ПРИЛОЖЕНИЕ 14.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. В.Л. КОМАРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УТВЕРЖДАЮ
Директор БИН РАН,

_____ Д.В. Гельтман
"29" августа 2017 г.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ПОЛУЧЕНИЮ ГЕНЕРАТИВНОЙ СТАДИИ КУЛЬТУР БАЗИДИОМИЦЕТОВ КОЛЛЕКЦИИ БИН РАН

(Разработано Н.В. Псурцевой)

Санкт-Петербург 2017

14. Стандартная операционная процедура по получению генеративной стадии культур базидиомицетов коллекции БИН РАН включает ряд последовательных действий по созданию условий для плодообразования в культуре и учитывает требования следующих стандартных операционных процедур:

— Стандартная операционная процедура по приготовлению питательных сред и стерильной посуды (Приложение 2);

— Стандартная операционная процедура по пересеву культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 4);

— Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 5);

— Стандартная операционная процедура по контролю чистоты (аутентичности) культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 6);

14.1. Получение в культуре примордиев или полноценно развитых плодовых тел пригодных для идентификации может служить для различных целей, одной из которых является верификация видовой принадлежности культуры.

14.2. Для успешного получения стадии плодообразования в культуре необходимо учитывать, к какой трофической группе относится штамм и условия плодообразования этого вида природе, включая:

— субстрат;

— температуру;

— влажность;

— освещенность.

14.2.1 Получение генеративной стадии на стандартной агаризованной среде в чашке Петри.

Для выявления культур базидиомицетов, способных плодоносить в чашках Петри на сусло-агаре штаммы высевают на чашки Петри и выращивают на среде сусло-агар в соответствии с СОП «Стандартная операционная процедура по получению морфологических характеристик культур базидиомицетов коллекции БИН РАН» (Приложение 11).

14.2.2. После освоения мицелием поверхности среды чашки переносят из термостата на свет: либо оставляют при комнатной температуре и естественном освещении, либо помещают в климатическую камеру с заданными параметрами – освещение не менее 100 люкс, температура 15–20 °С, влажность 80–95% и хорошая аэрация.

14.3. Получение генеративной стадии на древесном субстрате.

14.3.1. В качестве субстрата используют смесь опилок лиственных пород деревьев (Betula sp., Salix sp. и др.) и отрубей (рисовых или пшеничных) в соотношении 3:1.

14.3.2. В смесь опилок с отрубями добавляют кипящую воду до достижения равномерного увлажнения субстрата.

14.3.3. Влажный (но не переувлажненный) субстрат раскладывают по стеклянным, железным или пластиковым термостабильным емкостям объемом 150–750 мл.

14.3.4. Наполненные на ¾ емкости уплотняют легким постукиванием о деревянную поверхность и закрывают крышками или сложенной в несколько слоев фольгой.

14.3.5. Емкости с субстратом стерилизуют в автоклаве в течение 1 часа при 1 атм.

14.3.6. Инокуляцию субстрата проводят в ламинаре (с соблюдением стерильных условий) мицелием, выращенным на чашках Петри на среде сусло-агар. Для этого колонию на чашке разрезают скальпелем на части, переносят кусочки мицелия в емкости и слегка перемешивают с субстратом.

14.3.7. Инокулированные емкости помещают в темное место на 25°C на 2–4 недели. 14.3.8. После того как весь субстрат обрастет мицелием, емкости с некоторыми видами в течение 5 суток подвергали «холодовому шоку» (5 °C). Необходимость холодового шока зависит от экологических особенностей выращиваемых видов грибов.
14.3.8. Затем мицелиальные блоки осторожно, с соблюдением стерильности, вынимают из емкостей и переносят на чашку Петри (или прозрачные стенки емкостей покрывают фольгой) и помещают в Ziploc пластиковый пакет с небольшим количеством воды на дне для создания и поддержания влажности.
14.3.9. Пакеты с блоками переносят на свет: либо оставляют при комнатной температуре и естественном освещении, либо помещают в климатическую камеру с заданными параметрами – освещение не менее 100 люкс, температура 15–20 °C, влажность 80–95% и хорошая аэрация.
14.4. Чашки Петри или субстратные блоки регулярно (1-2 раза в неделю) контролируют на отсутствие контаминации и начало образования зачатков плодовых тел (примордиев).
14.5. При обнаружении примордиев фиксируют сроки начала плодообразования.
14.6. При формировании зрелых плодовых тел может возникнуть необходимость снять крышку с чашки Петри или извлеч блок из пакета. При этом следует накрыть чашку или блок подходящим по размеру стеклянным сосудом для сохранения влажности.
14.7. Зрелые плодовые тела фотографируют, используют для верификации, гербаризируют и сохраняют в качестве ваучерных образцов в соответствии с СОП «Стандартная операционная процедура по подготовке и закладке на хранение ваучерных гербарных образцов» (Приложение 17).

Получение генеративной стадии культур базидиомицетов осуществляется с использованием следующего лабораторного оборудования: ламинарные шкафы ВЛ-12, паровой стерилизатор (автоклав) ГК-100, термостаты ТС-1/80 и хладотермостаты ТСО-1/80, климатическая камера Sanyo, микроскопическая техника (световой микроскоп AxioScope A1, Carl Zeiss, стереомикроскопы МБС-10 и МС-2), холодильники, вытяжные шкафы и т.д.; оргтехники (PC с ОС Windows, принтеры, сканеры и пр.), фототехники (цифровые фотокамеры Canon, Olympus и пр.) и расходных материалов: комплекты инструментов для работы в ламинаре, наборы микропипеток, стерильные пластиковые чашки Петри, реактивы для приготовления сред, спирт и т.д.

Зав. лабораторией биохимии грибов БИН РАН,
Куратор Коллекции LE-BIN Н.В. Псурцева