Стандартная операционная процедура «Поддержание сортов картофеля в полевой культуре»

Составлено: Г.Ф. Сафиуллина, к.с.-х.н., в.н.с., З. Сташевски к.б.н., в.н.с.,  
А.Т. Гизатуллина, н.с.

Содержание и назначение: хранение материалов по биоразнообразию растений и предоставление селекционерам, специалистам и иным заинтересованным лицам возможностей для работы с этими коллекциями.

Местонахождение: ТатНИИСХ - обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

Пересмотр через: 1 год

Введение

Генетические ресурсы растений являются стратегическим ресурсом и основой устойчивого производства сельскохозяйственных культур. Их эффективное сохранение и использование имеют ключевое значение для обеспечения продовольственной и пищевой безопасности. Для решения данной проблемы необходимо, чтобы постоянно создавались новые сорта, адаптированные к неблагоприятным условиям окружающей среды в каждой климатической зоне.

Ценность сорта картофеля определяется комплексом признаков и свойств, из которых первостепенное значение имеет уровень потенциально возможной урожайности. Урожайность является интегральным показателем хозяйственной ценности любого сорта, его устойчивости к неблагоприятным условиям среды, к болезням и вредителям. Использование генофонда биоресурсной коллекции является необходимым инструментом селекционера при создании сортов картофеля.

В технологии производства полевой коллекции – хранение является особым звеном. Наряду с технологией выращивания, особенностями сорта, погодными условиями вегетационного и уборочного периодов, хранение является одним из факторов, влияющих на качество картофеля. Зачастую к уборке клубни не успевают полностью созреть, имеют неокрепшую кожуру, часто подвержены к удушью, уборку проводят при неблагоприятных условиях (дождливая и холодная погода). Поскольку холодные и увлажнённые клубни имеют повышенный тургор, в связи с чем сильно повреждается мякоть и кожура. В результате именно хранение, в конечном итоге, определяет качество и сохранность полевой коллекции картофеля.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола поддержания единиц хранения Коллекции.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с картофелем в полевых условиях.

Оборудование и материалы

Таблица В.1 – Расходные материалы и средства защиты – средства защиты рассчитываются для однократного выполнения в отношении одной единицы хранения

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Наименование | Единица измерения | Израсходовано единиц |
| Протравитель СелестТоп | л/т | 0,4 |
| Гербициды: | | |
| Зенкор | кг/га | 2 |
| Титус | кг/га | 0,07 |
| Агритокс | л/га | 1,2 |
| Фунгициды: | | |
| Ридомил Голд | кг/га | 2,5 |
| Манкоцеб | кг/га | 2 |
| Ширлан | л/га | 0,4 |
| Инсектицид: | | |
| Эйфория | л/га | 0,2 |
| Десикант: | | |
| Реглон | л/га | 3 |
| Удобрения: | | |
| Калий хлор | тонн/га | 0,3 |
| Диаммофоска | тонн/га | 0,4 |
| ГСМ | тонн | 0,043 |

Оборудование, задействованное для общего обеспечения деятельности коллекции: трактор МТЗ-1221, сажалка клоновая 4 рядная, плуг ПН-4-35, трактор Беларусь МТЗ-82, борона БДМ-3,2х4П, культиватор КСН-3, опрыскиватель ОП-2000М Руслан, погрузчик ПЭФ-1 а ТР 25-21, прицеп 2 ПТС-4, разбрасыватель ZA-М 1500.

Материальные затраты для общего обеспечения деятельности коллекции (рассчитывается за последние 12 месяцев): ящики овощные, сетки овощные, ведра полиэтиленовые, лопаты, тяпки, вилы, перчатки хозяйственные, перчатки х/б, компьютер, монитор, принтер, холодильник Стинол 256Q, канцелярские принадлежности, стол рабочий, журнал учета, весы, хранилище с системой активной вентиляции.

Поддержание сортов картофеля в полевой культуре

Выбор поля для посадки и его подготовка

Подготовка почвы

Обработку и удобрение почвы проводят согласно агротехническим правилам, принятым для выращивания картофеля в местных условиях:

Осенью проводится зяблевая вспашка земли с закладкой калийных удобрений на глубину до 30 см.

Ранней весной проводится боронование на глубину 5-7 см.

Внесение азотных и фосфорных удобрений, которые необходимо распределять равномерно по всей площади участка и закультивировать КСН-4.

Для достижения однородности тяжёлых суглинистых почв используют фрезерные культиваторы, а также при необходимости проводят сепарацию камней и комков.

Коллекционный питомник желательно размещать в полях севооборота. Это дает возможность предохранить картофель от заражения болезнями и вредителями.

Подготовка посадочного материала

За три недели до посадки нужно начать инспектирование клубней БРК картофеля (удаление клубней, пораженных болезнями и вредителями). При механизированной посадке заранее составляется схема размещения образцов (длина проходов, число ярусов, дорожек). Затем производится отбор материала по 20 клубней каждого сорта на 2 делянки. Сорта картофеля фасуются в сетки по 8 образцов, сетки маркируются.

Маркировка полей для коллекционного питомника.

Поле перед посадкой маркируют в двух направлениях (в продольном на 75 см, в поперечном на 25 см). Затем участок разбивают по шнуру на ярусы шириной 2,5 м. Ярусы разделяют дорожкой шириной 1,5 м.

На поле сорта располагают рендомизированно. По каждой группе спелости включают стандарт (районированный сорт). Срок посадки – оптимальный для данной области или зоны.

После завершения посадки составляют схему (план) фактического размещения образцов, на которой обозначены число ярусов, дорожек, нумерация делянок и этикеток, число растений. Копия схемы посадки вносится в компьютерную базу данных.

Посадка и уход за коллекционным питомником.

Посадка картофеля производится в борозды клоновой сажалкой с протравливанием клубней комбинированным инсектофунгицидом Селест Топ.

Через неделю после посадки клубней производится гребнеобразование. И последующее опрыскивание системным гербицидом против однолетних двудольных и злаковых сорных растений Зенкор совместно с контактным фунгицидом Манкоцеб.

Через две недели после опрыскивания проводится полевое инспектирование картофеля, оценка всходов. Производятся записи в журнал.

По степени засоренности через неделю после всходов проводится опрыскивание селективным гербицидом, предназначенный для обработки междурядий в посадках картофеля Агритокс совместно с селективным гербицидом Титус.

До смыкания рядков картофеля через 2-3 недели после всходов производят опрыскивание комбинированным фунгицидом Ридомил Голд МЦ, ВДГ.

Через 2-3 недели после всходов проводится полевое инспектирование картофеля, фенологические наблюдения, оценка развития болезней. Проводятся записи в журнал.

Через 10-14 дней после обработки комбинированным фунгицидом Ридомил Голд МЦ, ВДГ, производится обработка контактным фунгицидом Манкоцеб и комбинированным инсектицидом Эйфория, КС.

Каждые 10 дней производятся полевые инспектирования полей, проводятся записи в журнал.

Через 2 недели производится повторная обработка комбинированным инсектицидом Эйфория, КС и комбинированным фунгицидом Ридомил Голд МЦ, ВДГ.

После 10-14 дней проводится обработка контактным фунгицидом Манкоцеб.

Полевое инспектирование картофеля, оценка отмирания ботвы проводится через 8 недель после всходов.

Для завершающих опрыскиваний применяют контактный фунгицид для защиты картофеля от фитофтороза Ширлан, СК совместно с Реглон Супер, ВР для десикации и выдерживают 2 недели.

За неделю до уборки проводят скашивание ботвы.

Наблюдения, учеты и оценка

При изучении образцов коллекции используют полевые и лабораторные методы оценки. Полевой метод является основным при изучении и позволяет наиболее полно дать оценку образца в разных эколого-географических условиях.

В течение вегетационного периода учитывают:

Фенологические показатели: начало появления всходов (10% взошедших растений), массовые всходы (75% взошедших растений), начало цветения (10%), массовое цветение (75%), образование ягод, отмирание ботвы (начало, полное);

Визуальную оценку состояния растений: вирусные, грибные заболевания, влияние гербицидов на растение.

Для определения скороспелости у изучаемых сортов, производят выкапывание кустов на 60 –й день после посадки. Взвешивают товарные и мелкие клубни, подсчитывают число товарных и сравнивают со стандартными сортами.

Уборка, учет урожая и качества коллекционного питомника

Уборка производится вручную, клубни каждого растения от образца выкапываются отдельно и гнездами выкладываются в лунки. Клубни визуально оценивают по типичности, степени поражения болезнями, вредителями. Образцы с 10 кустов собираются в отдельную сетку, маркируются и переносятся на хранение.

При осенней переборке учитывают следующие показатели: дефекты клубней (неправильная форма, трещины, израстание, дуплистость, сухая гниль, фитофтороз, парша, ризоктониоз), выравненность клубней. Клубни каждого образца просматривают, отбраковывают больные и поврежденные, отмечая вид болезни и число больных клубней, характер и степень прорастания. Затем образцы разделяют по фракциям крупные >70 мм, средние 50-70 мм, мелкие <50 мм взвешивают, определяют число клубней каждой фракции. На семена оставляют выравненные по форме клубни. Затем рассчитывают процент товарности, урожайность, массу среднего клубня. Все наблюдения записывают в полевой журнал.

Оценка столовых качеств клубней

Оценку столовых качеств клубней проводят по методике отдела клубнеплодов ВИР. Для дегустации отбирают клубни правильной формы, типичной для сорта. Для оценки не допускаются клубни проросшие, неправильной формы, уродливые и с другими отклонениями. При варке в воде следует пользоваться мягкой водой (при ее отсутствии использовать кипяченую воду). При оценке вкусовых качеств картофель дегустируют без соли. Анализируемые образцы и стандарт должны быть зашифрованы.

Хранение полевой коллекции сортов картофеля

Оборудование и материалы

Материальные затраты для общего обеспечения деятельности коллекции: ящики овощные, сетки овощные, мешки полиэтиленовые, ведра полиэтиленовые, лопаты, перчатки хозяйственные, перчатки х/б, компьютер, монитор, принтер, канцелярские принадлежности, стол рабочий, журнал учета, термометр, деревянные поддоны, весы.

Расходные материалы и средства защиты: 10-20% гашеная известь, 3% медный купорос, дератизация

Оборудование, задействованное для общего обеспечения деятельности коллекции: хранилище с системой активной вентиляции, погрузчик ТР 25-21.

Перед закладкой на хранение коллекцию выдерживают 2-3 недели на крытой площадке, проходит временное хранение (лечебный период), после чего перебирают, калибруют по фракциям, взвешивают и закладывают на постоянное хранение.

Технология хранения начинается с подготовки хранилища: за две-три недели до начала загрузки производят ремонт, очистку от мусора и остатков прошлогоднего картофеля, проводят дезинфекцию хранилища 3%-ым раствором медного купороса. Стены хранилища, закрома, потолок белят 10-20% гашеной известью.

Каждый образец картофеля в коллекции после переборки сортируется в сетки, маркируется и укладывается на деревянные поддоны. Высота поддона от пола составляет 10-15 см, высота сеток на поддоне около 1 метра.

Этапы закладки картофеля на хранение

Просушивание картофеля

В процессе загрузки по мере заполнения поддонов проводят просушивание клубней из расчета 100-150 м3/т/ч за счет концентрации потока нагнетаемого воздуха в соответствующем распределительном канале, над которым сформирован поддон. Вентилируют непрерывно наружным воздухом. Продолжительность вентиляции зависит от состояния картофеля. Если картофель сухой – вентилируют 1-1,5 суток, влажный и холодный – 3-4 суток.

Лечебный период

Первые две недели в хранилище после просушивания, клубни проходят лечебный период с целью залечивания повреждений. Заживление клубней от ручной копки происходит при температуре от 12 до 18 ºС. Вентилируют теплым влажным рециркуляционным воздухом хранилища 5-6 раз в сутки по 30 минут с перерывами 3-4 часа.

Период охлаждения

После лечебного периода наступает период охлаждения. Если повреждения незначительные, температуру снижают постепенно на 0,5 ºС в сутки в течение 20-30 дней до температуры основного хранения.

Основной период

Поддерживается температура на уровне 2-4 °С, вентилируют 2-3 раза в неделю по 30 минут.

Весенний период

Для предупреждения раннего прорастания клубней картофеля, температуру понижают до 1,5-2 °С путем вентиляции в ночные и утренние часы суток.

Стандартная операционная процедура

«Поддержание коллекции сортов картофеля в асептической культуре *in vitro*»

Составлено: Г.Ф. Сафиуллина, к.с.-х.н., в.н.с., А.Т. Гизатуллина, н.с.

Содержание и назначение: поддержание коллекции сортов картофеля in vitro и предоставление селекционерам, специалистам и иным заинтересованным лицам для работы с этими коллекциями

Местонахождение: ТатНИИСХ - обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

Пересмотр через: 1 год

Введение

В мировой практике для сохранения генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур кроме полевых коллекций используют также технологии in vitro и методы криоконсервации. На сегодняшний день методы хранения оздоровленных растений in vitro являются практически единственным надежным способом сохранения генофонда вегетативно размножаемых растений, обеспечивающим надежную изоляцию и сохранность растений от всевозможных патогенов.

Поддержание вегетативно размножаемых растений в виде коллекций in vitro значительно расширит область практического использования генофонда данных культур, предоставив возможности для использования различных методов биотехнологии, что существенно ускорит селекционный процесс.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола поддержания единиц хранения Коллекции.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с картофелем в асептической культуре in vitro.

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

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

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

Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

Лабораторное оборудование:

рН-метр

Набор пипеток 100, 200, 1000 мкл

Пипеточный дозатор 0,5–100 мл

Плита электрическая

Дистиллятор

Стерилизатор паровой

Ламинар-бокс II класса защиты

Дозатор поршневой

Весы электронные

Сушильный шкаф 100-130 °С

Стерилизатор воздуха

Устройство для намотки ватных пробок - АО ОКТБ Кристалл

Расходные материалы и реактивы:

Агар-агар

Сахарный песок

Дезинфицирующий раствор

Аммоний азотокислый

Калий азотнокислый

Кальций хлорид 2 водный

Сульфат магния 7 водный

Калий фосфат

Микроэлементы

Борная кислота

Марганец сернокислый четырехводный

Цинк сернокислый четырехводный

Калий йодистый

Натрий молибденовокислый двухводный

Медь сернокислая пятиводная

Кобальт хлористый шестиводный

Трилон Б

Железо сернокислое семиводное

Пантотенат кальция

Тиамин

Пиридоксин

Аскорбиновая кислота

Колба плоскодонная

Стеклянная палочка

Пробирка биологическая, 200 мм длина, 14 мм диаметр

Цилиндр мерный

Стаканчик стеклянный

Чашка Петри

Спиртовка стеклянная

Ножницы

Пинцет

Скальпель

Штатив п/э

Халат медицинский

Резиновые тапочки

Оборудование, задействованное для общего обеспечения деятельности коллекции

Кондиционер:

- Внешний блок

- Внешний блок GU-S36HR

- Внутр.блок

- Внутр. блок GC-S36HR

Холодильник Стинол 256Q

Стеллаж различных модификаций

Компьютер

Монитор

Принтер

Материальные затраты для общего обеспечения деятельности коллекции

Лампа люминисцентная

Ведро эмалированное 12 л

Губка для мытья посуды

Средство для мытья посуды

Полотенце

Средство чистящее

Щетка для мытья посуды

Таз круглый 14 л

Таз круглый 16 л

Коврик диэлектрический

Канцтовары (ручки, тетради, маркеры, бумага, папки т.п.)

Замок врезной

Ведро для мусора

Мешки для мусора 20 л

Салфетка вискозная

Рукавицы брезентовые

Перчатки хозяйственные М, L

Поддержание коллекции сортов картофеля в асептической культуре in vitro

Микроразмножение растений, самый длительный этап, на котором микрорастения поддерживаются достаточно длительное время без контакта с внешней средой. Приготовление агаризованных пиаттельных сред включает:

Подготовка растворов

Приготовление маточных растворов: макроэлементов, микроэлементов, витаминов, хелата.

0,1 н HCl

0,1 н КОН

Приготовление питательной среды Мурасиге – Скуга

Смешивание необходимых макро-, микроэлементов, источников углерода, витаминов, агара.

Доведения pH до необходимого уровня (5,5-5,7).

Нагрев среды и плавление агара.

Разлив горячей питательной среды с помощью дозатора по 10 мл в пробирки, закрыть ватными пробками.

Поместить пробирки в бюксы, накрыть пергаментной бумагой и подготовить к стерилизации.

Автоклав привести в рабочее состояние: закрыть плотно крышку, воду залить до метки. Включить автоклав, давление пара довести до метки 1,2 атм. (в паровой камере), заполнить паром стерилизационную камеру, вытеснить конденсат в течении 10 минут, при этом давление пара в стерилизационной камере должно быть на уровне 0,1-0,2 атм. Довести давление в стерилизационной камере до 1 атм., включить автоматический режим.

Автоклавировать 20 минут при давлении в стерилизационной камере 1-1,2 атм.

Отключить автоклав, вытеснить пар из обеих камер довести давление до 0 атм.

Проавтоклавированные материалы перенести в комнату для пересадки тканей и поместить в шкафы или на стеллажи.

Подготовка рабочего места и расходных материалов

Металлические инструменты завернуть в плотную бумагу и поместить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при t 170-200 ºС в течение 2 часов.

Комната для черенкования перед работой обрабатывается хлорсодержащими моющими средствами и ультрафиолетовым облучением на протяжении 1 часа.

Рабочее место (ламинар-бокс) перед работой обрабатывается ультрафиолетом на протяжении 30-60 минут и все поверхности протираются 96% спиртом.

Руки во время работы периодически протираются 96% спиртом по мере необходимости.

Культивирование микрочеренков

Культивируемые экспланты достаются из пробирки на чашку петри, где производится их деление на микрочеренки при помощи пинцета и скальпеля.

Затем их помещают на свежую питательную среду.

В последующем пробирки в штативе ставятся на стеллажи в светокомнату с заданными условиями и культивируются при 5-6 лк 24-25 ºС днем и 19-20 ºС ночью, продолжительностью фотопериода 16 часов. Время депонирования пробирочной коллекции составляет 1 месяц.

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

После проведения пересадки микрорастений, стеклянную посуду тщательно моют, запаковывают в бумагу и высушивают в сушильном шкафу при температуре 140-150 ºС в течении 4 часов, после ее остывания переносят в комнату для хранения и по необходимости используют повторно.

При подготовке СОП «Поддержание коллекции сортов картофеля в асептической культуре in vitro»:

1. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / Murashige T and Skoog F // Physiol Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
2. Бутенко, Р.Г. Биотехнология. Кн. 3: Клеточная инженерия. М.: Высш. Шк., 1990. – с. 127.
3. Безвирусное семеноводство картофеля (рекомендации) / Л.Н. Трофимец, В.В. Бойко и др. – М.: ВО «Агропромиздат», 1990. – 32 с.