

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

Кафедра химии и защиты растений

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Методические указания
по выполнению лабораторных работ
для студентов всех форм обучения

Направление 35.04.09 Ландшафтная архитектура
«Современный ландшафтный дизайн урбанизированной среды»

Ставрополь
2020

1. Цель дисциплины

Целями освоения дисциплины «Основы биотехнологии растений» являются: формирование знаний и умений в области биотехнологии растений, как одной из отраслей науки и производства; изучение основных приемов культивирования клеток и тканей, использование методов *in vitro* для размножения гибридов с низкой жизнеспособностью; возможности применения биотехнологии в декоративном растениеводстве.

2. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесенных с планируемыми результатами освоения образовательной программы

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 анализировать современные проблемы науки и производства, решать сложные (не-стандартные) задачи в профессиональной деятельности	ОПК-1.1 Использует знание достижений науки и производства для решения конкретных задач в области профессиональной деятельности	Знания: достижений науки и производства для решения конкретных задач в области биотехнологии растений
		Умения: осуществлять поиск современной информации в области биотехнологии
		Навыки: решать ряд задач в области биотехнологии; осуществлять поиск современной информации в области биотехнологий
	ОПК-1.2 Применяет информационно-коммуникационные технологии для решения задач профессиональной деятельности	Знания: возможностей информационно-коммуникационных технологий
		Умения: применять информационно-коммуникационные технологии в поиске информации по заданной тематике
		Навыки: работы с информационно-коммуникационными технологиями
ПК-3 Способен разрабатывать научно-обоснованные технологии производства растительного материала с учетом его использования в озеленении	ПК-3.1 Способен к разработке и реализации системы мероприятий по сохранению зеленых насаждений и газонов	Знания: основных процессов биотехнологии как одного из этапов сохранения зеленых насаждений
		Умения: разрабатывать и реализовывать способы размножения растений методами <i>in vitro</i>
		Навыки: работы по размножению растений методами <i>in vitro</i>
	ПК-3.2 Способен разрабатывать научно-обоснованные технологии выращивания посадочного материала: декоративных деревьев и кустарников, цветочных культур, газонов	Знания: биотехнологий выращивания посадочного материала
		Умения: разрабатывать научно-обоснованные технологии выращивания посадочного материала: декоративных деревьев и кустарников, цветочных культур, газонов
		Навыки: работы в биотехнологической лаборатории

3. Место дисциплины в структуре образовательной программы

Дисциплина ФТД. 01 Основы биотехнологии растений является факультативной дисциплиной.

Изучение дисциплины осуществляется:

- для студентов очной формы обучения в 4 семестре;
- для студентов заочной формы обучения на 2 курсе

4. Перечень лабораторных работ

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 ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{K}_2\text{CrO}_7$).

Оборудование комнаты для приготовления питательных сред: лабораторные столы; холодильники для хранения маточных растворов солей, гормонов и витаминов; аналитические 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 °C; 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°C) 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°C.
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.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2

ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН

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. 2.1).

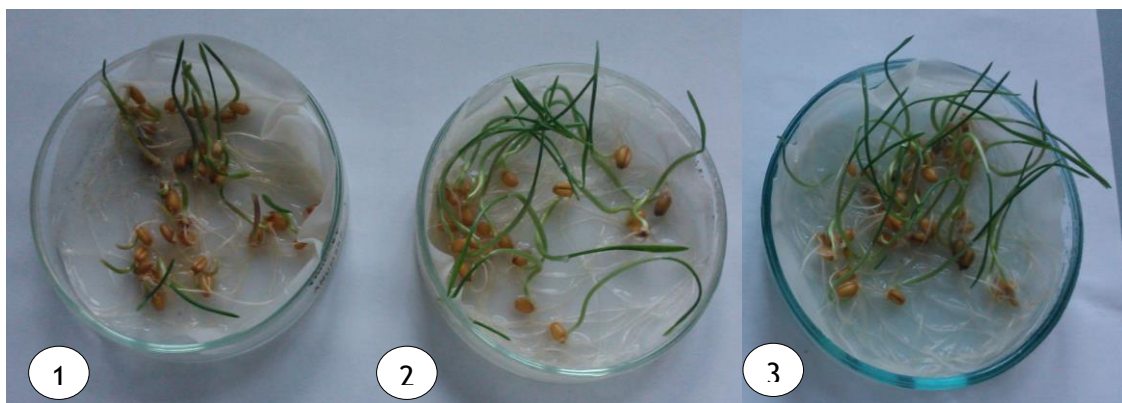


Рисунок 2.1. Сравнительное действие регуляторов роста на прорастание семян озимой пшеницы (1 – ингибиторы роста; 2 – контроль, стимулятор роста)

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. X₁ – количество проросших семян, X₂ – 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.

ЛАБРАТОРНАЯ РАБОТА №3

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. 3.1).



Рисунок 3.1. – 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 °C 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°C 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°C 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°C 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 № 4

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, канамицин 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. 4.1). 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 4.1 – 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 5. 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 так-

же 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 pH.

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 ростактивирующей способностью обладает кокосовое молоко - жидкий эндосперм кокосового ореха.

Для приготовления твердых питательных сред, в них добавляют 0,5 – 0,7% агар-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 макросолей - 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.5.1), Уайта (табл. 5.2), Гамборга и Эвелега (B₅) (табл.5.3).

Таблица 5.1 - 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 5.2 - 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 5.3. Компоненты питательной среды Гамборга и Эвелеге (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-ip, 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 5.4).

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 рН раствора, который устанавливают на уровне 5,6 – 5,8, используя 0,1 н. КОН или 0,1%-ный раствор НСl. В предварительно нагретую среду (60 – 70°C) добавляют 0,7 грамма агара и доводят до кипения периодически помешивая.

Таблица 5.4 - 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 НСl (В ₆)	10	
Тиамин - НСl (В ₁)	2	
Никотиновая кислота (РР)	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.

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 №6 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.6.1).



Рисунок 6.1. - Работа в ламинар-боксе (лаборатория биотехнологии Ставропольского ФНАЦ)

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 № 7

РУБЕЖНЫЙ КОНТРОЛЬ

Теоретические вопросы

1. Биотехнология как отрасль науки и отрасль производства.
2. Этапы развития биотехнологии
3. Связь биотехнологии с другими науками
4. Разделы современной биотехнологии
5. Основные направления и задачи современной биотехнологии.
6. Коммерциализация современной биотехнологии
7. Классификация регуляторов и их влияние на растения.
8. Представители группы регуляторов и стимуляторов роста растений.
9. 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*).
10. Создание условий асептики в биотехнологии
11. Питательные среды (виды, назначение, состав)
12. Рост клеток в культуре
13. Получение каллуса и его культивирование. Характеристика каллусной ткани, виды каллусной ткани
14. Физические факторы культивирования
15. Способы стерилизации в биотехнологии
16. Значение витаминов и фитогормонов в питательных средах
17. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения

Практико-ориентированные задания

18. Указать влияние ауксинов на растения и привести пример использования в биотехнологии и растениеводстве.
19. Указать влияние цитокининов на растения и привести пример использования в биотехнологии и растениеводстве.
20. Указать влияние гиббереллинов на растения и привести пример использования в биотехнологии и растениеводстве.
21. Указать влияние ингибиторов роста на растения и привести пример использования в биотехнологии и растениеводстве.
22. Описать методику определения действия регуляторов роста на прорастание семян озимой пшеницы.
23. Подобрать и обосновать выбор экспланта для получения каллусной ткани
24. Описать этапы приготовления питательных сред и пояснить требования, предъявляемые к каждому этапу
25. Описать / Подготовить ламинарный бокс к работе
26. Описать / Показать технику работы в ламинар-боксе
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.
30. Описать способы стерилизации растительных эксплантов / Провести стерилизацию растительных эксплантов

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8 *КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ* *(НА ПРИМЕРЕ КАРТОФЕЛЯ)*

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

8.1 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 8.1 – 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.

8.2 ИНДУКЦИЯ КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ *МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ РАСТЕНИЙ.*

Объяснение. Для укоренения растений, образовавшихся при микрочеренковании, их необходимо пересадить на новую питательную среду. Черенки и побеги легко укорене-

няются 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 приспосабливаются 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 пробирку 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.

8.3 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.

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).

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)

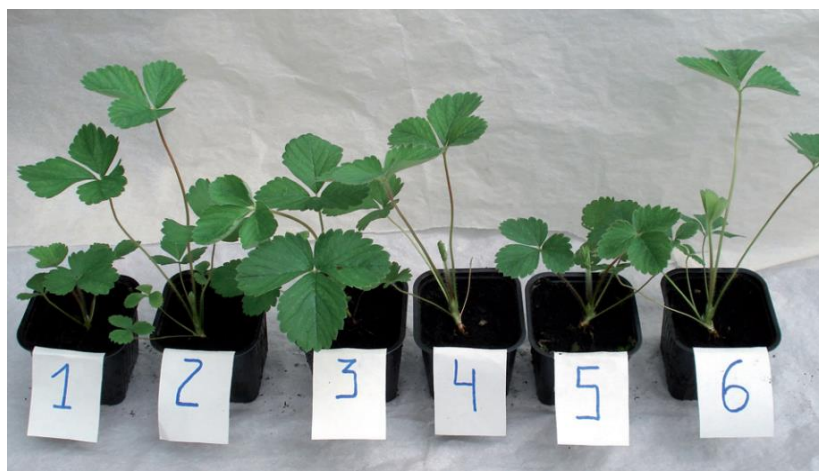


Рисунок 8.2 - Растения земляники сорта Редгонтлет на этапе адаптации:
1 – белый свет (контроль), 2 – белый свет (опудривание экостом), 3 – красный свет,
4 – красный свет (опудривание экостом), 5 – синий свет, 6 – синий свет (опудривание экостом)
(Беякова Л.В., Высоцкий В.А., Алексеенко Л.В., 2010).

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 гидропоники 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).

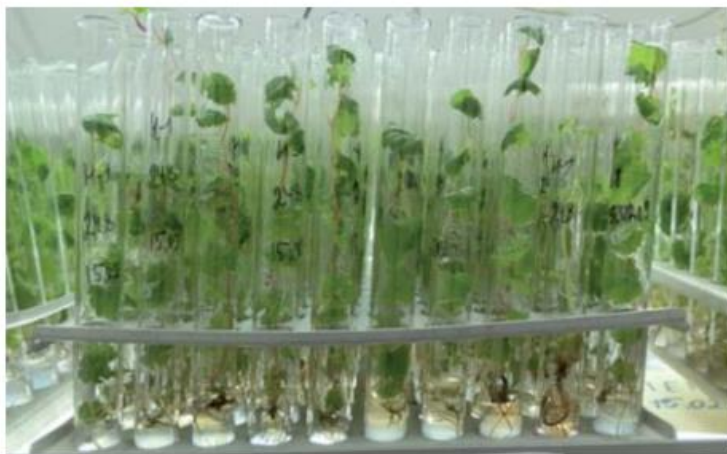


Рисунок 8.3 – Адаптация растений – регенерантов винограда (Браткова Л.Г., Малыхина А.Н., Цаценко Н.Н., 2015)



Рисунок 8.4 - 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 8.5 - Прошедшие адаптацию растения земляники садовой сорта «Наше Подмосковье» через 2 месяца после высадки в нестерильные условия (Князева И.В., 2017).

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 №9

ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР МЕТОДАМИ IN VITRO (КРУГЛЫЙ СТОЛ)

Вопросы для обсуждения

1. Клональное микроразмножение розы
2. Клональное микроразмножение гвоздики
3. Клональное микроразмножение хризантем
4. Клональное микроразмножение плодовых культур (на выбор)
5. Клональное микроразмножение древесных культур (на выбор)
6. Клональное микроразмножение эфиромасличных культур (на выбор)
7. Клональное микроразмножение тропических растений (на выбор)
8. Клональное микроразмножение редких растений (на выбор)
9. Клональное микроразмножение арабидопсиса
10. Тема по выбору студента

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ МЕТОДАМИ ИФА, ПЦР

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. 10.1).

Для успешного тестирования вирусов необходимо создать стандартные условия, использовать высококачественные антитела, ферменты, плата.

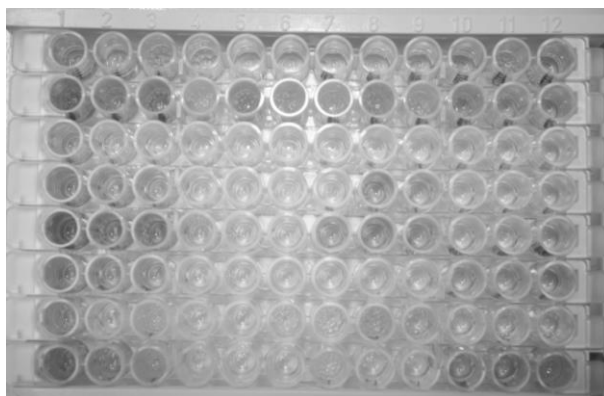


Рисунок 10.1. – Результаты иммуноферментного анализа в лунках платы
(<http://mgc.server888.de/wp-includes/js/jcrop/elisa-test>)

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. Пояснение принципа ПЦР проводится демонстрацией видеороликов. Закрепление материала проводится по типу обсуждения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11 **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В ДЕКОРАТИВНОМ** **РАСТЕНИЕВОДСТВЕ (КРУГЛЫЙ СТОЛ)**

Вопросы для обсуждения

1. Оздоровление посадочного материала декоративных культур (на выбор).
2. Производство и применение биоинсектицидов (на выбор).
3. Производство и применение биофунгицидов (на выбор).
4. Производство и применение энтомофагов (на выбор).
5. Производство и применение биоудобрений (на выбор).
6. Технология вермикультуры.
7. Получение здорового семенного материала при помощи методов биотехнологии.
8. Производство и применение биологических препаратов в защите растений (открытый и закрытый грунт)

9. Бактериальные энтомопатогенные препараты
10. Грибные энтомопатогенные препараты
11. Вирусные энтомопатогенные препараты
12. Производство и применение биоудобрений (биогумус, ЭМ-препараты)
13. Тема по выбору студента.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №12 *РУБЕЖНЫЙ КОНТРОЛЬ*

Теоретические вопросы

1. Значение клонального микроразмножения растений
2. Получение безвирусного посадочного материала
3. Методы клонального микроразмножения
4. Области применения клонального микроразмножения
5. Этапы клонального микроразмножения
6. Иммуноферментный анализ: значение, области применения в растениеводстве.
7. ПЦР-анализ: значение, области применения в растениеводстве
8. Применение методов биотехнологии в декоративном растениеводстве
9. Биологические удобрения
10. Биопрепараты для защиты растений

Практико-ориентированные задания

1. Иммуноферментный анализ: этапы проведения анализа
2. ПЦР –анализ: этапы проведения анализа
3. Описать технологию получения биологических удобрений.
4. Описать технологию получения азотных биоудобрений.
5. Описать технологию получения биологических препаратов (бактериальных, грибных, вирусных).

5. 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.

6. 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 «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.
3. Азарова О.П., Чачина С.Б. Основы биотехнологии: методические указания. – Омск, 2008. – 44 с.
4. 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).
5. 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).

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

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

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

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

10. 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).

11. Калинин Ф.Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992.

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

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

14. 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.

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

16. 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).

17. 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.

18. 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.).

19. 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.

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

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

22. 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.

23. Биотехнология (периодическое издание).

24. Генетика (периодическое издание).

25. Защита и карантин растений (периодическое издание).

26. Сельскохозяйственная биология (периодическое издание).

7. 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 «Лань»:** Чернодубов, А. И. Биотехнология в лесных культурах : учебное пособие / А. И. Чернодубов. — Воронеж : ВГЛТУ, 2014. — 26 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/64140>
3. **ЭБС «Znanium»:** Основы микробиологии и экологической биотехнологии: Учебное пособие / Б.С. Ксенофонтов. - М.: ИД ФОРУМ: НИЦ ИНФРА-М, 2015. - 224 с. — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/482844>
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. **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.
6. **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.
7. **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.
8. 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).
9. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для студентов вузов по специальности "Биология". - 4-е изд., стер. - М. : Академия, 2008. - 208 с.
10. 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.).
11. Сельскохозяйственная биология (периодическое издание).
12. Международная реферативная база данных SCOPUS. <http://www.scopus.com/>
13. 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.

14. **ЭБ «Труды ученых СтГАУ»:** Сельскохозяйственная биотехнология [электронный полный текст] : учеб.-метод. пособие по выполнению лабораторно-практ. работ для сту-

дентов 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] , 1974-2020 -. - Режим доступа <http://www.vniisb.ru/ru/> - свободный, загл. с экрана.
3. Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии [Электронный ресурс] , 1970-2020 -. - Режим доступа <http://niilgis.ucoz.ru/> свободный, загл. с экрана.
4. Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства (ВСТИСП) [Электронный ресурс] , 2020 - . - Режим доступа <https://vstisp.org/vstisp/>, свободный. Заглавие с экрана.
5. Интернет –портал по биотехнологии [Электронный ресурс] , 2011-2020 -. - 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] , 2020 - . - Режим доступа <http://www.kniish.ru/kniish22.html> , свободный, загл. с экрана.
8. Отдел биотехнологии Никитского ботанического сада [Электронный ресурс] , 2020 - . - 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] , 2020 - . - 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] , 2020 - . - 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-бензиламинопури

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

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.

Гиббереллины – фитогормоны (ГК₃ и др.), активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян.

ГК – гибберелловая кислота

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

Дифференциация – комплекс процессов, приводящих к различиям между клетками.

Дифференцировка – состояние специализации клеток, отличающее их от других.

ИУК – β-индолилуксусная кислота

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

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

Меристема – образовательная ткань с мелкими, активно делящимися клетками.

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*.

НУК – α-нафтилуксусная кислота

Пролиферация – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

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

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.

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

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.

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.

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

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