ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
_____ —
202_
(проект, первая редакция)

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

Подготовка лабораторных проб и методы микологического исследования

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения

Москва

Российский институт стандартизации

202_

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 042 «Карантин и защита растений»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от №

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.rst.gov.ru)

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 202_

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

Область применения .....
Нормативные ссылки .....
Термины и определения, сокращения.....
Общие требования.....
Общие требования к безопасности, персоналу, пробам (образцам) .....
Оборудование, расходные материалы и реактивы .....
Формирование лабораторной пробы от пробы (образца) .....
Визуальный метод .....
Метод микроскопии.....
Биологический метод с использованием питательной среды и влажной камеры .....
Биологический метод с использованием плавающих приманок .....
Культуральный метод.....
Метод смыва и центрифугирования .....
Метод окрашивания мицелия в зерне и семенах .....
Метод биологического тестирования почвы .....
Метод флотации - прямое тестирование почвы.....
Метод микробиологического посева почвы .....
Метод ПЦР .....
Приложение А (рекомендуемое) Состав и приготовление буферов и растворов……
Библиография .....

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

Подготовка лабораторных проб и методы микологического исследования

Plant quarantine

Laboratory samples preparation and methods of mycological testing

Дата введения —

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пробы (образцы) подкарантинной продукции и устанавливает методы подготовки лабораторных проб и методы микологического исследования.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 34198-2017 «Межгосударственный стандарт. Карантин растений. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. Общие требования».

ГОСТ 20562-2013 «Межгосударственный стандарт. Карантин растений. Термины и определения».

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный

стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения, сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 20562, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **проба (образец):** Часть подкарантинной продукции, отобранная для проведения лабораторного исследования;

3.1.2

лабораторное исследование: Исследование образца, отобранного при карантинном фитосанитарном обследовании подкарантинного объекта или досмотре подкарантинной продукции, с целью установления карантинного фитосанитарного состояния [ГОСТ 34198-2017, пункт 3.2]

3.1.3 **микологическое исследование**: Комплекс лабораторных методов, направленных на выявление, определение свойств и идентификацию грибов и грибоподобных организмов;

3.1.4 **навеска:** Количество пробы (образца), отобранное для получения лабораторной пробы требуемых параметров;

3.1.5 **гомогенизация:** Механическое измельчение навески, в ходе которой достигается однородная структура;

3.1.6 **дробление**: Механическое измельчение навески на более мелкие части;

3.1.7 **лабораторная проба**: часть пробы (образцы), подготовленная соответствующим образом и являющаяся достаточной для проведения лабораторного исследования;

3.1.8 **аналитическая проба**: мицелий или другая структура грибов и грибоподобных организмов, выделенных из лабораторной пробы, предназначенные для проведения анализа.

3.1.9 **аналитическая навеска**: Часть аналитической пробы установленной

массы (объема), целиком используемая при выполнении единичного анализа.

3.1.10 **контаминация:** загрязнение пробы (образца) или рабочих поверхностей посторонними микроорганизмами, генетическим материалом из других проб (образцов) (кросс-контаминация) или ПЦР-продуктами;

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

об/мин – обороты в минуту;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

Сем. – семейство.

Общие положения

4.1 Объектами микологического исследования являются: растения и их части, растительная продукция, гербарные образцы, прочие пробы (образцы) (почва и грунты, торф, удобрения животного и растительного происхождения, пробирки с растительным экстрактом, пробирки с генетическим материалом, колонии грибов и грибоподобных организмов на питательной среде, микропрепараты, сметки, вода, водные смывы).

Примечание

Данный перечень объектов исследования не является исчерпывающим.

4.2 Микологическое исследование проводят с целью выявления и идентификации грибов и грибоподобных организмов, которые являются определяемым показателем микологического исследования и составляют предмет исследования.

4.3 Формирование навесок, метод подготовки лабораторных проб и выбор методов микологического исследования осуществляют исходя из вида объекта исследования и предмета исследования.

4.4 Подготовка лабораторной пробы включает отбор, подготовку лабораторной пробы, подготовку аналитической пробы с дальнейшим проведением микологического исследования.

Требования к безопасности, персоналу, пробам (образцам)

5.1 Требования к безопасности

5.1.1 Выполнять лабораторные исследования необходимо, соблюдая требования техники безопасности при работе с химическими реактивами и лабораторным оборудованием.

5.1.2 Очистку использованного оборудования и материалов проводят химическими или физическими методами в соответствии с установленными в испытательной лаборатории требованиями.

5.1.3 Обеззараживание и утилизацию использованной посуды, материалов, жидкостей и зараженных проб (образцов) проводят химическими или физическими методами.

5.2 Требования к персоналу

Персонал, участвующий в микологическом исследовании, должен владеть методами подготовки лабораторных проб к микологическому исследованию и быть обучен технике обращения с лабораторным оборудованием.

5.3 Требования к образцам

5.3.1 Перед началом работы с пробой (образцом) проводят проверку соответствия сопроводительным документам.

5.3.2 Поступившую на исследование пробу (образец) осматривают на предмет пригодности к проведению исследования.

Растительный материал должен быть свежим, без признаков гниения, усыхания, наличия плесени. Сгнившие или заплесневевшие пробы (образцы) непригодны для исследования.

5.3.3 Непригодную для исследования пробу (образец) подвергают действиям, предусмотренным внутренней документацией лаборатории.

Пригодную для исследования пробу (образец) осматривают на наличие симптомов (согласно определяемому показателю) и формируют навеску.

Оборудование, расходные материалы и реактивы

Весы аналитические;

Весы лабораторные;

Шкаф сушильный лабораторный;

Автоклав;

Баня водяная;

Анализатор жидкости (Измерение pH растворов, сред, буферов);

Центрифуга до 13000 об. /мин;

Центрифуга до 3000 об. /мин;

Термостат с диапазоном температур 15°С-50°С;

Холодильник с морозильной камерой;

ПЦР-бокс;

Центрифуга для микропробирок под пробирки вместимостью 1,5 мл;

Микроцентрифуга-вортекс;

Термостат твердотельный для микропробирок;

Амплификатор нуклеиновых кислот в реальном времени;

Дозаторы автоматические или механические переменного объема;

Лампа бактерицидная;

Ламинарный бокс;

Фотоаппарат;

Гельдокументирующая система или трансиллюминатор;

Камера для горизонтального электрофореза;

Заливочный столик;

Рамки и гребенки для приготовления геля;

Лампа УФ;

Микроскоп;

Стереомикроскоп;

Окуляр-микрометр или ПО для проведения измерений;

Набор луп (увеличение 7х, 10х, 20х);

Цилиндры мерные;

Халат медицинский;

Зип-пакеты;

Пипетки Пастера или дозаторы;

Колбы стеклянные;

Пробирки центрифужные;

Пробирки объемом 1,5-2,0 мл;

Микропробирки;

Пестики стерильные для гомогенизации;

Чашки Петри, Коха;

Бутыли стеклянные лабораторные;

Стаканы лабораторные;

Колбы из термостойкого стекла;

Камера Горяева;

Спиртовка или горелка;

Ножницы лабораторные;

Пинцеты;

Скальпель;

Иглы препаровальная для посева культур грибов или стерильные зубочистки;

Прибор нагревательный (электроплитка);

Сита лабораторные;

Стекла предметные;

Стекла покровные;

Стекло часовое;

Бумага фильтровальная;

Марля;

Вата;

Перчатки медицинские одноразовые;

Контейнер для сбора биологического материала;

Контейнер пластиковый;

Наконечники для дозаторов переменного объема от 0,5 до 1000 мкл;

Набор для выделения ДНК;

Хлорсодержащий дезинфицирующий раствор;

Серебро азотнокислое;

Натрий хлористый;

Серная кислота;

Натрия гидроокись;

Трис $(HOCH_2)3CNH_2$;

Борная кислота (H_3BO_3);

ЭДТА Этилендиаминтетрауксусная кислота ($C_{10}H_{16}N_2O_8$);

Кислота лимонная;

Кислота молочная;

Селективные питательные среды;

Вода дистиллированная;

Иммерсионное масло;

Спирт этиловый ректификат 96%-ный;

Антибиотики;

Раствор этидия бромистого (мутаген);

Трис-боратный буфер;

Агароза;

Буферы для проведения ПЦР;

Тест системы для проведения ПЦР.

Формирование лабораторной пробы от пробы (образца)

7.1 Отбор лабораторной пробы от проб (образцов) осуществляют вручную. Работы проводятся в медицинских перчатках.

7.2 Образец (пробу) полностью извлекают из пакета, раскладывают на листе чистой бумаги или на дезинфицированном столе и подвергают визуальной проверке.

7.3 Чтобы не допустить кросс-контаминации при формировании лабораторной пробы, пробы (образцы) открывают и исследуют по одному (по очереди).

7.4 В случае, если масса пробы (образца) не позволяет получить необходимое количество лабораторного образца, то имеющуюся пробу (образец) используют целиком.

7.5 При проведении исследования с целью выявления и идентификации грибов и грибоподобных организмов, обитающих исключительно внутри тканей (эндофитно), проводится промывание образца в проточной водопроводной воде, с последующей стерилизацией с помощью 70% этанола (или другого дез. раствора) (после двукратно промыть в стерильной воде).

7.6 Количество отбираемого лабораторного образца зависит от исследуемого материала и дальнейшего метода исследования, каждую лабораторную пробу маркируют и помещают в контейнер для сбора биологического материала.

Визуальный метод

8.1 Метод применяют для выявления признаков поражения возбудителями, проводят визуальный осмотр образцов, поступивших на исследование.

8.1.1 При наличии характерных симптомов, развитого мицелия или спороношения проводится прямая микроскопия и морфометрия грибов и грибоподобных организмов, с исследуемого образца.

8.1.2 При отсутствии характерных симптомов или слабом развитии проводится отбор и применение дополнительных методов исследования.

8.1.3 Образцы осматривают на наличие симптомов заболеваний и отбирают для проведения исследований. Также отбирают бессимптомный материал для выявления возможной скрытой инфекции.

Метод микроскопии

Для идентификации грибов и грибоподобных организмов используют метод микроскопии.

9.1 Исследуемый материал с признаками наличия возбудителя помещается на предметное стекло.

9.2 Проведение прямой микроскопии с исследуемого образца.

9.2.1 При исследовании с растительного образца, зараженных семян.

9.2.1.1 Материал придерживают пинцетом, препаровальной иглой или стерильной зубочисткой отбирают фрагмент мицелия или исследуемого материала на чистое предметное стекло в каплю стерильной воды, накрывают покровным стеклом.

9.2.1.2 При необходимости действия выполняют под стереомикроскопом.

9. 2.1.3 Проведение анализа по 9.3.

9.2.2 При исследовании культуры/мицелия.

9.2.2.1 Препаровальной иглой или стерильной зубочисткой отбирают фрагмент мицелия или исследуемого материала на чистое предметное стекло в каплю стерильной воды, накрывают покровным стеклом.

9.2.2.2 При необходимости действия выполняют под стереомикроскопом.

9.2.2.3 Проведение анализа по 9.3.

9.2.3 При исследовании смыва.

9.2.3.1 Пипеткой Пастера или при помощи дозатора с одноразовым наконечником смыв перемешивается.

9.2.3.2 После перемешивания осадка, капля помещается на предметное стекло и накрывается покровным.

9.2.3.3 Проведение анализа по 9.3.

9.2.4 При исследовании микропрепарата.

9.2.4.1 Готовый микропрепарат помещается на предметный столик микроскопа.

9.2.4.2 Проведение анализа по 9.3.

9.2.5 При исследовании среза растительной ткани.

9.2.5.1 С исследуемого образца скальпелем или лезвием выполняется тонкий срез растительной ткани.

9.2.5.2 Срезанный фрагмент помещается на предметное стекло в каплю воды и накрывается покровным стекло.

9.3 Проведение микроскопии.

9.3.1 Проводят микроскопирование препарата, начиная с меньшего увеличения (100х), постепенно увеличивая до (400х), при применении объективов с большим увеличением, используют иммерсионное масло.

9.3.2 При выявление заданного показателя, проводят измерения морфологических структур согласно биологии возбудителя, обращая внимание на форму, цвет, количество перегородок, размеры (длина, ширина, диаметр и тд.).

9.3.3 Выполняют не менее 30 измерений необходимого параметра при помощи окуляр-микрометра или ПО, после чего высчитаю среднее значения, для сравнения с установленным значениями показателя.

9.3.4 При выявлении объекта проводят фотофиксацию.

Биологический метод с использованием питательной среды и влажной камеры

10.1 Отбор лабораторной пробы

10.1.1 Отбор семян для исследований биологическими методами (влажная камера, питательные среды)

10.1.1.1 Образец высыпают и равномерно распределяют на дезинфицированном подносе и подвергают визуальному осмотру с целью выявления семян с признаками поражения.

10.1.1.2 Отбирают 200-400 семян включая семена с симптомами и семена без видимых признаков поражения, при отсутствии симптомов отбирают бессимптомные семена, в случае поступления протравленных семян так же отбирается лабораторная проба.

10.1.1.3 Отобранные семена помещают в контейнер для сбора биологического материала и маркируют согласно сопровождающим документам.

10.1.1.4 При выявлении признаков наличия грибов на семенах может проводится прямая микроскопия по 9.2.1.

10.1.2 Отбор семян с вегетирующих растений

10.1.2.1 При исследовании вегетирующих растений с наличием семян, достигших полной биологической зрелости, проводится извлечение семян (шелушение, обмолот, и тд.) в ручною или с применением специального оборудования с соблюдением условий не допускающих кросс-контаминации при формировании лабораторной пробы дальнейшие действия проводятся по 10.1.1.1.

10.1.3 Отбор вегетативных частей

10.1.3.1 Отбор осуществляют с помощью стерильного скальпеля, ножа или ножниц.

10.1.3.2 От материала с симптомами отбирают ткани, расположенные на стыке здорового и пораженного участков: на границе пораженной ткани или язвы, вырезают участки 1-3 см, отмершие участки ткани не отбирают, чтобы избежать попадания большого количества сопутствующих микроорганизмов.

10.1.3.4 Отбор от бессимптомного материала проводят из 5-10 разных участков пробы (образца), согласно биологии возбудителя, от побегов, листьев, плодоножки или тканей в непосредственной близости от нее.

10.1.3.5 Помещают в контейнер для сбора биологического материала и маркируют согласно сопровождающим документам.

10.1.4 Отбор вегетирующих растений лиственных пород и травянистых растений

10.1.4.1 Отбирают участки черешков, фрагменты листьев, цветки, завязи, плодоножки, веточки, побеги, участки коры срезают продольно, так же при необходимости делают поперечный разрез, согласно биологии возбудителя (для осмотра проводящей системы растений) при наличии некрозов, растрескиваний, обесцвеченных участков, деформацией.

10.1.4.2 При отсутствии симптомов – отбираются фрагменты без признаков поражения.

10.1.4.3 Отобранные фрагменты растений помещают в контейнер для сбора биологического материала и маркируют согласно сопровождающим документам.

10.1.4.4 Для гербарных образцов проводят отбор по 10.1.4.1.

10.1.5 Отбор растений хвойных пород.

10.1.5.1 Отбирают хвою или ее фрагменты с признаками поражения, при наличии некрозов, растрескиваний, обесцвеченных участков, деформацией;

10.1.5.2 При отсутствии симптомов – отбираются фрагменты без признаков поражения.

10.1.5.3 Помещают в контейнер для сбора биологического материала и маркируют согласно сопровождающим документам.

10.1.5.4 Для гербарных образцов проводят отбор по 10.1.5.1.

10.1.6 Отбор древесины

10.1.6.1 При отборе от древесины отбирают фрагменты длиной 1-3 см и шириной 0.5-1 см с признаками поражения, при наличии некрозов, потемнений, растрескиваний, обесцвеченных участков, деформацией.

10.1.6.2 При отсутствии симптомов – отбираются фрагменты без признаков поражения.

10.1.6.2 Помещают в контейнер для сбора биологического материала и маркируют согласно сопровождающим документам.

10.1.6 Отбор плодов, ягод, клубней, микроклубней, корнеплодов.

10.1.6.1 Отбирают фрагменты ткани плодов или ягод размером 1-3 см с признаками поражения, расположенные на стыке здорового и пораженного участков, при наличии некрозов, потемнений, растрескиваний, обесцвеченных участков, деформацией.

10.1.6.2 При отсутствии симптомов – отбираются фрагменты без признаков

поражения.

10.1.6.2.1 Для плодов и ягод особое внимание уделяется месту прикрепления плода, у плодоножки.

10.1.6.2.2 Для клубней, микроклубней, корнеплодов при выявлении наростов и растрескиваний, наличие мицелия и спороношение проводится прямая микроскопия по 9.2.1.

10.1.6.2.3 При отсутствии явных симптомов, скальпелем срезают фрагменты длиной 1-3 см и шириной 0.5-1 см.

10.1.6.3 Помещают в контейнер для сбора биологического материала и маркируют согласно сопровождающим документам.

10.1.7 Отбор корней

10.1.7.1 Главный корень разрезают вдоль для визуального осмотра на наличие потемневших или побуревших участков.

10.1.7.2 При наличии изменения окраски отбирают фрагменты длиной 1-3 см и шириной 0.5-1 см с признаками поражения, так же отбирают боковые корни и корни без признаков поражения.

10.1.7.3 Нарезают длиной 3-5 см и помещают в контейнер для сбора биологического материала и маркируют согласно сопровождающим документам.

10.2 Подготовка к анализу

10.2.1 Для семенного материала.

10.2.1.1 Отобранные семена промывают проточной водой в течение от 15 минут до 1 часа, для семян бобовых культур время уменьшают от 10 до 20 минут.

10.2.1.2 Дезинфицируют одним из растворов: 70% этиловом спиртом в течение 3-5 мин, или 0,1% нитратом серебра, или 1% раствором гипохлорита натрия в течение 1-2 мин с последующим 2-х – 3-х кратным промыванием стерильной дистиллированной водой.

Для отдельных случаев применяют комбинированные способы стерилизации.

10.2.1.3 Стерильные семена обсушивают на бумажных фильтрах.

10.2.1.4 В стерильных условиях раскладывают в чашки Петри на селективные среды, при необходимости pH среды (при изготовлении сред) доводят до нужных параметров, согласно биологии возбудителя.

10.2.1.5 Для подавления бактериальной инфекции в питательные среды

вносятся антибиотики.

10.2.1.6 При использовании метода влажной камеры, на дно чашки помещают фильтровальную бумагу и увлажняют стерильной дистиллированной водой.

10.2.1.7 В каждую чашку на питательную среду или влажную камеру помещают семена соблюдая дистанцию примерно в 1 см одно от другого, количество семян на одну чашку может варьировать, в зависимости от ее размера.

10.2.1.8 Семена инкубируют в термостате или на лабораторном столе при заданной температуре согласно биологии возбудителя.

10.2.1.9 Проверяют на 3-е, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е сутки, согласно биологии возбудителя.

10.2.1.10 При формировании характерной колонии проводят идентификацию методом микроскопии по 9.2, методами ПЦР по 18.

10.2.2 Для вегетативных частей, плодов, корней, древесины.

10.2.2.1 Отобранные части промывают проточной водой в течение от 5 минут до 15 минут.

10.2.2.2 Дезинфицируют одним из растворов: 70% этиловом спиртом в течение 1-2 мин, или 0,1% нитратом серебра, или 1% раствором гипохлорита натрия в течение 1 мин с последующим 2-х – 3-х кратным промыванием стерильной дистиллированной водой.

10.2.2.3 В стерильных условиях раскладывают в чашки Петри на селективные среды, согласно биологии возбудителя.

10.2.2.4 Для необходимости подавления бактериальной инфекции в питательные среды вносятся антибиотики.

10.2.2.5 При использовании метода влажной камеры, на дно чашки помещают фильтровальную бумагу и увлажняют стерильной дистиллированной водой, сверху фильтровальной бумаги укладывают стерильные стекла или решетку, для меньшего контакта материала с увлажненной поверхностью.

10.2.2.6 В каждую чашку на питательную среду или влажную камеру помещают стерильные фрагменты, соблюдая дистанцию примерно в 1 см одного от другого, количество фрагментов, на одну чашку может варьировать, в зависимости от ее размера, для более крупных фрагментов используют чашки Коха.

10.2.2.7 Чашки с материалом инкубируют в термостате или на лабораторном

столе при заданной температуре согласно биологии возбудителя.

10.2.2.8 Проверяют на 3-е, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е сутки, согласно биологии возбудителя.

10.2.2.10 При формировании характерной колонии проводят идентификацию.

10.3 Идентификация

10.3.1 Идентификацию можно проводить, методом микроскопии по 9.2, методами ПЦР по 18.

Биологический метод с использованием плавающих приманок

11.1 Отбор лабораторной пробы

11.1.1 Отбор корней исследуемых растений.

11.1.1.1 Корни, розетки освобождают от почвы.

11.1.1.2 При наличии изменения окраски отбирают корни и нарезают длиной 3-5 см.

11.1.1.3 При отсутствии признаков поражения отбирают бессимптомный материал.

11.1.1.4 Помещают в контейнер для сбора биологического материала и маркируют согласно сопровождающим документам.

11.1.2 Отбор почвы.

11.1.2.1 От образца отбирают почву, массой 20-30 г.

11.1.2.2 Помещают в чашку Петри.

11.1.3 Отбор пробы воды.

11.1.3.1 Воду переливают в контейнер подходящего по объему размера.

11.2 Подготовка к анализу

11.2.1 Корни промывают под проточной водой от крупных частиц почвы в течение 3-5 минут.

11.2.2 Помещают на дно чашки Петри накрывают предметными стеклами и заливают водой так, чтобы она полностью покрывала предметные стекла.

11.2.3 Почву выравнивают и заливают дистиллированной водой так, чтобы она покрывала лабораторную пробу слоем 5-10 мм.

11.2.4 Для предотвращения излишнего загрязнения биоприманок, с поверхности чашек удаляют всплывшую органику.

11.2.5 Листья (восприимчивого растения хозяина) небольшого размера, используемые в качестве биоприманок, промывают под проточной водой в течение 3 мин и просушивают.

11.2.6 Подготовленные листья помещают на поверхность воды чашек с корнями, почвой или водой.

11.2.7 Чашки Петри, контейнеры с листьями-приманками инкубируют при комнатной температуре при 18-25 ºС.

11.2.8 Через 3-7 дней на листьях-приманках появляются некрозы.

11.3 Идентификация

11.3.1 Идентификацию можно проводить методом выделения на питательную среду по 10, методом микроскопии по 9.2, методами ПЦР по 18.

Культуральный метод

12.1 Выделение чистой культуры

12.1.1 Культивируемые грибы и грибоподобные организмы следует выделять в чистую культуру, для проведения идентификации и сравнения, а также длительного хранения.

12.1.1.1 При исследовании фрагмент мицелия, споры переносят в подготовленные чашки Петри со стерильной питательной средой, при помощи стерильной препаровальной иглы или стерильной зубочистки.

12.1.1.2 Новую чашку Петри маркируют с указанием названия питательной среды, даты и информации согласно сопроводительным документам.

12.1.1.3 Инкубируют в термостате при необходимых условиях, согласно биологии возбудителя.

12.1.1.4 Чистую культуру проверяют на 3-е, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е сутки, согласно биологии возбудителя.

12.2 Идентификация

12.3.1 При формировании характерной колонии проводят идентификацию методом микроскопии по 9.2, методами ПЦР по 18.

Метод смыва и центрифугирования

13.1 Отбор лабораторной пробы семян для исследований методом смыва и центрифугирования для выявления грибов рода *Tilletia, Ustilago*

13.1.1 Образец зерна высыпают и равномерно распределяют на дезинфицированном подносе и подвергают визуальному осмотру с целью выявления семян с признаками поражения или сорусов головневых грибов.

13.1.2 Способы отбора лабораторной пробы.

13.1.2.1 Первый способ отбора: от образца отбирают не менее 400 зерен, которые разделяют на 4 повторности примерно по 100 зерен, помещают в колбы или иные емкости объемом 100-250 мл.

13.1.2.2 Второй способ отбора: отбирают навески зерна массой 50 граммов, помещают в колбы или иные емкости объемом 100-250 мл.

13.1.2.2.1 Для удаления различных примесей перед центрифугированием водный смыв фильтруют сначала через сито с диаметром отверстий 53 мкм, а затем пропускать – через сито с диаметром отверстий 15 мкм.

13.1.2.2.2 Осадок, образующийся на сите (с диаметром отверстий 15-20 мкм), смывают небольшим количеством дистиллированной воды (3-5 мл) в центрифужные пробирки.

13.1.3 Колбы маркируются согласно сопроводительным документам.

13.1.4 При исследовании вегетирующих растений с наличием семян, достигших полной биологической зрелости, проводится предварительная подготовка по 10.1.2.

13.2 Подготовка к анализу

13.2.1 Колбы заливают стерильной водой так чтобы зерно было покрыто не менее чем на 1 см.

13.2.2 Закрывают и взбалтывают вручную или на шейкере (180-200 об/мин) в течение 5 мин.

13.2.3 Полученный водный смыв сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют при 2800-3200 об/мин в течение 3 мин.

13.2.4 Надосадочную жидкость осторожно сливают из центрифужных пробирок, оставляя на дне осадок с небольшим количеством жидкости примерно 0,5-1 мл.

13.2.5 Осадок взбалтывают и полностью используют для приготовления микропрепаратов.

13.2.6 При получение слишком насыщенного осадка, для удобства осадок

может быть разбавлен стерильной водой.

13.3 Идентификация

13.3.1 Идентификацию можно проводить, методом микроскопии по 9.2, методами ПЦР по 18.

Метод окрашивания мицелия в зерне и семенах

В случае если симптомы заболевания отсутствуют, образец анализируют методом окрашивания мицелия, для грибов рода *Ustilago*.

14.1 Отбор лабораторной пробы

14.1.1 Для анализа используют семена основной культуры, выделенные из навески массой 100 г -120 г.

14.2 Проведение анализа.

14.2.1 Перед отделением зародышей (эмбрионов) семена ячменя для отделения пленок помещают на 40 мин в 50%-ный раствор серной кислоты. (Концентрированную химически чистую кислоту разбавляют вдвое, наливая кислоту в воду).

Затем семена тщательно перемешивают, промывают проточной водой.

14.2.2 Эмбрионы семян пшеницы и ячменя отделяют от эндосперма двумя способами.

14.2.2.1 Семена замачивают в стеклянной или эмалированной посуде в 1 дм горячего свежеприготовленного раствора щелочи (KOH или NaOH, 100 г на 1 дм воды), в котором растворен синий краситель в количестве 1 г на 1 дм щелочи, и оставляют в термостате при 24°С на 12-24 ч. Содержимое изредка перемешивают стеклянной палочкой; при этом зародыши отделяются у 80% - 90% семян. Затем содержимое из посуды пропускают через лабораторные сита, вставленные одно в другое, диаметром отверстий 5, 3 и 1 мм и промывают проточной водой. Зародыши оседают на последнем сите с диаметром отверстий 1 мм. Отделившиеся окрашенные зародыши переносят в колбу вместимостью 250 см с 20%-ным раствором щелочи (200 г на 1 дм воды), взятой в количестве 200 см и кипятят в течение 10-15 мин. Затем зародыши тщательно промывают проточной водой, переносят в колбу с 50%-ной молочной кислотой и снова кипятят 1 мин.

14.2.2.2 Семена помещают в эмалированную или стеклянную посуду, заливают

3%-ным раствором щелочи и кипятят около 1 ч до полного отделения зародышей от эндосперма. Затем содержимое из посуды пропускают через набор лабораторных сит с диаметром отверстий 5, 3 и 1 мм с последующей промывкой их проточной водой. Зародыши, оставшиеся на последнем сите, переносят в колбу вместимостью 250 см и кипятят 40 мин в 15% - 20%-ном растворе щелочи, взятой в количестве 200 см, после чего их тщательно отмывают от щелочи. Отмытые зародыши помещают в стеклянный бюкс или колбу, где налито небольшое количество раствора синего красителя в концентрации 0,1%, доводят до кипения на электроплитке или спиртовке и кипятят в течение 10-20 с. При работе с реактивами следует соблюдать меры предосторожности. Потеря зародышей после всех операций не должна превышать 20%. Зародыши можно хранить в 50%-ном водном растворе глицерина. После кипячения каждый зародыш просматривают под микроскопом.

14.2.3 Зародыши располагают в рядки, с помощью препаровальных игл или небольшого скальпеля, и просматривают под микроскопом на предметном стекле или в чашках Петри.

14.3 Идентификация

14.3.1 Идентификацию можно проводить, методом микроскопии по 9.2.

Метод биологического тестирования почвы

15.1 Отбор почвы для исследований методом биологического тестирования почвы

15.1.1 Для проведения биологического тестирования в лабораторных условиях образец почвы помещается в горшки, в которые высаживаются клубни картофеля с высокой степенью восприимчивости к возбудителю.

15.2 Подготовка к анализу

15.2.1 На дно горшков, предназначенных для тестирования почвы, насыпается слой чистого песка толщиной около 3-4 см.

15.2.2 На песок помещают клубни картофеля с пророщенными в темноте глазками размером не более 3 мм.

15.2.3 Клубни засыпаются тестируемой почвой. Толщина слоя почвы над клубнями должна быть не менее 5 см.

15.2.4 Перед закладкой песок и тестируемая почва слегка увлажняются.

15.2.5 В горшки, предназначенные для положительного контроля, также вначале насыпается чистый увлажненный песок, сверху помещается незараженная почва, в которую погружаются клубни таким образом, чтобы верхушка клубней оставалась над поверхностью почвы на 1-2 см. На верхушку каждого клубня с пророщенными глазками помещается инфекционный компост. Инфекционная нагрузка – 15 г зараженного компоста на 1 клубень. Перед использованием компост слегка увлажняется до состояния густой кашицы. Затем клубни необходимо осторожно засыпать почвой, стараясь не перемещать компост с верхушек клубней. Толщина слоя почвы над клубнями с компостом также должна быть не менее 5 см.

15.2.6 Одновременно проводится посадка и отрицательного контроля с использованием 10 клубней этого же сорта картофеля. В отрицательном контроле клубни засыпаются чистой почвой.

15.2.7 Для проведения тестирования почвы отбираются клубни небольшого размера, калибром 4-5 см без признаков проявления заболеваний, с несколькими проклюнувшимися ростками.

15.2.8 Горшки располагают на отдельные поддоны (подставки) и помещают в изолированные помещения с регулируемой температурой воздуха и световым режимом 16 часов света / 18 часов темноты. Для получения достоверных результатов необходимо, чтобы температура воздуха в первые 30 дней не превышала 16-19 °С (более высокие температуры не рекомендуются), далее до уборки – не выше 20-22 °С.

15.2.9 Следует тщательно следить за тем, чтобы почва была влажной (но не переувлажненной). Для этого с момента посадки и до уборки почва должна регулярно увлажняться путем опрыскивания поверхности горшков в первые 3 недели, затем поливать, направляя воду вдоль стенок не допуская переувлажнения.

15.2.10 При уходе за растениями нельзя допускать перекрестного заражения между горшками. Побеги, достигшие 50 см, следует обрезать на высоту до 30 см, чтобы стимулировать прорастание дополнительных глазков и образование столонов.

15.2.11 Через 80-90 дней клубни достают из горшков и исследуют на наличие признаков поражения визуальным методом по 8.

15.3 Идентификация

15.3.1 Идентификацию можно проводить, методом микроскопии по 9.2, методами ПЦР по 18.

Метод флотации - прямое тестирование почвы

16.1 Отбор почвы для исследований методом флотации

16.1.1 250-350 г воздушно-сухой почвы измельчают в фарфоровой ступке и просеивают через сито с отверстиями в 1 мм.

16.1.1.1 Влажную почву высушивают в термостате до воздушно-сухого состояния при температуре не выше 50°С.

16.1.2 Просеянную почву высыпают на лист бумаги и разравнивают тонким слоем (не более 0,5 см) в виде квадрата, который делят на маленькие квадратики 3х3 см и от каждого ложечкой или шпателем отбирают немного почвы, весом 5-10 г. (в зависимости от типа почвы). При тяжелых глинистых – до 10 г, а легких песчаных - 5 г.

16.1.3 Отобранную навеску почвы ещё раз тщательно растирают в ступке пестиком и просеивают через сито или газовую ткань с отверстиями 0,25 мм для удаления крупных частиц.

16.2 Подготовка к анализу

16.2.1 Просеянную навеску почвы ссыпают в большие пробирки и заливают 3 объёмами четыреххлористого углерода или дихлорэтана.

16.2.2 От каждого образца готовят по несколько пробирок в зависимости от типа почвы.

16.2.3 Пробирки закрывают резиновыми пробками, тщательно встряхивают руками или центрифугируют в течение 1-2 минут при медленном вращении (100-300 об/мин).

16.2.4 Взвеси дают отстояться не менее 10-20 минут, а образовавшееся на её поверхности кольцо с органической примесью осторожно сливают на часовые стекла, которые помещают для испарения в вытяжной шкаф или в отдельное проветриваемое помещение.

16.2.5 После испарения осадок исследуют.

16.3 Идентификация

16.3.1 Образовавшийся осадок переносят частями на предметное стекло, анализу подвергается весь осадок.

16.3.2 Идентификацию можно проводить, методом микроскопии по 9.2, методами ПЦР по 18.

Метод микробиологического посева почвы

17.1 Отбор почвы для микробиологического посева

17.1.1 Исследуемый образец воздушно-сухой почвы высыпают на стерильный, плотный лист бумаги, тщательно перемешивают стерильным шпателем или ложкой, удаляют камни и прочие твердые примеси. Затем почву распределяют на листе ровным тонким слоем в форме квадрата.

17.1.1.1 Влажную почву высушивают в термостате до воздушно-сухого состояния при температуре не выше 50°С.

17.1.2 Просеянную почву высыпают на лист бумаги и разравнивают тонким слоем (не более 0,5 см) в виде квадрата, который делят на маленькие квадратики 3х3 см и от каждого ложечкой или шпателем отбирают немного почвы.

17.1.3 Почву просевают через сито диаметром 3 мм. При просеивании сито покрывают сверху бумагой. Почву дисперсную можно не подвергать просеиванию, почву торфяную, содержащую большое количество органических веществ, предварительно растирают в ступке.

17.1.4 Образец почвы тщательно перемешивают и из него отбирают навески, величины которых выбираются исходя из предполагаемой степени загрязнения почвы и планируемых исследований. Для учета почвенных микроорганизмов достаточно навески от 1 до 10 г.

17.2 Подготовка к анализу

17.2.1 В навеску почвы добавляют небольшое количество стерильной воды до получения пастообразного состояния почвы, растирая ее в течение 5 минут.

17.2.3 Из суспензии делают разведения. Первое разведение навески почвы (1:10) делают в стерильной посуде, добавляя к суспензии стерильную воду в соотношении 1:9 к весу почвы (например, 1 г почвенной суспензии разводят в 9,0 мл. см стерильной воды, 10 г почвы - в 90,0 мл. воды и т.д.).

17.2.4 После приготовления разведений применяют предварительную

подготовку почвы в зависимости от типа и вида учитываемого микроорганизма. Предварительная подготовка почвы, необходима для извлечения микроорганизмов из почвенных агрегатов.

17.2.5 Перемешивание почвенной суспензии первого разведения на мешалке / шейкере, в течении 20-30 минут при скорости 150-200 об. /мин. Или аналогичный метод, позволяющий разрушить почвенные агрегаты.

17.2.6 Почвенную суспензию, содержащую в 1,0 мл. 0,1 г почвы, через 30 секунд после предварительной обработки (за это время оседают грубые минеральные частицы) используют для приготовления последовательно убывающих концентраций почвы.

17.2.7 Из первого разведения, с содержанием почвы 0,1 г (10(1)) отбирают стерильной пипеткой или дозатором 1,0 мл. и переносят в пробирку с 9,0 мл. стерильной воды и получают второе разведение, содержащее 0,01 г/мл. (10(2)) почвы. Повторяют эту операцию, доводят разведение почвы до 0,0001 - 0,00001 г/мл. (10(4) - 10(5)). Для приготовления каждого разведения используют отдельные пипетки.

17.2.8 Из каждого разведения делают посев не менее 3-х кратной повторности по 100 мкл. или 200 мкл. на поверхность питательной среды и равномерно шпателем растирают по всей поверхности чашки.

17.2.9 Чашки Петри с посевом помещают в термостат при (28 – 30) °С в течение 72 ч.

17.2.10 Учет результата: количество колоний со всех повторностей чашек суммируют, делят на их количество и умножают на степень разведения. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ в 1 г почвы).

17.3 Идентификация

17.3.1 Идентификацию можно проводить, методом микроскопии по 9.2, методами ПЦР по 18.

Метод ПЦР

18.1 Выделение ДНК

18.1.1 Выделение ДНК из мицелия, морфологических структур грибов.

18.1.1.1 В пробирку объемом 1,5-2,0 мл добавить 200 мкл PBS буфера в каждую пробирку для исследуемого образца и отрицательный контроль выделения (ОКВ).

18.1.1.2. Поместить в каждую пробирку фрагмент мицелия исследуемого образца, при необходимости делают повторности.

18.1.1.3. Промаркировать пробирки.

18.1.1.4. Гомогенизировать мицелий в пробирках стерильными пестиками (каждый отдельным пестиком).

18.1.1.5 Выделение нуклеиновых кислот производят коммерческими наборами реактивов в соответствии с инструкциями производителя.

18.1.2 Выделение ДНК из семян.

18.1.2.1 Семена перемалывают в лабораторной мельнице или в ступке с пестиком до состояния муки мелкого помола.

18.1.2.2 Муку пересыпают в пробирку типа Фалькон 50 мл и приливают заранее приготовленный буфер PBS (Приложение А) в соотношении 1:1 по объемам. Выдерживают 2 часа при комнатной температуре и периодически встряхивают.

18.1.2.3 Затем суспензию центрифугируют при 5 тыс. оборотов/мин в течение 3 минут, для дальнейшего выделения ДНК отбирают надосадочную жидкость 500 мкл в трех повторностях.

18.1.2.4 Выделение нуклеиновых кислот производят коммерческими наборами реактивов в соответствии с инструкциями производителя.

18.1.3 Выделение ДНК из растительного материала, древесины.

18.1.3.1 Исследуемый фрагмент измельчают в лабораторной мельнице, в ступке с пестиком или при помощи гомогенизатора с добавлением PBS буфера до однородного состояния.

18.1.3.2 Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

18.1.3.3 Затем суспензию центрифугируют при 5 тыс. оборотов/мин в течение 3 минут, для дальнейшего выделения ДНК отбирают надосадочную жидкость 200-500 мкл в трех повторностях.

18.2 Хранение ДНК

18.2.1 Выделенную ДНК хранят до окончания исследования при температуре от -18 до -22 °С.

18.2.2 В случае необходимости повторного тестирования образец ДНК размораживают при комнатной температуре.

18.2.3 Перед внесением ДНК в реакционную смесь пробирки с ДНК

встряхивают на вортексе, а затем осаждают капли кратковременным центрифугированием.

18.3 Идентификация грибов с использованием полимеразной цепной реакции

18.3.1. Система контролей. На всех этапах процесса выполнения ПЦР-тестов и подготовки к ним следует использовать контроли качества выполнения работы.

18.3.1.1 Виды контролей при проведении ПЦР.

18.3.1.1.1 Положительный контрольный образец (ПКО) – ДНК штамма, таксономическая принадлежность которого достоверно определена.

18.3.1.1.2 Отрицательный контроль выделения (ОКВ) – аналитическая проба, в которой ДНК целевого штамма заведомо отсутствует (например, стерильная дистиллированная вода или фосфатно-солевой буфер), ДНК которой выделена одновременно с исследуемыми пробами.

18.3.1.1.3 Отрицательный контроль чистой зоны (ОКЧ) – проба, в которой целевой организм заведомо отсутствует. В чистой зоне ПЦР в отдельную реакционную пробирку вносят воду для ПЦР, закрывают крышку пробирки и более не открывают пробирку.

18.3.1.1.4 Внутренний положительный контроль (ВПК) – контроль отсутствия ингибиторов ПЦР. Контроль осуществляют путем добавления в реакционную смесь ДНК ПЦР-мишени, отличной от тестируемого штамма, а также праймеров к ней.

18.3.2 Количество контрольных образцов определяется внутренней документацией лаборатории.

18.3.3 Используемые олигонуклеотиды (праймеры), состав реакционной смеси и размер ампликонов зависят от определяемого показателя.

18.3.4 Тесты на основе полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле позволяют установить наличие или отсутствие определенных нуклеотидных последовательностей участков генома, специфичных для тестируемых микроорганизмов в образце.

18.3.5 Для проведения ПЦР-тестирования необходимо.

18.3.5.1 Разморозить при +4°С ДНК, компоненты реакционной смеси, растворы олигонуклеотидов.

18.3.5.2 Сделать расчет общего количества смеси (количество

тестируемых образцов+контрольные образцы+ 1 образец).

18.3.5.3 В микробробирке объемом 1,5-2,0 мл смешать все компоненты реакционной смеси за исключением ДНК.

18.3.5.4 Закрыть пробирку, перемешать смесь на вортексе.

18.3.5.5 Раскапать реакционную смесь по микропробиркам объемом 0,2 мл согласно протоколу.

18.3.5.1 В каждую микропробирку добавляем аликвоту ДНК.

18.3.5.2 Закрыть пробирку, перемешать смесь на вортексе.

18.3.5.3 Установить микропробирки в амплификатор, запустить соответствующий протокол.

18.3.5.4 По окончании протокола содержимое пробирок осадить кратковременным центрифугированием.

18.3.6 Детекцию продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5 %-ом агарозном геле с использованием красителя бромистого этидия с последующей визуализацией в гельдокументирующей системе.

18.3.6.1 Проведение гель-электрофореза

При проведении гель-электрофореза происходит разделение фрагментов ДНК по размеру из-за разной скорости движения в зависимости от молекулярного веса под действием внешнего электрического поля.

18.3.6.2 Приготовление агарозного геля

18.3.6.2.1 Собрать заливочный столик так, чтобы резиновый уплотнитель плотно прилегал к рамке заливочного столика. Установить гребенки, чтобы их нижние концы не касались дна рамки заливочного столика.

18.3.6.2.2 Навеску агарозы поместить в сухую чистую колбу подходящего объема. Отмерить мерным цилиндром необходимый объем 0,5× TBE-буфера, внести его в колбу с агарозой и тщательно перемешать.

18.3.6.2.3 Для приготовления 1,5 % геля к 1,5 г агарозы добавляют 100 мл 0,5× TBE-буфера. Объем можно корректировать в зависимости размеров рамки и заливочного столика.

18.3.6.2.4 Полученную смесь довести до кипения в СВЧ-печи (или на водяной бане) и тщательно перемешать. Процедуру следует повторять несколько раз до полного растворения агарозы. Раствор должен быть полностью однородным и

прозрачным, без видимых тяжей нерасплавленной агарозы.

18.3.6.2.5 Охладить раствор до 55-65 °С, добавить раствор бромистого этидия в концентрации 10 мг/мл, тщательно перемешать. На 1 мл геля используют 0,04 мкл бромистого этидия.

Примечание - бромистый этидий является ядовитым веществом.

18.3.6.2.6 Перелить полученный раствор в рамку заливочного столика так, чтобы зубцы гребенки были утоплены наполовину или несколько больше половины. При этом следует избегать образования пузырьков воздуха.

18.3.6.2.7 Ожидать застывания геля в течение 35-45 мин.

18.3.6.2.8 Осторожно удалить гребенки, не повреждая образовавшихся в геле карманов, вынуть рамку с гелем, перенести гель в камеру для электрофореза. Для хранения (в случае необходимости) гель осторожно вынимают из рамки и помещают в контейнер с 0,5× ТВЕ-буфером при температуре от +2 до +8 °С.

18.3.6.3 Нанесение образцов на гель.

18.3.6.3.1 Поместить рамку с агарозным гелем в камеру для электрофореза. Добавить такое количество 0,5× ТВЕ-буфера, чтобы гель был полностью им покрыт.

18.3.6.3.2 На каждой электрофореграмме должен присутствовать маркер молекулярного веса, который является контролем прохождения электрофореза, а также позволяет рассчитывать молекулярный вес полученных фрагментов ДНК.

18.3.6.3.3 В центре или по краям каждого ряда лунок внести маркер молекулярного веса. В каждом ряду должен присутствовать ПКО. В остальные лунки внести ампликоны образцов. Если при постановке ПЦР смесь была не окрашена, перед внесением в гель следует окрасить ампликоны специальным загрузочным буфером.

18.3.6.4 Проведение электрофореза.

18.3.6.4.1 Параметры тока зависят от оборудования в конкретной лаборатории. Напряженность электрического поля подбирают в зависимости от длины геля (в среднем 10-15 В/см).

18.3.6.4.2 Необходимо убедиться в том, что гель ровно расположен в камере для электрофореза лунками в сторону отрицательного полюса (черного цвета). Ампликоны будут двигаться в геле в сторону положительного полюса (красного цвета).

18.3.6.4.3 Накрыть крышкой с электродами камеру электрофореза так, чтобы электроды плотно сели в гнезда. Вставить электроды в источник тока, соблюдая полярность. Включить источник тока.

18.3.6.4.4 Дождаться окончания электрофореза.

18.3.6.5 Визуализация электрофореграмм.

18.3.6.5.1 Извлечь гель из камеры для проведения электрофореза и поместить на предметный стол гельдокументирующей системы.

18.3.6.5.2 Приступить к обработке результатов.

18.3.6.6 Интерпретация результатов.

18.3.6.6.1 Результат ПЦР положителен, если:

- отмечается наличие на электрофореграмме продукта амплификации длиной, аналогичной длине ампликонов целевого участка при тестировании исследуемого препарата ДНК и ПКО.

18.3.6.6.2 Результат ПЦР отрицателен, если:

- не отмечается наличие на электрофореграмме продукта амплификации длиной аналогичной длине ампликонов целевого участка при тестировании исследуемого препарата ДНК;

- отмечается наличие на электрофореграмме продукта амплификации длиной аналогичной длине ампликонов целевого участка при тестировании ПКО;

- отмечается наличие на электрофореграмме продукта амплификации ВПК при тестировании исследуемого препарата ДНК, ОКВ и ОКЧ.

18.3.6.6.3 Во всех остальных случаях результат считают недостоверным, ПЦР-тест следует повторить.

Приложение А
(рекомендуемое)

Состав и приготовление буферов и растворов

Спирт этиловый 70 %

Для приготовления 100 мл раствора 70 % этилового спирта к 27 мл дистиллированной воды добавляют 73 мл 96 % этилового спирта. Раствор 70 % этилового спирта хранят при комнатной температуре в закрытых стеклянных или пластиковых бутылях с соответствующей маркировкой. Срок хранения не ограничен.

Приготовление натрий-фосфатного буфера (PBS)

В мерной колбе вместимостью 1000 см3 с 800 см3 дистиллированной воды растворяют 8 г натрия хлорида, 0,2 г калия хлорида, 2,9 г натрия гидрофосфат додекагидрата, 0,2 г калия дигидроортофосфата. Доводят дистиллированной водой до 1000 см3 и перемешивают. Проверяют, равен ли pH натрий-фосфатный буфер 7,3±0,1.

Срок хранения натрий-фосфатного буфера в холодильнике при температуре от 2 до 5 ºС – не более 5 дней.

5-кратный (5×) трис-боратный буфер (TBE), pH 8,3

Состав: Трис $(HOCH_2)3CNH_2$ - 53,9 г; Борная кислота (H_3BO_3) - 27,5 г; ЭДТА Этилендиаминтетрауксусная кислота ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) - 3,72 г; Дистиллированная вода – до 1000 мл.

Приготовление: Ингредиенты растворяют, доводят pH растворами NaOH (или KOH) и HCl до 8,3 и стерилизуют смесь при температуре 121 °C в течение 15 мин. Стерильный 5-кратный (5x) трис-боратный буфер (TBE) хранят температуре от +2 до +8 °C не более 1 месяца.

Библиография

1. ГОСТ Р 1.2-2020 «Стандарты национальные Российской Федерации. Правила разработки, утверждения, обновления, внесения поправок и отмены»;

2. ГОСТ Р 1.5-2012 «Стандарты национальные. Правила построения, изложения, оформления и обозначения»;

3. ГОСТ 1.5-2001 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению»;

4. ГОСТ 34198-2017 «Межгосударственный стандарт. Карантин растений. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. Общие требования»;

5. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10.05.2016 № 41 «Об утверждении порядка лабораторного обеспечения карантинных фитосанитарных мер»;

6. Федеральный закон от 21.07.2014 № 206-ФЗ «О карантине растений»;

7. МСФМ № 27 «Диагностические протоколы»;

8. Варшалович А.А., Шамонин М.Г. Руководство по досмотру и экспертизе растительных и других подкарантинных материалов. 1972. 440 с.

УДК 632.4:006.354 ОКС 65.020.20

Ключевые слова: карантин растений, проба (образец), лабораторная проба, аналитическая проба, микологическое исследование