

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Ставропольский государственный аграрный университет»

Кафедра химии и защиты растений

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Методические указания
по выполнению лабораторных работ
для студентов всех форм обучения

Направление 35.03.04 Агрономия

Ставрополь
2021

1. Общие положения.

Целями освоения дисциплины «Основы биотехнологии» являются: формирование знаний и умений в области сельскохозяйственной биотехнологии, как одной из отраслей науки и производства; изучение основных приемов культивирования клеток и тканей, использование методов *in vitro* в области селекции и генной инженерии.

Дисциплина Б1.О.33 Основы биотехнологии является дисциплиной обязательной части программы бакалавриата.

Изучение дисциплины осуществляется:

- для студентов очной формы обучения в 5 семестре;
- для студентов заочной формы обучения на 4 курсе

Требования к результатам освоения содержания дисциплины

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций ОП ВО и овладение следующими результатами обучения по дисциплине:

Код и наименование компетенции*	Код(ы) и наименование (-ия) индикатора(ов) достижения компетенций	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
ОПК -1 Способен решать типовые задачи профессиональной деятельности на основе знаний основных законов математических и естественных наук с применением информационно-коммуникационных технологий;	ОПК-1.1 Демонстрирует знание основных законов математических, естественнонаучных и общепрофессиональных дисциплин, необходимых для решения типовых задач в области агрономии	Знания: основных направлений биотехнологии
		Умения: применять знание основных биотехнологических процессов для решения типовых задач в области агрономии
		Навыки: работы в биотехнологической лаборатории
	ОПК-1.2. Использует знания основных законов математических и естественных наук для решения стандартных задач в агрономии	Знания: основных направлений биотехнологии, отечественного и зарубежного опыта в области биотехнологии
		Умения: решать ряд задач в области биотехнологии; осуществлять поиск современной информации в области биотехнологий
		Навыки: работы в биотехнологической лаборатории; навыками работы с научной литературой

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1 ОРГАНИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Цель занятия: ознакомиться с организацией биотехнологической лаборатории.

Объяснение. Для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные изолированные помещения, а также современное оборудование и высококачественные реактивы.

Оборудование моечной комнаты: мойки с горячей и холодной водой; дистиллированная вода; дистилляторы и бидистилляторы; сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды – до 100–130°C, для инструментов – до 170°C; шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, емкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы с эксикаторами для хромпика ($H_2SO_4 + K_2CrO_7$).

Оборудование комнаты для приготовления питательных сред: лабораторные столы; холодильники для хранения маточных растворов солей, гормонов и витаминов; анали-

тические и торсионные весы; иономер; магнитные мешалки; плитки, газовые горелки; набор посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, мензурки, пробирки и др.).

Оборудование помещения для стерилизации: автоклавы с режимом работы – давление 1–2 атмосферы и температура 120 °С; стеллажи для штативов с питательными средами; шкафы для хранения стерильных материалов. Данное помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава.

Оборудование комнаты для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды: ламинар-боксы, лабораторные столы, стеллажи, бактерицидные лампы, шкафы для материалов и оборудования.

Оборудование культуральных комнат: световое отделение – источники освещения со спектром близким к спектру дневного света (от 3 до 10 kLx), температура (25°С) и влажности воздуха (70%), стеллажи для штативов с культивируемым материалом (рис. 1.1); темновое отделение – с тем же оборудованием, исключая источники освещения. Для культивирования эксплантов на питательной среде желательно использовать термостаты или хладотермостаты, способные с высокой точностью поддерживать задаваемые режимы температуры и влажности воздуха.

Необходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории: мерные колбы, колбы Эрленмейера, химические стаканы, мерные цилиндры, чашки Петри, пробирки, бутылки, пипетки, стеклянные палочки, стеклянные и мембранные фильтры, ланцеты (в том числе глазные, хирургические, анатомические), ножницы, пинцеты, ножи, бритвенные лезвия, препарировальные иглы, шпатели, бумага (оберточная, пергаментная, фильтровальная), фольга алюминиевая, вата, марля, шпагат.



Рисунок 1.1. Световая культуральная комната в лаборатории биотехнологии Ставропольского НИИ сельского хозяйства

Ход работы.

1. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории.
2. Под руководством преподавателя освоить принципы работы автоклава, сушильных шкафов, дистиллятора.
3. Посуду тщательно отмыть в растворах детергентов (стиральный порошок), промыть 8–10 раз проточной водой, поместить на 4–6 часов в хромпик (смесь серной кислоты с бихроматом калия), промыть теплой водой, затем дважды дистиллированной и бидистиллированной.
4. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на два часа при температуре 100–130°С.
5. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.
6. Зарисовать образцы посуды.

Материалы и оборудование. Химические стаканы (50, 100, 250 мл), штативы с пробирками, инструменты (пинцеты, скальпели, препаровальные иглы), моющие средства (стиральный порошок), хромпик.

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу командной игры.

ЛАБРАТОРНАЯ РАБОТА №2 **СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

Цель работы: изучить способы стерилизации посуды, инвентаря, питательных сред, используемых для культивирования растительных эксплантов.

Объяснение. Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* проводят в стерильных (асептических) условиях: в стерильном ламинар-боксе, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах. В случае нарушения стерильности на средах хорошо развиваются микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Стерилизация – это полное уничтожение микроорганизмов и их покоящихся форм (спор). Существуют разные методы стерилизации: с помощью влажного, сухого пара, облучения ультрафиолетовыми лучами, обработки химическими веществами.

Стерилизация посуды. Большинство культур в лабораторных условиях выращивают в пробирках, колбах Эрленмейера, в чашках Петри. Вначале посуду тщательно моют в растворах детергентов, а также в растворе двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпиковая смесь). Вымытую посуду ополаскивают водопроводной, затем дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения стерильных предметов из воздуха, перед стерилизацией их закрывают ватными пробками, заворачивают в оберточную бумагу или закрывают фольгой (у стаканов и колб достаточно завернуть только горлышко). Затем посуду можно стерилизовать двумя способами:

1. Посуду выдерживают в автоклаве под давлением в течение 20–40 минут при температуре 100–130°C. Продолжительность автоклавирования зависит от его режима: при давлении 0,5 атмосферы – 20–40 минут, при 1 атм. – 15 минут.

2. При сухом способе стерилизации чашки Петри, колбы, стаканы, завернутые в плотную бумагу, стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 140°C в течение двух часов, при температуре 180°C – 30 минут (рис. 2.1).



Рисунок 2.1. – Хранение стерильной посуды в ламинар-боксах
(<http://bio-x.ru/articles/trebovaniya-k-laboratorii>)

Стерилизация инструментов. Инструменты (скальпели, пинцеты, иглы и т.д.) стерилизуются в сушильном шкафу описанным выше способом. Металлические инструменты стерилизуют сухим жаром в термостатах с температурой 170–250 °С в течении одного – двух часов. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты помещают в стакан со спиртом и обжигают в пламени спиртовки. *Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции!* Перед повторным применением его снова помещают в спирт и обжигают.

Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду, питательные среды стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1–2 атмосферы и при температуре 120°С в течение 20–60 мин, в зависимости от объема стерилизуемого материала.

Колбы, штативы со средой, вату, бумагу, халаты перед автоклавированием заворачивают в целлофановую бумагу либо помещают в биксы.

Стерилизация питательных сред. Автоклавирование питательных сред для культивирования растительных тканей и пробирочных растений проводят после их розлива в пробирки под давлением 0,7–0,8 атм. При температуре 115–120°С в течение 15–30 минут, в зависимости от объема среды. Органические жидкости, не выносящие нагревания, освобождаются от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Данный процесс называется *холодной стерилизацией*.

Стерилизация ламинар-бокса. Чаще всего для стерилизации помещений (ламинар-боксов, культуральных комнат) используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5 – 2 часов (в зависимости от площади помещения). Работы в облученном помещении начинают через 15–20 минут после отключения бактерицидных ламп, так как под действием ультрафиолетового излучения (UV) двухатомный кислород воздуха (O₂) становится трехатомным озоном (O₃) – газом, токсичным для человека. Для достижения максимальной стерильности перед обработкой ультрафиолетом все поверхности тщательно отмываются моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ. Поверхности ламинар-бокса обрабатывают 96% спиртом.

Непосредственно перед работой необходимо протереть рабочую поверхность бокса этиловым спиртом, разложить в нем необходимые инструменты и материалы: спирт, в закрытой посуде, спиртовку, спички, простерилизованный инструмент и посуду.

Ход работы.

1. Металлические инструменты и стеклянную посуду завернуть в плотную бумагу и поместить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при t° 170–200°С в течение двух часов.

2. Чашки Петри, штативы с пробирками, заполненными питательной средой, вату, марлю, фильтровальную бумагу, колбы с дистиллированной водой (закрытые фольгой) завернуть в целлофановую бумагу и поместить в автоклав.

3. Простерилизовать в автоклаве дистиллированную воду в колбе. Для получения стерильной воды налейте в колбу 1/3 часть объема дистиллированной воды, закройте ватной пробкой, а сверху плотной бумагой или фольгой. Автоклавировать 30 минут при одной атмосфере.

4. 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 течение десяти 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.

5. Автоклавировать двадцать минут при давлении в стерилизационной камере 1–1,2 атм.

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

7. Проавтоклавированные материалы перенести в комнаты для инокуляции растительных эксплантов и поместить в шкафы или на стеллажи.

Материалы и оборудование: Чашки Петри (3 шт., одна с фильтровальной бумагой), колбы с дистиллированной водой, штативы с пробирками, заполненными питательной средой, препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, вата, марля, бумага (фильтровальная и целлофановая), ножницы, плитка кафельная, спиртовка, спички, спирт, химические стаканчики).

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 **СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТОВ**

Цель работы: изучить характер стерилизующих растворов и способы стерилизации растительных эксплантов.

Объяснение. Для получения каллусной культуры, пробирочных растений, используют стерильные экспланты. Их в свою очередь получают путем вычленения из растительных объектов.

Растительные объекты перед стерилизацией тщательно отмывают проточной водой, иногда с моющими средствами, очищают от излишних тканей. С корнеплодов снимают кожуру, с побегов и корней – кору, с почек – почечные чешуи; промывают дистиллированной водой и помещают на несколько секунд в 70 % спирт (семена на одну – две минуты). После этого сегменты корней, побегов, стеблей, клубней или семена переносят в стерилизующий раствор.

Растительные экспланты стерилизуют растворами веществ, содержащими активный хлор (хлорамином (NH_2Cl), гипохлоритом кальция ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), и натрия (NaClO)), бром (бромной водой (Br_2)), перекисью водорода (H_2O_2), спиртом ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), нитратом серебра (AgNO_3), диацидом, антибиотиками.

Этиловый спирт часто применяют для предварительной стерилизации, погружая материал на несколько секунд в 70-96% спирт. Иногда такой стерилизации достаточно (ее используют при работе с плодами, семенами, побегами, завязями).

Гипохлорит кальция (хлорная известь) используется в виде 5–7% раствора для обработки почек, завязей, цветков, семян, побегов в течение пяти – восьми минут.

Гипохлорит натрия используется в виде 0,5–5% раствора для обработки любых эксплантов в течение 1–20 минут. Это вещество является клеточным ядом, поэтому время стерилизации и концентрацию подбирают экспериментально. Например: для изолированных зародышей используют 2–3% раствор в течение 10–15 минут, а для сухих семян 3–5% раствор в течение часа. Остатки гипохлорита натрия сначала удаляют 0,01 н соляной кислотой (HCl), а затем восемь раз промывают дистиллированной водой.

Хлорамин применяют в концентрации 1–6%. Пыльники и молодые зародыши обрабатывают в течение 1-3 мин., сухие семена – 30–60 минут, затем промывают стерильной дистиллированной водой два – три раза.

Растворы, содержащие активный хлор, используются один раз и готовят непосредственно перед работой.

Диацид используется в 0,2% растворе для стерилизации корнеплодов, семян, кусочков тканей, верхушечных меристем, изолированных зародышей, пыльников. Диацид готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолмеркурхлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (330 мл). Затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента твин-80; хранят в плотно закрытой колбе в темноте.

Антибиотики применяют для стерилизации растительного материала, инфицированного бактериями (ткани корончатогалловых опухолей). Наиболее часто применяют стрептомицин и тетрамицин (10–80 мг/л), ампициллин (200–400 мг/л), левомецитин, канмицин и другие.

После стерилизации материал переносят в стерильную дистиллированную или бидистиллированную воду, выдерживают десять минут, затем меняют воду еще два раза, выдерживают по 10 минут (рис. 3.1). На стерильной рабочей поверхности (чашки Петри, листы бумаги, оргстекло) обрезают стерильным скальпелем концы сегментов исходного материала, где клетки могут быть повреждены, и из средних зон нарезают кусочки тканей, которые помещают на питательную среду для образования каллуса. При стерилизации отрезков стебля или верхушечных почек в растворах гипохлорита рекомендуется парафинировать срезы, чтобы стерилизующий раствор не проник в сосуды, что может привести к интоксикации ткани. Перед началом работы со стерильными объектами, работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат.



Рисунок 3.1 – Стерильные ростки картофеля перед началом работы

Ход работы

1. Отобрать 30 здоровых зерновок пшеницы (тритикале, огурца, редиса).
2. В ламинар-боксе поместить семена в чашки Петри со стерилизующими растворами (6 % хлорамин, 6 % гипохлорит кальция, 96 % спирт, ампициллин 400 мг/л, вода) по пять семян в каждую. Время стерилизации подобрать экспериментально.
3. Отмыть семена от стерилизующих растворов дистиллированной автоклавированной водой.
4. Поместить семена для проращивания в стерильные чашки Петри на стерильную фильтровальную бумагу в небольшое количество стерильной дистиллированной воды. Чашки Петри закрыть и перенести в термостат для проращивания при температуре 25–26°C.
5. Результаты опыта зарисовать через неделю. Сделать выводы об эффективности стерилизующих растворов.

Материалы и оборудование: Стерильные чашки Петри, колбы с автоклавированной дистиллированной водой, химические стаканы, стерилизующие растворы, флакон с 70 или 96% спиртом, спиртовка; зерновки пшеницы (тритикале, огурца, редиса); стерильная бумага (оргстекло, кафельная плитка); стерильные вата, пинцеты, фильтровальная бумага.

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Цель занятия: изучить действие регуляторов роста: абсцизовая кислота (АБК), гиббереллин (ГК), ауксин (2,4-Д), ретардант хлорхолинхлорид (ТУР), цитокинин (кинетин) – на прорастание семян озимой пшеницы.

Объяснение. *Абсцизовая кислота* относится к фитогормонам ингибирующего действия. Ее присутствием определяется физиологический покой в растительных организмах. *Гиббереллин* – фитогормон стимулирующего действия, определяет линейный рост побегов. *2,4-Д* относится к группе ауксинов. *Кинетин* – относится к группе цитокининов. *Хлорхолинхлорид* относится к группе ретардантов, вызывает действие, обратное гиббереллину, которое проявляется в укорачивании побегов (рис. 4.1).



Рисунок 4.1. Сравнительное действие регуляторов роста на прорастание семян озимой пшеницы (1 – ингибиторы роста; 2 – контроль, 3 – стимулятор роста)

Ход работы.

1. Отсчитывают по 150-200 зерен озимой пшеницы (редиса, огурцов, гороха). Стерилизуют их в 6% ном растворе хлорамина в течение 1-2 минут с последующим промыванием в стерильной дистиллированной воде.
2. Отдельно в мерных цилиндрах готовят растворы регуляторов роста.
3. Зерна замачивают в приготовленных растворах, заранее оставляя контрольный вариант (вода).
4. Через 30 минут семена раскладывают на двух-трех слоях увлажненной бумаги в чашках Петри по 25 шт в каждую, этикетируют и помещают в растительни, а затем в термостаты с температурой 20°C.
5. Через 7 дней семена осматриваются, определяется их всхожесть (%), измеряется длина проростков и корней. Данные заносятся в таблицу (табл.3.1).
6. Полученные результаты анализируются и делаются выводы о действии регуляторов роста на прорастание зерновок озимой пшеницы.

Таблица 3.1. - Влияние регуляторов роста на прорастание семян
озимой пшеницы

Вариант	X ₁	X ₂	%	Дп	Дк	Ср. Дп	Ср.Дк
Контроль							
Ауксин							
Цитокинин							
Гиббереллин							
Ингибитор роста							

Примечание. X_1 – количество проросших семян, X_2 – общее количество семян, % – всхожесть, Дп – общая длина проростков, Дк – общая длина корней, Ср.Дп – средняя длина проростков, Ср.Дк – средняя длина корней.

Материалы и оборудование: чашки Петри с асептически проросшими зерновками озимой пшеницы, линейки, плотная бумага, образцы регуляторов роста, раствор хлорамина, стерильная дистиллированная вода.

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5 **УПРАВЛЕНИЕ ПОКОЕМ И ПРОРАСТАНИЕМ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ** **С ПОМОЩЬЮ ФИТОРЕГУЛЯТОРОВ**

Цель занятия: изучить влияние регуляторов роста на процессы прорастания клубней картофеля.

Объяснение. В южных районах страны возможно получение двух урожаев картофеля в год, однако, на практике это часто не реализуется. Одной из причин является недостаток посадочного материала, так как клубни, полученные в прошедшем году, трудно сохранить до второго срока посадки, а клубни первого урожая не способны к прорастанию из-за того, что находятся в состоянии глубокого покоя. Для прерывания покоя можно использовать обработку гиббереллинами, резко повышая содержание фитогормонов – стимуляторов прорастания.

Потери картофеля при хранении во многом обусловлены преждевременным выходом клубней из состояния покоя, то есть разрушением ингибитора прорастания – фитогормона абсцизовой кислоты. Для предотвращения процессов прорастания клубней картофеля рекомендуется обработка ингибиторами роста, что препятствует протеканию данных процессов и способствует лучшей сохранности клубней.

Ход работы.

1. Приготовить растворы гиббереллина и 2-хлорэтилфосфоновой кислоты (концентрацию указывает преподаватель).

2. Замочить клубни в этих растворах на 10-20 мин, после чего обсушить фильтровальной бумагой и запаковать в пакеты, вложив в каждый пакет этикетку с указанием варианта обработки, поместить в термостат при температуре 26...29°C.

3. Через 14 сут. провести учет проросших глазков. По этим данным определить оптимальные концентрации препаратов для стимулирования состояния покоя и прорастания клубней.

Материалы и оборудование: клубни картофеля; гиббереллин, 2-хлорэтилфосфоновая кислота или препараты на ее основе, этиловый спирт, посуда для приготовления растворов и замачивания клубней, термостат, бумажные пакеты.

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Цель занятия: получить навыки приготовления питательных сред для культивирования растительных эксплантов. Изучить назначение компонентов питательных сред для изолированных тканей.

Объяснение. Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы: азот, фосфор, калий, кальций, серу, магний, железо; микроэлементы: цинк, медь, марганец, бор, кобальт, йод, молибден; витамины: тиамин (В₁), пиридоксин (В₆), никотиновая кислота (РР), а также углеводы и фитогормоны. Некоторые питательные среды включают гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах рН.

Углеводы являются незаменимыми компонентами питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве источника углерода используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 20–40 г/л. Полисахариды, как правило, не применяются, но поскольку некоторые ткани, например опухолевые, содержат активные гидролитические ферменты (амилазу). Они могут расти на средах с растворимым крахмалом.

Гормоны необходимы для дедифференцировки клеток и индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины (вызывающие клеточную дедифференцировку) и цитокинины (индуцирующие деление дедифференцированных клеток). В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов должно быть снижено или они могут быть исключены. На средах без гормонов растут опухолевые и "привыкшие" ткани.

В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолилуксусную кислоту (ИУК), индолилмасляную кислоту (ИМК), нафтилуксусную кислоту (НУК). По свойствам, индолилуксусная кислота (ИУК) почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота. Для индукции каллуса обычно необходимы высокие концентрации ауксинов (чаще это 2,4-Д), при последующих пересадках их уменьшают.

В качестве источника цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, аденин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин, 2-ип (2-изопентиладенин). 6-БАП. Зеатин и 2-изопентиладенин по сравнению с кинетином более активны в отношении поддержания роста изолированных тканей и индукции органогенеза.

Отдельные питательные среды кроме ауксинов и цитокининов, включают гибберелловую кислоту (ГК). Присутствие гиббереллинов в среде не является обязательным, но для образования более вытянутых побегов, они необходимы.

Для индукции первичного каллуса и реже для поддержания его роста в питательную среду иногда добавляют растительные экстракты или соки. Наибольшей ростостимулирующей способностью обладает кокосовое молоко - жидкий эндосперм кокосового ореха.

Для приготовления твердых питательных сред, в них добавляют 0,5 – 0,7% агара. Он представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей.

С целью экономии времени и соблюдения точной концентрации компонентов питательных сред, растворы макро- и микросолей, витаминов, фитогормонов готовят концентрированными, что позволяет многократно их использовать. Рекомендуемая концентрация растворов макро- и микросолей - больше необходимой в 10 – 20 раз, микросолей – в 100 – 1000 раз, витаминов – в 1000 раз. Маточные растворы хранят в холодильнике, причем для хранения витаминов и фитогормонов необходима отрицательная температура.

Для культивирования растительных клеток, тканей и органов используют питательные среды различного гормонального состава. Наиболее широко применяются среды Мурасиге и Скуга (MS, MC) (табл.6.1), Уайта (табл. 6.2), Гамборга и Эвелега (B₅) (табл.6.3).

Таблица 6.1 - Компоненты питательной среды Мурасиге и Скуга

Компонент	Кол-во (мг/л)	Компонент	Кол-во (мг/л)
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0,83
KNO ₃	1900	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	37,3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	Тиамин - HCl	0,1
KH ₂ PO ₄	170	Пиридоксин HCl	0,5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	24,1	Никотиновая кислота	0,5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	Мезоинозит	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	Глицин	2,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	Сахароза	3000
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25		
PH 5,6 - 5,8			

Таблица 6.2 - Компоненты питательной среды, Уайта

Компонент	Кол-во (мг/л)	Компонент	Кол-во (мг/л)
Ca(NO ₃) ₂	200	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,02
MgSO ₄	360	ZnSO ₄	1,5
Na ₂ SO ₄	200	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0025
KNO ₃	80	KI	0,75
KCl ₂	65	Пиридоксин HCl	0,1
NaH ₂ PO ₄	16,5	Тиамин - HCl	0,1
H ₃ BO ₃	1,5	Никотиновая кислота	0,5
MnSO ₄	4,5	Глицин	3,0
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5	Сахароза	2000
PH 5,6 - 5,8			

Таблица 6.3. Компоненты питательной среды Гамборга и Эвелега (B₅)

Компонент	Кол-во (мг/л)	Компонент	Кол-во (мг/л)
NaH ₂ PO ₄	150	Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	
KNO ₃	1500	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	KI	0,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	FeSO ₄ ·7H ₂ O	28
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	Тиамин - HCl	10,0
H ₃ BO ₃	3,0	Пиридоксин HCl	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10,0	Никотиновая кислота	1,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	Мезоинозит	100
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	2,4-Д	2,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,0	Сахароза	2000
PH 5,8			

Ход работы.

Приготовить 100 мл питательной среды Мурасиге-Скуга (табл.6.1).

Перед непосредственным приготовлением питательной среды, готовят маточные растворы макро-, микросолей, хелата железа (раствор FeSO₄ и Na₂ЭДТА, необходимый

для образования хелата железа следует нагреть до кипения). Полученные маточные растворы сливают в емкости с притертой пробкой (хелат железа – в темной посуде), снабжают этикеткой и хранят в холодильнике при температуре 4°C не больше месяца.

Для приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10-кратные навески и растворяют их в 10 мл воды; 1 мл содержит порцию витаминов, необходимую для приготовления 1 л питательной среды по прописи Мурасиге-Скуга. Хранят растворы в стеклянных флаконах / колбах (на 10-20 мл) в замороженном состоянии.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом: 1) берут по 10 или 100 мг ауксинов (2,4-Д, ИУК, ИМК, НУК) и абсцизовой кислоты (АБК), растворяют в небольшом количестве этанола; 2) цитокинины (кинетин, зеатин, 2-ип, аденин, 6-БАП) растворяют в небольшом количестве 0,5 н. HCl или КОН. Затем в растворы добавляют дистиллированную воду до объема 100 мл (1мл содержит 0,1 или 1,0 мг гормона).

На основе маточных растворов готовят питательную среду МС (таблица 6.4).

В термостойкий химический стакан / колбу емкостью 250 мл помещают 3 г сахарозы, доливают дистиллированную воду ($\approx$ до 30 мл) и после растворения сахарозы добавляют 10 мл маточного раствора макросолей, 1мл микросолей, 1мл витаминов, 0,5 мл хелата железа. Объем раствора доводят до 100 мл. Перед добавлением агар-агара измеряют pH раствора, который устанавливают на уровне 5,6 – 5,8, используя 0,1 н. КОН или 0,1%-ный раствор HCl. В предварительно нагретую среду (60 – 70°C) добавляют 0,7 грамма агара и доводят до кипения периодически помешивая.

Таблица 6.4 - Состав питательной среды Мурасиге-Скуга

Компоненты среды	Маточный раствор, г/л	Количество маточного раствора для приготовления 1л среды, мл
Макросоли, г/л:		100
KNO ₃	19,0	
NH ₄ NO ₃	16,5	
KH ₂ PO ₄	17,0	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7	
CaCl ₂ ·H ₂ O	4,4	
Fe-хелат, г/л:		5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,57	
Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	7,45	
Микросоли, мг на 200 мл:		10
H ₃ BO ₃	124	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	482	
ZnSO	172	
KI	16,6	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	5,0	
CuSO ₄	0,5	
CoCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	
Витамины, мг на 200 мл:		10
Пиридоксин HCl (B ₆)	10	
Тиамин - HCl (B ₁)	2	
Никотиновая кислота (PP)	10	

Горячую питательную среду разливают в пробирки примерно до 1/3 объема, закрывают ватно-марлевыми пробками или алюминиевой фольгой и стерилизуют в автоклаве.

Материалы и оборудование: стаканы химические на 250 мл, колбы для хранения маточных растворов, мерные пипетки, цилиндры, весы аналитические и ВЛКТ-500, электроплитка, химреактивы (табл.2).

Лабораторная работа проводится либо в малых группах по 2-3 человека, либо по типу «Ученик в роли учителя», где студентам предлагается объяснить для своих коллег определенный раздел лабораторной работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7 **РУБЕЖНЫЙ КОНТРОЛЬ**

Теоретические вопросы

1. Биотехнология как отрасль науки и отрасль производства.
2. Предмет и методы сельскохозяйственной биотехнологии
3. История биотехнологии
4. Этапы развития биотехнологии
5. История развития молекулярной биотехнологии
6. Коммерциализация молекулярной биотехнологии.
7. Основные направления и задачи современной биотехнологии.
8. Понятие фитогормонов и фиторегуляторов, их классификация
9. Применение фитогормонов и фиторегуляторов в целях индукции корнеобразования, морфо- и эмбриогенеза, клубнеобразования
10. Организация биотехнологической лаборатории (оборудование моечной комнаты; оборудование комнаты для приготовления питательных сред; оборудование помещения для стерилизации; оборудование комнаты для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды; оборудование культуральных комнат (световая, темновая); необходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории).
11. Создание условий асептики в биотехнологии
12. Питательные среды (виды, назначение, состав)
13. Компоненты питательных сред
14. Способы стерилизации в биотехнологии
15. Принцип приготовления питательных сред
16. Основные компоненты питательных сред
17. Макроэлементный состав питательных сред
18. Микроэлементный состав питательных сред
19. Значение витаминов и фитогормонов в питательных средах

Практико-ориентированные задания

20. Указать влияние ауксинов на растения и привести пример использования в биотехнологии и растениеводстве.
21. Указать влияние цитокининов на растения и привести пример использования в биотехнологии и растениеводстве.
22. Указать влияние гиббереллинов на растения и привести пример использования в биотехнологии и растениеводстве.
23. Указать влияние ингибиторов роста на растения и привести пример использования в биотехнологии и растениеводстве.
24. Описать методику определения действия регуляторов роста на проращивание семян озимой пшеницы.
25. Описать возможности управления покоем клубней картофеля с помощью фиторегуляторов.
26. Описать этапы приготовления питательных сред и пояснить требования, предъявляемые к каждому этапу
27. Описать способы стерилизации посуды / Подготовить посуду к стерилизации
28. Описать способы стерилизации инструментов / Подготовить инструменты к стерилизации
29. Описать технологию и методики стерилизации питательных сред.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8

ТЕХНИКА РАБОТЫ В ЛАМИНАР-БОКСЕ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОРОСТКОВ

Цель работы: ознакомиться с техникой работе в ламинар-боксе при культивировании стерильных эксплантов.

Объяснение. При культивировании растительных эксплантов, стерильных проростков работы проводятся в ламинар-боксе, обеспечивающем условия асептики. Перед работой все поверхности ламинара обрабатываются 70-96% спиртом, простерилизованные инструменты (в водонепроницаемой бумаге), материалы, растительный материал помещают на стол ламинара и включают УФ-излучение. Через 20 минут выключают УФ и включают биофильтры на 10-15 мин. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат и шапочку, руки обрабатывают 70-96% спиртом. Пинцеты, скальпели и препаровальные иглы помещают в химический стакан со спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигают на пламени спиртовки. Во избежание ожогов тканей рекомендуется несколькими наборами инструментов (рис.8.1).



*Рисунок 8.1. - Работа в ламинар-боксе (лаборатория биотехнологии
Ставропольского НИИСХ)*

Ход работы

1. Отобрать десять здоровых зерновок пшеницы (семена табака, моркови, перца и др.), промыть их в мыльном растворе, а затем водопроводной и дистиллированной водой. Поместить в марлевые /тканевые мешочки и погрузить на одну – две минуты в 70-96% спирт, после чего простерилизовать в 15% растворе перекиси водорода в течение десяти минут, или в 6% растворе хлорамина – в течение пяти минут. Затем промыть стерильной дистиллированной водой 3-5 раз, меняя ее через каждые 5-7 минут.

2. С помощью стерильного пинцета разложить семена на влажную фильтровальную бумагу в стерильной чашке Петри.

3. Для получения проростков на питательной среде поместить по одному семени в пробирку со стерильной средой МС.

4. Пробирки и чашки Петри с семенами поставить в термостат при температуре 25 – 26 °С. Для получения неэтиолированных проростков семена выращивают на свету при той же температуре.

Материалы и оборудование: Семена озимой пшеницы, табака, моркови, перца и др.; стерильные чашки Петри, дистиллированная вода, марля, нитки, пинцеты, скальпели; стерильная бумага (оргстекло, кафельная плитка); спиртовка, спички, пробирки с питательной средой Мурасиге – Скуга без гормонов.

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9 **ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ**

Цель работы: ознакомиться с видами каллусной ткани, способами их получения и культивирования

Объяснение. Каллусная клетка, в результате деления которой возникает каллус, представляет собой один из типов клеточной дифференцировки. Для растения *in vitro* каллус – это группа клеток, возникающая при травмах и защищающая место поранения (раневая паренхима). В ней накапливаются питательные вещества для регенерации анатомических структур или утраченного органа.

Дифференцированные клетки в растении объединяются в ткани и выполняют определенные функции. Клетки различаются не только функционально, но и морфологически.

На питательных средах с большим содержанием ауксинов (2,4-Д) клетки экспланта дедифференцируются и переходят к пролиферации. Особенности дедифференциации клеток экспланта зависят от генетики и эпигенетики экспланта. Клетки утрачивают прежние функции и морфологию. Причем чем меньше структурно и химически дифференцирована клетка, тем легче получить каллус.

В клетке, готовящейся к делению, стимулируется синтез всех форм РНК, начинается репликация ДНК, исчезают специфические тканевые белки-антигены, синтезируются новые, специфичные для каллусных клеток. Меняется активность структурных генов и белкового аппарата клеток. Дедифференциация специализированных клеток начинается с обогащения их элементами цитоплазмы: микротрубочками, мембранами ЭПС и комплекса Гольджи, рибосомами, исчезают хлоро- и хромопласты, продукты их деятельности; может образоваться много ядер или увеличиться число хромосом; укрупняются вакуоли.

Каллус, выращиваемый поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенную структуру (рис. 9.1). Клетки каллуса либо бесцветны, либо имеют желтоватый оттенок. В зависимости от происхождения и условий культивирования различают каллусы: рыхлые, с сильно оводненными, легко отделяющимися друг от друга клетками; средней плотности, с зонами меристематической активности; плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов.



*Рисунок 9.1 – Образование каллуса на листовом экспланте растения
маклеи сердцевидной*

В биотехнологии, для отработки методик культивирования, чаще всего используют те виды растений, которые и в обычных условиях легко укореняются, регенерируют, образуют каллус. Поэтому большинство методов получения и культивирования каллуса разработано, в частности, для табака. Каллус можно получить практически из любой части растения, так как клетки табака легко дедифференцируются и переходят к пролиферации. Для культивирования каллусов из листьев табака используют среду Мурасиге – Скуга с добавлением ауксинов (2,4-Д).

Каллусную ткань можно получить из разных частей растения, в том числе из кончиков корней. Образование каллуса происходит в области первичных и вторичных меристем. Процесс каллусообразования зависит от размера экспланта. Оптимальная величина экспланта 5–10 мм³ и масса 20–100 мг.

Многие ткани имеют физиологическую полярность, поэтому каллус лучше образуется на той стороне экспланта, которая ближе к апикальным меристемам корня. Кончики корней легко образуют каллус, если они помещены на среду горизонтально, тогда как сегменты стебля лучше формируют каллус, если их поместить вертикально.

Для культивирования на питательных средах лучше использовать стерильные корешки, полученные при проращивании семян в стерильных условиях.

Ход работы

Работа проводится в стерильном ламинар-боксе

1. Семена фасоли поместить в чашки Петри (по 15 штук в чашку), залить раствором хлорамина до полного погружения семян в жидкость и оставить на 20 минут.
2. Промыть семена стерильной дистиллированной водой три раза.
3. Стерильные семена залить стерильной водой и оставить для набухания на 24 часа.
4. Семена с разрушенной кожурой удалить, а жизнеспособные простерилизовать повторно 6 % хлорамином в течение 20 минут.
5. Промыть семена стерильной дистиллированной водой три раза.
6. Семена перенести в стерильные чашки Петри (по пять штук в каждую чашку).
7. Надрезать оболочку семени стерильным скальпелем, придерживая семя стерильным пинцетом.
8. Стерильным скальпелем и препарировальной иглой изолировать корешки (2–3 мм) и перенести в чашки Петри со стерильной дистиллированной водой (по 15 штук в чашку).
9. Корешки стерильной препарировальной иглой поместить на поверхность агаризованной среды и слегка вдавить в агар для обеспечения хорошего контакта со средой (среда Гамборга и Эвелега).

Материалы и оборудование: семена фасоли, 6% раствор хлорамина, стерильные инструменты: пинцеты, скальпели, препарировальные иглы, чашки Петри с питательными средами для индукции каллусогенеза, стерильные чашки Петри, флаконы со спиртом и стерильной дистиллированной водой.

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10 КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ (НА ПРИМЕРЕ КАРТОФЕЛЯ)

Цель занятия: получить практические навыки в области клонального микроразмножения растений.

10.1 ЧЕРЕНКОВАНИЕ ПОБЕГОВ

Объяснение. Одним из наиболее распространенных способов размножения картофеля является черенкование в пробирочной культуре. Для этого растение разрезают на части. Черенки переносят в пробирки с питательной средой Мурасиге и Скуга (рис. 10.1). Размножение черенкованием основано на подавлении апикального доминирования и активации путем удаления верхушечного побега пазушных меристем, из которых при помещении на питательную среду развивается новый побег. Черенкование проводят с интервалом 14 – 21 день. Из одного растения, как правило, получают 5–8 черенков, за 2–3 месяца количество растений составит 3–5 тысяч растений, а за 7 месяцев – 30 – 40 тысяч.



Рисунок 10.1 – Черенки пробирочных растений картофеля перед посадкой на питательную среду

Ход работы.

1. Работа проводится в стерильном ламинар-боксе с соблюдением техники работы на всех этапах (УФ обработка ламинара, стерилизация инструментов, путем обжига в пламени горелки и т.д.).
2. Пробирочное растение картофеля достать из пробирки, поместить на рабочую поверхность (чашка Петри, оргстекло, кафельная плитка), разрезать на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Часть стебля над листом при этом должна быть в 2–3 раза меньше, чем часть ниже листа.
3. Черенки поместить в пробирки на питательную среду МС.
4. Пробирки с черенками поместить в световую культуральную комнату.
5. Наблюдать за развитием побегов через 7 и 14 дней.

Материалы и оборудование: пробирочные растения картофеля, пробирки со стерильной питательной средой МС, стерильные скальпели, пинцеты, чашки Петри, вата, спирт.

10.2 ИНДУКЦИЯ КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ РАСТЕНИЙ

Объяснение. Для укоренения растений, образовавшихся при микрочеренковании, их необходимо пересадить на новую питательную среду. Черенки и побеги легко укореняются на средах с обедненным составом минеральных солей (среда Уайта, Мурасиге-Скуга, разбавленная вдвое), либо на средах с добавлением ауксинов: ИУК, НУК, ИМК.

Проростки, сформировавшиеся в пробирках со средами, можно рассматривать как небольшие укорененные растения, которые необходимо адаптировать к обычным условиям выращивания. Такие растения лучше пересаживать в грунт, когда полностью сформируются 5–6 листьев и достаточно разрастутся корни. Однако, разные виды культурных растений по-разному приспособляются к изменению условий среды. Каждое растение

требует специально подобранных условий культивирования в грунте, которые устанавливают экспериментально.

Ход работы.

1. В стерильных условиях проростки извлечь из пробирок и стерильным пинцетом перенести в пробирки с питательными средами для укоренения.
2. Пробирки с пересаженными растениями поставить в штативы и перенести в культуральную комнату с освещением 5 кЛх, температурой $25 + 2^{\circ}\text{C}$ и влажностью воздуха 70 %.
3. Результаты укоренения оценить через 1–4 недели, сделать рисунки.
4. Укоренившиеся растения перенести в ящики или вегетационные сосуды с торфом и песком (3:1).

Материалы и оборудование. Пробирки с проростками, пробирки с питательными средами для индукции корнеобразования: без гормонов и с добавлением ИУК, стерильные инструменты, ламинар-бокс, спиртовки, флакон с 96 % спиртом, вата, стерильные чашки Петри.

10.3 ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ IN VITRO

Объяснение. В практике биотехнологии на искусственных питательных средах с определенным набором биологических регуляторов можно вызвать пролиферацию почек и побегов, укоренить их, а также индуцировать образование микроклубней. Для этого обычно используют среды с высоким содержанием минеральных солей (Мурасиге-Скуга), углеводов (сахарозы до 8 % от объема среды), цитокининов, абсцизовой кислоты, хлорхлорида.

В течение первых 10–12 суток после черенкования растения выращивают на обычном фотопериоде (16–17 часовой) с интенсивностью освещения 3–5 кЛх, при температуре 25°C днем и $19\text{--}20^{\circ}\text{C}$ ночью. Последующее культивирование проводят на 12 часовом фотопериоде при той же степени освещенности и температуре. В некоторых случаях, после выращивания в условиях длинного дня пробирки переносят в холодильник с температурой 10°C . образование микро-клубней происходит через 1–1,5 месяца.

Микроклубни хранят в холодильнике при температуре $+2\text{--}+5^{\circ}\text{C}$ и влажности воздуха до 95 %. Их закладывают в стерильные пробирки без среды по 10 штук в каждую и закрывают пробками (срок хранения до 6 месяцев). Таким образом, создаются условия, соответствующие периоду покоя картофеля, что способствует лучшей всхожести и жизнеспособности растений.

Весь период от микрочеренкования до получения микроклубней составляет 60–65 дней.

Ход работы.

1. В стерильных условиях, стерильными инструментами извлечь проростки с хорошо сформированными корнями из пробирок и перенести на питательные среды для индукции клубнеобразования.
2. Пробирки с пересаженными в них растениями закрыть и перенести в культуральную комнату.
3. Провести наблюдение процесса клубнеобразования через 4–6–8 недель культивирования.
4. Результаты зарисовать, сделать выводы на основании теории гормональной регуляции.
5. Заложить микроклубни на хранение.

Материалы и оборудование. Ламинар-бокс, пробирки с питательной средой для получения микроклубней, пробирки со стерильными проростками, имеющими 5–6 сформированных листьев, флаконы с 96 % спиртом для стерилизации инструментов, скальпели, пинцеты, препарировальные иглы, спиртовка, вата, стерильные чашки Петри.

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11 **АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ – РЕГЕНЕРАНТОВ В УСЛОВИЯХ** **ЗАЩИЩЕННОГО ГРУНТА**

Цель занятия: изучить способы адаптации растений – регенерантов.

Объяснение. Несмотря на успешность начальных этапов клонального микроразмножения, при переходе к массовому производству существует проблема низкой воспроизводимости результатов исследований на этапах укоренения микрочеренков и адаптации микрорастений.

На приживаемость растений – регенерантов влияют следующие факторы:

- Наличие и состав фитогормонов.
- Действие физических факторов (спектральный состав света, магнитно-импульсное воздействие).
- Состав грунтов.
- Удобрения и агрохимикаты.

11.1. Влияние фитогормонов и препаратов из группы элиситоров

На этапе адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям повышению приживаемости и ускорению дальнейшего роста способствуют фитогормоны и препараты группы элиситоров. Для стимуляции корнеобразования, черенки / растения – регенеранты обрабатывают 3-индолилуксусной кислотой (60 мг/л) в течение 24 ч)). Для укоренения плодовых и ягодных культур используют ИМК в концентрации 0,5...1,0 мг/л. Для ускорения ризогенеза вводят в питательную среду α -НУК в концентрации 1,0 мг/л.

В настоящее время большое внимание уделяется использованию новых регуляторов роста, отличающихся по своей природе, но характеризующихся высокой биологической эффективностью, низкой токсичностью для человека и окружающей среды, невысокой стоимостью. К таким регуляторам можно отнести циркон, рибав-экстра, эпин-экстра, агат-25К, лариксин, эмистим, амбиол, иммуноцитифит и другие (Упадышев М.Т., 2008).

11.2. Действие физических факторов на ускорение микроразмножения растений

Спектральный состав света. Увеличение выхода оздоровленных растений достигается и за счет оптимизации условий освещения, в том числе подбора спектрального состава света. На этапе размножения выявлено преимущество красного (640-660 нм) и зеленого (520-550 нм) света, на этапе укоренения – красного и белого света.

В исследованиях, проведенных Л.В. Беяковой, В.А. Высоцким, Л.В. Алексеенко (2010) отмечено влияние элиситоров, добавленных в питательную среду при культивировании растений под лампами белого света на этапе укоренения, на основные биометрические показатели и приживаемость растений при адаптации (рис. 11.1).

Магнитно-импульсное воздействие оказывает разнообразные физиологические эффекты на растения, влияет на активность ферментов и проницаемость клеточных мембран, что приводит к повышению регенерационной способности. Сочетание магнитной обработки разнонаправленными импульсами с последующим культивированием побегов на свету с долями излучения 87,5 % в красной области и 12,5 % – в синей улучшает ризогенез плодово-ягодных культур. (Упадышев М.Т., 2011)

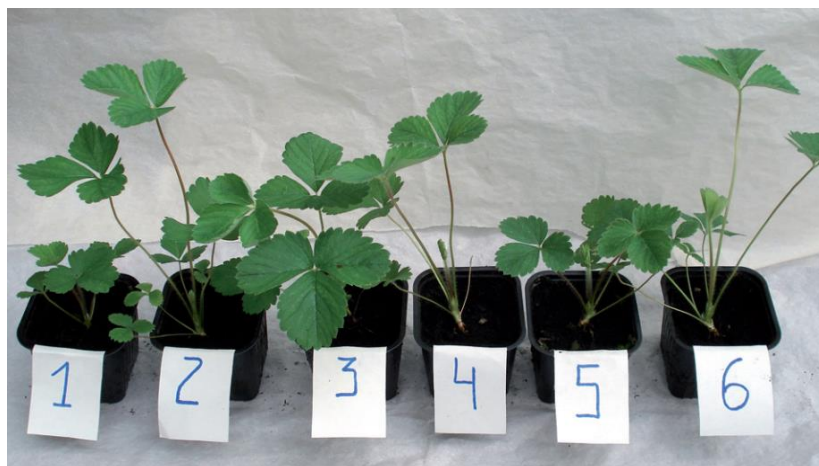


Рисунок 11.1 - Растения земляники сорта Редгонтлет на этапе адаптации:
 1 – белый свет (контроль), 2 – белый свет (опудривание экостом), 3 – красный свет,
 4 – красный свет (опудривание экостом), 5 – синий свет, 6 – синий свет (опудривание экостом) (Белякова Л.В., Высоцкий В.А., Алексеенко Л.В., 2010).

11.3. Влияние состава грунтов на адаптацию растений *ex vitro*

Как правило, микрорастения садовых культур для адаптации к нестерильным условиям в марте-апреле переносят в обогреваемые теплицы, где их пересаживают в пикировочные ящики, кассеты, пластиковые контейнеры или пленочные укрытия, заполненные приготовленным заранее искусственным субстратом. В течение периода адаптации в теплицах поддерживается высокая относительная влажность воздуха 65-90% и температура воздуха 22-28°C, а так же освещенность 2-5 тыс. люкс при фотопериоде 15-18 часов.

При адаптации микрорастений *ex vitro* в практике микроклонального размножения используют большое количество видов субстратов:

1. Торф и песок (1:1). Растения укореняют в течение 6 недель под пленкой, в условиях повышенной влажности. Растения содержат под освещением люминесцентных ламп с низкой интенсивностью освещения при 16-часовом фотопериоде и температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Далее адаптированные растения пересаживают в горшки диаметром 10 см с почвенной смесью и переносят в теплицу. Для прохождения первого этапа адаптации растений в условиях *in vivo* можно использовать вегетационные сосуды, полиэтиленовые сосуд-пакеты.

2. Песок (стерилизованный, промытый водой, перманганатом калия, и др.). В качестве субстрата используется для адаптации растений, предпочитающих песчаные почвы (например, виноград). Для пересадки в сосуд - пакет на песчаный субстрат используют только те растения, которые интенсивно растут. Через 8–10 дней после посадки сосуд - пакеты периодически раскрывают для адаптации к условиям *in vivo*. Период укоренения составляет в среднем 50–90 дней.

3. Субстраты (БИОНА 111, Биогрунт, кокосовый субстрат чистый, минеральный цеолитовый, торфяной и др.) обладают различной степенью влияния на приживаемости растений – регенерантов. Состав субстратов, соотношение компонентов, в разной степени влияют на ризогенез растений сельскохозяйственных, плодово-ягодных и декоративно-древесных культур.

4. Гидропоника. Данный прием устраняет необходимость в этапе *in vitro* корнеобразования и фазы акклиматизации на твердом субстрате. Питательный раствор для гидропонной установки готовят на основе питательной среды Андерсона, уменьшив в два раза концентрацию микро- и макроэлементов и исключив все органические компоненты (сахарозу, витамины и пр.). Для интенсивного корнеобразования и адаптации в гидропонной установке используют двухстадийную методику, предложенную Н.А. Вечерниной с соавторами (2008). Кювету гидропонники заполняют по очереди двумя растворами: №1 –

раствор с повышенным содержанием фосфатов и №2 – раствор с повышенным содержанием нитрата аммония (Зайцева Ю.А., 2015).

5. Минераловатные кубики / почвенный грунт используются для дальнейшего укоренения растений в сочетании с регуляторами роста ауксиновой природы (β -индолилмасляной (ИМК) и β -индолилуксусной (ИУК) кислот).

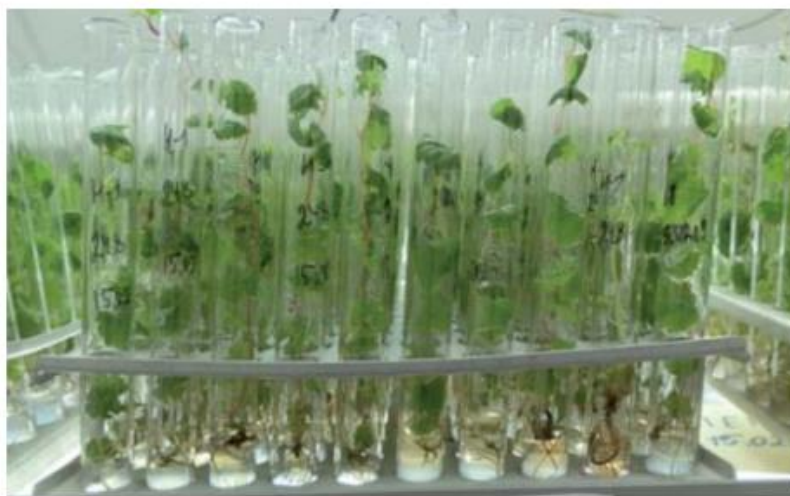


Рисунок 11.2 – Адаптация растений – регенерантов винограда (Браткова Л.Г., Малыхина А.Н., Цаценко Н.Н., 2015)



Рисунок 11.3 - Адаптация растений-регенерантов земляники сорта «Наше Подмосковье» к почвенному субстрату в условиях адаптационной комнаты (развитие микрорастений земляники садовой на 20 сутки после посадки) (Князева И.В., 2017).



Рисунок 11.4 - Прошедшие адаптацию растения земляники садовой сорта «Наше Подмосковье» через 2 месяца после высадки в нестерильные условия (Князева И.В., 2017).

11.4. Повышение адаптационной способности микрорастений в зависимости от применяемых удобрений и агрохимикатов

Поскольку для выращивания маточных растений в качестве субстрата чаще всего используется торф, то резервом повышения продуктивности маточников плодово-ягодных культур, винограда может стать разработка системы минерального питания.

Для стимулирования корнеобразования и ускорения адаптации применяют препараты, содержащие гумат, хитозансодержащие препараты (Экогель, Амулет), биопрепараты (Мицефит, Агролан, Триходермин) др.

Дополнительный эффект дает обеззараживание субстратов фунгицидами (ТМТД, Максим, Превикур и др.)

Ход работы.

1. Растения с двумя-тремя листьями и развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетами.

2. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85-90° С в течение 1-2 ч. *Для большинства растений в качестве субстратов используют смеси в следующих соотношениях: торф : песок (3:1); торф : дерновая земля : перлит (1:1:1); торф : песок : перлит (1:1:1).*

3. Пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты, заполняют заранее приготовленным почвенным субстратом.

4. Растениям обеспечивают относительную влажность воздуха близкую к 100%, что будет обеспечивать успешную акклиматизацию *ex vitro* регенерированных растений в первые дни после пересадки. В этот период значительные потери воды могут привести к гибели микроклонов. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами. Без создания условий с повышенной влажностью наблюдается очень быстрое увядание.

Материалы и оборудование. Пробирки со стерильными проростками, имеющими 5–6 сформированных листьев и сформированную корневую систему, пинцеты, дистиллированная вода, почвенный субстрат, торфяные / пластиковые горшочки, пикировочные ящики, увлажнитель воздуха, растворы ауксинов для полива растений.

Практическая часть занятия проводится индивидуально с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №12 РУБЕЖНЫЙ КОНТРОЛЬ

Теоретические вопросы

1. Эксплант, его виды; стерилизация эксплантов и посадка на питательные среды.
2. Каллусная культура, ее виды. Морфогенез.
3. Цитогенетические особенности культивируемых клеток.
4. Рост клеток в культуре.
5. Типы дифференцировки в культуре клеток.
6. Физические факторы культивирования.
7. Культура клеточных суспензий.
8. Культура одиночных клеток
9. Культуры изолированных протопластов
10. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения
11. Значение клонального микроразмножения растений
12. Клональное микроразмножение растений и его преимущества
13. Методы клонального микроразмножения.
14. Этапы клонального микроразмножения.

15. Области применения клонального микроразмножения
16. Получение безвирусного посадочного материала
17. Влияние фитогормонов и препаратов из группы элиситоров на приживаемость растений - регенерантов
18. Действие физических факторов на ускорение микроразмножения растений
19. Магнитно-импульсное воздействие на мериклоны растений
20. Влияние состава грунтов на адаптацию растений *ex vitro*
21. Повышение адаптационной способности микрорастений в зависимости от применяемых удобрений и агрохимикатов

Практико-ориентированные задания

22. Подобрать и обосновать выбор экспланта для получения каллусной ткани
23. Описать / Подготовить ламинарный бокс к работе
24. Описать / Показать технику работы в ламинар-боксе
25. Описать возможные варианты адаптации растений к нестерильным условиям.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13 ***ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ***

Цель занятия: изучить технологии производства микроорганизмов.

Объяснение. К важнейшим отраслям биоиндустрии следует отнести некоторые отрасли пищевой промышленности (широкомасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов, ферментов).

Для поддержания жизненных функций организма, построения клеток и тканей необходим постоянный синтез различных белковых соединений. Если растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все белковые аминокислоты из углекислоты, воды, аммиака и минеральных солей, то человек и животные не могут синтезировать некоторые аминокислоты (валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин), которые называют *незаменимыми*. Эти аминокислоты должны поступать в организм в готовом виде с пищей; их отсутствие вызывает тяжелые заболевания человека и снижение продуктивности сельскохозяйственных животных.

Для человека главные источники незаменимых аминокислот — белки животного и растительного происхождения, входящие в состав пищи, а для животных — в основном растительные белки. Все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках пищи в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма.

Если содержание белков в растительном корме ниже нормы, то во избежание перерасхода кормов и повышения себестоимости животноводческой продукции количество белка в корме компенсируют введением белковых добавок в виде препаратов незаменимых аминокислот, либо белковой массы с более высоким содержанием ряда аминокислот по сравнению с эталоном. Для балансирования кормов (в которых основной компонент — зерно злаковых культур) по белку и незаменимым аминокислотам применяют концентрированные белковые добавки — комбикорма. Для их приготовления используют мясокостную и рыбную муку, отходы мясной и молочной промышленности, жмыхи масличных растений, отруби, шроты зернобобовых культур.

Особый интерес представляет использование микроорганизмов в качестве источника белка и витаминов при производстве пищевых продуктов. Перспектива и экономическая целесообразность употребления микроорганизмов в технологии производства пищевых продуктов диктуются рядом факторов:

1. возможностью использования разнообразных химических соединений, в том числе отходов производства, для культивирования микроорганизмов;
2. высокой интенсивностью синтеза белков;
3. относительно несложной технологией культивирования микроорганизмов, которое можно осуществлять круглосуточно и во все сезоны года;

4. относительно высоким содержанием белка и витаминов, а также углеводов, липидов и препаратов на основе микробов;

5. повышенным содержанием незаменимых аминокислот по сравнению с растительными белками;

6. возможностью направленного генетического влияния на химический состав микроорганизмов в целях совершенствования белковой и витаминной ценности продукта.

Использование белка микробного происхождения для изготовления пищевых продуктов позволяет экономить высокоценные животные и растительные белки, а также повышать биологическую ценность готового продукта.

В качестве источников кормового белка чаще используют различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, белковые коагуляты травянистых растений.

13.1. ГЛУБИННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ В ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

Ход работы.

1. На первой пробирке отмечают название засеваемой культуры – *E. Coli B* (опыт), на второй пробирке – К (контроль стерильности работы).

2. На столе помещают спиртовку, пенал с пипетками кладут возле правой руки. Зажигают спиртовку, открывают пенал со стерильными стеклянными пипетками. Все манипуляции с пробирками проводят вблизи пламени спиртовки.

3. Пипеткой набирают 5 мл ПБ и добавляют 2,5 мл в первую пробирку, а оставшийся объем среды вносят во вторую пробирку. Бактериологическую петлю стерилизуют прокаливанием в пламени спиртовки, остужают о незасеянную область агаризованной среды в чашке Петри или о внутреннюю стерильную поверхность крышки чашки Петри.

4. Стерильным концом бактериологической петли снимают одну изолированную колонию бактерий и переносят в первую пробирку, тщательно ресуспендируют.

5. В контрольную пробирку засев бактерий не производят.

6. Пробирки ставят в штатив и помещают в термостат (37 °С) для инкубирования в течение 18–24 ч.

7. Проводят учет результатов, оценивая наличие роста бактериальной культуры по помутнению питательной среды. Если рост бактерий наблюдается только в опытной пробирке, следовательно, эксперимент был выполнен правильно.

Материалы и оборудование. Спиртовка, стерильные стеклянные пипетки на 5 или 10 мл, штатив со стерильными стеклянными пробирками на 10–15 мл, колба с 10 мл жидкой полноценной питательной среды – питательный бульон (ПБ), чашка Петри с засеянной культурой бактерий *Escherichia coli B*, бактериологическая петля, стакан для использованных пипеток, маркер по стеклу.

13.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ПОВЕРХНОСТИ АГАРИЗОВАННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ В ЧАШКЕ ПЕТРИ

Ход работы.

1. На дне чашки Петри подписывают название бактериальной культуры – *E. Coli B*.

2. Бактериальную культуру набирают пипеткой и 0,1 мл наносят на поверхность среды в чашке Петри.

3. Шпатель стерилизуют методом обжигания в пламени спиртовки, остужают о внутреннюю поверхность крышки чашки Петри, после чего используют для засева бактериальной культуры на поверхность ПА.

4. Чашку инкубируют в термостате (37 °С).

5. Через 24 ч выявляют наличие роста бактерий на поверхности агаризованной питательной среды.

Материалы и оборудование. Спиртовка, пенал со стерильными стеклянными пипетками на 1 или 2 мл, стерильная чашка Петри с агаризованной полноценной питательной средой (ПА), пробирка с культурой *E. Coli* В в ПБ, закрывающаяся емкость с этиловым спиртом, шпатель Дригальского, стакан для использованных пипеток, маркер по стеклу.

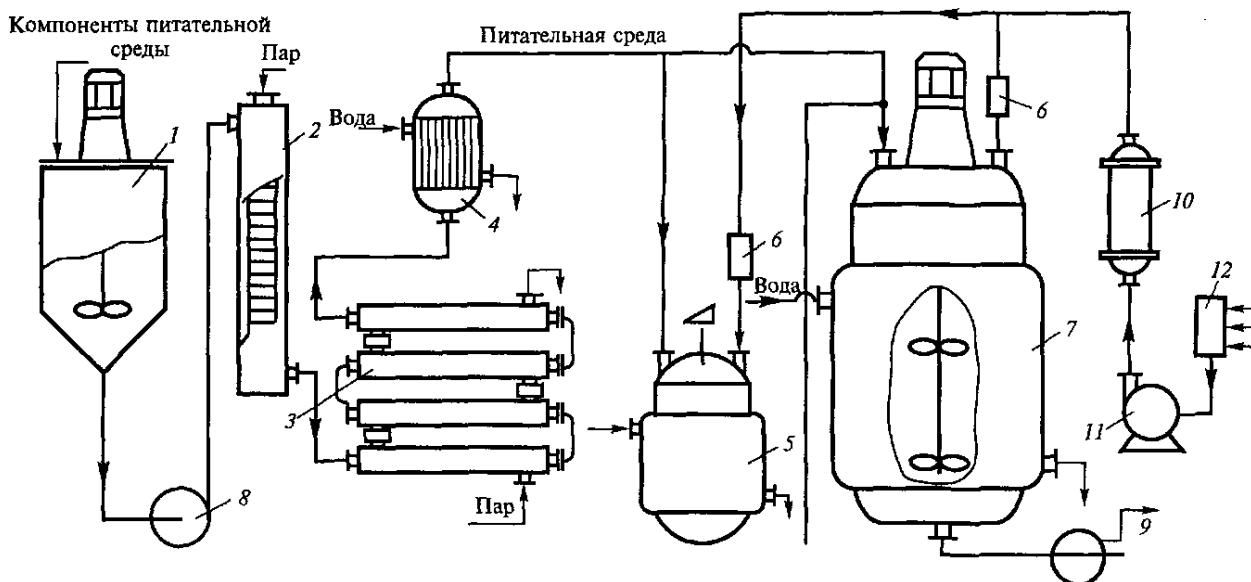


Рис. 13.1 - Принципиальная технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов (по А.А.Свитцову и др., 1986): 1 - смеситель питательной среды; 2 — стерилизатор в непрерывном режиме потока питательной среды; 3, 4 — теплообменники; 5 — посевные аппараты; 6, 10, 12 — фильтры для очистки воздуха; 7 — ферментер; 8, 9 — насосы; 11 — компрессор

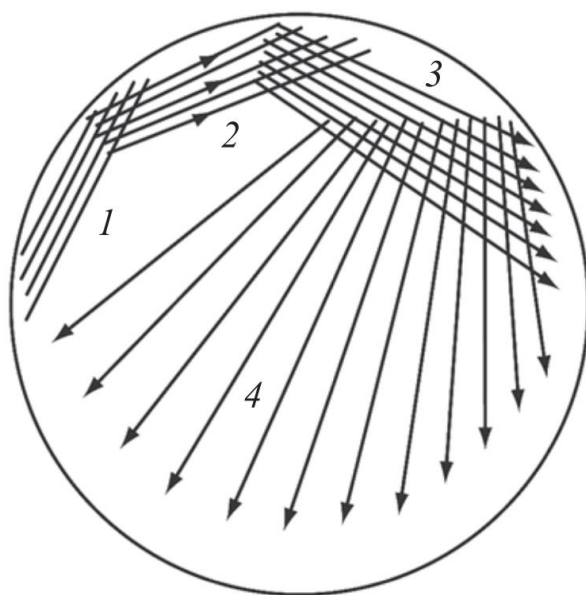


Рис. 31.2 -Техника посева, порядок нанесения (1–4) бактериальной культуры на поверхность агаризованной питательной среды в чашке Петри методом истощающего штриха

Практическая часть занятия проводится индивидуально с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №14 **МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ И ДОСТИЖЕНИЯ** **СЕЛЕКЦИОНЕРОВ (круглый стол)**

Примерные темы для круглого стола

1. Культура изолированных клеток и тканей в селекции растений
2. Клональное микроразмножение
3. Получение гаплоидов *in vitro* и использование их в селекции
4. Клеточная селекция растений
5. Селекция растений на клеточном уровне
6. Получение растений –регенерантов, устойчивых к абиотическим стрессовым факторам методами клеточной инженерии (засуха, засоление, металлы, экстремальные температуры, устойчивость к болезням).
7. Мутагены и их применение в селекции
8. Гибридизация соматических клеток
9. Методы биотехнологии в селекции зерновых культур
10. Методы биотехнологии в селекции овощных культур
11. Методы биотехнологии в селекции плодово-ягодных культур
12. Методы биотехнологии в селекции лекарственных трав
13. Методы биотехнологии в селекции декоративных растений
14. Методы биотехнологии в селекции древесных культур
15. Биотехнологические методы селекции на устойчивость к вредителям и болезням сельскохозяйственных культур
16. Получение генетически-модифицированных растений
17. Тема по выбору студента.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №15 **ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ** **КЛЕТОК**

Цель работы: знакомство с методами выделения и рестрикционного анализа ДНК, получение экспериментальных навыков для конструирования и анализа рекомбинантных ДНК(DNA).

Объяснение. Клонирование рекомбинантной ДНК в общепринятом объекте генно-инженерных исследований – бактерии *E. coli* практически всегда является составной частью процесса получения трансгенного организма. Как правило, *E. coli* используют для сборки и проверки корректности генетической конструкции, а также для получения препаративных количеств рекомбинантной ДНК для последующей трансформации целевого организма в трансгенный. При этом плазмидные векторы являются наиболее популярными для клонирования рекомбинантной ДНК.

Плазмиды – внехромосомные автономно реплицирующиеся генетические элементы клетки, представляющие собой преимущественно кольцевые замкнутые молекулы ДНК.

Методы выделения плазмидной ДНК основаны на том, что бактериальные плазмиды находятся в кольцевой замкнутой форме и имеют небольшие размеры по сравнению с геномной ДНК.

Первый этап многих методов состоит в разрушении жесткой бактериальной клеточной стенки путем их обработки ЭДТА и лизоцимом (для грамотрицательных бактерий)

с образованием сферопластов. ЭДТА, хелатируя ионы металлов, также защищает ДНК от действия катион-зависимых нуклеаз. Реакцию проводят в изотоническом растворе (при достаточно высокой концентрации сахарозы или другого вещества) для предотвращения немедленного лизиса получаемых сферопластов.

Затем сферопласты лизируют, например, путем добавления детергента. Клеточный дебрис (подвижная микрофлора, дополнительные включения) и фрагменты бактериальной хромосомы, связанные с клеточной оболочкой, можно удалить центрифугированием или фильтрованием. Из различных методов выделения плазмид наиболее широко используется метод щелочного лизиса бактерий (метод Бирнбойма – Доли) и его модификации, как для получения мини-препаратов, так для крупномасштабного выделения ДНК.

Метод основан на том, что в щелочных условиях (~рН 12,0–12,5) происходит денатурация линейных молекул ДНК (расплетение двойной спирали), в то время как кольцевые замкнутые молекулы не денатурируют или денатурируют незначительно и обратимо. Когда клеточный экстракт нейтрализуют при высокой концентрации соли, белки, геномная ДНК и клеточная РНК осаждаются. Происходит это, по-видимому, потому, что длинные одноцепочечные молекулы ДНК и РНК реассоциируют в высокой соли после денатурации случайным и беспорядочным образом, образуя нерастворимую массу. Большая часть клеточной РНК осаждается вместе с белками, поскольку реакцию проводят в присутствии додецилсульфата Na (SDS). Оставшуюся клеточную РНК в препарате удаляют обработкой РНКазой А (в основном это транспортная РНК, которая, видимо, вследствие легкости образования внутримолекулярных двухцепочечных участков, сравнительно легко ренатурирует и растворяется в высокой соли).

После удаления осадка центрифугированием плазмидную ДНК осаждают из осветленного клеточного лизата этанолом или изопропанолом. Такой препарат ДНК можно использовать для многих целей, например, для рестрикционного анализа. Для многих других приложений часто необходимы более чистые препараты ДНК, например, для подготовки фрагментов к клонированию или для трансфекции – в таком случае ДНК подвергают дальнейшей очистке.

Для получения высокочистых препаратов небольших по размерам ДНК, пригодных для практически всех молекулярно-биологических приложений, очень популярен метод очистки ДНК на колонках с фильтрами из стекла (*glass*), кварца (*silica slurries*) или силикагеля (*silica-gel membrane*).

ДНК обратимо сорбируется на поверхность стеклянной мембраны в растворе с высокой концентрацией хаотропной соли, примеси отмываются хаотропной солью и 70 % этанолом. Затем очищенная ДНК элюируется в буфере с низкой ионной силой. Для очистки небольших количеств плазмидной ДНК или фрагментов часто используют центрифужные мини-колонки с такими силикатными фильтрами. Подобные наборы выпускаются многими фирмами.

Задача 15.1. Выделение плазмидной ДНК

Ход работы.

1. Культуру *E. coli*, содержащую рекомбинантную плазмиду pUC18, центрифугировать 2 мин в 2 мл пробирках при 8 об/мин. Культуральную среду вылить, осадок осушить.
2. Ресуспендировать осадок в 100 мкл раствора 1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM глюкозы, РНКазы А) с лизоцимом (на кончике шпателя на 10 мл), инкубировать 5 мин при комнатной температуре.
3. Добавить 200 мкл раствора 2 (0,2 M NaOH, 1 10% SDS). Инкубировать с мягким перемешиванием с переворачиванием пробирки до полной прозрачности, но не более 5 мин.
4. Добавить 200 мкл 3 M NaOAc pH 4,75, смешать переворачиванием и инкубировать 5 мин, периодически помешивая.
5. Центрифугировать на максимальных оборотах 10 мин (~16 тыс. об./мин).

6. Супернатант осторожно, не разрушая осадок, прилить к 1 мл этанола, перемешать и центрифугировать 2 мин на максимальных оборотах.
7. Осадок промыть 1 мл 70 % этанола перемешиванием на вортексе, затем центрифугировать 2 мин на максимальных оборотах.
8. Супернатант удалить, осадок подсушить на воздухе 10 мин и растворить в 80 мкл TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

Задача 15.2. Анализ полученных препаратов плазмидных ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле

Для оценки количества и качества ДНК, а также размеров молекул ДНК используют электрофорез в гелях агарозы (горизонтальный) или полиакриламидных гелях (вертикальный электрофорез). Молекулы ДНК визуализируются интеркалирующими флуоресцентными красителями, например, бромистым этидием. Двухцепочечная ДНК эффективно связывает бромистый этидий и начинает ярко флуоресцировать при облучении ультрафиолетом (УФ). Результаты электрофореза документируют в проходящем УФ-свете с помощью цифровой фотокамеры или специальной системы для документирования гелей.

Плазмидная интактная ДНК из клетки выделяется обычно в нескольких формах, которые разделяются в процессе электрофореза (рис. 15.1).

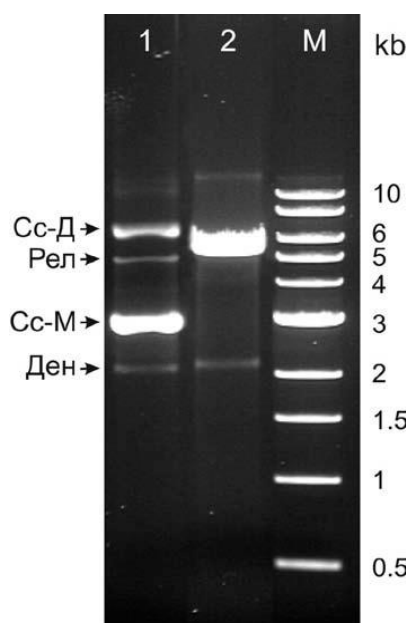


Рис. 15.7. Пример электрофореза в 1 % геле агарозы, окрашен бромистым этидием. (1 – интактная плазида, 2 – линейная плазида после расщепления уникальной рестриктазой (один сайт на молекулу), 3 – маркеры молекулярного веса, длины в тысячах нуклеотидных пар. Формы интактной плазмиды: Ден – денатурированная, Сс-М – суперскрученная мономерная, Сс-Д – суперскрученная димерная, Рел – релаксированная, линейная форма в данном препарате отсутствует) (Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова и др., 2009.)

В хорошем препарате ДНК доминирует суперскрученная мономерная и димерная формы (суперспиральная плазида), при некотором повреждении ДНК появляются релаксированная форма (расплетенное кольцо, к чему приводит наличие разрыва в одной из цепей), редко бывает линейная форма, образующаяся при двухцепочечных разрывах плазмидного кольца. В препарате плазмидной ДНК возможна небольшая примесь денатурированной ДНК, а также фракция РНК. Денатурированная форма образуется при необратимых сдвигах цепей плазмидного кольца относительно друг друга в процессе денатурации. Рестриктазы не опознают сайты на такой ДНК с нарушенной двухцепочечной структурой

и, соответственно, не расщепляют данную фракцию ДНК (рис. 15.1). Подвижность полос с формами кольцевой плазмиды зависит от условий электрофореза и концентрации бромистого этидия, так как внедрение интеркалирующих красителей расплетает ДНК, изменяя ее конформацию.

Суммарное количество плазмидной ДНК во внесенной в гель пробе оценивают путем сопоставления интенсивности свечения полос со стандартной ДНК маркеров.

Ход работы:

1. Приготовить буфер ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0) для электрофореза разведением стокового раствора ТАЕх50.

2. Приготовить 1 % геля агарозы на ТАЕ-буфере путем расплавления навески агарозы в микроволновой печи. После остывания до умеренно горячего состояния добавить бромистый этидий до 0,25 мкг/мл и залить гель в форму.

3. Нанести 1 и 2 мкл полученного препарата рядом с 1 мкл маркерной ДНК в лунки приготовленного 1 % геля агарозы. Образцы перед нанесением чтобы наносимый объем составил 10–15 мкл, для равномерного распределения ДНК по толщине геля.

4. Провести электрофорез в течение 30 мин при напряжении 100 В.

5. С помощью системы видео документации получить фотографию геля в проходящем УФ-свете при длине волны 260 нм.

6. Идентифицировать полосы плазмидной ДНК в препарате. Оценить суммарное количество плазмидной ДНК во внесенной в гель пробе путем сопоставления интенсивности свечения полос полученного препарата с интенсивностью свечения стандартной ДНК. После этого пересчитать количество полученной ДНК на общий объем препарата.

7. Записать вывод о качестве и количестве полученного препарата плазмидной ДНК.

Задача 15.3. Рестрикционный анализ полученного препарата плазмидной ДНК.

Рестриктазы, или, более корректно, рестрикционные эндонуклеазы, являются важнейшими инструментами создания рекомбинантных ДНК и физического картирования ДНК-молекул. Рестриктазы расщепляют двухцепочечную ДНК внутри молекулы. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК длиной от четырёх пар нуклеотидов (сайт узнавания) и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его (сайт расщепления). Наиболее широкое применение в геной инженерии нашли высокоспецифичные рестриктазы, узнающие палиндромные последовательности ДНК и расщепляющие ДНК-молекулу внутри сайта узнавания. При этом могут образовываться концы цепей трех структурных типов.

Если разрыв происходит посередине сайта рестрикции, то образуются фрагменты с полностью спаренными ("тупыми") концами. Когда расщепление ДНК происходит в стороне от середины сайта, образуются выступающие одонитевые концы, получившие название "липких", т. е. способных "слипаться" с комплементарным концом, образующимся в противоположной цепи в результате ее разрыва. Число нуклеотидов в одонитевом концевом участке может варьировать от одного до пяти.

Молекулы ДНК из разных источников, обработанные одной и той же высокоспецифичной рестриктазой, расщепляющей палиндромные последовательности, будут иметь одинаковые гибридизующиеся между собой липкие концы. Наличие таких липких концов у фрагментов ДНК существенно облегчает их ковалентное сшивание специальным ферментом ДНК-лигазой (лигирование) в рекомбинантную молекулу. Поскольку рестриктазы узнают специфические последовательности в молекуле ДНК, становится возможным физически определить месторасположение таких последовательностей, обрабатывая ДНК соответствующими рестриктазами. Физическую карту молекулы ДНК по рестрикционным сайтам можно составить, анализируя длины фрагментов ДНК после расщепления различными рестриктазами.

Ход работы.

1. На основании физической карты плазмиды выбрать три рестриктазы для проведения расщепления полученного препарата плазмидной ДНК в двух вариантах реакции гидролиза двумя рестриктазами одновременно.

2. Для каждого из вариантов из каталога фирмы-поставщика (Сибэнзим) выбрать состав реакционной смеси, в которой одновременно активны обе из используемых рестриктаз.

3. По данным определения содержания ДНК в полученном препарате выбрать объемы пробы для рестрикционного анализа. Определить необходимое количество единиц активности рестриктазы для полного гидролиза полученного препарата за 30 мин и в соответствии с этим добавляемый объем фермента. Записать состав реакционной смеси.

4. Собрать реакции в двух вариантах и инкубировать 30 мин при оптимальной температуре расщепления для конкретных ферментов. В качестве отрицательного контроля ставится проба ДНК без добавления ферментов всего 3 микропробирки.

5. Провести электрофорез гидролизованных образцов в 1 % геле агарозы вместе с маркерными ДНК.

6. Оценить полноту расщепления пробы и размер полученных рестрикционных фрагментов. Сопоставить полученный размер с ожидаемым согласно физической карте плазмиды. Записать выводы.

Материалы и оборудование: Термостатируемый шейкер-инкубатор Exella E-24, «New Brunswick»(США) для выращивания клеточных культур; система видеодокументирования гелей «Molecular Imager Gel Doc XR» производства «Bio-Rad» (США) с трансиллюминатором; микроцентрифуга для пробирок «Eppendorf» 5417R (США) с ротором для микропробирок 1,5–2,0 мл; оборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза фирмы «Bio-Rad» (США): источник постоянного тока «PowerPac HV Power Supply» и «Sub-Cell GT» камеры с заливочными столиками; лабораторный шейкер-вортекс V-1 фирмы «BioSan»; охлаждаемый термостат, модель KB53 фирмы «Binder» (Германия); наборы из трех автоматических пипеток на 2–20 мкл, на 20–200 мкл и на 100–1000 мкл «Gilson»; мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки и наконечники для пипеток; стационарная культура E. coli, содержащая рекомбинантную плазмиду; буферы и реагенты для выделения плазмидной ДНК; буферы и реагенты для рестрикционного анализа ДНК; буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза.

Практическая часть занятия проводится в виде демонстрационных опытов. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №16 БУДУЩЕЕ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ (конкурс проектов)

Для участия в конкурсе проектов студенты в виде рисунков, макетов, композиций представляют современные направления развития биотехнологии.

По итогам конкурса проводится оценка студентов по следующим параметрам: оригинальность, перспективность, презентабельность.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №17 БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ: ВОЗДЕЙСТВИЕ ГМО НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ, ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ (круглый стол)

Темы для подготовки доклада к круглому столу

1. Использование генно-инженерных организмов в сельском хозяйстве: что уже имеется (трансгенные сорта сельскохозяйственных растений, толерантные к гербицидам; трансгенные сорта сельскохозяйственных растений, устойчивые к насекомым-вредителям; трансгенные сорта сельскохозяйственных растений, устойчивые к вирусным болезням; трансгенные сорта сельскохозяйственных растений с улучшенными качественными характеристиками; получение трансгенных гетерозисных гибридов сельскохозяйственных растений на основе системы мужской стерильности/восстановления фертильности). Что нас ждет в ближайшем будущем.
2. Биобезопасность генно-инженерной деятельности.
3. Понятия «риск» и «оценка риска».
4. Что подразумевается под риском генно-инженерной деятельности.
5. Принцип принятия мер предосторожности.
6. Понятие «научная неопределенность» в приложении к оценке риска генно-инженерной деятельности.
7. Принципы построения процедуры оценки риска генно-инженерной деятельности.
8. Идентификация факторов риска генно-инженерной деятельности на практике.
9. Оценка риска генно-инженерной деятельности.
10. Информация, необходимая для оценки риска генно-инженерной деятельности.
11. Основные факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека.
12. Факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека в замкнутых системах.
13. Факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека связанной с высвобождением ГИО в окружающую среду или их использованием в хозяйственной деятельности.
14. Оценка риска патогенности ГИО для человека.
15. Определение масштабов потенциального неблагоприятного воздействия генно-инженерных микроорганизмов на здоровье человека.
16. Определение вероятности неблагоприятного воздействия генно-инженерных микроорганизмов на здоровье человека.
17. Определение необходимых мер защиты в зависимости от уровня патогенности генно-инженерных организмов.
18. Оценка риска потенциальных вредных воздействий на здоровье человека пищевого сырья и традиционных продуктов питания.
19. Процедура оценки риска ГМ продовольственного сырья и продуктов питания.
20. Оценка потенциальной токсичности новых для организма-хозяина молекулярных продуктов трансгенов.
21. Каким образом могут воздействовать на экологические системы различные типы генно-инженерных организмов.
22. В чем отличие генно-инженерных организмов от организмов, полученных путем традиционной селекции, с точки зрения экологической безопасности.
23. Как проводится оценка экологического риска использования генно-инженерных организмов.
24. Какие экологические риски могут быть связаны с высвобождением и распространением ГИО.
25. Международно-правовой режим биобезопасности.
26. Основные положения Картахенского протокола по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии.
27. Орхусская конвенция и Международная конвенция по охране новых сортов растений.

28. Опыт правового регулирования безопасности генно-инженерной деятельности на национальном уровне.
29. Государственное регулирование биобезопасности в США.
30. Государственное регулирование биобезопасности в странах Европейского Союза.
31. Государственное регулирование биобезопасности в Российской Федерации.
32. Что нам дает маркировка ГМ-продуктов.
33. Информирование и участие общественности в принятии решений, касающихся безопасности генно-инженерной деятельности.

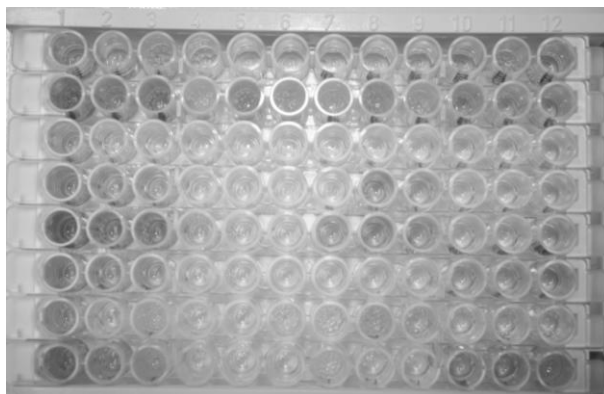
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №18 *ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ. ТЕСТИРОВАНИЕ* *РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА НА СОДЕРЖАНИЕ ВИРУСОВ*

Цель работы: изучить принцип иммуноферментного анализа, как одного из методов диагностики вирусных болезней сельскохозяйственных культур.

Объяснение. Принцип метода ИФА заключается в следующем: к одному из компонентов антиген-антитело присоединяют фермент, другой компонент сорбируют на твердой фазе. Затем проводят реакцию нейтрализации, добавляют субстрат и определяют активность комплекса. Активность фермента, то есть количество образовавшихся комплексов антиген-антитело пропорционально содержанию вирусов.

Для анализа используют полистероловые платы, в лунки которых добавляют сыворотку и антитела, полученные на основе тестируемых вирусов из крови млекопитающих. Антитела адсорбируются на поверхности ячеек платы в течение 6 часов. Остатки сыворотки удаляют специальным буфером. Затем в лунки вносят исследуемые вытяжки растений (сок листьев, клубней). При наличии вирусного заражения образуется комплекс вирус-антитело. Обязательно готовят контрольные платы (без заражения).

После промывания буфером в ячейки добавляют антитела в комплексе с ферментами: фосфотазой и пероксидазой. В присутствии вируса на поверхности платы образуется комплекс «антиген-антитело-фермент». Если материал стерилен, комплексы не образуются, а остатки фермента отмываются буфером. После всех описанных выше манипуляций в лунки платы добавляют субстрат, на котором работает фермент (для фосфотазы необходимы эритроциты крови, которые разрушаются в ее присутствии). В результате реакции между ферментом и субстратом окраски растворов в лунках платы изменяются в зависимости от степени заражения вирусом: нет окраски – «-» – вирус отсутствует, светло-коричневая окраска – «+» – среднее заражение вирусом, ярко-коричневая окраска – «++» – высокая степень заражения вирусом (рис. 18.1). Для успешного тестирования вирусов необходимо создать стандартные условия, использовать высококачественные антитела, ферменты, плату.



Ход работы.

1. Растительный материал гомогенизируют и центрифугируют.
2. Заполнить сывороткой полистероловые плата и оставить для инкубации на 6 часов.
3. Промыть плата буфером.
4. Внести в лунки плата центрифугат и оставить для инкубации на 1 час.
5. Промыть плата буфером.
6. Заполнить плата сывороткой с ферментом и оставить на 1 час.
7. Промыть плата буфером.
8. Внести в лунки субстрат для фермента.
9. Протестировать изменение окраски в лунках плата по шкале.
10. Отобрать образцы без вирусов, со слабой степенью заражения и с сильным заражением вирусом.
11. Результаты тестирования зарисовать, сделать выводы о качестве посадочного материала.

Материалы и оборудование. Полистероловые плата, растительные вытяжки, гомогенизатор, сыворотки, растворы ферментов, кровь млекопитающих, буферный раствор, центрифуга, растительный материал.

Практическая часть занятия проводится в виде демонстрационных опытов. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №19
«БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ»

Примерные темы докладов

1. Оздоровление посадочного материала сельскохозяйственных культур (на выбор).
2. Получение растений устойчивых к гербицидам.
3. Производство и применение биоинсектицидов (на выбор).
4. Производство и применение биофунгицидов (на выбор).
5. Производство и применение энтомофагов (на выбор).
6. Производство и применение биоудобрений (на выбор).
7. Роль биологических лабораторий в защите сельскохозяйственных культур от вредных объектов.
8. Получение трансгенных растений, устойчивых к грибной, бактериальной и вирусной инфекции.
9. Получение трансгенных растений, устойчивых к насекомым.
10. Технология вермикюльтуры.
11. Получение здорового семенного материала сельскохозяйственных культур (на выбор).
12. Выведение сортов и гибридов, устойчивых к вредителям и болезням.
13. Производство и применение биологических препаратов в защите растений (открытый и закрытый грунт)
14. Бактериальные энтомопатогенные препараты
15. Грибные энтомопатогенные препараты
16. Вирусные энтомопатогенные препараты
17. Разведение и применение энтомофагов в открытом и закрытом грунте (трихограмма, бракон, златоглазка, амброзиевый листоед, энкарзия и др.)
18. Производство и применение биоудобрений (биогумус, ЭМ-препараты)
19. Методы диагностики вирусных болезней сельскохозяйственных культур

20. Тема по выбору студента.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №20 *РУБЕЖНЫЙ КОНТРОЛЬ*

Теоретические вопросы

1. Научные основы биотехнологии микроорганизмов.
2. Биологические агенты
3. Аппаратура для реализации биотехнологических процессов и получения конечного продукта
4. Аппаратура для конечной стадии биотехнологических производств и получения готового продукта
5. Промышленный биосинтез белковых веществ
6. Микробиологическое получение аминокислот
7. Микробиологическое получение органических кислот
8. Промышленный синтез антибиотиков
9. Инженерная энзимология
10. Другие направления биотехнологии микроорганизмов
11. Взятие образцов микроорганизмов.
12. Получение чистой культуры бактерий.
13. Получение накопительных культур.
14. Культивирование микроорганизмов: глубинное и поверхностное.
15. Методы сохранения генофонда растений
16. Задачи и значение криосохранения растительного генофонда.
17. Технология замораживания, криосохранения, оттаивания, реактивации клеток и меристем
18. Использование методов *in vitro* для размножения гибридов с низкой жизнеспособностью.
19. Оплодотворение *in vitro*.
20. Культура изолированных семян и зародышей.
21. Андрогенез, партеногенез и гиногенез
22. Культура изолированных клеток и тканей в селекции.
23. История развития генетической инженерии
24. Генная инженерия растений
25. Получение трансгенных растений
26. Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава запасных белков растений
27. Повышение эффективности процесса фотосинтеза
28. Генно-инженерные подходы к решению проблемы усвоения азота
29. Устойчивость растений к фитопатогенам
30. Устойчивость растений к гербицидам
31. Устойчивость растений к насекомым
32. Устойчивость растений к абиотическим стрессам
33. Значение методов ПЦР-анализа и иммуноферментного анализа в растениеводстве и защите растений
34. Иммуноферментный анализ
35. ПЦР- анализ
36. История открытия полимеразной цепной реакции
37. Сущность ПЦР- анализа.
38. Достоинства и трудности метода ПЦР
39. Технология получения и применения биологических удобрений.

40. Биологические методы и препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений.
 41. Производство биогаза
 42. Биобезопасность генно-инженерной деятельности
 43. Что подразумевается под риском генно-инженерной деятельности
 44. Основные факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека
 45. Факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека в замкнутых системах.
 46. Факторы риска генно-инженерной деятельности для здоровья человека, связанной с высвобождением ГИО в окружающую среду или их использованием в хозяйственной деятельности.
 47. Международно-правовой режим биобезопасности
 48. Государственное регулирование биобезопасности в Российской Федерации.
 49. Выбор, распространение и применение биотехнологии. Предотвращение риска
- Практико-ориентированные задания**
50. Описать методы биотехнологии, применяемые в селекции растений.
 51. Описать этапы подготовки растения к криоконсервированию.
 52. Описать этапы генетической трансформации растения.
 53. Иммуноферментный анализ: этапы проведения анализа
 54. ПЦР –анализ: этапы проведения анализа
 55. Описать технологию получения биологических удобрений.
 56. Описать технологию получения азотных биоудобрений.
 57. Описать технологию получения биологических препаратов (бактериальных, грибных, вирусных).

4. Содержание отчета по лабораторной работе

Отчет о проведенной лабораторной работе записывается в конце работы. В рабочую тетрадь вносятся рисунки (если таковые требуются), результаты и выводы.

5. Список использованной литературы

1. ЭБ «Труды ученых СтГАУ»: Ченикалова, Е. В. Биотехнология в защите растений [электронный полный текст] : практикум по выполнению лабораторных работ ; учебное пособие для бакалавров и магистров, обучающихся по направлению 110400 «Агрономия» / Е. В. Ченикалова, М. В. Добронравова, Д. А. Павлов ; СтГАУ. - Ставрополь : АГРУС, 2013. - 2,95 МБ.
2. ЭБС «Znanium»: Основы микробиологии и экологической биотехнологии: Учебное пособие / Б.С. Ксенофонтов. - М.: ИД ФОРУМ: НИЦ ИНФРА-М, 2015. - 224 с.
3. ЭБС «Znanium»: Предупреждение преступлений, связанных с использованием биотехнологий /А.И.Трусов - М.: ИЦ РИОР, НИЦ ИНФРА-М, 2015. - 190 с.
4. ЭБС «Лань»: Калмыкова М.С., Калмыков М.В., Белоусова Р.В. Основы полимеразной цепной реакции с разными форматами детекции: учеб. пособие. – СПб.: Издательство «Лань», 2009. – 94 с.
5. Азарова О.П., Чачина С.Б. Основы биотехнологии: методические указания. – Омск, 2008. – 44 с.
6. Биотехнология : учебник для студентов вузов по с.-х., естественнонауч., пед. специальностям и магистерским программам / под ред. Е. С. Воронина. - СПб. : ГИОРД, 2008. - 704 с. - (Гр. МСХ РФ).
7. Биотехнология в защите растений. Практикум по выполнению лабораторных работ : учеб. пособие для бакалавров и магистров по направлению 110400 "Агрономия" /

сост.: Е. В. Ченикалова, М. В. Добронравова, Д. А. Павлов ; СтГАУ. - Ставрополь : АГРУС, 2013. - 108 с. - (Гр. УМО).

8. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

9. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – 286 с.

10. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 240 с.

11. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: Курс лекций. – Минск: БГУ, 2007. - 102 с.

12. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для студентов вузов по специальности "Биология". - 4-е изд., стер. - М. : Академия, 2008. - 208 с. - (Высшее профессиональное образование. Гр. УМО).

13. Калинин Ф.Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В.В. Технология микроразмножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992.

14. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983.

15. Клеточная инженерия / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин // Биотехнология. Т. 3. – М.: Высш. школа, 1987. – 127 с.

16. Лабораторно-практические занятия по сельскохозяйственной биотехнологии: метод. указания / Сост. Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев, Е.З. Кочиева, Д.В. Калашников, В.М. Ковалев, Л.И. Хрусталева; под ред. акад. РАСХН В.С. Шевелухи. – М.: Изд-во МСХА, 1996. – 90 с.

17. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Порофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: Наука, 1990. – 120 с.

18. Нетрусов А. И. Введение в биотехнологию : учебник для студентов вузов по направлению "Биология" и смежных направлениям. - Москва : Академия, 2014. - 288 с. - (Высшее образование. Бакалавриат. Гр. УМО).

19. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие / Составители: Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б., Гринь Н.А. – Саратов, 2002.- 45 с.

20. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник для студентов вузов по с.-х., естественнонауч. и пед. специальностям и магист. программам / под ред. В. С. Шевелухи. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : Высш. шк., 2003. - 469 с. : ил. - (Гр.).

21. Сельскохозяйственная биотехнология: Методические указания/ Белорусская государственная сельскохозяйственная академия; Сост А.В. Кильчевский, Т.В. Никонович, В.В. Французенок, В.В. Ермоленков, Е.П. Воробьева. - Горки, 1999. - 24 с.

22. Словарь терминов по биотехнологии и биологической защите растений / сост.: Е. В. Ченикалова ; СтГАУ. - Ставрополь : Параграф, 2011. - 24 с.

23. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : лаб. практикум / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова и др. – Электрон. дан.(3 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – (Современные проблемы и методы биотехнологии : УМКД № 1323-2008 / рук. творч. коллектива Т. Г. Волова). –1 электрон. опт. диск (DVD).

24. Щелкунов. С. Н. Генетическая инженерия : учеб. пособие для студентов вузов по специальностям: "Биотехнология", "Биохимия", "Генетика", "Микробиология". - 3-е изд., испр. и доп. - Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2008. - 514 с. : ил. - (Гр.).

25. Оборудование для иммуноферментного анализа [Электронный ресурс], - 1996-2015. - Режим доступа <http://www.medlabs.ru/EIFA/EqIFA.htm>, свободный, загл. с экрана.

26. ELISA TEST [Электронный ресурс]. - Режим доступа <http://mgc.server888.de/wp-includes/js/jcrop/elisa-test>, свободный, загл. с экрана.

27. Western Flower Thrips in Greenhouses: A Review of its Biological Control and Other Methods [Электронный ресурс], - 2013. <http://biocontrol.ucr.edu/wft.html>, свободный, загл. с экрана.
28. Биотехнология (периодическое издание).
29. Генетика (периодическое издание).
30. Защита и карантин растений (периодическое издание).
31. Земледелие (периодическое издание).
32. Картофель и овощи (периодическое издание).
33. Сельскохозяйственная биология (периодическое издание).

6. Перечень основной и дополнительной учебной литературы, необходимой для освоения дисциплины

а) основная литература:

1. ЭБС «Лань»: Исаков, И.Ю. Биотехнология в лесном хозяйстве [Электронный ресурс] : учебное пособие / И.Ю. Исаков, А.И. Сиволапов, М.Ю. Нечаева. — Электрон. дан. — Воронеж : ВГЛТУ, 2017. — 208 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/102260>. — Загл. с экрана.
2. ЭБС «Лань»: Общая селекция растений [Электронный ресурс] : учебник / Ю.Б. Коновалов [и др.]. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2018. — 480 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/107913>. — Загл. с экрана.
3. Нетрусов, А. И. Введение в биотехнологию : учебник для студентов вузов по направлению "Биология" и смежных направлениям / А. И. Нетрусов. - Москва : Академия, 2014. - 288 с. - (Высшее образование. Бакалавриат. Гр. УМО).

б) Дополнительная литература:

1. ЭБС «Лань»: Калмыкова, М.С. Основы полимеразной цепной реакции с разными форматами детекции [Электронный ресурс] : учебное пособие / М.С. Калмыкова, М.В. Калмыков, Р.В. Белоусова. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2009. — 80 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/513>. — Загл. с экрана.
2. ЭБС «Znanium»: Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств : учеб. пособие / А.В. Луканин. — М. : ИНФРА-М, 2020. — 304 с. — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/348711>
3. ЭБС «Znanium»: Основы микробиологии и экологической биотехнологии: Учебное пособие / Б.С. Ксенофонтов. - М.: ИД ФОРУМ: НИЦ ИНФРА-М, 2019. - 224 с. — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/341804>
4. ЭБС «Znanium»: Трусков А. И. Предупреждение преступлений, связанных с использованием биотехнологий : монография / А.И. Трусков. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2018. — 190 с. — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/970146>
5. ЭБС «Znanium»: Экологическая биотехнология: Учебное пособие / Т.Е. Бурова, О.Б. Иванченко. – СПб.:ГИОРД, 2018. - 176 с. — Режим доступа: <https://znanium.com/read?id=357528>
6. ЭБ «Труды ученых СтГАУ»: Ченикалова, Е. В. Биотехнология в защите растений [электронный полный текст] : практикум по выполнению лабораторных работ ; учебное пособие для бакалавров и магистров, обучающихся по направлению 110400 «Агрономия» / Е. В. Ченикалова, М. В. Добронравова, Д. А. Павлов ; СтГАУ. - Ставрополь : АГРУС, 2013. - 2,95 МБ.
7. ЭБ «Труды ученых СтГАУ»: Ченикалова, Е. В. Биотехнология в защите растений [электронный полный текст] : курс лекций / Е. В. Ченикалова ; СтГАУ. - Ставрополь, 2015. - 6,54 МБ.
8. ЭБ «Труды ученых СтГАУ»: Селионова, М. И. Основы генетической инженерии [электронный полный текст] : учеб. пособие / М. И. Селионова, Т. И. Антоненко ; СтГАУ. - Ставрополь : АГРУС, 2011. - 1,70 МБ.
9. Биотехнология : учебник для студентов вузов по с.-х., естественнонауч., пед. специальностям и магистерским программам / под ред. Е. С. Воронина. - СПб. : ГИОРД, 2008. - 704 с. - (Гр. МСХ РФ).

10. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для студентов вузов по специальности "Биология". - 4-е изд., стер. - М. : Академия, 2008. - 208 с.
11. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник для студентов вузов по с.-х., естественнонауч. и пед. специальностям, и магист. программам / под ред. В. С. Шевелухи. - М. : Высш. шк., 1998. - 416 с. - (Гр.).
12. Сельскохозяйственная биология (периодическое издание).
13. Международная реферативная база данных SCOPUS. <http://www.scopus.com/>
14. Международная реферативная база данных Web of Science. - http://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=D1pA5xVwJ2ohFIO7GYz&preferencesSaved

в) Методические материалы, разработанные преподавателями кафедры по дисциплине, в соответствии с профилем ОП.

15. ЭБ «Труды ученых СтГАУ»: Сельскохозяйственная биотехнология [электронный полный текст] : учеб.-метод. пособие по выполнению лабораторно-практ. работ для студентов всех форм обучения / Л. В. Мазницына, Ю. А. Безгина, А. Н. Шипуля, О. В. Шарипова ; СтГАУ. - Ставрополь, 2016. - 21,5 МБ.

г) Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины.

1. Федеральный закон «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности» [Электронный ресурс] / Консультант плюс. - Режим доступа http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_200732/, свободный, загл. с экрана.
2. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии [Электронный ресурс] , 1974-2019 -. - Режим доступа <http://www.vniisb.ru/ru/> - свободный, загл. с экрана.
3. Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии [Электронный ресурс] , 1970-2019 -. - Режим доступа <http://niilgis.ucoz.ru/> свободный, загл. с экрана.
4. Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства (ВСТИСП) [Электронный ресурс] , 2019 -. - Режим доступа <https://vstisp.org/vstisp/>, свободный. Заглавие с экрана.
5. Интернет –портал по биотехнологии [Электронный ресурс] , 2011-2019 -. - Режим доступа <http://bio-x.ru/> свободный, загл. с экрана.
6. Криобанк Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. [Электронный ресурс] , 2019 -. - Режим доступа <http://www.ippras.ru/cfc/cryo/> свободный, загл. с экрана.
7. Отдел биотехнологии КНИИСХ [Электронный ресурс] , 2019 -. - Режим доступа <http://www.kniish.ru/kniish22.html> , свободный, загл. с экрана.
8. Отдел биотехнологии Никитского ботанического сада [Электронный ресурс] , 2019 -. - Режим доступа <http://nikitasad.ru/otdel-biologii-razvitiya-rastenij-biotehnologii-i-biobezopasnosti/>, свободный, загл. с экрана.
9. Сборник научных трудов Никитского ботанического сада [Электронный ресурс] , 2018 -. - Режим доступа <http://scbook.nbgnsipro.com/>, свободный, загл. с экрана.
10. Санкт-Петербургский НИИ лесного хозяйства [Электронный ресурс] , 2019 -. - Режим доступа <http://spb-niilh.ru/scientific-activities/directions/forest-biotechnology>, свободный, загл. с экрана.
11. Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха [Электронный ресурс] , 2019 -. - Режим доступа <http://lorchinstitute.ru/>, свободный, загл. с экрана.

ТЕРМИНОЛОГИЯ

In vitro – выращивание растительных объектов «в стекле» (пробирке, колбе, биореакторе) на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

In vivo – (лат. – буквально «в (на) живом»), то есть «внутри живого организма» или «внутри клетки». В науке **in vivo** обозначает проведение экспериментов на (или внутри) живой ткани при живом организме.

Ex vitro – (лат.) — из стекла (например, организм, выращенный из культуры ткани);

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

6-БАП – 6-бензиламинопурин

Адвентивные почки – почки, возникшие из тканей и клеток растения, обычно их не образующих.

Анеуплоид – ядро, клетки, организм с числом хромосом, отклоняющимся от X и от чисел, кратных X .

Апекс – верхушечная часть стебля или корня.

Апикальное доминирование – явление подавления роста боковых почек побега в присутствии терминальной почки.

Ауксины – фитогормоны (ИУК, НУК, 2,4-Д), активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие образование корней у проростков.

Гаплоид – ядро, клетки, организм, характеризующиеся набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (символ n).

Гиббереллины – фитогормоны ($ГК_3$ и др.), активизирующие рост стеблей, вызывающие прораствание семян.

ГК – гибберелловая кислота

Дедифференциация – переход специализированных клеток к пролиферации и неорганизованному каллусному росту (утрата клетками специализации).

Диплоид – ядро, клетки, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленным числом, характерным для данного вида (символ $2n$).

Дифференциация – комплекс процессов, приводящих к различиям между клетками.

Дифференцировка – состояние специализации клеток, отличающее их от других.

Доминант – ген, проявляющийся как признак при условии, когда гомологичные наборы имеют разные гены.

Изолированный протопласт – растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического разрушения.

Инокулюм – часть клеточной суспензии, используемая для переноса на свежую питательную среду.

ИУК – β -индолилуксусная кислота

Каллус – группа дедифференцированных клеток, возникших *in vivo* или *in vitro* путем неорганизованной пролиферации.

Кариотип – набор хромосом, характерных для данного вида.

Клеточная селекция *in vitro* – метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

Клон – культура, возникшая из одной клетки.

Клональное микроразмножение или микроклональное размножение – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному (метод вегетативного размножения растений в культуре *in vitro*).

Культура «привыкших» тканей – выращивание тканей, возникших путем редифференциации или мутации клеток нормальных каллусных тканей, и способных расти на питательных средах без гормонов.

Культура зиготических зародышей *in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

Культура изолированных протопластов – выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента

осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок изолированные протопласты превращаются в культуру клеток.

Культура каллусов *in vitro* – выращивание в длительной пересадочной культуре каллусов, возникших путем дедифференциации и пролиферации клеток, тканей, органов растений.

Культура корней *in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней.

Культура меристем *in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде изолированного апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

Культура органов *in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней, стеблевых апексов, незрелых частей цветка, незрелых плодов.

Культура суспензионная или культура клеток *in vitro* – асептическое выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде.

Культура тканей *in vitro* – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.

Линия – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

Меристема – образовательная ткань с мелкими, активно делящимися клетками.

Моноплоид – ядро, клетка, организм, характеризующиеся основным числом хромосом в полиплоидной серии (символ X).

Морфогенез *in vitro* – процесс формообразования, то есть заложения, роста и развития клеток (цитогенез), тканей (гистогенез) и органов (органогенез) в культуре клеток и тканей *in vitro*.

Мутация – изменения в генетическом материале клеток путем перестройки ДНК ядер и органелл, изменений в структуре хромосом или уровне ploидности организма.

НУК – α -нафтилуксусная кислота

Омнипотентность ядер – сохранение ядрами соматических клеток растений всех потенций ядра зиготы, то есть сохранение всей генетической информации.

Полиплоид – ядро, клетки, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символ 3X, 4X и т.д.).

Пролиферация – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

Псевдодиплоид – ядро, клетки, организм, характеризующиеся диплоидным числом хромосом, отличающиеся от зигот данного вида по кариотипу.

Регенерация – восстановление целостного организма из клетки, ткани, органа.

Редифференциация – переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Рецессив – ген или генетически обусловленный признак, проявляющийся в диплоидной клетке или организме при условии, когда оба набора хромосом несут данные гены.

Ризогенез – процесс заложения, роста и развития корней.

Ростовой цикл – рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризующийся сигмоидальной (S-образной) кривой. Фазы ростового цикла: латентная (лаг-фаза), экспоненциальная (лог-фаза, фаза логарифмического роста), замедления роста, стационарная, деградации.

Слияние изолированных протопластов – формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

Сомаклональные вариации и варианты – фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органелльных цитоплазматических геномов культивируемых клеток. От истинных генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (изменения в структуре генов, хромосом, геномов).

Соматическая (парасексуальная) гибридизация – способ создания гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений путем генетической рекомбинации хромосом и генов ядра и органелл вне сексуального цикла, например путем слияния изолированных протопластов.

Соматический гибрид – растение, полученное путем гибридизации изолированных протопластов.

Субкультивирование – процесс переноса транспланта или инокулюма в культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Субпротопласт – изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, сохранивший ядро.

Тотипотентность – свойство соматических клеток полностью реализовать генетический потенциал целого организма.

Трансплант – часть каллусной ткани, используемая для переноса на свежую питательную среду.

Фитогормоны – (гормоны растений) – биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.

Цибрид – растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с цитопластом, протопластом с инактивированным ядром или с энуклеированным протопластом.

Цикл выращивания – период от помещения клеточного инокулюма или каллусного транспланта на питательную среду до последующего субкультивирования.

Цитокинины – фитогормоны (кинетин, 6-БАП), активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек.

Цитопласт – ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

Штамм – культура, возникшая после первого субкультивирования, и состоящая из многих клеточных линий, возникших из клеток первичного каллуса.

Эксплант – фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

Эмбрионидогенез – процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) неполовым путем в культуре тканей и клеток *in vitro*.

Эпигенетические вариации – фенотипическое выражение дифференциальной активности генов. От мутаций и соматических вариаций отличаются тем, что не сохраняются в цикле клетка-растение-клетка.

Эуплоид – ядро, клетки, организм с числом хромосом, кратным X .