспособности образцов)

Составлено: Полулях А.А., к.с.-х.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол установления заполняемости коллекции и определение состояния жизнеспособности образцов

Местонахождение: ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

Пересмотр через: 1 год

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Ампелографическая коллекция - насаждение разнообразных сортов, клонов, форм и видов винограда, предназначенное для изучения и выделения наиболее ценных из них. Ампелографическая коллекция представляет основной генофонд винограда разного географического происхождения и включает культурные, дикорастущие формы и родственные виды, которые могут расти в условиях определенной страны и региона.

Базовая коллекция – коллекция образцов, которая представляет основной генофонд культуры различного географического происхожденияи и включают культурные, дикорастущие формы и родственные виды, которые могут произрастать в условиях определенной страны и региона.

Полевая коллекция - плантация (сад, виноградник), на которой размещается коллекция генетических ресурсов вегетативно размножающихся растений.

Генофонд винограда - совокупность генов популяции, вида или другой таксономической единицы, в пределах которых характеризуются определенной частота, а также совокупность растений - носителей этих генов.

Образец - сохраняемое в живом виде растение, из которого можно получить целый организм или организмы, относящиеся к одному виду или внутривидовому таксону одного ранга, которые являются компонентами коллекции винограда и основными единицами хранения, изучения и использования в научных, селекционных и образовательных программах.

Ведение коллекции образцов генеофонда винограда - комплекс мероприятий, направленных на поддержание коллекции в жизнеспособном состоянии и генетической целостности, пополнение новыми образцами, документирование в базе данных, изучение по комплексу хозяйственно-биологических признаков, выделение источников и доноров и обеспечение научных, селекционных, учебных и других программ образцами генофонда растений.

Учет образцов коллекций - деятельность по созданию баз данных, включающих паспортные, описательные и оценочные данные образцов коллекции винограда.

База данных сохранения образцов генофонда винограда - електронная база данных, в которой содержится перечень образцов генофонда, сохраняемых в полевой коллекции, а также отформатированная и упорядоченная информация о размещении этих образцов, динамику состояния их жизнеспособности и количества растений, которыми они представлены.

I.ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

Виноград – многолетнее растение, которое размножается вегетативно. Для сохранения биоразнообразия винограда согласно международным стандартам (FAO, 2014; Maghradze et all., 2015) используются полевые коллекции. Полевые генбанки винограда созданы во многих странах мира. Самая крупная коллекция во Франции насчитывает 7179 образцов, в Германии в коллекциях *ex situ* насчитывается 5500 образцов и т.д. Базовая ампелографическая коллекция «Магарач» содержит 3357 образцов. Полевые коллекции подвержены воздействию факторов окружающей среды, таких как экстремальные зимние температуры, поздние весенние заморозки, засуха, поражаются болезнями и вредителями винограда, зависят от условий содержания и т.д. Поддержание жизнеспособности и качества образцов коллекции винограда, обеспечивает сохранение, управление и использование генетических ресурсов винограда.

Для проверки состояния жизнеспособности образцов винограда, хранимых в полевой коллекции, разработана система мониторинга, которая включает СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач».

II.ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Цель разработки стандартной операционной процедуры (СОП) состоит в:

- Определении заполняемости коллекции.
- Проверке и определении состояния жизнеспособности образцов винограда, хранимых в полевой коллекции.
- Определении наличия живых растений, репрезентирующих каждый из образцов коллекции после перезимовки, воздействия экстремальных условий среды - морозы, весенние заморозки и т.д.

СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» разработана в качестве стандарта для инвентаризации, учета, сохранности, развития и использования коллекции винограда.

III. Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач»

3.1 Оборудование и материалы.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

- Полевой журнал для внесения данных.
- Канцелярские товары.
- Каталог коллекции в виде 4 томов.
- Персональный компьютер для создания электронного варианта каталога и баз данных.

3.2 Согласно международным стандартам (FAO, 2014; Maghradze et all., 2015) и методике закладки и формирования коллекции (Лазаревский, 1963), каждый полевой банк должен иметь четкую карту, показывающую точное местоположение каждого образца на участке коллекции. Для этого площадь коллекции разбита на кварталы, а кварталы в свою очередь разделены на ряды. Расстояние между рядами составляет 3,0 м. В каждом ряду отмечены кустомета, на которых через 1,5 м высаживают растения, репрезентирующие образцы коллекции. Таким образом, каждое растение имеет свои координаты и адрес расположения на коллекционном участке: квартал, ряд, кустоместо. Ампелографическая коллекция «Магарач» разбита на 28 кварталов, в каждом квартале 127 рядов, в каждом ряду по 10 кустомест. Каждый образец в коллекции представлен 10 растениями. Всего в коллекции 34879 кустомест.

3.3 Проверка наличия живых растений в коллекционных насаждениях проводится весной, после распускания почек. В каталог коллекции, который занимает 4 журнала, заносится информация о наличии живых растений на каждом из кустомест ампелографической коллекции, а также отмечается наличие ослабленных растений.

3.4 Далее полученная информация заносится в базу данных сохранения образцов генофонда винограда для учета образцов ампелографической коллекции «Магарач», где указывается название образца, его номер в коллекции, адрес расположения в полевой коллекции, количество живых растений, которыми представлен образец.

3.5 СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» проводится один раз в год.

3.6 Суммарная длительность СОП для инвентаризации 1 образца: 40 мин. В том числе:

1. Проверка наличия живых растений – 25 мин.
2. Запись информации о наличии живых растений в журнал 5 мин.

3. Заполнение базы данных сохранения образцов генофонда винограда - 10 мин.

3.7 Квалификация сотрудника:

На этапах 3.2 - 3.4: начальник отдела (10 мин), главный научный сотрудник (10 мин), ведущий научный сотрудник (10 мин), агроном (10 мин).

IV. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» были использованы следующие литературные источники:

1 Лазаревский М.А. Изучение сортов винограда. – Ростов на Дону: Ростовский университет, 1963. – 152 с.

2 FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Food Agric. Org. United Nations (FAO), Rome; 2014: (http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-siemap/theme/seeds-pgr/gbs/en/).

3 Maghradze D., Maletic E., Maul E., Faltus M., Failla O. Field genebank standards for grapevines. Vitis 54(Special issue), 273–279 (2015).

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Стандартная операционная процедура

«Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач»

(оценка по морфобиологическим признакам чистосортности или генетической идентичности растений, которыми представлены образцы коллекции)

Составлено: Полулях А.А., к.с.-х.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол установления чистосортности и генетической идентичности растений образцов коллекции

Местонахождение: ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

Пересмотр через: 1 год

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Ампелографическая коллекция - насаждение разнообразных сортов, клонов, форм и видов винограда, предназначенное для изучения и выделения наиболее ценных из них. Ампелографическая коллекция представляет основной генофонд винограда разного географического происхождения и включает культурные, дикорастущие формы и родственные виды, которые могут расти в условиях определенной страны и региона.

Базовая коллекция – коллекция образцов, которая представляет основной генофонд культуры различного географического происхожденияи и включают культурные, дикорастущие формы и родственные виды, которые могут произрастать в условиях определенной страны и региона.

Полевая коллекция - плантация (сад, виноградник), на которой размещается коллекция генетических ресурсов вегетативно размножающихся растений.

Генофонд винограда - совокупность генов популяции, вида или другой таксономической единицы, в пределах которых характеризуются определенной частота, а также совокупность растений - носителей этих генов.

Образец - сохраняемое в живом виде растение, из которого можно получить целый организм или организмы, относящиеся к одному виду или внутривидовому таксону одного ранга, которые являются компонентами коллекции винограда и основными единицами хранения, изучения и использования в научных, селекционных и образовательных программах.

Ведение коллекции образцов генеофонда винограда - комплекс мероприятий, направленных на поддержание коллекции в жизнеспособном состоянии и генетической целостности, пополнение новыми образцами, документирование в базе данных, изучение по комплексу хозяйственно-

биологических признаков, выделение источников и доноров и обеспечение научных, селекционных, учебных и других программ образцами генофонда растений.

Учет образцов коллекций - деятельность по созданию баз данных, включающих паспортные, описательные и оценочные данные образцов коллекции винограда.

База данных сохранения образцов генофонда винограда - електронная база данных, в которой содержится перечень образцов генофонда, сохраняемых в полевой коллекции, а также отформатированная и упорядоченная информация о размещении этих образцов, динамику состояния их жизнеспособности и количества растений, которыми они представлены.

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

Для сохранения генетических ресурсов винограда, согласно международным стандартам (FAO, 2014; Maghradze et all., 2015), в настоящее время основным методом является полевая коллекция. Полевые генбанки винограда созданы во многих странах мира. Самая крупная коллекция во Франции насчитывает 7179 образцов, в Германии в коллекциях *ex situ* насчитывается 5500 образцов и т.д. Базовая ампелографическая коллекция «Магарач» содержит 3357 образцов. Площадь составляет 15,6 га. Каждый образец в коллекции представлен 10 кустами.

Поддержание жизнеспособности, качества и генетической идентичности образцов коллекции винограда, обеспечивает сохранение, управление и рациональное использование генетических ресурсов винограда.

СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» разработана для оценки генетической идентичности растений, которыми репрезентирован каждый из образцов полевой коллекции винограда.

СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» включает выполнение ряда процедур, в том числе:

- СОП Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам.

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Цель стандартной операционной процедуры (СОП) состоит в:

- Проверке генетической идентичности растений, которыми представлен каждый образец винограда в полевой коллекции.
- Выявлении несоответствий и подмесей.
- Определении соответствия каждого образца коллекции (группы растений, которыми представлен образец) названию, под которым он числится в коллекции.
- Определении заполняемости коллекции.

СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» разработана в качестве стандарта для обеспечения генетической целостности и качества образцов коллекции винограда. СОП рекомендована для использования в ведении коллекции винограда.

III. Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» (оценка по морфобиологическим признакам чистосортности или генетической идентичности растений, которыми представлены образцы коллекции).

3.1 Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

- Полевые журналы для внесения данных.
- Каталог коллекции в виде 4 томов.
- Персональный компьютер для создания каталога и баз данных.
- Канцелярские товары.

3.2 Согласно международным стандартам (FAO, 2014; Maghradze et all., 2015) и методике закладки и формирования коллекции (Лазаревский, 1963), каждый полевой банк должен иметь четкую карту, показывающую точное местоположение каждого образца на участке коллекции, и каждое растение имеет свои координаты и адрес расположения на коллекционном участке: квартал, ряд, кустоместо. Ампелографическая коллекция «Магарач» разбита на 28 кварталов, в каждом квартале 127 рядов, в каждом ряду по 10 кустомест. Всего в коллекции 34879 кустомест. Каждый образец в коллекции представлен 10 растениями.

3.3 Оценку генетической идентичности растений, которыми представлен каждый образец проводят путем сравнения по комплексу морфобиологических признаков, включающих следующие признаки:

Молодой побег

Листья закрытых и полуоткрытых верхушек должны быть раскрыты, чтобы оценить соответствующую часть верхушки.

Форма (открытость) верхушки молодого побега

Распределение антоциановой окраски на верхушке побега

Интенсивность антоциановой окраски верхушки

Интенсивность (плотность) паутинистого опушения верхушки

Интенсивность (плотность) щетинистого опушения верхушки

Побег

Наблюдение во время цветения в зоне третьей части побега.

Внешний вид (габитус), положение побега

Окраска спинной (дорсальной) стороны междоузлия

Окраска брюшной (вентральной) стороны междоузлия

Окраска спинной (дорсальной) стороны узла

Окраска брюшной (вентральной) стороны узла

Интенсивность (плотность) щетинистого опушения на узлах

Интенсивность (плотность) щетинистого опушения на междоузлиях

Интенсивность (плотность) паутинистого опушения на узлах

Интенсивность (плотность) паутинистого опушения на междоузлиях

Распределение антоциановой окраски на чешуях глазков

Интенсивность антоциановой окраски чешуй глазков

Распределение усиков на побеге (число последовательных усиков)

Длина усиков

Молодой лист

Наблюдение вести во время цветения.

Окраска верхней поверхности листьев

Плотность паутинистого опушения между главными жилками на нижней поверхности листа

Плотность щетинистого опушения между главными жилками на нижней поверхности листа

Плотность паутинистого опушения на главных жилках нижней поверхности листа

Плотность щетинистого опушения на главных жилках нижней поверхности листа

Сформировавшийся лист

Наблюдение с момента завязывания ягод до начала созревания.

Величина пластинки листа

Форма листовой пластинки

Количество лопастей листа

Окраска верхней поверхности пластинки

Антоциановая окраска главных жилок верхней поверхности листа

Антоциановая окраска главных жилок нижней поверхности листа

Гофрировка (углубления) верхней поверхности пластинки листа

Волнистость пластинки между центральной и боковыми жилками

Профиль (поперечное сечение в средней части пластинки)

Пузырчатость верхней поверхности пластинки

Форма зубчиков

Длина зубцов

Длина зубцов по отношению к их ширине

Форма (степень открытости / перекрываемости) черешковой выемки

Форма основания черешковой выемки

Зубчики черешковой выемки листа

Ограниченность дна черешковой выемки жилкой

Форма (тип) или степень открытости / перекрываемости верхних боковых вырезок

Форма основания верхних боковых вырезок

Зубцы на верхних боковых вырезках

Плотность паутинистого опушения между главными жилками на нижней стороне листа

Плотность щетинистого опушения между главными жилками на нижней стороне листа

Плотность паутинистого опушения главных жилок на нижней стороне листа

Плотность щетинистого опушения главных жилок на нижней стороне листа

Паутинистое опушение главных жилок на верхней стороне листа

Щетинистое опушение главных жилок на верхней стороне листа

Плотность паутинистого опушения черешка

Плотность щетинистого опушения черешка

Длина черешка относительно главной жилки

Глубина верхних боковых вырезок

Одревесневший побег

Наблюдение проводят после опадения листьев или в период покоя.

Поперечное сечение

Поверхность

Основная окраска

Цветок

Наблюдение во время цветения.

Тип цветка (половые органы)

Соцветие

Наблюдение во время цветения.

Расположение (уровень) первого соцветия

Количество соцветий на побеге

Гроздь

Наблюдение в период зрелости.

Гроздь: длина, без гребненожки

Гроздь: ширина

Плотность грозди

Длина ножки грозди

Одревеснение ножки грозди

Гроздь: форма

Гроздь: число крыльев первичной грозди

Ягода

Наблюдение в период зрелости.

Длина ягоды

Ширина ягоды

Однородность размеров

Форма ягод

Окраска кожицы

Равномерность окраски кожицы

Пруин (восковой налет)

Толщина кожицы

Сочность мякоти

Особенности привкуса

Длина плодоножки

Степень трудности отделения от плодоножки

Семя

Наблюдение за семенами в период зрелости.

Наличие семян в ягоде

Длина семени

Масса семени

Фенология

Время распускания почек

Массовое цветение

Начало созревания ягод

Физиологическая зрелость ягод

Осенняя окраска листьев

Рост

Наблюдение во время цветения и повторить снова после опадения листьев.

Сила роста побега

Длина междоузлий

Диаметр междоузлий

Устойчивость

Устойчивость к засухе

Устойчивость к милдью (*Plasmopara*)

Степень устойчивости листьев к оидиуму

Степень устойчивости листьев к серой гнили (*Botrytis)*

Технологическая ценность

Масса одной грозди

Средняя масса одной ягоды

Содержание сахаров в сусле

Титрумая кислотность сусла

3.4 Инвентаризация коллекции и проверка генетической идентичности растений, которыми представлен каждый образец в коллекционных насаждениях, проводится в течение вегетационного периода.

3.5 Далее полученная информация заносится сначала в рабочие журналы а далее в базу данных сохранения образцов ампелографической коллекции «Магарач», где указывается название образца, его номер в коллекции, адрес расположения в полевой коллекции, количество кустомест, которое занимает данный образец, количество растений, которыми представлен образец, их идентичность, наличие растений, которые отличаются от исходного образца с указанием их координат размещения в коллекции и перечисляются основные признаки, по которым выявлены несоответствия.

3.6 СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» проводится один раз в год.

3.7 Суммарная длительность СОП для инвентаризации 1 образца: 40 мин. В том числе:

- Инвентаризация коллекции и проверка генетической идентичности растений – 20 мин.
- Запись информации в рабочий журнал - 10 мин.
- Заполнение базы данных сохранения образцов генофонда винограда - 10 мин.

3.8 Квалификация сотрудника:

На этапах 3.3 - 3.6: начальник отдела (10 мин), главный научный сотрудник (10 мин), ведущий научный сотрудник (10 мин), агроном (10 мин).

IV. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач» были использованы следующие литературные источники:

1. FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Food Agric. Org. United Nations (FAO), Rome; 2014: (http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-siemap/theme/seeds-pgr/gbs/en/).
2. Maghradze D., Maletic E., Maul E., Faltus M., Failla O. Field genebank standards for grapevines. Vitis 54(Special issue), 273–279 (2015).
3. Лазаревский М.А. Методы ботанического описания и агробиологического изучения сортов винограда// Ампелография СССР/ под ред. Проф. Фролова-Багреева А.М.- М.: Пищепромиздат, 1946.- Т.1.- С. 347-401
4. Мелконян М.В., Волынкин В.А. Методика ампелографического описания и агробиологической оценки винограда.- Ялта: ИВиВ «Магарач», 2002.- 27с.
5. Лазаревский М.А. Изучение сортов винограда. – Ростов на Дону: Ростовский университет, 1963. – 152 с.
6. Трошин Л. П., Маградзе Д. Н Ампелографический скрининг генофонда винограда: учеб. нагляд. Пособие. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – 120 с.
7. Codes des caracteres descriptifs des varietes et especes de *Vitis*. – OIV, 2009. Website http://www.oiv.int/fr/ и http://www.oiv.int/oiv/info/frplubicationoiv#listdesc.
8. Grapevine (*Vitis* L.) guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. TG50/9 from 2008-04-09. International Union for the protection of new varieties of plants (UPOV). – Geneva: Switzerland, 2008. – 52 p.
9. Descriptors for grapevine (*Vitis spp*.) / International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). – Rome, 1997. – 58 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Стандартная операционная процедура

«Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам»

Составлено: Полулях А.А., к.с.-х.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол соответствия каждого образца коллекции (группы растений, которыми представлен образец) названию, под которым он числится в коллекции и генетической идентичности растений, которыми представлен каждый образец винограда в полевой коллекции.

Местонахождение: ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

Пересмотр через: 1 год

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Ампелографическая коллекция - насаждение разнообразных сортов, клонов, форм и видов винограда, предназначенное для изучения и выделения наиболее ценных из них. Ампелографическая коллекция представляет основной генофонд винограда разного географического происхождения и включает культурные, дикорастущие формы и родственные виды, которые могут расти в условиях определенной страны и региона.

Базовая коллекция – коллекция образцов, которая представляет основной генофонд культуры различного географического происхожденияи и включают культурные, дикорастущие формы и родственные виды, которые могут произрастать в условиях определенной страны и региона.

Полевая коллекция - плантация (сад, виноградник), на которой размещается коллекция генетических ресурсов вегетативно размножающихся растений.

Генофонд винограда - совокупность генов популяции, вида или другой таксономической единицы, в пределах которых характеризуются определенной частота, а также совокупность растений - носителей этих генов.

Образец - сохраняемое в живом виде растение, из которого можно получить целый организм или организмы, относящиеся к одному виду или внутривидовому таксону одного ранга, которые являются компонентами коллекции винограда и основными единицами хранения, изучения и использования в научных, селекционных и образовательных программах.

Ведение коллекции образцов генеофонда винограда - комплекс мероприятий, направленных на поддержание коллекции в жизнеспособном состоянии и генетической целостности, пополнение новыми образцами, документирование в базе данных, изучение по комплексу хозяйственно-

биологических признаков, выделение источников и доноров и обеспечение научных, селекционных, учебных и других программ образцами генофонда растений.

Учет образцов коллекций - деятельность по созданию баз данных, включающих паспортные, описательные и оценочные данные образцов коллекции винограда.

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

Согласно международным стандартам (FAO, 2014; Maghradze et all., 2015), в настоящее время основным методом сохранения генетических ресурсов винограда является полевая коллекция. Базовая полевая ампелографическая коллекции «Магарач» насчитывает 3357 образцов. Площадь составляет 15,6 га. Каждый образец в коллекции представлен 10 кустами.

Основными условиями успешного сохранения, управления и рационального использования генетических ресурсов винограда является поддержание генетической идентичности образцов коллекции винограда. Необходимо следить за тем, чтобы идентичность образцов коллекции поддерживалась в течение различных процессов: интродукции или приобретения, хранения и распространения.

СОП «Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам» разработана для подтверждения идентичности образцов заявленным названиям и соответствии их морфобиологических признаков ампелографическим характеристикам заявленных названий с целью поддержания генетической целостности образцов полевой коллекции винограда.

СОП «Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам» включает выполнение ряда процедур, в том числе:

- СОП «Инвентаризация Ампелографической коллекции «Магарач».

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Цель стандартной операционной процедуры (СОП):

- определение соответствия каждого образца коллекции (группы растений, которыми представлен образец) названию, под которым он числится в коллекции.

- проверка генетической идентичности растений, которыми представлен каждый образец винограда в полевой коллекции.

СОП «Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам» распространяется на коллекцию сортообразцов, условия и способы закладки коллекции, ее формирование, ведение и использование. СОП разработана в качестве стандарта для обеспечения генетической целостности и качества образцов полевой коллекции винограда.

III. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОБРАЗЦОВ ВИНОГРАДА ПО МОРФОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ

3.1 Оборудование и материалы.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

- Дескриптор ампелографического скрининга генофонда винограда.
- Полевые журналы для внесения данных.
- Канцелярские товары.
- Каталог коллекции в виде 4 томов.
- Перчатки.
- Бумага.
- Персональный компьютер (системный блок ADVANTIS 2004 г., дисплей Samsung SyncMaster 795mb) для создания каталога и баз данных.

3.2 Идентификация образцов винограда Ампелографической коллекции «Магарач» по морфобиологическим признакам».

3.2.1 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам верхушки молодого побега, включающих следующие признаки:

- Форма (открытость) верхушки молодого побега
- Распределение антоциановой окраски на верхушке побега
- Интенсивность антоциановой окраски верхушки
- Интенсивность (плотность) паутинистого опушения верхушки
- Интенсивность (плотность) щетинистого опушения верхушки

Наблюдение проводится до цветения. Чтобы оценить соответствующую часть верхушки, листья закрытых и полуоткрытых верхушек должны быть раскрыты.

3.2.2 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам молодого побега, включающих следующие признаки:

- Внешний вид (габитус), положение побега
- Окраска спинной (дорсальной) стороны междоузлия
- Окраска брюшной (вентральной) стороны междоузлия
- Окраска спинной (дорсальной) стороны узла
- Окраска брюшной (вентральной) стороны узла
- Интенсивность (плотность) щетинистого опушения на узлах
- Интенсивность (плотность) щетинистого опушения на междоузлиях
- Интенсивность (плотность) паутинистого опушения на узлах
- Интенсивность (плотность) паутинистого опушения на междоузлиях

- Распределение антоциановой окраски на чешуях глазков
- Интенсивность антоциановой окраски чешуй глазков
- Распределение усиков на побеге (число последовательных усиков)
- Длина усиков

Наблюдение вышеперечисленных признаков проводится во время цветения в зоне третьей части побега.

3.2.3 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам молодого листа, включающих следующие признаки:

- Окраска верхней поверхности листьев
- Плотность паутинистого опушения между главными жилками на нижней поверхности листа
- Плотность щетинистого опушения между главными жилками на нижней поверхности листа
- Плотность паутинистого опушения на главных жилках нижней поверхности листа
- Плотность щетинистого опушения на главных жилках нижней поверхности листа

Наблюдение вышеперечисленных признаков проводится во время цветения.

3.2.4 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам сформировавшегося листа, включающих следующие признаки:

- Величина пластинки листа
- Форма листовой пластинки
- Количество лопастей листа
- Окраска верхней поверхности пластинки
- Антоциановая окраска главных жилок верхней поверхности листа
- Антоциановая окраска главных жилок нижней поверхности листа
- Гофрировка (углубления) верхней поверхности пластинки листа
- Волнистость пластинки между центральной и боковыми жилками
- Профиль (поперечное сечение в средней части пластинки)
- Пузырчатость верхней поверхности пластинки
- Форма зубчиков
- Длина зубцов
- Длина зубцов по отношению к их ширине
- Форма (степень открытости / перекрываемости) черешковой выемки
- Форма основания черешковой выемки
- Зубчики черешковой выемки листа
- Ограниченность дна черешковой выемки жилкой

- Форма (тип) или степень открытости / перекрываемости верхних боковых вырезок
- Форма основания верхних боковых вырезок
- Зубцы на верхних боковых вырезках
- Плотность паутинистого опушения между главными жилками на нижней стороне листа
- Плотность щетинистого опушения между главными жилками на нижней стороне листа
- Плотность паутинистого опушения главных жилок на нижней стороне листа
- Плотность щетинистого опушения главных жилок на нижней стороне листа
- Паутинистое опушение главных жилок на верхней стороне листа
- Щетинистое опушение главных жилок на верхней стороне листа
- Плотность паутинистого опушения черешка
- Плотность щетинистого опушения черешка
- Длина черешка относительно главной жилки
- Глубина верхних боковых вырезок

Наблюдение вышеперечисленных признаков проводится с момента завязывания ягод до начала созревания.

3.2.5 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам одревесневшего побега, включающих следующие признаки:

- Поперечное сечение
- Поверхность
- Основная окраска
- Чечевички
- Наличие щетинистого опушения на узлах

Наблюдение проводят после опадения листьев или в период покоя.

3.2.6 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам цветка, включающих следующие признаки:

- Тип цветка (половые органы)

Наблюдение проводят во время цветения.

3.2.7 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам соцветия, включающих следующие признаки:

- Расположение (уровень) первого соцветия
- Количество соцветий на побеге
- Плодоносность базальных 1-3 почек по наличию соцветий

Наблюдение проводят во время цветения.

3.2.8 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам грозди, включающих следующие признаки:

- Гроздь: длина, без гребненожки
- Гроздь: ширина
- Плотность грозди
- Длина ножки грозди
- Одревеснение ножки грозди
- Гроздь: форма
- Гроздь: число крыльев первичной грозди

Наблюдение проводят в период зрелости.

3.2.9 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам ягоды, включающих следующие признаки:

- Длина ягоды
- Ширина ягоды
- Однородность размеров
- Форма ягод
- Окраска кожицы
- Равномерность окраски кожицы
- Пруин (восковой налет)
- Толщина кожицы
- Сочность мякоти
- Особенности привкуса
- Длина плодоножки
- Степень трудности отделения от плодоножки

Наблюдение в период зрелости.

3.2.10 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам семени, включающих следующие признаки:

- Наличие семян в ягоде
- Длина семени
- Масса семени
- Наличие поперечных складок на брюшной стороне

Наблюдение за семенами в период зрелости.

3.2.11 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по фенологическим признакам:

- Время распускания почек
- Массовое цветение
- Начало созревания ягод
- Физиологическая зрелость ягод
- Осенняя окраска листьев

3.2.12 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по признакам роста:

- Сила роста побега
- Длина междоузлий
- Диаметр междоузлий

Наблюдение во время цветения и повторить снова после опадения листьев.

3.2.13 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по показателям устойчивости:

- Устойчивость к засухе
- Устойчивость к милдью (*Plasmopara*)
- Степень устойчивости к милдью (*Plasmopara*) листьев
- Степень устойчивости к милдью (*Plasmopara*) листьев в лабораторных условиях (диск-тест)
- Степень устойчивости к милдью (*Plasmopara*) гроздей
- Степень устойчивости листьев к оидиуму
- Степень устойчивости к оидиуму гроздей
- Степень устойчивости листьев к серой гнили (*Botrytis)*
- Степень устойчивости к серой гнили (*Botrytis)* гроздей

3.2.14 Оценка идентичности образцов коллекции заявленным названиям по показателям технологической ценности:

- Масса одной грозди
- Средняя масса одной ягоды
- Содержание сахаров в сусле
- Титруемая кислотность сусла

3.3 Полученная информация заносится в поквартальные журналы-каталоги, где указывается название образца, его номер в коллекции, адрес расположения в полевой коллекции, количество кустомест, которое занимает данный образец, количество растений, которыми представлен образец, их идентичность, наличие растений, которые отличаются от исходного

образца с указанием их координат размещения в коллекции и перечисляются основные признаки, по которым выявлены несоответствия. Эти данные могут корректироваться в процессе эксплуатации коллекции.

3.4 В базу данных сохранения образцов, для учета образцов ампелографической коллекции «Магарач», вносится информация, где указывается название образца, его номер в коллекции, адрес расположения в полевой коллекции, количество кустомест, которое занимает данный образец, количество растений, которыми представлен образец, их идентичность, наличие растений, которые отличаются от исходного образца с указанием их координат размещения в коллекции.

3.5 СОП «Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам» проводится один раз в год.

3.6 Суммарная длительность СОП для 1 образца: 70 мин. В том числе:

- Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам – 40 мин.
- Запись информации в рабочий журнал - 15 мин.
- Заполнение базы данных сохранения образцов генофонда винограда - 15 мин.

3.7 Квалификация сотрудника:

На этапах 3.2 - 3.4: начальник отдела (15 мин), главный научный сотрудник (15 мин), ведущий научный сотрудник (20 мин), агроном (20 мин).

IV. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Идентификация образцов винограда по морфобиологическим признакам» были использованы следующие литературные источники:

1 FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Food Agric. Org. United Nations (FAO), Rome; 2014: (http://www.fao.org/).

2 Maghradze D., Maletic E., Maul E., Faltus M., Failla O. Field genebank standards for grapevines. Vitis 54(Special issue), 273–279 (2015).

3 Лазаревский М.А. Методы ботанического описания и агробиологического изучения сортов винограда// Ампелография СССР/ под ред. Проф. Фролова-Багреева А.М.- М.: Пищепромиздат, 1946.- Т.1.- С. 347-401

4 Мелконян М.В., Волынкин В.А. Методика ампелографического описания и агробиологической оценки винограда.- Ялта: ИВиВ «Магарач», 2002.- 27с.

5 Лазаревский М.А. Изучение сортов винограда. – Ростов на Дону: Ростовский университет, 1963. – 152 с.

6 Трошин Л. П., Маградзе Д. Н Ампелографический скрининг генофонда винограда: учеб. нагляд. Пособие. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – 120 с.

7 Codes des caracteres descriptifs des varietes et especes de *Vitis*. – OIV, 2009. Website http://www.oiv.int/fr/ и http://www.oiv.int/oiv/info/frplubicationoiv#listdesc.

8 Grapevine (*Vitis* L.) guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. TG50/9 from 2008-04-09. International Union for the protection of new varieties of plants (UPOV). – Geneva: Switzerland, 2008. – 52 p.

9 Descriptors for grapevine (*Vitis spp*.) / International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). – Rome, 1997. – 58 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Стандартная операционная процедура
«Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков

«Ампелографической коллекции «Магарач»

Составлено: Полулях А.А., к.с.-х.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол установления лучших образцов АК «Магарач» по биологическим и хозяйственным признакам.

Местонахождение: ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

Пересмотр через: 1 год

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Ампелографическая коллекция - насаждение разнообразных сортов, клонов, форм и видов винограда, предназначенное для изучения и выделения наиболее ценных из них.

Базовая коллекция – коллекция образцов, которая представляет основной генофонд культуры различного географического происхожденияи и включают культурные, дикорастущие формы и родственные виды, которые могут произрастать в условиях определенной страны и региона

Полевая коллекция - плантация (сад, виноградник), на которой размещается коллекция генетических ресурсов вегетативно размножающихся растений

Генофонд винограда - совокупность генов популяции, вида или другой таксономической единицы, в пределах которых характеризуются определенной частота, а также совокупность растений - носителей этих генов.

Образец - сохраняемое в живом виде растение, из которого можно получить целый организм или организмы, относящиеся к одному виду или внутривидовому таксону одного ранга, которые являются компонентами коллекции винограда и основными единицами хранения, изучения и использования в научных, селекционных и образовательных программах.

Банк данных генофонда винограда - собранная и сосредоточенная информация о наличии ценных биологических и хозяйственных признаков у существующих сортов и форм винограда.

Учет образцов коллекций - деятельность по созданию баз данных, включающих паспортные, описательные и оценочные данные образцов коллекции винограда.

Ведение коллекции образцов генеофонда винограда - комплекс мероприятий, направленных на поддержание коллекции в жизнеспособном состоянии и генетической целостности, пополнение новыми образцами, документирование в базе данных, изучение по комплексу хозяйственно-биологических признаков, выделение источников и доноров и обеспечение научных, селекционных, учебных и других программ образцами генофонда растений.

Источник ценного признака – образец генофонда винограда с определенным уровнем фенотипического проявления признака.

Признаковая коллекция - коллекция, в которой образцы подобраны по определенному уровню фенотипического проявления отдельных признаков или их сочетаний. В эти коллекции включают эталоны и образцы с различным уровнем проявления признаков.

База признаковых данных - электронная база данных, в которой содержится отформатированная и упорядоченная характеристика коллекционных образцов по комплексу признаков и свойств, полученная путем изучения.

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

Основными условиями успешного ведения, развития и рационального использования генетических ресурсов, является выделение источников ценных биологический и хозяйственных признаков. В базовой ампелографической коллекции «Магарач» собрано 3357 образцов из различных виноградарских регионов мира (41 страны), многие из которых несут множество ценных генов и признаков, наследственная основа которых – неисчерпаемый источник исходного материала для селекции.

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Цель стандартной операционной процедуры:

- изучение образцов полевой коллекции винограда по биологическим и хозяйственным признакам;
- выделение лучших образцов по биологическим и хозяйственным признакам;
- учет образцов коллекции и формировании признаковой базы данных генофонда винограда.

СОП «Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков «Ампелографической коллекции «Магарач» разработана для получения ценных хозяйственных и биологических характеристик образцов полевой коллекции винограда, учета образцов коллекций и формирования признаковых баз данных генофонда винограда с целью практического применения ценных образцов коллекции винограда в науке и производстве. СОП рекомендована для ведении, развития и рационального использования коллекции винограда.

III. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНИСТОЧНИКОВ ЦЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ХОЗЯЙСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

3.1 Оборудование и материалы.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

- Полевые журналы для внесения данных.
- Канцелярские товары.
- Сводные журналы образцов коллекции по фенологии и агробиологии.
- Персональный компьютер (системный блок ADVANTIS 2004 г., дисплей Samsung SyncMaster 795mb) для создания каталога и баз данных.
- Рефрактометр полевой
- Рефрактометр лабораторный
- Реактивы для титрования: NaOH, фиксаналы серной кислоты, индикатор бромфеноловый синий.
- Лабораторная посуда: колбы для титрования, пипетки, бюретка для титрования, колбы и сосуды для растворов 3, 2, 1 л, мерные цилиндры и стаканы.
- Лабораторная одежда: белые халаты – 2 шт, перчатки – 10 пар.
- Секаторы.
- Соковыжималка.
- Весы лабораторные ВЛКТ – 500 г.
- Весы ручные.
- Фильтровальная бумага.
- Марля и полотенца.
- Фотоаппарат OLYMPUS CAMEDIA C5060.

3.2 Изучение фенологических фаз вегетационного периода винограда (Лазаревский 1946, 1963; Мелконян, Волынкин 2002).

3.2.1 Дата начала сокодвижения.

3.2.2 Время распускания почек, дата.

3.2.3 Начало цветения, дата.

3.2.4 Начало созревания ягод, дата.

3.2.5 Промышленная зрелость, дата.

3.2.6 Число дней от даты распускания почек до начала цветения.

3.2.7 Число дней от начала цветения до начала созревания ягод.

3.2.8 Число дней от начала созревания до промышленной зрелости ягод, дни.

3.2.9 Продолжительность периода: начало распускания почек – промышленная зрелость, дни.

3.2.10 Сумма активных температур на дату промышленной зрелости, °С.

3.2.11 Начало вызревания лозы.

Оценку фенологических фаз вегетационного периода винограда проводят на 7-10 кустах конкретного сорта

3.3 Агробиологические учеты (Лазаревский 1946, 1963; Мелконян, Волынкин 2002)

3.3.1 На кусте: количество глазков.

3.3.2 На кусте: количество развившихся побегов.

3.3.3 На кусте: количество недоразвитых побегов.

3.3.4 На кусте: количество плодоносных побегов.

3.3.5 На кусте: количество соцветий.

3.3.6 Развившихся побегов, %.

3.3.7 Плодоносных побегов, %.

3.3.8 Коэффициент плодоношения К1.

3.3.9 Коэффициент плодоносности К2.

3.3.10 Сила роста побега

Агробиологические учеты проводят на 7-10 кустах конкретного сорта

3.4 Учет показателей урожая (Лазаревский 1946, 1963; Мелконян, Волынкин 2002).

3.4.1 Средняя масса грозди, г.

3.4.2 Урожай с куста, кг.

3.4.3 Урожайность, ц\га.

3.4.4 Масса одной грозди.

3.4.5 Средняя масса одной ягоды.

Учет показателей урожая проводят на 7-10 кустах конкретного сорта

3.5 Оценка показателей технологической ценности и увологические характеристики (Лазаревский 1946, 1963):

3.5.1 Процент завязывания ягод

3.5.4 Количество сахаров в соке ягод, г/100см^3

3.5.5 Содержание кислот в соке ягод, г/дм^3

3.5.6 Число ягод в грозди

3.5.7 Вес 100 ягод, г

3.5.8 Вес 100 семян, г

3.5.9 Показатель строения – отношение веса ягод к весу гребней грозди.

3.5.10 Ягодный показатель – число ягод на 100 грамм грозди.

3.5.11 Показатель сложения – отношение веса мякоти к весу кожицы.

3.5.12 Структурный показатель - отношение веса мякоти к весу скелета (вес гребней и кожицы).

3.5.13 Дегустационная оценка столового винограда, балл.

3.6. Оценка показателей устойчивости к болезням и факторам среды (OIV, 2009; Трошин, Маградзе 2013)

3.6.1 Устойчивость к засухе

1 – очень низкая

3 – низкая

5 – средняя

7 – высокая

9 – очень высокая

Оценка подвоя к засухе проводится на привитых растениях. Оценка в 1 балл – листья на привое некротизированы или полностью засохли, возможен листопад; 5 баллов – листья на привое пожелтели; 9 баллов – цвет листьев зеленый с оттенками, присущими для данного привойного сорта без некрозов и высыхания.

3.6.2 Устойчивость к милдью (*Plasmopara*)

1 – отсутствует: Шасла белая

9 – имеется: *V. riparia*

3.6.3 Степень устойчивости к милдью (*Plasmopara)* листьев

1 – очень низкая

3 – низкая

5 – средняя

7 – высокая

9 – очень высокая

Оценку болезни учитывают на листьях 4–6 кустов конкретного сорта через три недели от начала цветения винограда.

3.6.4 Степень устойчивости к милдью (*Plasmopara*) гроздей

1–3 – очень низкая и низкая:

5 – средняя

7–9 – высокая и очень высокая

Оценка устойчивости гроздей винограда к милдью производится в два срока; через три недели после начала цветения и за 3 недели до начала размягчения (окрашивания) ягод в грозди. Обязательным условием является характеристика погодных условий вегетации, оказавших влияние на развитие болезни.

3.6.5 Устойчивость к оидиуму

1 – отсутствует

9 – имеется

3.6.6 Степень устойчивости листьев к оидиуму

1 – очень низкая

3 – низкая

5 – средняя

7 – высокая

9 – очень высокая

Оценка устойчивости виноградных листьев к оидиуму производится в два срока: через три недели от начала цветения и после съема урожая до первых заморозков. Учеты проводят на всех листьях 4–5 кустов. Обязательным условием является характеристика погодных условий вегетации, оказавших влияние на развитие болезни.

3.6.7 Степень устойчивости к оидиуму гроздей

1–3 – очень низкая и низкая

5 – средняя:

7–9 – высокая и очень высокая

Оценку поражения гроздей винограда производить лучше в два срока – до начала размягчения ягод и перед уборкой урожая на 4–5 кустах каждого сорта. Обязательным условием является характеристика погодных условий вегетации, оказавших влияние на развитие болезни.

3.6.8 Степень устойчивости листьев к серой гнили (*Botrytis)*

1–3 – очень низкая и низкая

5 – средняя:

7–9 – высокая и очень высокая

Оценку поражения листьев серой гнилью определяют на 6 кустах до начала цветения винограда.

3.6.9 Степень устойчивости к серой гнили *(Botrytis)* гроздей

3 – очень низкая и низкая

5 – средняя

9 – высокая и очень высокая

Оценку развития серой гнили производить на всех гроздях 6 кустов винограда в два срока. Первый срок – начало окрашивания ягод, второй – перед уборкой урожая.

3.7 Выделение лучших образцов по биологическим и хозяйственным признакам путем сравнения показателей изучаемых и контрольных образцов.

3.8 Формирование признаковых баз данных биологических и хозяйственных признаков образцов коллекции винограда. В формате Excel вносится информация: название сорта, номер в коллекции, признаки сорта, перечисленные в пунктах 3.2 -3.6.

3.9 Формирование признаковой коллекции источников ценных признаков винограда для селекции и лучших представителей для производства. В формате Excel формируется коллекция их отобранных образцов, которые имеют наивысшую оценку по определенному признаку. Например, признаковая коллекция устойчивых к милдью образцов винограда.

3.10 СОП «Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков «Ампелографической коллекции «Магарач» проводится один раз в год.

3.11 Суммарная длительность СОП для 1 образца: 120 мин. В том числе:

4. Изучение фенологических фаз вегетационного периода винограда – 15 мин.
5. Агробиологические учеты – 15 мин.
6. Учет показателей урожая – 15 мин.
7. Оценка показателей технологической ценности – 15 мин.
8. Оценка показателей устойчивости к болезням и факторам среды – 15 мин.
9. Запись информации в рабочий журнал - 15 мин.
10. Выделение лучших образцов - 10 мин.
11. Формирование признаковых баз данных биологических и хозяйственных признаков – 10 мин.
12. Формирование признаковой коллекции источников ценных признаков – 10 мин.

3.12 Квалификация сотрудника:

На этапах 3.2 - 3.9: начальник отдела (30 мин), главный научный сотрудник (30 мин), ведущий научный сотрудник (30 мин), агроном (30 мин).

IV. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Выделение генисточников ценных биологических и хозяйственных признаков «Ампелографической коллекции «Магарач» были использованы следующие литературные источники:

1 Лазаревский М.А. Методы ботанического описания и агробиологического изучения сортов винограда// Ампелография СССР/ под ред. Проф. Фролова-Багреева А.М.- М.: Пищепромиздат, 1946.- Т.1.- С. 347-401

2 Мелконян М.В., Волынкин В.А. Методика ампелографического описания и агробиологической оценки винограда.- Ялта: ИВиВ «Магарач», 2002.- 27с.

3 Лазаревский М.А. Изучение сортов винограда. – Ростов на Дону: Ростовский университет, 1963. – 152 с.

4 Трошин Л. П., Маградзе Д. Н Ампелографический скрининг генофонда винограда: учеб. нагляд. Пособие. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – 120 с.

5 Codes des caracteres descriptifs des varietes et especes de *Vitis*. – OIV, 2009. Website http://www.oiv.int/fr/ и http://www.oiv.int/oiv/info/frplubicationoiv#listdesc.

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Стандартная операционная процедура

«Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач»

Составлено: Полулях А.А., к.с.-х.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол формирования паспортных баз данных с целью инвентаризации и учета образцов коллекции винограда

Местонахождение: ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН».

Пересмотр через: 1 год

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Ампелографическая коллекция - насаждение разнообразных сортов, клонов, форм и видов винограда, предназначенное для изучения и выделения наиболее ценных из них.

Базовая коллекция – коллекция образцов, которая представляет основной генофонд культуры различного географического происхожденияи и включают культурные, дикорастущие формы и родственные виды, которые могут произрастать в условиях определенной страны и региона

Полевая коллекция - плантация (сад, виноградник), на которой размещается коллекция генетических ресурсов вегетативно размножающихся растений

Генофонд винограда - совокупность генов популяции, вида или другой таксономической единицы, в пределах которых характеризуются определенной частота, а также совокупность растений - носителей этих генов.

Образец - сохраняемое в живом виде растение, из которого можно получить целый организм или организмы, относящиеся к одному виду или внутривидовому таксону одного ранга, которые являются компонентами коллекции винограда и основными единицами хранения, изучения и использования в научных, селекционных и образовательных программах.

Банк данных генофонда винограда - собранная и сосредоточенная информация о наличии ценных биологических и хозяйственных признаков у существующих сортов и форм винограда.

Учет образцов коллекций - деятельность по созданию баз данных, включающих паспортные, описательные и оценочные данные образцов коллекции винограда.

Ведение коллекции образцов генеофонда винограда - комплекс мероприятий, направленных на поддержание коллекции в жизнеспособном состоянии и генетической целостности, пополнение новыми образцами, документирование в базе данных, изучение по комплексу хозяйственно-

биологических признаков, выделение источников и доноров и обеспечение научных, селекционных, учебных и других программ образцами генофонда растений.

База паспортных данных - электронная база данных, в которой содержится отформатированная и упорядоченная информация о паспортных данных образцов коллекции генофонда винограда, в частности, регистрационные номера образца, его таксономическая принадлежность, название, место характер происходжения, биологический статус.

Каталог образцов генофонда растений - печатное или электронное издание, содержащее перечень образцов коллекции генофонда с их характеристикой.

База данных сохранения образцов генофонда винограда - електронная база данных, в которой содержится перечень образцов генофонда, сохраняемых в полевой коллекции, а также отформатированная и упорядоченная информация о размещении этих образцов, динамику состояния их жизнеспособности и количества растений, которыми они представлены.

Каталог образцов генофонда растений - печатное или электронное издание, содержащее перечень образцов коллекции генофонда с их характеристикой.

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

В базовой ампелографической коллекции «Магарач» собрано 3357 образцов из различных виноградарских регионов мира (41 страны), различного направления и использования, с множеством свойств и признаков. Для успешного ведения, развития и использования и эффективного управления генетическими ресурсами необходимо знание материала и его систематизация. Для этого проводится работа по паспортизации и учету образцов коллекции.

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП «Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач» разработан в качестве стандарта для формирования паспортных баз данных с целью инвентаризации и учета образцов коллекции винограда, обеспечивает их систематизацию, облегчает поиск, обработку и использование информации о генетических ресурсах винограда.

Разработанная СОП соответствует международным стандартам ведения паспортных баз данных (http://www.eu-vitis.de; http://www.vivc.de) и рекомендована для ведения, развития и эффективного управления генетическими ресурсами винограда.

III. ПАСПОРТИЗАЦИЯ ОБРАЗЦОВ ВИНОГРАДА ДЛЯ ВНЕСЕНИЯ В ЭЛЕКТРОННУЮ БАЗУ ДАННЫХ «АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ «МАГАРАЧ»

3.1 Оборудование и материалы.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

- Канцелярские товары.
- Бумага.
- Сводные журналы.
- Персональный компьютер (системный блок ADVANTIS 2004 г., дисплей Samsung SyncMaster 795mb).

3.2 Формирование структуры паспортной базы данных:

- Номер регистрации образца в коллекции.
- Название образца.
- Аббревиатура образца.
- Синонимы образца.
- Ботанический вид.
- Внутривидовой таксон.
- Плоидность.
- Происхождение образца страна.
- Происхождение образца регион, область.
- Происхождение образца: местный, селекционный.
- Происхождение образца (для селекционных образцов) – родительские формы.
- Происхождение образца (для селекционных образцов) – учреждение - оригинатор.
- Происхождение (для селекционных образцов) – авторы образца.
- Год посадки в коллекции.
- Характеристика основных признаков: направление, использование, срок созревания, устойчивость.

3.3 Паспортная база данных заполняется на ПК в формате Microsoft Office Excel или Microsoft Office Access.

3.4 СОП «Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач» проводится один раз в год.

3.5 Суммарная длительность СОП для 1 образца: 80 мин. В том числе:

- Сбор информации для 1 образца согласно структуре паспортной базы данных – 60 мин.

- Заполнение паспортной базы данных - 20 мин.

3.6 Квалификация сотрудника:

На этапах 3.2 - 3.3: начальник отдела (20 мин), главный научный сотрудник (20 мин), ведущий научный сотрудник (20 мин), агроном (20 мин).

IV. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП СОП «Паспортизация образцов винограда для внесения в электронную базу данных «Ампелографической коллекции «Магарач» были использованы следующие источники:

1. http://www.eu-vitis.de;
2. http://www.vivc.de

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Стандартная операционная процедура

«Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)»

Составлено: Гориславец С.М., к.с.-х.н., Рисованная В.И., к.б.н., Володин В.А., к.с.-х.н.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящая стандартная операционная процедура устанавливает порядок работ по экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), для последующего ПЦР анализа в целях ДНК типирования сортов винограда и диагностики фитопатогенов (фитоплазмы).

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий СОП применяется сотрудниками сектора молекулярно – генетических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»).

3 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДОКУМЕНТЕ

СОП – стандартная операционная процедура

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СТАВ – буфер для экстракции ДНК

4 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Соблюдать стандартные меры безопасности.

4.1 Работать в лаборатории в перчатках и халате, вне лабораторных ПЦР-помещений запрещается носить эти же халаты.

4.2 Снимать перчатки вне пределов лаборатории, при контакте с дверными ручками, при контакте с любыми предметами, которыми сотрудники пользуются без перчаток.

5 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ на этапе выделения ДНК.

5.1 Приём растительного материала, поступившего для исследования, выполняется в отдельной зоне и регистрируется в журнале.

5.2 При работах по выделению нуклеиновых кислот из биологического материала на всех этапах необходимо использовать одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами), проавтоклавированные перед использованием или с маркировкой «DNase, RNase- free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

5.3 Одноразовые пластиковые расходные материалы (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер и автоклавироваться.

5.4Допускаетсяиспользованиереактивов, тест-наборов, как отечественного, так и зарубежного производства по качеству и метрологическим характеристикам не ниже требуемых.

5.5 При использовании тест-наборов экстракция выполняется в соответствии с инструкцией к ним.

6 ОБОРУДОВАНИЕ

6.1 Твердотелый термостат/Водяная баня (+40^{0}C - +95^{0}C)

6.2 Весы лабораторные (SPU 202 “OHAUS”)

6.3 Компьютер

6.4 Стерлизатор паровой ГК-10-1

6.5 Вытяжной шкаф

6.6 Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °C, морозильник не выше - 24° C.

6.7 Центрифуга с охлаждением до14 000 об/мин («5417R»)

6.8 Микроцентрифуга – вортекс, «Микроспин» 2400 об. /мин. («Biosan»)

6.9 Система очистки воды EasyPure II RF/UV

6.10 Трансилюминатор

7.0. МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

7.1 Набор лабораторных реагентов для выделения ДНК из растений «DNeasyPlantMiniKit

7.2 Деионизированная вода (1 л) Вода MQ

7.3 Дозатор (0.2-20 мкл)

7.4 Дозатор (20-200 мкл)

7.5 Дозатор (200-1000 мкл)

7.6 Наконечник пластиковый на пипетку - 20 мкл

7.7 Наконечник пластиковый на пипетку - 200 мкл

7.8 Наконечник пластиковый на пипетку - 1000 мкл

7.9 Ступка фарфоровая, пестик

7.10 Пробирки, градуированные объемом 1.5 мл ("Eppendorf")

7.11 Штатив для пробирок объемом 1,5 мл.

7.12 Перчатки латексные

7.13 Халат

7.14 спирт 96%

7.15 Жидкий азот

7.16 Хлороформ

7.17 Изоамиловый спирт

7.18 Изопропанол

7.19 CTAB

7.20 Tris-HClpH 8,0

7.21 EDTA

7.22 NaCl

7.23 2-меркаптоэтанола

7.24 Бумажные полотенца/фильтровальная бумага

7.25 Пинцет

7.26 Журнал

7.27 Скальпель

8.0 ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ПРИ ДНК-ТИПИРОВАНИИ СОРТОВ ИЛИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ (ФИТОПЛАЗМЫ) (ЗОНА ЭКСТРАКЦИИ НК)

Экстракция ДНК состоит из ряда последовательных процедур.

8.1 Все необходимое разместить в вытяжном шкафу заранее до включения

Примечание. В связи с тем, что при экстракции ДНК используются реактивы, такие как хлороформ- изоамиловая смесь,2-меркаптоэтанол целесообразно экстракцию выполнять в вытяжном шкафу.

8.2 Включить ультрафиолетовую лампу.

8.3 Через 30 мин выключить ультрафиолетовую лампу.

8.4 Включить вентиляцию на 15 минут, прежде чем начать работу.

8.5 Отделить 1 г ткани листа.

8.6 Растереть 1.0 гр. ткани листа в стерильной ступке с 7 мл.лизирующего раствора CTAB буфера (3 % CTAB,1 MTris-HClpH 8,0, 20 mMEDTA, 1.4 MNaCl) с добавлением 0.2 % 2-меркаптоэтанола.

8.7 Перенести 1 мл гомогената в пробирку эппендорф.

Примечание. Использовать одноразовые автоклавированные пробирки и наконечники для дозаторов желательно с маркировкой «DNase – free».

8.8. Далее экстрагировать ДНК в соответствии с рекомендациями методической литературы [1].

8.9 Определить концентрацию ДНК на спектрофотометре в соответствии с рекомендациями СОП «Контроль качества нуклеиновых кислот (НК)».

8.10 Использовать полученную ДНК для ПЦР – анализа.

8.11 Маточный раствор ДНК хранить в морозилке от -20^{0}С до -70^{0}С.

9.0 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При необходимости визуализация результатов экстракции ДНК выполняется методом гель-электрофореза или оценивается на спектрофотометре (биофотометре). Результаты по проверке экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), вносятся в рабочий журнал.

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие на агарозном блоке фрагмента ДНК, как в контрольных, так и в опытных образцах в виде полос, светящихся под УФ – говорит о положительном результате экстракции ДНК.Отношение А260/А280 для ДНК находиться впределах 1,6-1,9,Показатели полученных растворов ДНК достаточны для выполнения последующих ПЦР

11 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

При подготовке СОП «Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)» были использованы следующие литературные источники:

1.Методика генотипирования, идентификации и регистрации генотипов винограда с помощью анализа микросателлитных локусов (SSR- PCR) рд 00384830 – 064 – 2010

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Стандартная операционная процедура

«Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для тестирования Agrobacterium sp.»

Составлено: Гориславец С.М., к.с.-х.н., Рисованная В.И., к.б.н., Волков Я.А., к.с.-х.н., Володин В.А., к.с.-х.н., Колосова А.А.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), для последующего ПЦР анализа с целью диагностики *Agrobacteriumsp*

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая СОП применяется сотрудниками сектора молекулярно – генетических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»).

3 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДОКУМЕНТЕ

СОП – стандартная операционная процедура

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Agrobacterium – род бактерий

4 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Соблюдать стандартные меры безопасности.

4.1 Работать в лаборатории в перчатках и халате, вне лабораторных ПЦР-помещений не носить эти же халаты.

4.2 Снимать перчатки вне пределов лаборатории, при контакте с дверными ручками, при контакте с любыми не контаминированными предметами, которыми сотрудники пользуются без перчаток.

5 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ на этапе выделения ДНК

5.1 Приём растительного материала, поступившего для исследования, выполняется в отдельной зоне и регистрируется в журнале.

5.2 При работах по выделению нуклеиновых кислот из биологического материала на всех этапах необходимо использовать одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами), проавтоклавированные перед использованием или с маркировкой «DNase, RNase- free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

5.3 Одноразовые пластиковые расходные материалы (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер и автоклавироваться.

5.4Допускаетсяиспользованиереактивов, тест-наборов, как отечественного, так и зарубежного производства по качеству и метрологическим характеристикам не ниже требуемых.

5.5 При использовании тест-наборов экстракция выполняется в соответствии с инструкцией к ним.

6 ОБОРУДОВАНИЕ

6.1 Твердотелый термостат/Водяная баня (+40^{0}С - +95^{0}С)

6.2 Компьютер

6.3 Термостат с диапазоном температур от комнатная до 70°С (рабочая температура +28 ° С.)

6.4 Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °С, морозильник не выше – 20° С.

6.5 Центрифуга с охлаждением до14 000 об/мин («5417R»)

6.6 Микроцентрифуга – вортекс, «Микроспин» 2400 об. /мин. («Biosan»)

6.7 Бокс микробиологической безопасности БМБ – II («Ламинар – С»)

6.8 Система очистки воды EasyPure II RF/UV

6.9 Стерлизатор паровой ГК-10-1.

7 МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

7.1 Деионизированная вода (1 л)

7.2 Дозатор (0.2-20 мкл)

7.3 Дозатор (20-200 мкл)

7.4 Дозатор (200-1000 мкл)

7.5 Наконечник пластиковый на пипетку - 20 мкл.

7.6 Наконечник пластиковый на пипетку - 200 мкл.

7.7 Наконечник пластиковый на пипетку - 1000 мкл.

7.8 Пробирки градуированные объемом 1.5 мл ("Eppendorf")

7.9 Штатив для пробирок объемом 1,5 мл;

7.10 Стерильные чашки Петри.

7.11 Колбы стеклянные 100 мл.

7.12 Спиртовка.

7.13 Пробирки стеклянные 15-20 мл.

7.14 Бюксы стеклянные.

7.15 Шпатели Дригальского.

7.16 Бактериологическая петля.

7.17 Скальпель.

7.18 Перчатки латексные

7.19 Халат

7.20 спирт 96%

7.21 ГРМ-бульон

7.22 Циклогексимид

7.23 Селенит натрия, Na2SeO3

8.0 ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА *AGROBACTERIUMSP*

Экстракция ДНК для диагностики *Agrobacteriumsp* включает два этапа:

- выделении бактерий *Agrobacteriumsp.* из тканей растений на селективные питательные среды;
- непосредственная экстракция ДНК из культуры клеток бактерий.

Перед началом работы выполнить следующие процедуры:

8.1 Все необходимое разместить в ламинарном шкафу заранее до включения

8.2 Включить в ламинарном шкафу ультрафиолетовую лампу за 30 мин до начала экстракции

8.3 Через 30 мин выключить ультрафиолетовую лампу – 1мин.

8.4 Включить вентиляцию в шкафах, подождите 15 минут, прежде чем начать работу - 1мин.

8.5 Отобранный образец стерилизовать 70 %-м раствором этилового спирта – 5 мин.

8.6 Нарезать диски – 5 мин

8.7 Далее выделение бактерий *Agrobacteriumsp.* из тканей растений на селективные питательные среды выполняется в соответствии с методическими рекомендациями [1].

8.8 Для экстракции ДНК использовать одно - трёхдневную культуру.

8.9 Далее экстрагировать ДНК в соответствии с рекомендациями методической литературы [1,2] – 30 мин.

8.10 Использовать полученную ДНК для ПЦР –анализа.

8.11 Хранить при t -20° Сне более недели, длительное хранение при - 70° С

Примечание. Использовать одноразовые автоклавированные пробирки и наконечники с фильтром для дозаторов

Суммарная длительность СОП для 1 образца 187 мин. + инкубация 10080 мин.

9 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Визуализация результатов экстракции ДНК из бактериальной культуры образцов сортов винограда выполнена методом гель-электрофореза в 1.3% агарозном геле с использованием контрольных образцов.

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие на агарозном блоке фрагментов ДНК, как в контрольных, так и в опытных образцах в виде полос, светящихся под УФ – говорит о положительном результате экстракции ДНК.Воспроизводимость результатов составляет 100%

11 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

При подготовке СОП «Экстракция дезоксирибонуклеиновых кислоты (ДНК) для тестирования *Agrobacterium* » были использованы следующие литературные источники:

1 Методические рекомендации. Методика детекции возбудителей бактериальных заболеваний винограда методом ПЦР. РД 00384830 – 067 – 2010.

2 Comparative study of diagnostic methods used for monitoring of common grape vine (Vitisvinifera L.) crown gall (Agrobacterium vitisOphel& Kerr) in Slovenia

3 Janja LAMOVŠEK, Igor ZIDARIČ, Irena MAVRIČPLEŠKO, Gregor UREK, Stanislav TRDAN. ActaagriculturaeSlovenica, 103 - 2,september 2014 str. 313 – 321. COBISS Code 1.01

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Стандартная операционная процедура

«Экстракция рибонуклеиновой кислоты (РНК)»

Составлено: Гориславец С.М., к.с.-х.н., Рисованная В.И., к.б.н., Володин В.А., к.с.-х.н.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок экстракции рибонуклеиновой кислоты (РНК), для последующего выполнения синтеза первой цепи кДНК (комплементарной ДНК) методом обратной транскрипции (ОТ) в целях диагностики вирусных фитопатогенов.

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая СОП применяется сотрудниками сектора молекулярно – генетических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»).

3 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДОКУМЕНТЕ

СОП – стандартная операционная процедура

РНК – рибонуклеиновая кислота

кДНК– комплементарная ДНК

ОТ– обратная транскрипция

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

4 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Соблюдать стандартные меры безопасности.

4.1 Работать в лаборатории в перчатках и халате, вне лабораторных ПЦР-помещений запрещается носить эти же халаты.

4.2 Снимать перчатки вне пределов лаборатории, при контакте с дверными ручками, при контакте с любыми контаминированными предметами, которыми сотрудники пользуются без перчаток.

5 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ на этапе выделения РНК

5.1 Приём растительного материала, поступившего для исследования, выполняется в отдельной зоне и регистрируется в журнале.

5.2 При работах по выделению нуклеиновых кислот из биологического материала на всех этапах необходимо использовать одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки и

наконечники с фильтрами), проавтоклавированные перед использованием или с маркировкой «DNase, RNase- free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

5.3 Одноразовые пластиковые расходные материалы (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер и автоклавироваться.

5.4Допускаетсяиспользованиереактивов, тест-наборов, как отечественного, так и зарубежного производства по качеству и метрологическим характеристикам не ниже требуемых.

5.5 При использовании тест-наборов экстракция выполняется в соответствии с инструкцией к ним.

6 ОБОРУДОВАНИЕ

6.1 Твердотелый термостат/Водяная баня (+40^{0}C - +95^{0}C)

6.2 Компьютер

6.3 Гомогенизатор

6.4 Весы лабораторные (SPU 202 “OHAUS”)

6.5 Стерлизатор паровой ГК-10-1

6.6 Вытяжной шкаф

6.7 Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °С, морозильник не выше - 24° С.

6.8 Центрифуга с охлаждением до14 000 об/мин («5417R»)

6.9 Микроцентрифуга – вортекс, «Микроспин» 2400 об. /мин. («Biosan»)

6.10 Система очистки воды EasyPure II RF/UV

7. МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

7.1 Шпатель лабораторный

7.2 Набор лабораторных реагентов для выделения РНК из растений «RNeasyPlantMiniKit (50)»

7.3 Вода MQ

7.4 Дозатор (2-20 мкл)

7.5 Дозатор (20-200 мкл)

7.6 Наконечник пластиковый с фильтрами и маркировкой «DNase, RNase - free» на пипетку - 2.0-20.0 мкл

7.7 Наконечник пластиковый с фильтрами и маркировкой «DNase, RNase - free» на пипетку - 20.0-200.0 мкл

7.8 Ступка фарфоровая, пестик

7.9 Пробирки, градуированные объемом 1.5 мл ("Eppendorf")

7.10 Штатив для пробирок объемом 1,5 мл;

7.11 Перчатки латексные

7.12 Халат

7.13 спирт 96%

7.14 Ацета́т натрия CH_3COONa

7.15 Гуанидинатиоцианат, для молекулярной биологии

7.16 ЭДТА динатриевая соль 2-водн., для молекулярной биологии

7.17 Ацета́тка́лия CH_3COOK

7.18 PVP-40

7.19 Диоксид кремния SiO_2

7.20 Лаурил-саркозил натрия

7.21 2-меркаптоэтанола

7.22 NaI

7.23 Na_2SO_3

7.24 Пинцет лабораторный

Экстракция РНК состоит из ряда последовательных процедур.

8 ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЭКСТРАКЦИИ РНК В ЦЕЛЯХ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ

Выделение РНК из исследуемого материала в зоне экстракции НК

8.1 Все необходимое разместить в вытяжном шкафу заранее до включения.

8.2 Включить в вытяжном шкафу ультрафиолетовую лампу за 30 мин до начала экстракции.

8.3 Через 30 мин выключить ультрафиолетовую лампу – 1 мин.

8.4 Включить вентиляцию, подождать, 15 минут, прежде чем начать работу.

8.5 Обработать внутри шкафа 70% спиртом – 2 мин.

8.6 Взвесить 100 - 110 мг ткани винограда, гомогенизировать в охлаждённой ступке или гомогенизатором - 10 мин.

8.7 Гомогенат перенести в пробирку типа «Eppendorf» и далее экстрагировать РНК в соответствии с рекомендациями RottandJelkman [1] 60 мин.

8.8 Оценить качество экстрагированных РНК на биофотометре или аналогичном приборе в соответствии с рекомендациями СОП «Контроль качества нуклеиновых кислот (НК)» - 5 мин.

8.9 Использовать полученную РНК для синтеза первой цепи кДНК (обратная транскрипция).

8.10 Хранить при температуре не выше t^o -20°C.

Примечание. Использовать одноразовые автоклавированные пробирки и наконечники для дозаторов желательно с маркировкой «RNase – free»

В целом суммарная длительность СОП для 1 образца 123 мин.

9.0 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При необходимости визуализация результатов экстракции выполняется методом гель-электрофореза или оценивается на спектрофотометре (биофотометре). Результаты по проверке экстракции РНК вносятся в рабочий журнал.

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие на агарозным блоке фрагмента РНК в виде полос, светящейся под УФ – говорит о положительном результате экстракции РНК.

11 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

При подготовке СОП «Экстракция рибонуклеиновых кислоты (РНК)» были использованы следующие литературные источники:

1. Rott ME, Jelkmann W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry, adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR and modification of an RNA extraction protocol [Text] / Rott ME // Eur. J Plant Pathol. – 2001. – Vol. 107. – P. 411-420.

2. Методические рекомендации. Методика детекции вирусных заболеваний винограда методами RTPCR и RT-PCRREAL-timeрд 00384830 - 065 - 2010

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Стандартная операционная процедура

«Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК)»

Составлено: Гориславец С.М., к.с.-х.н., Рисованная В.И., к.б.н., Володин В.А., к.с.-х.н.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартная операционная процедура «Контроль качества нуклеиновых кислот (НК)» устанавливает порядок оценки, на биофотометре, качества нуклеиновых кислот ДНК и РНК, предназначенных для выполнения ПЦР анализа при ДНК типировании сортов винограда, диагностике фитопатогенов и для синтеза первой цепи кДНК (комплементарной ДНК). Данный СОП основывается на результатах, полученных при выполнении СОПов: «Экстракция дезоксирибонуклеиновых кислоты (ДНК)», «Экстракция дезоксирибонуклеиновых кислоты (ДНК) для тестирования *Agrobacterium*», «Экстракция рибонуклеиновых кислоты (РНК)»

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий СОП применяется сотрудниками сектора молекулярно – генетических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»).

3 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДОКУМЕНТЕ

СОП – стандартная операционная процедура

НК – нуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

4 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Соблюдать стандартные меры безопасности.

5 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ на этапе контроля качества НК.

При работах по оценке качества нуклеиновых кислот необходимо использовать одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами), проавтоклавированные перед использованием или с маркировкой «DNase, RNase- free»

6 ОБОРУДОВАНИЕ

6.1 Спектрофотометр для измерения длин волн в диапазоне 230-280 нм (напр. «BioPhotometrplus, Eppedorf»)

6.2 Холодильник с морозильной камерой не выше - 24° С.

6.3 Микроцентрифуга – вортекс, 2400 об. /мин. (напр. «Микроспин, Biosan»)

6.4 Система очистки воды EasyPure II RF/UV

6.5 Компьютер

7 МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

7.1 Халаты

7.2 Стерильные пробирки типа «Eppendorf» 1.5 мл.

7.3 Дозатор (до 2.0-20)

7.4 Дозатор (20-200 мкл)

7.5 Наконечник пластиковый на пипетку - 20 мкл (1000 шт.)

7.6 Наконечник пластиковый на пипетку - 200 мкл (1000 шт.)

7.7 Штативы для пробирок типа «Eppendorf» 1.5 мл.

7.8 Кювета (10 мм)

7.9 Вода MQ

7.10 Перчатки латексные

Контроль качества экстрагированных НК состоит из ряда последовательных процедур.

Требования к кювете. Для исследований применяют стандартные стеклянные или пластмассовые кюветы, высота оптической траектории должна быть на 8,5 мм выше основы кюветы, и полная высота кюветы должна составить по крайне мере 36 мм. Кюветы должны быть оптически прозрачными для соответствующей длины волны измерения.

8 ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА НК

8.1 Разморозить во льду образцы НК (ДНК, РНК) – 30 мин.

8.2 За 15 минут до начала измерений включить биофотометр – 1мин

8.3 Установить вид НК («двухцепочечная» или «одноцепочечная» ДНК, РНК – 1мин.

8.4 На штатив установить пробирки типа «Eppendorf» объемом 1.5 мл. – 1 мин.

8.5 В пробирку внести 67,5 мкл дистиллированной воды – 1мин.

8.6 Раствор НК осторожно пипетировать, отобрать 7.5 мкл.и добавить в пробирку с дистиллированной водой (пункт 7.4) – 3 мин.

Примечание. Для пипетирования и отбора ДНК разных образцов использовать одноразовые наконечники.

8.7 В отдельную кювету внести 75 мклдеионизированной воды, использовать в качестве контроля – 1 мин.

8.8 Из полученной смеси (пункт 7.5) отобрать, используя одноразовые наконечники, 75 мкл раствора и внести в кювету биофотометра для измерения – 1 мин.

Примечание. Измерениеследует проводить дважды.

Суммарная длительность СОП для 1 образца – 42 минут.

9.0 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Провести измерения при длине волны А260/А230 и А260/А280 нм в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией – 3мин.

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отношение А260/А280 для ДНК должно находиться впределах 1,6-1,9, в то время как для РНК - около 2,0. Показатели полученных растворов ДНК и РНК достаточны для выполнения последующих ОТ и ПЦР

11. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

При подготовке СОП «Экстракция дезоксирибонуклеиновых кислоты (ДНК)» были использованы следующие литературные источники:

1. BioPhotometer plus. Operating manual // Eppendorf. – 2007. – 151p.

ПРИЛОЖЕНИЕ П

Стандартная операционная процедура

«Получение комплементарной ДНК (кДНК)»

Составлено: Гориславец С.М., к.с.-х.н., Рисованная В.И., к.б.н., Володин В.А., к.с.-х.н.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения, синтеза первой цепи кДНК (комплементарной ДНК) методом обратной транскрипции (ОТ) для последующего ПЦР анализа в целях диагностики вирусных фитопатогенов. Данный СОП основывается на результатах, полученных при выполнении СОПа: «Экстракция рибонуклеиновой кислоты (РНК)».

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая СОП применяется сотрудниками сектора молекулярно – генетических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»).

3 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДОКУМЕНТЕ

СОП – стандартная операционная процедура

ПЦР – полимеразная цепная реакция

мкл– микролитры

п.н. – пары нуклеотидов

4 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Соблюдать стандартные меры безопасности.

4.1 Работать в лаборатории в перчатках и халате, вне лабораторных ПЦР-помещений запрещается носить эти же халаты.

4.2 Снимать перчатки вне пределов лаборатории, при контакте с дверными ручками, при контакте с любыми контаминированными предметами, которыми сотрудники пользуются без перчаток.

5 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ на этапе синтеза первой цепи кДНК (комплементарной ДНК) методом обратной транскрипции (ОТ)

5.1 Использовать одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами), проавтоклавированные перед использованием или с маркировкой «DNase, RNase-free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

5.2 Одноразовые пластиковые расходные материалы (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер и автоклавироваться.

5.3Допускаетсяиспользованиереактивов, тест-наборов, как отечественного, так и зарубежного производства по качеству и метрологическим характеристикам не ниже требуемых.

5.4 При использовании тест-наборов экстракция выполняется в соответствии с инструкцией к ним.

6 ОБОРУДОВАНИЕ

6.1 ПЦР бокс/ламинарный бокс

6.2 Твердотелый термостат/Водяная баня

6.3 Стерлизатор паровой ГК-10-1

6.4 Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С, морозильник не выше - 24° С

6.5 Микроцентрифуга «MicrospinFV-2400»

6.6 Компьютер

7 МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

7.1 RevertAid™ FirstStrandcDNASynthesisKit - набор для синтеза первой цепи кДНК

7.2 Вода MQ

7.3 Дозатор (2-20 мкл)

7.4 Дозатор (20-200 мкл)

7.5 Наконечник пластиковый на пипетку - 20 мкл

7.6 Наконечник пластиковый на пипетку - 200 мкл

7.7 Пробирки градуированные объемом 1.5 мл ("Eppendorf")

7.8 Штатив для пробирок объемом 1,5 мл

7.9 Перчатки латексные

7.10 Халат

8.0 ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ СИНТЕЗА ПЕРВОЙ ЦЕПИ кДНК (КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ДНК) МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ (ОТ)

8.1 Разморозить во льду РНК и реактивы, необходимые для синтеза кДНК - 40 мин.

8.2 Далее обратная транскрипция (ОТ) выполняется в соответствии с рекомендациями к наборуRevertAid™ FirstStrandcDNASynthesisKit – 140 мин.

8.3 Реакционный продукт обратной транскрипции может непосредственно использован для ПЦР или сохранен при -20°С. Для длительного хранения рекомендуется -70°С.

В целом суммарное время выполнения СОПа – 185 мин.

9 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синтез первой цепи кДНК выполнен методом обратной транскрипции (ОТ). В результате синтезирована кДНК, которая была использована для проведения ПЦР со специфическими к различным вирусам праймерами. Результаты визуализированы методом гель-электрофореза.

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По расположению ампликонов относительно маркера длин ДНК, К+ и К- делают вывод о наличии или отсутствии в пробе последовательности фрагмента ДНК определенного размера.

11 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. ИнструкцияктестнаборуRevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)
2. РД 00384830 - 065 - 2010 Методика детекции вирусных заболеваний винограда методами RTPCR и RT-PCRreal-time

ПРИЛОЖЕНИЕ Р

Стандартная операционная процедура

«Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)»

Составлено: Гориславец С.М., к.с.-х.н., Рисованная В.И., к.б.н., Володин В.А., к.с.-х.н.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в целях последующего ДНК типирования сортов и молекулярной диагностики фитопатогенов. Данный СОП основывается на результатах, полученных при выполнении СОПов: «Экстракция дезоксирибонуклеиновых кислоты (ДНК)», «Экстракция дезоксирибонуклеиновых кислоты (ДНК) для тестирования *Agrobacterium*», «Получение комплементарной ДНК (кДНК)», «Контроль качества НК».

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий СОП применяется сотрудниками сектора молекулярно – генетических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»).

3 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДОКУМЕНТЕ

СОП – стандартная операционная процедура

НК – нуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УФ – ультрафиолет

мкл– микролитры

PCRmix - смесь для проведения ПЦР

4 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Соблюдать стандартные меры безопасности.

4.1 Работать в лаборатории в перчатках и халате, вне лабораторных ПЦР-помещений запрещается носить эти же халаты.

4.2 Снимать перчатки вне пределов лаборатории, при контакте с дверными ручками, при контакте с любыми контаминированными предметами, которыми сотрудники пользуются без перчаток.

5 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ на этапе выполнения ПЦР

5.1 При выполнении ПЦР на всех этапах необходимо использовать одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами), проавтоклавированные перед использованием или с маркировкой «DNase, RNase- free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

5.2 Одноразовые пластиковые расходные материалы (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер и автоклавироваться.

5.3Допускаетсяиспользованиереактивов, тест-наборов, как отечественного, так и зарубежного производства по качеству и метрологическим характеристикам не ниже требуемых.

5.4 При использовании тест-наборов экстракция выполняется в соответствии с инструкцией к ним.

6 ОБОРУДОВАНИЕ

6.1 Твердотелый термостат/Водяная баня

6.2 Стерлизатор паровой ГК-10-1

6.3 ПЦР бокс/ламинарный бокс

6.4 Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °С, морозильник не выше - 24° С

6.5 ДНК-амплификатор (Mastercycler), температурный диапазон +4°С … +99 °С

6.6 Микроцентрифуга для стриповых пробирок

6.7 Микроцентрифуга для пробирок типа «Eppendorf» 1.5 мл

6.8 Система очистки воды EasyPure II RF/UV

7 МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

7.1 Халаты

7.2 Стерильные пробирки типа «Eppendorf» 1.5 мл

7.3 Дозатор (0.2-2.0 мкл)

7.4 Дозатор (2.0-20.0 мкл)

7.5 Дозатор (20.0-200.0 мкл)

7.6 Наконечник пластиковый на пипетку - 0.2-2.0 мкл

7.7 Наконечник пластиковый на пипетку - 2.0-20.0 мкл

7.8 Наконечник пластиковый на пипетку - 20.0-200.0 мкл

7.9 Стерильные стриповые пробирки («стрипы») 0.2 мл

7.10 Штативы для стриповых пробирок

7.11 Наконечники для дозаторов с переменным объемом дозирования до 10; 20; 200 мкл

7.12 Штативы для пробирок типа «Eppendorf»

7.13 Вода дистиллированная (DNasefree; RNasefree)

7.14 Перчатки одноразовые, латексные

7.15 PCRmix, смесь для проведения ПЦР (2x) типа MasterMix

7.16 Специфичные для ПЦР реакции праймеры с флюорохромной меткой (forward)

7.17 Специфичные для ПЦР реакции праймеры (revers)

7.18 Специфичные для ПЦР реакции праймеры (Pr) для тестирования фитопатогенов

7.19 Приспособление для быстрого закрывания CappingAid ("Eppendorf")

7.20 Вода MQ

8.0 ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ЗОНА ПЦР)

(ДНК, кДНК, ДНК Agrobacterium)

8.1 Все необходимое для проведения ПЦР (дозаторы, наконечники и др.) разместить в ПЦР боксе заранее до включения УФ лампы.

8.2 Включить в ПЦР боксе ультрафиолетовую лампу за 30 мин до начала работы.

8.3 Включить вентиляцию в шкафах, подождать 15 минут, прежде чем начать работу.

8.4 Перед приготовлением реакционной смеси разморозить во льду PCRmix (2x) и ДНК. Осторожно перемешать и кратко центрифугировать.

8.5 В пробирку типа «Eppendorf» 1.5/2.0мл.добавить, из расчёта 25 мкл. финального объёма на один образец плюс один объем дополнительно, следующие компоненты: 4,5 мкл H_20 (Rnasefree), 12,5мклPCRmix (2x), 2,0 мклPR (F) (сфлюорохромной меткой или без неё) и 2мклPR (R).

8.6 Осторожно перемешать и кратко центрифугировать.

8.7 Внести одним наконечником по 21 мкл.реакционной смеси (пункт 8.6).

8.8.1 Внести в стрипы с реакционной смесью 1-4 мклДНК или кДНК (матрицы), ДНК контрольных образцов.

8.9 Поместить образцы в амплификатор, задать программу для проведения ПЦР (напр. MICROV1).
8.10 По завершении программы отключить прибор, стрипы с полученными продуктами ПЦР реакции (ампликонами) поместить в холодильник (+4°C).
8.11 Полученные ПЦР продукты могут быть использованы в целях ДНК типирования сортов с использованим метода фрагментного анализа, диагностики вирусных и бактериальных фитопатогенов.

9.0 ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИnested ПЦР В ЦЕЛЯХ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНА (ФИТОПЛАЗМЫ) (ЗОНА ПЦР)

9.1 Тестирование латентной формы фитоплазменной инфекции выполняется методом nested ПЦР.
9.2 Приготовить реакционную смесь для тестирования фитоплазменной инфекции.
9.2.1 Разморозить все реактивы и ДНК.
9.2.2 В реакционную смесь внести специфические праймеры и экстрагированную ДНК.
9.3 Выполнить ПЦР.
9.4 Развести ПЦР продукты водой MQ 1:1000.
9.5 В реакционную ПЦР смесь (пункт 9.4) внести специфические праймеры.
9.6 Выполнить ПЦР.
9.7 При выполнении ПЦР использовать положительный контроль ($К^{+}$) и отрицательный контроль ($К^{-}$) ПЦР реакции.

10 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Визуализация и регистрация ПЦР продуктов выполнена методом гель-электрофореза в 1.3% агарозном геле с использованием контрольных образцов и маркера длин ДНК фрагментов.

11 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие на агарозном блоке ПЦР ампликонов, как в контрольных, так и в опытных образцах, в виде полос, светящихся под УФ и отсутствие их в отрицательном контроле - позволяет сделать вывод о получение ПЦР-продуктов, которые можно использовать для последующего ДНК типирования, а также для молекулрной диагностики *Agrobacterium,* фитоплазмы и вирусных фитопатогенов.

12 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

При подготовке СОП «Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)» были использованы следующие литературные источники:

1 E. Boudon-Padieu, A. Béjat, D. Clair, J. Larrue, M. Borgo, L. Bertotto and E. Angelini. Grapevine yellows: Comparison of different procedures for DNA extraction and amplification with PCR for routine diagnosis of phytoplasmas in grapevine. // Vitis 42 (3), 141–149 (2003).

2 РД 00384830 – 064 – 2010 Методика генотипирования, идентификации и регистрации генотипов винограда с помощью анализа микросателлитных локусов (SSR- PCR)

3 РД 00384830 – 067 – 2010 Методика детекции возбудителей бактериальных заболеваний винограда методом ПЦР

4 РД 00384830 - 065 - 2010 Методика детекции вирусных заболеваний винограда методами RTPCR и RT-PCRreal-time

ПРИЛОЖЕНИЕ С

Стандартнаяоперационная процедура

«Оценка нуклеиновых кислот и результатов ПЦР методом гель-электрофореза»

Составлено: Гориславец С.М., к.с.-х.н., Рисованная В.И., к.б.н., доцент, Володин В.А., к.с.-х.н.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения гель-электрофореза для визуализации продуктов экстракции НК и ПЦР продуктов и учитывает результаты СОПов: «Экстракция дезоксирибонуклеиновых кислоты (ДНК)», «Экстракция дезоксирибонуклеиновых кислоты (ДНК) для тестирования *Agrobacterium*», «Получение комплементарной ДНК (кДНК)», «Контроль качества НК», «Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)»

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая СОП применяется сотрудниками сектора молекулярно – генетических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»).

3 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДОКУМЕНТЕ

СОП – стандартная операционная процедура

УФ – ультрафиолет

мкл– микролитры

К+ – положительный контроль

К- – отрицательный контроль

4 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Соблюдать стандартные меры безопасности.

Зона выполнения гель-электрофореза относится к так называемой «грязной зоне», в связи с этим следует строго соблюдать следующие правила:

4.1 Работа с ПЦР продуктами должна проводиться в изолированной зоне сотрудником лаборатории, не производящим одновременно манипуляций в других зонах ПЦР-лаборатории.

4.2 Работать в лаборатории в перчатках и халате, предназначенных только для этой зоны.

5 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ на этапе выполнения гель-электрофореза.

5.1 При работах на этапе выполнения гель-электрофореза необходимо использовать одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами), проавтоклавированные перед использованием или с маркировкой «DNase, RNase- free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

5.2 Оборудование и расходные материалы используются только в этой зоне.

5.3 Одноразовые пластиковые расходные материалы (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер и автоклавироваться.

5.4Допускаетсяиспользованиереактивов, тест-наборов, как отечественного, так и зарубежного производства по качеству и метрологическим характеристикам не ниже требуемых.

5.5 При использовании тест-наборов гель-электрофорез выполняется в соответствии с инструкцией к ним.

6 ОБОРУДОВАНИЕ

6.1 Стерлизатор паровой ГК-10-1

6.2 Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от +2 до +8 °С, морозильник не выше - 24° С

6.3 Микроцентрифуга – вортекс, «Микроспин» 2400 об./мин. («Biosan»)

6.4 Прибор для гель-электрофореза ("BioRad")

6.5 Микроволновая печь.

6.6 Источник питания "Эльф-8" PS-800

6.7 Система очистки воды EasyPure II RF/UV

6.8 Трансиллюминатор ECX-20M ViberLourmat

6. 9 Весы лабораторные (SPU 202 “OHAUS”)

6.10 Компьютер

6.11 Фотоаппарат

7 МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

7.1 10х ТБЕ-буфер для электрофореза

7.2 Агароза

7.3 Вода MQ

7.4 Маркер длин ДНК 100bp DNA Ladder

7.5 Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder

7.6 Loadingbuffer TC4x

7.7 Дозатор (2-20 мкл)

7.8 Дозатор (20-200 мкл)

7.9 Наконечник пластиковый на пипетку - 20 мкл

7.10 Наконечник пластиковый на пипетку - 200 мкл

7.11 Пробирки, градуированные объемом 1.5 мл ("Eppendorf")

7.12 Штатив для пробирок объемом;

7.13 Перчатки латексные

7.14 Халат

7.15 Мерный цилиндр, 100 мл

7.16 Стакан для растворения агарозы в ТБЕ буфере

8.0 Порядок действий при выполнениоценки результатов ПЦР методом гель-электрофореза (т.н. «грязная зона»)

8.1 Подготовить электрофоретическую камеру для заливки агарозным гелем. – 5 мин

8.2 Приготовить 1х ТВЕ из 10х ТВЕ буфера для заполнения электрофоретической камеры и приготовления геля. – 10 мин.

Примечание. 10х ТБЕ-буфер для электрофореза (концентрированный буферный раствор);

8.3 Приготовить 1,5 % смесь для агарозного геля: в 60 мл 1х ТВЕ внести 0,9 г агарозы. – 3 мин.

8.3.1 Расплавить в микроволновой печи – 5 мин.

Примечание. Для разделения молекул ДНК или ПЦР продуктов используют гели с различной концентрацией агарозы соответствующие определенному размеру молекул ДНК (1-4%):

8.4 Снизить температуру расплавленной агарозы до +40…+50 ^{o} С – 20 мин.

Примечание. В зависимости от температуры воздуха время охлаждения агарозы может занимать более 20 мин.

8.5 Залить камеру расплавленной агорозой – 3 мин.

8.6 Установить гребенку, не касаясь дна рамки прибора. Толщина агарозного геля должна быть около 0,6 см. – 1 мин.

8.7 Полимеризация агарозного геля – 20 мин.

8.7.1 Залить ТБЕ буфер таким образом, чтобы он покрыл агарозный гель не менее чем на 5 мм – 1 мин.

8.8 Осторожно вынуть гребенку из агарозного геля, не повредив лунки – 2 мин.

8.9 Приготовление и нанесение образцов

8.9.1 Подготовить смесь для внесения ПЦР продуктов в агарозный гель, который включает: H_2O, $LoadingbufferTC_{4X}$ – 5 мин.

8.9.2 Внести смесь (пункт 9.1.) в пробирки – 1 мин.

8.9.3 Одноразовыми наконечниками внести образцы в лунки агарозного геля – 3 мин.

8.9.4 В отдельные лунки внести маркер длин ДНК (6 мкл.), К+ и К- – 3 мин.

8.9.5 Подключить электрофоретический прибор к источнику питания – 1 мин.

8.9.6 Гель-электрофорез – 40 мин.

8.9.7 По окончанию электрофореза отключить прибор от сети, гребенку осторожно вынуть из агарозного геля, не повредив лунки – 2 мин.

8.9.8 Перенести агорозный блок в ванночку с раствором бромистого этидия на 20 минут.

Примечание. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волы 290-330 нм.

Внимание: Все манипуляции с гелями и растворами, которые содержат бромистыйэтидий (EtBr), необходимо выполнять в отдельном помещении в одноразовых перчатках.

8.9.9 Перенести агарозный блок из ванночки с раствором этидия бромида в дистилированную воду для отмывки этидия бромида – 5 мин

8.9.10 Поместить агарозный блок на столик трансиллюминатора, в котором по флуоресценции идентифицируют амплифицированные фрагменты– 5 мин

В целом суммарное время выполнения СОПа - 170 мин.

9 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы фрагментов ДНК или амплифицированной ДНК (ампликона). Задокументировать (создать фото в проходящем УФ) изображение и сохранить в памяти компьютера

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По расположению ДНК-фрагментов или ампликонов, относительно маркера длин ДНК, ампликонов стандартных образцов, К+ и К- делают вывод о наличии или отсутствии в пробе последовательности фрагмента ДНК определенного размера. Результаты анализа не подлежат учету:

- если на электрофореграмме в положительном контроле (К+), отсутствует специфические полосы (ампликоны);
- если на электрофореграмме в отрицательные контроли (К-), появляются специфическая полосы (ампликоны).

ПРИЛОЖЕНИЕ Т

Стандартная операционная процедура

«Идентификация сортов винограда методом фрагментного анализа»

Составлено: Гориславец С.М., к.с.-х.н., Рисованная В.И., к.б.н., доцент, Володин В.А., к.с.-х.н.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения фрагментного анализа продуктов ПЦР и учитывает требования СОПов «Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)», «Контроль качества нуклеиновых кислот (НК), «Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)»

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий СОП применяется сотрудниками сектора молекулярно – генетических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»).

3СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДОКУМЕНТЕ

СОП – стандартная операционная процедура

мкл– микролитры

п.н. – пары нуклеотидов

POP – универсальный денатурирующий полимер

4 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

4.1 Соблюдать стандартные меры безопасности при работе на генетическом анализаторе, указанные в «Руководстве по использованию генетического анализатора 3130 фирмы AppliedBiosystems»

4.2 Работать в зоне выполнения фрагментного анализа продуктов ПЦР в перчатках и халате.

4.3 Снимать перчатки вне пределов лаборатории, при контакте с дверными ручками, при контакте с любыми не контаминированными предметами, которыми сотрудники пользуются без перчаток.

5. ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ на этапе выполнения фрагментного анализа продуктов ПЦР на генетическом анализаторе 3130 AppliedBiosystems.

5.1 При выполнении фрагментного анализа продуктов ПЦР на всех этапах необходимо использовать одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами), проавтоклавированные перед использованием или с маркировкой «DNase, RNase-free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

5.2 Одноразовые пластиковые расходные материалы (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер и автоклавироваться.

5.3 Допускаетсяиспользованиереактивов, тест-наборов, как отечественного, так и зарубежного производства по качеству и метрологическим характеристикам не ниже требуемых.

5.4 При использовании тест-наборов экстракция выполняется в соответствии с инструкцией к ним.

5.5 Использовать перчатки одноразовые, латексные без напыления.

6 ОБОРУДОВАНИЕ

6.1 Генетический анализатор 3130 AppliedBiosystems.

6.2 ПЦР бокс/ламинарный бокс

6.3 Система подготовки ультрачистой воды, модель D7035

6.4 Стерлизатор паровой ГК-10-1.

6.5 Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С, морозильник не выше - 24° С.

6.6 Микроцентрифуга для стриповых пробирок (ExiSpin).

6.7 Компьютер

6.8 Капилляры, длина 36 см, 4 шт, для генетического анализатора

7 МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

7.1 Комплект раегентов для фрагментного анализа, 100 реакций

7.2 POP-7

7.3 Вода MQ

7.4 Дозатор (2-20 мкл)

7.5 Дозатор (20-200 мкл)

7.6 Наконечник пластиковый на пипетку - 20 мкл.

7.7 Наконечник пластиковый на пипетку - 200 мкл.

7.8 Штатив для стрипов, объемом 0.2 мл;

7.9 Перчатки латексные, без порошка.

7.10 Халат.

7.11 Журнал.

7.12 96-луночный планшет (0,1 мл) с оптической плёнкой/крышками (уп./10 шт.)

7.13 Подставка под 96-луночный планшет.

7.14 Маты силиконовые, покровные (для приборов AppliedBiosystems, для 96 луночных плашек, с перегородками, Axygen, 10 шт./уп.)

7.15 Держатель планшета (фиксатор)

7.16 Дозаторы с переменным объемом дозирования до 20 мкл

8.0 ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ МЕТОДОМ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА(ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР ABI 3130)

Продукты амплификации изучаемых и контрольных образцов (стандартные или «референтные» сорта) анализируют на генетическом анализаторе ABI Prism 3130. Детекция положения и количественная оценка фрагментов ДНК осуществляется с помощью лазерной системы прибора. Для анализа амплифицированных фрагментов размером до 600 п.н. используют набор из 4-х капилляров длиной 36 см, тип полимера POP 7.

Порядок действия:

8.1 Добавить в стрипы с полученными ПЦР-продуктами формамид Hi-Di и размерный стандарт LIZ450

8.2 По 15 мкл полученной смеси внести в лунки плашки

8.3 Далее фрагментный анализ выполняется в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией.

8.4 Установка параметров фрагментного анализа и сбор данных выполняется с помощью программного обеспечения Data Collection

8.5 Интерпретация полученных результатов выполняется с помощью программного обеспечения GeneMapperv4.0 в автоматическом или ручном режимах.

Суммарное время выполнения СОПа составляет 120 мин.

9.0 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установка параметров фрагментного анализа и сбор данных выполнена с помощью программного обеспечения DataCollection.

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация полученных результатов выполнена с помощью программного обеспечения GeneMapper v4.0. При оценке результатов фрагментного анализа изучаемых и референсных образцов установлены наличие и размер аллелей анализируемых локусов, на основе которых получены ДНК-профили анализируемых сортов винограда.

11. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

При подготовке СОП «Идентификации сортов винограда методом фрагментного анализа были использованы следующие литературные источники:

1 Руководство по использованию генетического анализатора 3130 AppliedBiosystems, 2004.

2 РД 00384830 – 064 – 2010 Методика генотипирования, идентификации и регистрации генотипов винограда с помощью анализа микросателлитных локусов (SSR- PCR)

ПРИЛОЖЕНИЕ У

Стандартная операционная процедура

«Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции

с использованием метода *in vitro*»

Составлено: Павлова И.А., к.б.н.

Стандартная операционная процедура устанавливает порядок выполнения последовательности проведения оздоровления растений от вирусов посредством культуры апикальных меристем.

Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием методов *invitro* состоит и последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

- «Экстракция рибонуклеиновой кислоты (РНК)»
- «Получение комплементарной ДНК (кДНК)»
- «Контроль качества экстрагированных нуклеиновых кислот (НК)»
- «Выполнение полимеразной цепной реакции (ПЦР)»
- «Оценка результатов ПЦР методом гель-электрофореза»

Последовательность получения растений, свободных от вирусов через культуру апикальных меристем: 1 - инфицированное вирусом растение, 2 - сегменты стебля; 3-стерилизация первичных эксплантов; 4 - вычленение апикальной меристемы из пазушной почки; 5 -культивирование апикальной меристемы; 6 - побеги, развившееся из апикальной меристемы; 6 - тестирование растений на присутствие вирусов; 7 - укоренение свободных от вирусов побегов.

1. Тестирование образца, проведенное согласно соответствующей СОП показало наличие вирусной инфекции у растения.

2. Сегменты побега

2.1.Одревесневшие побеги нарезают секатором на сегменты в 20-30 см, помещают в емкости с водопроводной водой, проращивают в комнатных условиях до образования зеленых побегов в среднем три недели. В мае-июне заготавливают зеленые побеги непосредственно с куста.

2.2. От побегов отделяют верхушки размером 2-2,5 см и помещают в стеклянные бюксы с крышкой.

3.Стерилизация

3.1. В ламинарном боксе в стеклянные бюксы с верхушками побегов сначала наливают 70% этиловый спирт экспозиция 30-40 секунд. Затем спирт сливают и заливают второе стерилизующие вещество: диоцид на 5-8 минут или гипохлорит натрия на 8-10 минут.

3.2.Промывка

После стерилизации экспланты промывают стерилизованной дистиллированной водой. Для этого сливают стерилизующий раствор и заливают стерильный дистиллят. Воду меняю 4-5 раз в течении 10-15 минут.

4.Вычленение апикальной меристемы

4.1.В ламинарном боксе при помощи глазного пинцета и скальпеля из верхушек побегов вычленяют меристемы размером 0,5-0,8 мм. Для этого стерилизованные верхушки пинцетом кладут в чашку Петри с увлажненной фильтровальной бумагой и под бинокулярной лупой вычленяют меристемы с листовыми зачатками.

4.2.Вычлененные меристемы пинцетом или специально сделанной иглой высаживают на мостики из фильтровальной бумаги в жидкой среде М1 в пробирки или в стаканы на 50- 100 мл, содержащие по 2-3 мл среды[1]. В сосуд высаживают по одной меристеме, закрывают крышкой из фольги.

5.Культивирование меристем

5.1.Культивируют при температуре 23-28^0 С, 16-часовом фотопериоде, первую неделю при освещении 800-1000 лкс, а затем увеличивают освещение до 2-5 тыс.лкс. Культивируют на качалках.

5.2.Через 20-30 дней эксплантыувеличиваются в размере до 1-2 см. Их повторно пересаживают пинцетом на среду жидкую М2, толщиной 2-3 мм[1].

5.3.Через 14 дней вырастают побеги длиной 3-4 см с 6-10 почками. В стерильных условиях верхнюю часть побега с 3-4 почкам срезают и пересаживают на среду М3[2]. Процедуру повторяют 3-4 раза.

5.4. Культивирование осуществляют на свету при 16-часовом фотопериоде интенсивностью 2-3тыс. люкс и температуре +27°С.

6.После нескольких пассажей материал берут для повторного тестирования. Для этого используют соответствующий СОП.

7. В случае отсутствия вирусной инфекции полученные побеги в стерильных условиях высаживают на среду Н2 для укоренения[3].

СОП «Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием метода *in vitro»* проводится три-четыре раза в год.

Суммарная длительность СОП на 1 образца: 54 мин. В том числе:

1 - инфицированное вирусом растение – 5 мин.,

2 - сегменты стебля – 5 минут;

3- стерилизация первичных эксплантов – 25 мин;

4 - вычленение апикальной меристемы – 3 мин;

5 -культивирование апикальной меристемы – 6 мин, по 1мин. на один пассажа;

6 - побеги, развившиеся из апикальной меристемы - по 1 мин. на побег, на 10 десять побегов – 10 мин.;

7 - укоренение свободных от вирусов побегов – по 1 мин. на побег, на 10 побегов – 10 минут.

Суммарный период проведения СОП от трех месяцев.

СОП «Оздоровление растений винограда от патогенной инфекции с использованием метода *in vitro»* осуществляется с использованием следующего оборудования:

Ламинарный кабинет AHC-4D1c горизонтальным потоком ветра и стендом-подставкою, климатическая камера (Binder), бинокулярная лупа, стеллажи с освещением.

Комплекты общелабораторного оборудования: наборы микропипеток, источники питания, холодильники, вытяжные шкафы, дистиллятор, электронные весы, pH-метр и др.

УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / Голодрига П.Я., Зленко В.А, Чекмарев Л.А., Бутенко Р.Г., Левенко Б.А., Пивень Н.М. – Ялта: ВНИИВиПП, 1986. – 56 с.
2. Патент №2113111, Россия, МПК A01H1/04 Способ выращивания растений из труднопрорастающих семян/ Зленко В.А. Котіков И.В. ТрошинЛ.П., Павлова И.А./Россия.- № 95101091/13; Заявл. 26.01.95.; Опубл. 20.06.98.; Бюл. № 17
3. Павлова И.А., Зленко В.А., Волынкин В.А. Применение методов биотехнологии для получения оздоровленного посадочного материала винограда// Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні: Наукові праці Південного філіалу «Кримський Агротехнологічний університет» Національного аграрного університету. – Сімферополь., 2008. – Вип. 107 – С. 161-164.
4. Клименко В.П., Павлова И.А. Оптимизация условий для оздоровления роста и развития растений, полученных с помощью биотехнологических методов// Наукові праці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України. – Київ, 2012.– Вип. 16. – С. 261-264.