

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Волхонов Михаил Станиславович

Должность: Ректор

Дата подписания: 14.02.2025 17:12:25

Уникальный программный ключ:

40a6db1879d6a9ee29ec8e0ffb2f95e4614a0998

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ  
ФГБОУ ВО КОСТРОМСКАЯ ГСХА

Кафедра агрохимии, биологии и защиты растений

# БИОТЕХНОЛОГИЯ САДОВЫХ КУЛЬТУР

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

*Для контактной и самостоятельной работы  
студентов, обучающихся по направлению подготовки  
35.03.05 Садоводство,  
очной формы обучения*

КАРАВАЕВО  
Костромская ГСХА  
2024

УДК 581.1 (07)

ББК 44

Б 63

*Составитель:* канд. с.-х. наук, доцент кафедры агрохимии, биологии и защиты растений Костромской ГСХА А.А. Панкратова.

*Рецензент:* канд. с.-х. наук, доцент, доцент кафедры земледелия, растениеводства и селекции Костромской ГСХА А.Н. Сорокин.

*Рекомендовано методической комиссией факультета агробизнеса в качестве учебного пособия для контактной и самостоятельной работы студентов, обучающихся по направлению подготовки 35.03.05 Садоводство, очной формы обучения*

Б 63    **Биотехнология садовых культур** : учебное пособие / сост. А.А. Панкратова. — Караваево : Костромская ГСХА, 2024. — 65 с. ; 20 см. — 50 экз. — Текст непосредственный.

В издании приведены краткий обзор теоретического материала, содержание и методики выполнения лабораторных работ по клеточной биотехнологии и биоинженерии, задания для самостоятельной работы, словарь терминов, вопросы для промежуточного итогового контроля знаний студентов.

Пособие предназначено для студентов направления подготовки 35.03.05 Садоводство очной формы обучения.

УДК 581.1 (07)

ББК 44

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Тема 1.</b> Организация лаборатории биотехнологии, приборы, их назначение и режим работы. Техника безопасности.	
Способы стерилизации в биотехнологии.....	7
Контрольные вопросы к теме 1 .....	14
<b>Тема 2.</b> Приготовление исходных маточных растворов и питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений .....	15
Контрольные вопросы к теме 2 .....	20
<b>Вопросы к семинару по темам 1, 2 .....</b>	<b>20</b>
<b>Тема 3.</b> Техника введения в культуру <i>in vitro</i> . Культура каллусной ткани .....	21
Контрольные вопросы к теме 3 .....	30
<b>Тема 4.</b> Культивирование изолированных зародышей (эмбриокультура) .....	31
Контрольные вопросы к теме 4 .....	34
<b>Вопросы к семинару по темам 3, 4 .....</b>	<b>34</b>
<b>Тема 5.</b> Клональное микроразмножение растений. Производство оздоровленного посадочного материала садовых культур.....	35
Контрольные вопросы к теме 5 .....	43
<b>Тема 6.</b> Иммуноферментный анализ (ИФА) оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур .....	43
Контрольные вопросы к теме 6 .....	47
<b>Вопросы к семинару по темам 5, 6 .....</b>	<b>47</b>
<b>Тема 7.</b> Вторичная дифференцировка и морфогенез в культуре каллусных тканей. Получение растений-регенерантов .....	48
Контрольные вопросы к теме 7 .....	52
<b>Тема 8.</b> Адаптация стерильных растений к почвенным условиям выращивания <i>ex vitro</i> .....	52
Контрольные вопросы к теме 8 .....	54
<b>Вопросы к семинару по темам 7, 8 .....</b>	<b>54</b>
<b>Самостоятельная работа студента.....</b>	<b>56</b>
Приложения .....	57
Используемая литература .....	58
Словарь терминов.....	60

## **ВВЕДЕНИЕ**

На основе биотехнологии и биоинженерии разрабатываются новейшие высокоэффективные технологии сохранения и расширения биоразнообразия на Земле; производства продовольственных товаров, препаратов пищевого, медицинского, природоохранного и других назначений. Научной основой биотехнологии являются принципы биохимии и микробиологии, клеточной и молекулярной биологии, генетики и селекции. Клеточная и тканевая биотехнология, а также генетическая инженерия растений – перспективные направления размножения, сохранения и увеличения генетического разнообразия растений.

**Биотехнология** — это наука о генно-инженерных, клеточных методах, технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Благодаря возможностям биотехнологии можно существенно интенсифицировать производство, повысить эффективность использования природных ресурсов, создавать новые источники энергии, решать проблемы, связанные с восполнением дефицита белка. Особая роль отводится биотехнологии и биоинженерии в решении проблемы повышения эффективности и устойчивости сельскохозяйственного производства, что является важнейшим фактором для обеспечения продовольственной безопасности страны. Поэтому изучение теоретических основ и практическое освоение биотехнологических методов интенсификации агропромышленного производства являются крайне важными и необходимыми условиями в подготовке современных специалистов сельского хозяйства.

Все направления исследований основаны на культивировании живых клеток, тканей, органов растительных организмов в условиях *in vitro*.

Спецкурс «Биотехнология садовых культур» предназначен для студентов факультета агробизнеса 3 курса очной формы обучения, обучающихся по направлению бакалавриат.

После изучения дисциплины студенты должны:

– знать: генетические основы биотехнологии в садоводстве; основные методы, применяемые в биотехнологии — культура клеток, тканей, пыльцы, протопластов, клеточная селекция, генная инженерия; задачи, направления и проблемы биотехнологии применительно к современным потребностям, наиболее значимые проекты биотехнологии в садоводстве, научные и правовые основы обеспечения биобезопасности в биотехнологии, биоинженерии и использовании трансгенных растений.

– уметь: подобрать исходный материал растений, вводить растительный материал в культуру *in vitro*, применять схемы получения генетически новых растительных форм из различных органов растений, подбирать и составлять питательные среды на разных этапах культивирования, составлять селекционно-генетические программы с использованием методов биотехнологии.

**Цель курса** — ознакомление с теоретическими положениями и практическими результатами в биотехнологии растений, связанными с получением форм с новыми или улучшенными признаками.

Основная задача дисциплины — формирование у студентов представлений о биотехнологии в садоводстве как новой отрасли биологической науки, овладение знаниями основных методов.

**Цель учебного пособия** — подробно ознакомить студентов с конкретными объектами и методами клеточной биотехнологии и биоинженерии растений, привить им навыки работы в лаборатории биотехнологии. При подборе объектов исследований основное внимание было уделено растениям, используемым в садоводстве.

В настоящем учебном пособии приведены краткий обзор теоретического материала, содержание и методики выполнения лабораторных работ по клеточной биотехнологии и биоинженерии, задания для самостоятельной работы, словарь терминов, вопросы для промежуточного итогового контроля знаний студентов.

Использование данного пособия не исключает подготовку к занятиям по другой учебной литературе.

***Требования к отчету по лабораторным работам.*** Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить в тетрадь тему, цель, перечень использованных в лабораторной работе материалов и оборудования, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, таблиц или в графическом виде (при необходимости зарисовывать результат).

# **ТЕМА 1. ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ, ПРИБОРЫ, ИХ НАЗНАЧЕНИЕ И РЕЖИМ РАБОТЫ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

## **Работа 1. ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРИИ БИОТЕХНОЛОГИИ, ПРИБОРЫ, ИХ НАЗНАЧЕНИЕ И РЕЖИМ РАБОТЫ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ.**

**Цель работы:** ознакомиться с основными подразделениями лаборатории, приборами, оборудованием и условиями их использования в работе биотехнологической лаборатории.

### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

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

Лаборатория должна иметь следующие помещения:

1. *Моечная* — отдельное помещение или совмещенное с автоклавной и помещением для приготовления питательных сред, хранения лабораторной посуды, химических реагентов. Помещение должно отвечать требованиям, предъявляемым к помещениям для установки сосудов, работающих под давлением. Должен быть предусмотрен подвод холодной и горячей воды, установлена глубокая мойка для мытья посуды, подвод силовой линии 220/380 В и контур заземления, оборудована приточно-вытяжная вентиляция и канализационный слив для отвода конденсата из автоклава. В этой комнате устанавливаются следующие приборы: автоклав вертикальный ВК-75; сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды — до 100...130°C, для инструментов — до 170°C; ёмкость с дистиллированной водой; электроплитки; весы аналитические; pH-метр для установления кислотности питательной среды.

Из оборудования в комнате находятся: шкафы остекленные для лабораторной посуды; шкафы для хранения химических реагентов; холодильники для хранения маточных растворов солей, фитогормонов и витаминов; столы для приготовления питательных сред.

Из приборов и материалов, необходимых для проведения работ в лаборатории имеются: посуда химическая мерная от 5 мл до 2 л (колбы, стаканы, цилиндры); пипетки и микропипетки от 0,01 до 50 мл; пинцеты; скальпели; ножницы; ножи; бритвенные лезвия; препарировальные иглы; бумага (оберточная, пергаментная, фильтровальная); фольга алюминиевая; вата; марля; шпагат; шпатели разные; пробирки химические ПХ 0 14 мм; пробирки биологические ПБ 0 21 мм.

2. *Стерильный бокс (операционная)* — изолированное помещение для операций в стерильных условиях. В этом помещении устанавливаются: пылезащитные камеры (ламинар - боксы); облучатели ультрафиолетовые; лампы кварцевые; микроскопы стереоскопические; шкафы остекленные для материалов и оборудования. В ламинар-боксе проводятся стерилизация растительного материала, микрочеренкования, вычленение эксплантов и меристем растений, стерильные пересадки растений. Ламинар-боксы оснащены ультрафиолетовыми лампами, которые можно включать на ночь для стерилизации внутренней поверхности. Рабочая зона «операционной» должна иметь подводку силовой линии электроснабжения, а также контур заземления.

3. *Культуральная комната in vitro (световая)*— помещение для инкубации культур в контролируемых условиях. В помещении устанавливают систему модульных стеллажей с трубчатыми люминесцентными лампами типа ЛДЦ-80 (ЛДЦ-40) или светодиодными лампами типа LED-T8-M-PRO, LED-T8-P-PRO, режим освещения со спектром близким к дневному свету поддерживается на уровне 5000-8000 Лк. Реле времени регулирует световой период. Световая комната имеет подводку силовой линии и контур заземления. Для поддержания заданной температуры 18-27°C используется кондиционер, относительная влажность воздуха 70%.

4. *Адаптационная комната* — предназначена для адаптации микрорастений к почвенным или гидропонным условиям выращивания. Ее оборудуют стеллажами для ящиков (горшочеков) с грунтом или гидропонными установками. Если адаптацию проводят в течение всего года, то необходимо

обеспечить дополнительное освещение растениям с режимом 5000-8000 Лк. Данное помещение оснащают горячей и холодной водой и выделяют место для пересадки растений из условий *in vitro* в *ex vitro*.

**5. Раздевалка** необходима для смены одежды и обуви.

Все помещения должны соответствовать определенным требованиям для обеспечения удобства в работе и обеспечения техники безопасности.

**Общие положения техники безопасности при работе в лаборатории биотехнологии**

*При работе в лаборатории возможны следующие виды опасности:* пожар, термический ожог, химический ожог, взрыв, поражение электротоком, травмирование осколками стеклянной посуды.

***Правила техники безопасности:***

1. К выполнению работ в лаборатории могут приступать только студенты, сотрудники, прошедшие инструктаж по технике безопасности, что обязательно фиксируется в специальном журнале.

2. Студенты, сотрудники должны проводить исследования только в белом халате, чтобы избежать порчи одежды химическими реактивами.

3. Для соблюдения стерильности при работе в стерильном боксе (операционной) студентам и сотрудникам необходимо надевать чистый белый халат, стерильные медицинские шапочки, маску, бахилы, перчатки.

4. Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, тишину и порядок. Посторонним лицам запрещено посещать сотрудников, работающих в лаборатории в стерильных условиях, во время экспериментов, отвлекать их.

5. Рабочее место следует держать в чистоте. Нельзя нагромождать его посудой, бумагой и ненужным материалом.

6. При нагревании жидкостей и твердых тел в пробирках либо в колбах нельзя направлять отверстие сосуда на себя или соседей.

7. Категорически запрещено пробовать какие-либо вещества на вкус. Запах вещества следует определять на расстоянии от себя.

8. При взвешивании запрещено насыпать химические вещества непосредственно на чашку весов.

9. Всю посуду после работы с минеральными кислотами, щелочами, ядовитыми веществами следует сразу же тщательно вымыть.

10. При обращении со стеклянной химической посудой и приборами необходимо соблюдать меры предосторожности. Стеклянную посуду следует держать осторожно, не сжимая ее сильно пальцами. Мыть посуду ершами или стеклянной палочкой надо аккуратно, так как ими легко пробить дно или стенки стеклянной посуды, что может привести к порезам.

11. Выливать в раковины остатки стерилизующих веществ (особенно диацид), отработанные питательные среды строго запрещено.

12. Работать в ламинар-боксе при включенной ультрафиолетовой лампе строго запрещено.

13. При работе с трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или маской.

14. Спиртовую горелку следует держать в чистоте, заправлять спиртом вдали от открытых источников огня, не допускать сильного нагревания резервуара; нельзя оставлять зажженную спиртовку без присмотра.

15. Нагревание растворов и питательных сред необходимо проводить в стеклянной посуде на асbestosвой сетке; нагревание на открытом огне допускается только при использовании специальной посуды, например колбы Кельдаля.

16. Запас спирта и других летучих жидкостей в лаборатории должен быть небольшим, необходимым для текущей работы. Хранить спирт следует в изолированном отделении шкафа, удаленном от источников огня и снабженным плотно закрывающейся дверцей, покрытой войлоком или асбестом и обитой поверху кровельным железом.

17. Основной запас эфира хранят в холодной комнате, и лишь небольшое количество, необходимое для работы, - в лаборатории, в местах, удаленных от источника огня.

18. При попадании кислоты (хромпика) на кожу нужно немедленно ее смыть водой и обработать пораженные участки тела мыльным раствором.

19. Если щелочь попала на руки или другие открытые части тела, следует немедленно смыть ее водой; остатки щелочи необходимо нейтрализовать небольшим количеством буфера для нейтрализации.

20. Лаборатория должна быть оснащена медицинской аптечкой для оказания первой помощи пострадавшему.

21. Работать с автоклавом и дистиллятором следует только по инструкции и при наличии специального разрешения (допуска).

22. При возникновении пожара следует немедленно отключить электричество, отключить электроприборы, засыпать песком или накрыть одеялом очаг возгорания. Большое пламя тушат с помощью огнетушителя.

23. Если на ком-либо загорелась одежда, пострадавшего следует облить водой или немедленно положить на пол и накрыть одеялом. Одеяло не снимают, пока пламя не погаснет.

24. О сильном пожаре следует немедленно сообщить дежурному пожарной охраны.

25. По окончании работы необходимо рабочее место привести в порядок, проверить, выключены ли электрические приборы, вода в лаборатории.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал наглядно ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории, оборудованием, принципом его работы и техникой безопасности при работе в лаборатории.

**Задание 2.** Результаты работы законспектировать в лабораторной тетради.

### **Ход работы № 1**

1. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории.
2. Под руководством преподавателя ознакомиться с принципом работы автоклава, сушильных шкафов, дистиллятора.

### ***Работа 2. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ***

**Цель работы:** ознакомиться с существующими способами стерилизации в лаборатории биотехнологии.

## **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

### **Создание асептических условий для проведения работ с культурой клеток и тканей**

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных органов, клеток и тканей растений *in vitro* является соблюдение строгой стерильности (создание асептических условий), поскольку на искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, что является крайне нежелательным.

Во-первых, в результате их жизнедеятельности, может существенно измениться состав питательных сред.

Во-вторых, изолированные органы растений легко повреждаются микроорганизмами, в результате чего подавляется их рост в условиях *in vitro*.

Поэтому все опыты проводят в стерильных помещениях — ламинар-боксах. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат, шапочку, маску, на руки — хирургические перчатки, дополнительно обрабатывая их 96% спиртом. Стерилизуют бокс, инструменты, посуду, растительный материал, питательный среды, ватные пробки и др. материалы.

### ***Методы стерилизации.***

**Стерилизация ламинар-бокса.** Стерильный бокс и ламинар-бокс стерилизуются ультрафиолетовым облучением с помощью бактерицидных ламп 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 двухатомный кислород воздуха становится трехатомным озоном — газом, токсичным для человека. Для достижения максимальной стерильности перед обработкой УФ все поверхности тщательно отмываются моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ. Внутренняя поверхность

ламинар-бокса, спиртовку, лупу, пробирки или колбы перед началом работы стерилизуется 70% спиртом.

*Стерилизация посуды.* Химическую посуду, предварительно вымытую моющим средством (детергентом), трижды прополосканную дистиллированной водой, просушенную стерилизуют в сушильном шкафу при 160°C в течение 2 часов.

*Стерилизация инструментов.* Инструменты (скальпели, пинцеты, иглы) стерилизуются вместе с химической посудой в термостате при 160°C в течение 2 часов. Непосредственно перед работой и во время работы инструменты еще раз стерилизуют в ламинар-боксе, помещая их в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом, обжигая на пламени спиртовки. **Во время проведения работы инструменты нельзя класть на стол, на бумажный матрасик, нельзя касаться руками непосредственно простерилизованной части инструмента.**

*Стерилизация материалов.* Материалы (вату, марлю, бумажные матрасики, ватные пробки, халаты, косынки) стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. в течение 20 — 30 минут.

*Стерилизация питательных сред.* Питательные среды, разлитые в стерильную посуду, закрывают крышками с ватно-марлевыми пробками и, стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C и под давлением 1 атм. в течение 20 минут.

*Стерилизация растительного материала.* Для стерилизации растительных материалов (семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растений) применяют растворы: 0,1%-ного диацида, 13 - 20%-ного пероксида водорода, 10%-ного хлорамина, 8%-ного гипохлорита натрия или кальция. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, снимают кожуру, кроющие листья, промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена на 1 - 2 мин) в 70% этиловый спирт. Затем растительные объекты многократно прополаскивают в дистиллированной воде.

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, левомицетин, каномицин и другие препараты.

*Холодная стерилизация.* Органические жидкости, неподдающиеся тепловой обработке, фитогормоны освобождают от бактериальной инфекции путем пропускания их через стерильные мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал наглядно ознакомиться со способами создания асептических условий в помещениях лаборатории и стерилизации оборудования, посуды, инструментов, питательных сред, растительного материала.

**Задание 2.** Результаты работы законспектировать в лабораторной тетради.

**Материалы и оборудование.** Химические стаканы (50, 100, 250 мл), стеклянные банки, пробирки, моющие средства (стиральный порошок), ерши, емкость с дистиллированной водой.

### **Ход работы № 2**

Под руководством преподавателя провести стерилизацию химической посуды.

1. Химическую посуду тщательно отмыть в растворах детергентов (стиральный порошок), промыть 8 - 10 раз проточной водой, затем дважды ополоснуть дистиллированной водой.

2. Чистую подсушеннную посуду поместить в сушильный шкаф на 2 часа для стерилизации при температуре 100 - 130°C.

### ***Контрольные вопросы к теме 1***

- 1) Перечислить основные подразделения лаборатории биотехнологии и указать их назначение.
- 2) Перечислить основные приборы лаборатории биотехнологии и указать их назначение.

3) Перечислить основные положения техники безопасности при работе в лаборатории биотехнологии.

4) Указать существующие способы стерилизации в биотехнологии.

5) Что означает создать асептические условия в лаборатории биотехнологии?

## **ТЕМА 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНЫХ МАТОЧНЫХ РАСТВОРОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ**

### **Работа 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНЫХ МАТОЧНЫХ РАСТВОРОВ.**

**Цель работы:** ознакомиться с составом маточных растворов, методикой их приготовления, хранения и использования.

#### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

Любая питательная среда для выращивания культуры изолированных клеток и тканей растений включает в свой состав следующие группы веществ: *макроэлементы* (N, P, K, Ca, S, Mg, Fe); *микроэлементы* (B, Zn, Cu, Mn, I, Mo); а также *витамины*, *углеводы*, *фитогормоны* или их синтетические аналоги; *агар* (в случае выращивания на твердой питательной среде); *дистиллированную воду*. Некоторые питательные среды включают аминокислоты, гидролизат казеина. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) или ее натриевая соль (*трилон Б*), которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах pH.

Основой для всех питательных сред для культивирования растительных эксплантов является смесь минеральных солей. Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора — в виде фосфатов; серы — в виде сульфатов; а также растворимых солей  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ . Железо используется в виде  $[FeO_4]$  или  $Fe_2O_4 + \text{ЭДТА}$  (этилендиаминтетраацетат) или ее натриевая соль  $Na$  ЭДТА (*трилон Б*) — наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями и хелатов Fe.

Азот, фосфор, сера входят в состав органических соединений: белков, жиров, нуклеиновых кислот. Железо, цинк, марганец, молибден, кобальт участвуют в работе пигментов фотосинтеза (хлорофилла) и каротиноидов,

окислительно-восстановительных ферментов (катализы, пероксидазы, полифенолоксидазы). Следовательно, все эти элементы выполняют в клетках и тканях структурную и катализическую функцию. В то же время ионы  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Cl^-$ ,  $H^+$  необходимы для регуляции pH среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления, полярности).

*Углеводы* как источник энергии — незаменимые компоненты питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, т.к. в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. В качестве источника углеводов используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 2 - 4% (20 — 40 мг/л среды). Полисахариды в питательных средах практически не используются.

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют компоненты биологических катализаторов — *витамины* группы В:  $B_1$  (тиамин),  $B_6$  (пиридоксин),  $B_{12}$ ,  $C$  (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит (витаминоподобное соединение).

Для управления процессами формообразования в культуре тканей необходимы биологические регуляторы роста и развития — *фитогормоны*. Эти вещества влияют на дифференциацию и дедифференциацию (см. словарь терминов) клеток и тканей, инициируют гистогенез, индуцируют деление и растяжение клеток, участвуют в процессах старения и созревания, либо стимулируют, либо ингибируют рост и развитие клеточных культур, обуславливают формирование пола. В биотехнологических исследованиях чаще используют синтетические гормоны, стимулирующие рост и развитие: ауксины, цитокинины, гиббереллины.

В качестве источников *цитокининов* в питательных средах используют: 6-фурфуриламинопурин (кинетин), 6-бензиламинопурин (6-БАП), 2-изопентениладенин (2ip), зеатин.

В качестве источников *ауксинов* в питательных средах используют: 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д),  $\beta$ -индолил-3-уксусную кислоту

(ИУК), индолил-3-масляную кислоту (ИМК),  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК).

Кроме веществ ауксинового и цитокининового механизма действия в отдельные питательные среды включают *гиббереллины* - гибберелловую кислоту (ГК), которая стимулирует рост изолированной ткани.

Для индукции первичного каллуса и роста клеток в качестве биологических добавок в состав питательной среды добавляют растительные экстракты, например, кокосовое молоко (жидкий эндосперм кокосового ореха), вытяжки из незрелых зерновок кукурузы (лучше в период молочной спелости), которые содержат цитокинины — кинетин и зеатин (6-ти замещенные аминопурины) и NN-дифенилмочевину в концентрации 10 - 15% от общего объёма среды.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар — полисахарид, получаемый из морских водорослей, который образует с водой гель при pH 5,6 - 6,0. Концентрация агара в питательной среде составляет 0,7%.

С целью экономии времени растворы макро- и микросолей, витаминов и фитогормонов готовят более концентрированными, что дает возможность их многократно использовать.

Концентрированные маточные растворы хранят в специальных условиях: макро- и микросоли в холодильнике в сосудах с притертymi пробками при 0...+4°C; витамины, фитогормоны, ферменты, растительные экстракты — при - 20°C в небольших по 5 - 10 мл сосудах с пробками (пеницилловые флаконы).

Для культивирования клеток, тканей и органов растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяются среды Мурасиге-Скуга (МС) (*см. приложение 1*), Уайта, Гамборга.

### **Порядок приготовления маточных растворов**

Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10 — 40 раз, их готовят на дистиллированной воде. Каждую из макросолей растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, а затем сливают и объем доводят до 1 литра, причем раствор MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O вливают

последним без нагревания в охлажденную смесь, что предотвращает выпадение осадка. Соль  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  готовят и хранят отдельно. Хелат железа (раствор  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) готовят при нагревании и хранят отдельно.

Маточные растворы микросолей превосходят рабочие по концентрации в 100 - 1000 раз, витаминов в 1000 раз. Каждую соль микроэлементов также растворяют отдельно и сливают в общий стаканчик, а объем доводят до 100 мл. Полученные растворы макро- и микроэлементов сливают в колбы с притертой пробкой (хелат железа — в темную колбу), наклеивают этикетку с указанием наименования раствора и даты его приготовления и, помещают в холодильник.

Для приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10-кратные навески и растворяют их (каждый витамин в отдельности) в 10 мл воды; 1 мл содержит концентрацию витамина необходимую для приготовления 1 л питательной среды МС. Хранят растворы витаминов во флаконах из-под пеницилла в замороженном состоянии.

Фитогормоны плохо растворяются в воде, поэтому их растворы готовят следующим образом: берут 10 мг вещества ауксины (2,4-Д, ИУК, НУК) растворяют в 0,5 — 2,0 мл этанола, цитокинины (кинетин, зеатин, БАП, 2ip) — в небольшом количестве 0,5Н HCL или KOH, абсцизовую кислоту (АБК) — в 70% этаноле. Затем растворы подогревают (кроме АБК) и доливают водой до объема 100 мл (1 мл раствора содержит 1 мг фитогормона). В холодильнике их можно хранить при температуре + 4<sup>0</sup>C не больше 1 месяца. На основе маточных растворов готовят питательную среду МС, которая будет использована в дальнейших работах.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал ознакомиться с методикой приготовления маточных растворов.

**Задание 2.** Результаты работы законспектировать в лабораторной тетради.

## **Работа 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.**

**Цель работы:** ознакомиться с составом питательной среды Мурасиге и Скуга (МС), методикой её приготовления, хранения и использования.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал совместно с преподавателем выполнить лабораторную работу № 2.

**Задание 2.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради.

**Материалы и оборудование.** Химические стаканы, колбы, мерные цилиндры от 5 мл до 2 л, пробирки, банки, пипетки от 0,01 мл до 10 мл или дозаторы, весы аналитические до 500 г, весы торсионные до 100 мг, пинцеты, ножницы, шпатели, электроплитки, химические реактивы или готовые маточные растворы макро- и микросолей, витаминов, фитогормонов.

### **Ход работы № 2**

1. В химический стакан емкостью 1,0 л поместить 30 г сахарозы, долить дистиллированной водой до 400 мл и растворить.
2. Добавить к раствору сахарозы 50 мл маточного раствора макросолей, 1 мл раствора микросолей, 5 мл хелата железа, 5 мл хлористого кальция.
3. Добавить к полученному раствору необходимое количество витаминов: В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, С, РР и фитогормонов (в зависимости от вида питательной среды).
4. Приготовить агар: навеску 7 г заранее поместить в колбу емкостью 1,5 л и залить дистиллированной водой до 200 мл для набухания, затем растворить, нагревая на плитке или газовой горелке, при постоянном помешивании до полного растворения. В готовый агар влить приготовленные растворы солей.
5. Питательную среду довести до нужного объема (1 л) дистиллированной водой. Измерить pH среды: если pH превышает 5,5 - 6,0 добавить несколько капель 0,1% HCl, если ниже этого значения — 0,1% KOH или NaOH.
6. Готовую питательную среду разлить в пробирки или банки на 1/3 объема, закрыть пробирки ватными пробками или алюминиевой фольгой, банки крышками.
7. Поместить пробирки в металлические штативы или завернуть по 10 шт. в плотную оберточную бумагу, перевязав бечевкой (для того, чтобы в автоклаве пробирки не упали и не открылись пробки).

8. Штативы с пробирками или банки с питательной средой установить в металлические биксы, затем плотно зафиксировать крышку каждого бикса.

9. Поместить биксы в автоклав для стерилизации в течение 20 минут под давлением 1 атм.

### ***Контрольные вопросы к теме 2***

- 1) Указать состав маточных растворов и методику их приготовления.
- 2) Указать состав питательных сред и методику их приготовления.
- 3) Указать какое назначение имеют компоненты входящие в состав маточных растворов?
- 4) Указать какое назначение имеют компоненты входящие в состав питательных сред?
- 5) Указать основные принципы соблюдения стерильности при приготовлении питательных сред.

### **ВОПРОСЫ К СЕМИНАРУ ПО ТЕМАМ 1, 2**

#### **«БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК НАУКА И ОТРАСЛЬ ПРОИЗВОДСТВА. ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРИИ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНЫХ МАТОЧНЫХ РАСТВОРОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ»**

1. Пояснить в чем заключается значение биотехнологии как науки и отрасли производства?
2. Указать краткую историю развития биотехнологии.
3. Указать каковы сущность и задачи современной биотехнологии?
4. Пояснить каково значение биотехнологии в садоводстве?
5. Пояснить, каким образом устроена биотехнологическая лаборатория?
6. Указать каково значение биотехнологии в пищевой промышленности?
7. Указать каково значение биотехнологии в биоэнергетике?
8. Перечислить правила техники безопасности при работе в лаборатории.
9. Указать каково значение методов биотехнологии в защите растений, переработке и хранении растительной продукции?

10. Указать каково значение биотехнологических методов в решении проблемы утилизации сельскохозяйственных отходов, защиты окружающей среды?
11. Перечислить существующие методы стерилизации инструментов.
12. Перечислить меры безопасности при работе в ламинар-боксе.
13. Перечислить меры безопасности при работе с автоклавом.
14. Пояснить каково назначение питательных сред, значение входящих в их состав компонентов?
15. Перечислить методы стерилизации лабораторной посуды.
16. Указать какие существуют способы создания асептических условий в лаборатории?
17. Перечислить методы стерилизации растительного материала.
18. Перечислить основные этапы приготовления маточных растворов.
19. Перечислить основные этапы приготовления питательных сред.
20. ***Повторить самостоятельно материал по теме*** — «Теоретические основы молекулярной биологии».

### **ТЕМА 3. ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ**

#### ***Работа 1. ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ЭКСПЛАНТОВ КОМНАТНЫХ РАСТЕНИЙ.***

**Цель работы:** научиться проводить стерилизацию растительного материала (частей, фрагментов комнатных растений) с последующим выделением (растительных эксплантов) с целью получения продолжительно растущей каллусной ткани или выращивания из нее асептического растения.

#### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

Введение в культуру *in vitro* возможно из любых частей растительного организма (частей стеблей, листьев, корней, корнеплодов, луковиц, семян). Стерильные растительные экспланты, стерильные проростки культур выращивают в условиях *in vitro* с целью получения эксплантов *in vitro* для

введения в каллусную или опухолевую культуру и для работы с меристематическими тканями с последующим выращиванием целого асептического растения.

Впервые культура каллусной ткани (*см. словарь терминов*) из корнеплодов моркови была получена французским ученым Готре в 1932 г. эта ткань, благодаря пассированию (пересадке) ее на свежую питательную среду, продолжала расти неопределенное долгое время, не утрачивая способность к делению. Образование каллусной ткани происходит в области первичных или вторичных меристем, а также из паренхимы, прилегающей к этим меристемам.

Процесс каллусогенеза зависит от размера первичного экспланта. Чем он крупнее, тем разнообразнее набор клеток, что обуславливает более сложные отношения между основной тканью и клетками, дающими начало каллусообразованию. Первичный эксплант обычно имеет размер 5 — 10 мм<sup>3</sup> и массу 20 — 100 мг.

Образование и рост каллусной ткани контролируется фитогормонами из группы ауксинов и цитокининов. Под действием ауксинов происходит дедифференцировка, а под действием цитокининов — интенсивное деление, в результате которого образуется ткань. Каллусную ткань можно получать из разных частей растений: стеблей, корней, тканей клубня, листьев, зародышей, гипокотилей, семядолей и др.

Для получения стерильных проростков предварительно стерилизованные семена выкладывают в чашки Петри на стерильную фильтрованную бумагу, смоченную дистиллированной водой или непосредственно на питательную среду. Для получения каллусной ткани растительные фрагменты (органы) культур помещают на агаризованную питательную среду, оставляют на 2 — 3 дня для проращивания в климатической камере.

### **Стерилизация растительного материала**

Перед стерилизацией ткани растения тщательно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, у корней и корнеплодов снимают кожуру, затем промывают

дистиллированной водой. Семена перед стерилизацией промывают в мыльном растворе, затем в сите теплой проточной водой, помещают в марлевые мешочки, в которые кладут этикетки с номером с указанием сорта и генотипа. После этого все операции по стерилизации растительных объектов проводят в стерильном боксе.

Их опускают на несколько секунд в 96%-й этиловый спирт. Обработка тканей этанолом повышает эффект основного стерилизующего раствора. Затем растительные образцы помещают в стерилизующий раствор, после чего многократно прополоскивают в стерильной дистиллированной воде. Время стерилизации зависит от экспланта и от степени активности раствора (табл. 1).

**Таблица 1 — Продолжительность стерилизации исходного растительного материала (по Р.Г. Бутенко, 1999), минут**

Объект	Диацид 0,1%-ный	Гипохлорид Na 5...9%-ный	Пероксид водорода 12%-ный
Семена сухие набухшие	15...20 6...10	15...20 10...15	12...15 6...8
Ткани мясистого корня клубня одревесневшего стебля	20...30 20...40	15...20 20...25	- -
Листья	1...3	3...6	3...5
Апексы	1...10	3...15	2...7

**ПРИМЕЧАНИЕ:**

*диацид* - раствор этанолмеркурхлорида и цетилипиридиния хлорида;

*гипохлорит натрия* — клеточный яд, остатки вещества сначала удаляют 0,01н HCl, а затем 8 раз промывают автоклавированной дистиллированной водой;

*пероксид водорода* — легче всего отмывается со стерилизуемых объектов.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить на практике методику стерилизации растительного материала, технику вычленения и введения эксплантов в культуру *in vitro*.

**Задание 2.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Заполнить таблицу (см. таблица 2) с указанием растительного объекта, вводимого в культуру, стерилизующего агента, его

концентрации и экспозиции (*примечание: в таблицу войдут результаты следующих 2 лабораторных работ*). Зарисовать в лабораторной тетради схему процесса стерилизации растительных объектов. Обозначить этапы процесса стерилизации. Через 2 — 3 недели отметить активность образования каллуса.

**Материалы и оборудование.** Органы растений, фрагменты органов или тканей комнатных растений; пробирки или банки с агаризованной питательной средой; колба на 500 мл со стерильной дистиллированной водой; стерильные инструменты (пинцет и скальпели); стерилизующий раствор; фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом; 70%-й этиловый спирт; 3 стерильных химических стакана емкостью 0,5 л, химический стакан емкостью 1 л; стерильные бумажные матрасики; спиртовка; спички; вата для стерилизации рук и поверхности стола ламинар-бокса.

### **Ход работы № 1**

1. Органы или фрагменты тканей органов комнатных растений отмыть щеткой с мылом в теплой проточной воде.
2. Промыть дистиллированной водой. Поместить в стаканы с дистиллированной водой и перенести в стерильный операционный бокс.
3. В операционном боксе перед началом работы обработать руки и рабочую поверхность стола ламинар-бокса ватой, смоченной в 70%-м этиловом спирте.
4. Подготовить инструменты - стерильный скальпель и пинцет поместить в фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом и установить на столе ламинар-бокса в отдалении от спиртовки. Зажечь спиртовку.
5. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью его погрузить растительные фрагменты на 10 сек. в 96%-й этиловый спирт, затем, в стерилизующий раствор с рекомендуемой экспозицией согласно таблице 1.
6. Растительные фрагменты промыть в 3 — 5 объемах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушить.

7. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки, с помощью его вынуть стерильные фрагменты из стаканов и перенести на стерильные бумажные матрасики.

8. Стерильный скальпель обжечь на пламени спиртовки. С помощью скальпеля из простерилизованных частей растений вырезать экспланты, сделать на них надсечки в нескольких местах для появления в дальнейшем раневого каллуса.

9. Стерильный пинцет обжечь над пламенем спиртовки. Надсеченные экспланты разместить на поверхности агаровой питательной среды МС, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой.

10. Горлышко пробирки или банки с высаженными эксплантами предварительно обжечь на пламени спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.

11. Маркером на пробирке или банке указать дату и шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной среды.

12. Разместить в климатической культуральной комнате с температурным режимом 26<sup>0</sup>С и влажностью 70% при освещенности 8000 — 10000 Лк.

Каллус сформируется через 2 - 3 недели культивирования эксплантов.

**Таблица 2 — Методы стерилизации семян и растительных эксплантов**

Метод стерилизации	Стерилизующее вещество	Концентрация %/мл	Экспозиция сек./мин.	Цель
<i>Растительные органы, фрагменты комнатных растений</i>				
Предстерилизация				
Стерилизация				
Постстерилизация				
<i>Части корнеплодов, клубнеплодов, луковиц растений</i>				
Предстерилизация				
Стерилизация				
Постстерилизация				
<i>Семена сухие, набухшие</i>				
Предстерилизация				
Стерилизация				
Постстерилизация				

**ПРИМЕЧАНИЕ:**

*Предстерилизация* — условия обработки варьируют в зависимости от объекта. Растительные органы и ткани промывают водопроводной водой и помещают в спирт. Собственно стерилизация — предварительно простерилзованные органы и ткани помещают в стерилизующий раствор. Постстерилизация — отмывание объекта от стерилизующего раствора порциями дистиллята.

## ***Работа 2. ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO ЭКСПЛАНТОВ МЯСИСТЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ: КОРНЕПЛОДОВ, ЛУКОВИЦ***

**Цель работы:** научиться проводить стерилизацию «грубого, мясистого» растительного материала (частей, фрагментов корнеплодов, луковиц) с последующим выделением (растительных эксплантов) с целью получения продолжительно растущей каллусной ткани или выращивания из нее асептического растения.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить на практике методику стерилизации растительного материала, технику вычленения и введения эксплантов в культуру *in vitro*.

**Задание 2.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Продолжить заполнение таблицы (*см. таблица 2*) с указанием растительного объекта, вводимого в культуру, стерилизующего агента, его концентрации и экспозиции. Зарисовать в лабораторной тетради схему процесса стерилизации растительных объектов. Обозначить этапы процесса стерилизации.

**Материалы и оборудование.** Корнеплоды моркови, луковицы цветочных растений; пробирки или банки с агаризованной питательной средой; колба на 500 мл со стерильной дистиллированной водой; стерильные инструменты (пинцет и скальпели); стерилизующий раствор; фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом; 70%-й этиловый спирт; 3 стерильных химических стакана емкостью 0,5 л, химический стакан емкостью 1 л; стерильные бумажные матрасики; спиртовка; спички; вата для стерилизации рук и поверхности стола ламинар-бокса.

### **Ход работы № 2**

1. Корнеплоды моркови, луковицы тюльпанов, нарциссов, гладиолусов отмыть щеткой с мылом в теплой проточной воде. У корнеплодов снять кожуру.

2. Разрезать корнеплоды на фрагменты толщиной 0,5 см, луковицы разделить на отдельные чешуи.

3. Промыть дистиллированной водой. Поместить в стаканы с дистиллированной водой и перенести в стерильный операционный бокс.

4. В операционном боксе перед началом работы обработать руки и рабочую поверхность стола ламинар-бокса ватой, смоченной в 70%-м этиловом спирте.

5. Подготовить инструменты - стерильный скальпель и пинцет поместить в фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом и установить на столе ламинар-бокса в отдалении от спиртовки. Зажечь спиртовку.

6. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью его погрузить растительные фрагменты на 5 минут в 96%-й этиловый спирт, затем, в стерилизующий раствор с рекомендуемой экспозицией согласно таблице 1.

7. Растительные фрагменты промыть в 3 — 5 объемах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушить.

8. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки, с помощью его вынуть стерильные фрагменты из стаканов и перенести на стерильные бумажные матрасики.

9. Стерильный скальпель обжечь на пламени спиртовки. С помощью скальпеля из простерилизованных частей растений вырезать экспланты размером не более 0,5 см в диаметре и 0,1 — 0,2 см толщиной, сохраняя ориентацию к сердцевинной части у корнеплодов и к донцу у луковиц, сделать на них надсечки в нескольких местах для появления в дальнейшем раневого каллуса. Эксплант корнеплода должен содержать ксилемную, флоэмную паренхиму и камбий.

10. Стерильный пинцет обжечь над пламенем спиртовки. Надсеченные экспланты разместить на поверхности агаровой питательной среды МС, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой.

11. Горлышко пробирки или банки с высаженными эксплантами предварительно обжечь на пламени спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.

12. Маркером на пробирке или банке указать дату и шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной среды.

13. Разместить в климатической культуральной комнате с температурным режимом 26<sup>0</sup>С и влажностью 70% при освещенности 8000 — 10000 Лк.

Каллус сформируется через 3 недели культивирования.

### ***Работа 3. ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO СЕМЯН. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОРОСТКОВ.***

***Цель работы:*** научиться проводить стерилизацию семян культурных растений с целью получения стерильных проростков.

***Задание 1.*** Используя представленный теоретический материал освоить на практике методику стерилизации семенного материала и выращивания проростков iv vitro различных культур.

***Задание 2.*** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Продолжить заполнение таблицы (см. таблица 2) с указанием растительного объекта, вводимого в культуру, стерилизующего агента, его концентрации и экспозиции. Зарисовать в лабораторной тетради схему процесса стерилизации растительных объектов. Обозначить этапы процесса стерилизации. Через 1 — 2 недели отметить активность прорастания семян, роста растений.

**Материалы и оборудование.** Семена культурных растений (на выбор преподавателя или по желанию студента); пробирки или банки с агаризованной питательной средой; колба на 500 мл со стерильной дистиллированной водой; стерильные инструменты (пинцет и скальпели); стерильные марлевые

мешочки; стерилизующий раствор; фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом; 70%-й этиловый спирт; 3 стерильных химических стакана емкостью 0,5 л, химический стакан емкостью 1 л; стерильные чашки Петри; спиртовка; спички; вата для стерилизации рук и поверхности стола ламинар-бокса.

### **Ход работы № 3**

1. Отобрать 10 семян культуры (мелкосемянные культуры можно больше), поместить семена в марлевые мешочки (мелкие семена в пластиковые биологические пробирки с крышкой), мешочки перевязать ниткой, прикрепить этикетку. Все последующие операции по стерилизации мелких семян выполнять непосредственно в пластиковых пробирках.
2. Тщательно промыть семена в мыльном растворе с последующей отмыvkой водопроводной водой.
3. Промыть дистиллированной водой. Поместить мешочки с семенами в стаканы с дистиллированной водой и перенести в стерильный операционный бокс.
4. В операционном боксе перед началом работы обработать руки и рабочую поверхность стола в ламинар-боксе ватой, смоченной в 70%-м этиловом спирте.
5. Подготовить инструменты - стерильный скальпель и пинцет поместить в фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом и установить на столе ламинар-бокса в отдалении от спиртовки. Зажечь спиртовку.
6. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью его погрузить мешочки с семенами на 1 — 3 минуты (в зависимости от размера и сухости семян) в 96%-й этиловый спирт, затем, в стерилизующий раствор с рекомендуемой экспозицией согласно таблице 1. Спирт и стерилизующий раствор в пробирку с мелкими семенами добавлять и оттягивать с помощью шприца.
7. Семена промыть в 3 — 5 объемах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушить.

8. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки, с помощью его вынуть мешочки с семенами из стаканов и перенести на стерильные чашки Петри.

9. С помощью стерильных хирургических игл в отдельной стерильной чашке Петри снять с крупных семян оболочку.

10. Стерильный пинцет обжечь над пламенем спиртовки. С помощью его разложить стерильные семена в стерильные пробирки или банки с питательной среды МС, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой.

11. Горлышко пробирки или банки с высаженными семенами предварительно обжечь на пламени спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.

12. Маркером на пробирке или банке указать дату и шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной среды.

13. Разместить в климатической культуральной комнате с температурным режимом 26<sup>0</sup>С и влажностью 70% при освещенности 8000 –10000 Лк для прорастания.

### ***Контрольные вопросы к теме 3***

1) Пояснить, в чем заключается методика стерилизации растительного материала?

2) Пояснить, от чего зависит время проведения стерилизации растительного материала?

3) Пояснить, что означает термин «введение в культуру *in vitro*»?

4) Перечислить какие части растений являются пригодными для введения в культуру *in vitro*?

5) Указать в чем отличие между методами предстерилизации, стерилизации и постстерилизации растительного материала?

6) Пояснить, что собой представляет каллусная ткань и каковы способы ее культивирования?

7) Указать, что собой представляют стерильные проростки, способы их получения?

8) Перечислить этапы введения в культуру *in vitro* растительного материала.

## **ТЕМА 4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ (ЭМБРИОКУЛЬТУРА)**

### **Работа 1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР.**

**Цель работы:** научиться вычленять и культивировать зародыши (эмбриокультура).

#### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации возникает после оплодотворения. Часто при этом образуются невсхожие семена. Причиной может быть расхождение во времени развития зародыша и эндосперма. Из-за слабого развития эндосперма зародыш часто неспособен к нормальному прорастанию. В таких случаях из зрелой зерновки изолируют зародыш и выращивают его в питательной среде. Выращивание зародышей в искусственной питательной среде называется эмбриокультурой.

Применение эмбриокультуры в селекции приобретает в последнее время большое значение для получения отдаленных межвидовых и межродовых гибридов: плодовых, зерновых, злаковых, овощных культур.

Культура изолированных зародышей как вспомогательный метод при отдаленной гибридизации применяется не только для преодоления постгамной несовместимости, но также с целью микроразмножения ценных гибридов. В этом случае микроразмножение идет путем каллусогенеза, индукции морфогенеза и получения растений - регенерантов из каллусной ткани.

Техника клонирования незрелых зародышей позволяет размножать ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одна возможность применения культуры зародышей — использование ее в клеточной селекции.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить на практике методику изолирования зародышей из с последующей культивацией в условиях *in vitro*.

**Задание 2.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Заполнить таблицу 1. Зарисовать в лабораторной тетради схематично этапы вычленения зародышей. Обозначить этапы работы. Через 1 — 2 недели отметить активность роста изолированных зародышей.

**Материалы и оборудование.** Набухшие семена (предварительно замоченные в воде на 24 часа); пробирки или банки с агаризованной питательной средой МС; колба на 500 мл со стерильной дистиллированной водой; стерильные инструменты (пинцет, скальпели, хирургические иглы); стерильные чашки Петри; стерильные марлевые мешочки; стерилизующий раствор; фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом; 70%-й этиловый спирт; 3 стерильных химических стакана емкостью 0,5 л, химический стакан емкостью 1 л; стерильные бумажные матрасики; спиртовка; спички; вата для стерилизации рук и поверхности стола ламинар-бокса.

### **Ход работы № 1**

1. За 24 часа до проведения лабораторной работы отобранные семена тщательно промыть в мыльном растворе с последующей отмыvkой водопроводной водой.

2. Поместить семена в чистые чашки Петри на фильтровальную бумагу, обильно смочив дистиллированной водой. Поставить в термостат для набухания.

3. Поместить набухшие семена в марлевые мешочки, перевязав ниткой. Все последующие операции по стерилизации выполняются в стерильном операционном боксе.

4. В операционном боксе перед началом работы обработать руки и рабочую поверхность стола в ламинар-боксе ватой, смоченной в 70%-м этиловом спирте.

5. Подготовить инструменты - стерильный скальпель, пинцет, хирургические иглы поместить в фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом и установить на столе ламинар-бокса в отдалении от спиртовки. Зажечь спиртовку.

6. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью его погрузить мешочки с семенами на 10 - 15 минут в 96%-й этиловый спирт, затем, в стерилизующий раствор с рекомендуемой экспозицией согласно таблице 1 (*см. тему № 3*).

7. Семена промыть в 3 - 5 объемах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушить.

8. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки, с помощью его вынуть мешочки с семенами из стаканов и перенести на стерильные чашки Петри, развязать мешочки.

9. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки, с помощью его разместить семена на стерильном бумажном матрасике.

10. Стерильную хирургическую иглу и скальпель обжечь над пламенем спиртовки. Придерживая семя хирургической иглой, скальпелем провести надрез оболочки семени вокруг зародыша.

11. Две хирургические иглы обжечь над пламенем спиртовки. Придерживая семя хирургической иглой, с помощью боковой части другой иглы надавить на зародыш (на границе с эндоспермом) и вычленить его.

12. С помощью стерильной иглы поместить вычлененный зародыш в стерильные пробирки или банки с питательной среды МС щитком вниз, чуть вдавливая их (но, не заглубляя) при этом для усиления контакта со средой.

13. Горлышко пробирки или банки с высаженными зародышами обжечь над пламенем спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.

14. Маркером на пробирке или банке указать шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной среды.

15. Разместить в климатической культуральной комнате с температурным режимом 26<sup>0</sup>С и влажностью 70% при освещенности 8000-10000 Лк для прорастания.

**Таблица 1 — Результаты культивирования изолированных зародышей**

Растительный объект	Количество высаженных зародышей, шт.		Регенерировано растений	
	высажено	выжило	шт.	%

***Контрольные вопросы к теме 4***

- 1) Указать, что означает термин «эмбриокультура»?
- 2) Перечислить назначение и применение эмбриокультуры.
- 3) Перечислить этапы введения в эмбриокультуру.
- 4) Указать какой растительный объект применяется для получения эмбриокультуры и каким будет конечный результат?
- 5) Перечислить для каких видов растений применяется метод эмбриокультуры?

**ВОПРОСЫ К СЕМИНАРУ ПО ТЕМАМ 3, 4**

**«КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ»**

1. Пояснить в чем заключается значение клеточной и тканевой биотехнологии в растениеводстве?
2. Пояснить в чем заключается значение биотехнологии в селекции растений?
3. Указать, в чем заключается преимущество селекции с использованием генетической инженерии, по сравнению с традиционной, при получении новых сортов и гибридов?
4. Перечислить основные методы селекции *in vitro*.
5. Перечислить вспомогательные методы селекции *in vitro*.
6. Перечислить биотехнологические методы, применяемые для ускорения селекционного процесса.

7. Пояснить, что означает термин «сусpenзионные культуры», каковы особенности их применения?
8. Поянить в чем заключается суть культивирования изолированных протопластов?
9. Поянить в чем заключается суть культивирования отдельных клеток?
10. Пояснить в чем заключается суть клеточной инженерии?
11. Пояснить в чем заключается суть генетической инженерии?
12. Указать факторы, влияющие на способность эксплантов к регенерации.
13. Пояснить в чем заключается преодоление программной несовместимости?
14. Пояснить, что означает культура изолированных семяпочек и зародышей — преодоление постгамной несовместимости?
15. Перечислить этапы культивирования незрелых зародышей в условиях *in vitro*.
16. Пояснить, что означает термин «каллусная культура», указать способы культивирования каллусных тканей?
17. Указать способы получения каллусной ткани и возможные нежелательные явления.
18. Пояснить каким образом происходит морфогенез в каллусных тканях?
19. Пояснить какими генетическими особенностями обладают каллусные клетки.
20. Указать каковы причины генетической неоднородности каллусных клеток?
21. Пояснить, что понимают под андрогенезом и гиногенезом?
22. Пояснить, что представляют собой опухолевые и «привыкшие» ткани?
23. Указать основные компоненты питательных сред, наиболее часто используемых для каллусогенеза и различных типов морфогенеза.

**ТЕМА 5. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ.  
ПРОИЗВОДСТВО ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА  
САДОВЫХ КУЛЬТУР**

## **Работа 1. ИЗОЛИРОВАНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ.**

**Цель работы:** научиться изолировать и культивировать апикальные меристемы земляники садовой.

### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

Меристематические ткани апексов и пазушных почек органов растений используют для получения генетически однородного, безвирусного посадочного материала любой культуры, а также получения неограниченного количества мериклонов, идентичных исходному генотипу. Метод основан на том, что активно делящиеся клетки конуса нарастания, расположенного на верхушке побега диаметром 0,1 мм и длиной около 0,25 — 0,3 мм, не содержат вирусов, в отличие от дифференцированных клеток растения, входящих в состав более крупных по размеру апексов. Меристема представляет собой образовательную ткань с активно делящимися клетками, состоящую из конуса нарастания и одного-двух листовых зачатков — примордиев, свободную от вирусной и бактериальной инфекции. Чтобы получить чистые от инфекции клоны, предварительно применяют химиотерапию (добавление в питательную среду противовирусных препаратов), и термотерапию (использование сухого горячего воздуха) исходных растений, от которых впоследствии будут взяты меристемы. Безвирусные растения, выращенные из апикальных меристем, размножают и высаживают в теплицу для получения взрослых плодоносящих растений.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить на практике методику изолирования и культивирования апикальных меристем в условиях *in vitro*.

**Задание 2.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Заполнить таблицу 1. Зарисовать в лабораторной тетради схему процесса вычленения апикальной меристемы. Через неделю отметить активность образования побегов земляники.

**Материалы и оборудование.** Розетки (столоны) земляники садовой; стерильные пробирки или банки с питательной средой МС; бинокулярная лупа; стерильные инструменты (пинцет, скальпели, хирургические иглы); фарфоровый стаканчик с 96%-й этиловым спиртом; стерильные бумажные матрасики, стерильные чашки Петри; спиртовка; спички; 70%-й этиловый спирт; вата для стерилизации рук и поверхности стола ламинар-бокса.

### **Ход работы № 1**

1. Столоны земляники тщательно промыть в мыльном растворе с последующей отмыvkой водопроводной водой.
2. Срезать все листья и выделить скальпелем или ножом пазушные почки, находящиеся у основания листьев столонов земляники.
3. Промыть почки дистиллированной водой. Поместить в стаканы с дистиллированной водой и перенести в стерильный операционный бокс.
4. В операционном боксе перед началом работы обработать руки, рабочую поверхность стола ламинар-бокса и бинокулярную лупу ватой, смоченной в 70%-м этиловом спирте.
5. Подготовить инструменты - стерильный скальпель и пинцет поместить в фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом и установить на столе ламинар-бокса в отдалении от спиртовки. Зажечь спиртовку.
6. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью его погрузить почки на 2 минуты в 96%-й этиловый спирт, затем, в стерилизующий раствор с рекомендуемой экспозицией согласно таблице 1 (см. тему № 3). Почки промыть в 3 — 5 объемах стерильной дистиллированной воды.
7. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки, с помощью его вынуть стерильные почки из стаканов и перенести на стерильные бумажные матрасики для подсушки.
8. Вычленение меристемы проводят под бинокулярной лупой при десятикратном увеличении.
9. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью пинцета поместить почку на чашку Петри под бинокулярную лупу.

10. Стерильный скальпель и хирургическую иглу обжечь на пламени спиртовки. С помощью скальпеля и иглы простерилизованные почки освободить от многочисленных листовых чешуек; затем, придерживая почку иглой, скальпелем вычленить меристематический купол размером не более 0,25 мм с одним-двумя листовыми примордиями.

11. Вычлененную меристему перенести на скальпеле в пробирку или банку с агаризованной питательной средой МС.

12. Горлышко пробирки или банки с высаженными эксплантами предварительно обжечь на пламени спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.

13. Маркером на пробирке или банке указать дату и шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной среды.

14. Разместить в климатической культуральной комнате с температурным режимом 23 — 25°C, влажностью воздуха 70%, при освещенности 5000 — 10000 Лк.

Через 1 неделю культивирования описать побеги, развившиеся из меристем, по полученным результатам заполнить таблицу 1.

**Таблица 1 — Результат культивирования апикальных меристем**

Объект	Количество меристем, %		Регенерация побегов	
	высажено	выжило	шт.	%

## **Работа 2. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ КУЛЬТУР.**

**Цель работы:** научиться черенковать стерильные растения-регенеранты *in vitro*.

### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

Под *микроклональным размножением* растений понимают массовое бесполое (вегетативное) размножение растений из различных органов и тканей на искусственных питательных средах в условиях *in vitro*, получаемые в результате чего формы генетически идентичны исходному материалу. Этот

метод размножения растений имеет следующие преимущества перед традиционными способами:

В основе микроразмножения лежит использование уникальной способности растительной клетки реализовать под влиянием экспериментальных воздействий присущую ей totipotентность (*см. словарь терминов*).

Этот метод имеет ряд чрезвычайно важных преимуществ:

- 1) за короткий срок возможно получение огромного количества однородного посадочного материала (коэффициент микроразмножения  $10^5$ - $10^7$  растений в год);
- 2) ускоряется селекционный процесс, сроки получения товарной продукции новых сортов уменьшаются до 2 - 3 лет вместо 10 - 12;
- 3) происходит освобождение тканей от патогенных микроорганизмов и вирусов, т.е. получение безвирусных растений за счет использования меристемной культуры;
- 4) растения, получаемые в культуре тканей, генетически однородны;
- 5) возможно поддержание роста растений круглый год с экономией площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- 6) при выращивании растений с длительной ювенильной фазой можно добиться ускоренного перехода к репродуктивной фазе развития;
- 7) удается размножать растения, которые размножаются с трудом или совсем не размножаются вегетативно, а также трудноукореняемые растения (розы, орхидеи, орехоплодные и хвойные растения);
- 8) пробирочные растения легко транспортировать на любые расстояния.

Указанные преимущества метода клonalного размножения настолько велики, что в ближайшее время следует ожидать рентабельных биотехнологий получения этим способом посадочного материала новых ценных сортов растений. За последнее десятилетие технология микроклонального размножения стала коммерческим производством. Наибольшее распространение микроклональное размножение получило при

культивировании декоративных и тропических растений, а для картофеля, аспарагуса, земляники, некоторых подвоев яблони и персика оно начинает заменять традиционные способы размножения и селекции.

Процесс клonalного микроразмножения включает в себя 4 этапа:

- 1) выбор растения-донора и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- 2) собственно микроразмножение;
- 3) укоренение микропобегов и при необходимости их депонирование при пониженных температурах;
- 4) адаптация пробирочных растений к почвенным условиям теплицы или открытого грунта.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить на практике методику черенкования растений-регенерантов *in vitro* земляники садовой, ежевики, малины, малинно-ежевичного гибрида, подвоя яблони.

**Задание 2.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Заполнить таблицу 2. Зарисовать в лабораторной тетради схему процесса микроклонального размножения. Через неделю отметить активность роста растений-регенерантов *in vitro*.

**Материалы и оборудование.** Стерильные растения-регенеранты земляники садовой, ежевики, малины, малинно-ежевичного гибрида, подвоя яблони; стерильные пробирки или банки с питательной средой МС; стерильные инструменты (пинцет и скальпели); фарфоровый стаканчик с 96%-й этиловым спиртом; стерильные бумажные матрасики; спиртовка; спички; 70%-й этиловый спирт; вата для стерилизации рук и поверхности стола ламинар-бокса.

### **Ход работы № 2**

1. Микроразмножение проводят в ламинар-боксе, предварительно простерилизовав руки и рабочую поверхность стола ламинар-бокса ватой, смоченной в 70%-м этиловом спирте.

2. Подготовить инструменты - стерильные скальпели и пинцет поместить в фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом и установить на столе ламинар-бокса в отдалении от спиртовки. Зажечь спиртовку.

3. Прежде чем извлечь растение, горлышко пробирки или банки, стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки.

4. С помощью пинцета вынуть растения из пробирки или банки и поместить на стерильный бумажный матрасик.

5. Стерильные скальпели обжечь на пламени спиртовки, с их помощью растения разделить (разрезать) — конгломерат микропобегов земляники — на отдельные микrorозетки; конгломерат ежевики, малины, малинно-ежевичного гибрида, подвоя яблони — на отдельные растения.

6. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью пинцета перенести расчлененные растения в пробирки или банки с питательной средой МС по 1 растению в пробирку и по 7 - 10 растений на банку.

7. Горлышко пробирки или банки с высаженными растениями предварительно обжечь на пламени спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.

8. Маркером на пробирке или банке указать дату и шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной среды.

9. Разместить в климатической культуральной комнате с температурным режимом 23 — 25°C, влажностью воздуха 70%, при освещенности 5000 — 10000 Лк.

Развитие побегов расчлененных растений отмечается через 7 и 14 дней.

**Таблица 2 — Результат культивирования растений-регенерантов *in vitro***

Объект	Количество растений, %		Регенерация побегов	
	высажено	выжило	шт.	%

### **Работа 3. ИНДУКЦИЯ КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ САДОВЫХ КУЛЬТУР.**

**Цель работы:** ознакомится с методикой укоренения стерильных растений-регенерантов *in vitro*.

### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

Для стимуляции корнеобразования производят непосредственное культивирование микропобегов в течение 3 - 4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (0,5 - 2 мг/л). Установлено, что ризогенная активность индолил-3-масляной кислоты (ИМК) и нафтилуксусной (НУК) кислот, синтетических аналогов ауксина значительно превышает то же действие природного фитогормона — индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Затенение нижней части культуральных сосудов плотной черной материей или добавление в питательную среду активированного угля способствует укоренению микропобегов.

Некоторые исследователи с целью повышения процента укореняемости и коэффициента размножения растений *in vitro* проводят испытания нетрадиционных регуляторов роста.

### **Теоретическое описание методики укоренения *in vitro*.**

1. Укоренение стерильных растений *in vitro* проводят в ламинар-боксе, предварительно простерилизовав руки и внутреннюю поверхность ламинар-бокса 70%-м этиловым спиртом.
2. Прежде чем извлечь растение, горлышко банки и пинцет обжечь на пламени спиртовки.
3. Растение вынимают с помощью стерильного пинцета из пробирки или банки и переносят в пробирку или банку с питательной средой МС, предназначенной для образования корневой системы.
4. Горлышко пробирки или банки с высаженными растениями предварительно обжечь на пламени спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.
6. Маркером на пробирке или банке указать дату и шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной среды.

7. Разместить в климатической культуральной комнате, где поддерживается 16 часовой фотопериод, температурный режим 23 — 25°C, влажность воздуха 70%, освещенность 5000 — 10000 Лк.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить методику укоренения растений-регенерантов *in vitro* земляники садовой, ежевики, малины, малинно-ежевичного гибрида, подвоя яблони.

**Задание 2.** Законспектировать в лабораторной тетради методику укоренения растений-регенерантов *in vitro*.

### **Контрольные вопросы к теме 5**

- 1) Указать, что означает термин микроклональное размножение растений?
- 2) Перечислить преимущества данного метода размножения.
- 3) Перечислить этапы микроклонального размножения растений.
- 4) Указать, что означает методика изолирования и культивирования апикальных меристем в условиях *in vitro*?
- 5) Перечислить этапы вычленения апикальной меристы растений.
- 6) Указать, в чем заключается отличие микроклонального размножения разных видов растений?
- 7) Указать, что означает термин «индукция корнеобразования»?

## **ТЕМА 6. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА) ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ПЛОДОВО- ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР**

### **Работа 1. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА) ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР.**

**Цель работы:** научиться проводить иммуноферментный анализ (ИФА) оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур.

#### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

Вирусы являются опаснейшими патогенами садовых культур. Среди них особое место занимают механически переносимые вирусы, т.е. вирусы, которые можно перенести механической инокуляцией сока на другие виды растений.

Наиболее эффективными и высокопроизводительными методами иммунодиагностики вирусов садовых растений являются: ПЦР-диагностика (полимеразная цепная реакция) — это высокоточный метод диагностики растений для выявления поражения инфекциями (фитопатогенами) и иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий выявить вирусные частицы в концентрации всего 1 — 100 нг/мл.

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: фосфатазой и пероксидазой. В присутствии вируса на поверхности платы образуется комплекс антиген-антитело-фермент. Если материал стерileн, комплексы не образуются, а остатки фермента отмываются буфером. После всех описанных выше манипуляций в лунки платы добавляют субстрат, на котором работает фермент (для фосфатазы 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.

Оценку результатов ИФА проводят с помощью фотометра при длине волны 490 нм с остановкой реакции серной кислотой или без остановки реакции при длине волны 450 нм, а при отсутствии фотометра — визуально.

Оптическое поглощение для положительных проб должно минимум в три раза превышать поглощение для отрицательных проб:

$$P=3X, \text{ где}$$

P — порог достоверности положительных результатов,

X — значение  $A_{490(450)}$  для отрицательных контролей.

Практический опыт показывает, что зараженные образцы имеют  $A_{490}$  или  $A_{450}$  превышающие 0,30, а здоровые — не превышающие 0,15. Образцы, имеющие  $A_{490}$  или  $A_{450}$  в интервале 0,15 — 0,30 необходимо проанализировать повторно.

При визуальной оценке результатов используют следующую шкалу:

- нет окраски «-» — вирус отсутствует,
- светло-коричневая окраска «+» — среднее заражение вирусом,
- ярко-коричневая окраска «++» — высокая степень заражения вирусом.

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

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить на практике методику проведения иммуноферментной диагностики оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур.

**Задание 2.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради, написать вывод о качестве посадочного материала.

**Материалы и оборудование.** Полистероловые платы, растительные образцы *in vitro*, вальцы, биологические пробирки, сыворотки, растворы ферментов, кровь млекопитающих, буферный раствор, центрифуга, растительный материал.

### **Ход работы № 1**

1. Растительный материал растереть на вальцах, собрать выделившийся растительный сок в пластиковые биологические пробирки.

2. В центрифуге провести гомогенизацию растительного сока.

3. Нанесение антител: налить по 0,1 мл рабочего раствора антител в лунки платы, накрыть плату крышкой и инкубировать в течение ночи при +4°C или 2 часа при +37°C в термостате.

4. Промывка: удалить раствор из платы. Заполнить лунки дистиллированной водой с детергентом и через 15 - 30 сек. удалить ее. Повторить промывку дистиллированной водой с детергентом дважды. В третий раз заполнить лунки промывочным буфером и через 15 - 30 сек. удалить его. Излишек влаги удаляется легкими ударами перевернутой платы по листу фильтровальной бумаги.

5. Нанесение анализируемых образцов (сока растений).

Внести в лунки платы анализируемые образцы, а также положительный и отрицательный контроли в объеме 0,1 мл. Накрыть плату крышкой и инкубировать в течение ночи при +4°C. Следует помнить, что объем вносимого в лунки образца не должен превышать 0,1 мл во избежание появления неспецифической реакции.

6. Повторная промывка (см. п. 2).

7. Нанесение конъюгата: налить по 0,1 мл рабочего раствора конъюгата в лунки платы, накрыть плату крышкой и инкубировать 1 час при +37°C. Следует помнить, что превышение объема, вносимого в лунки конъюгата, может привести к неспецифической реакции.

8. Промывка (см. п. 2). Промывку после конъюгата следует проводить 3 раза дистиллированной водой с детергентом и один раз промывочным буфером.

9. Проведение ферментативной реакции: налить по 0,1 мл свежеприготовленного раствора субстрата в лунки и инкубировать для развития окраски при комнатной температуре в течение 20-40 минут при использовании «быстрого» субстрата и 40-60 минут при использовании

«медленного» субстрата, после чего реакцию следует остановить добавлением в каждую лунку 0,05 мл 3 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

10. Протестировать изменение окраски в лунках платы по шкале.

11. Отобрать образцы без вирусов, со слабой степенью заражения и с сильным заражением вирусом.

### ***Контрольные вопросы к теме 6***

1) Указать для чего применяются экспресс-диагностики анализа и оценки оздоровленного растительного материала?

2) Пояснить в чем заключается принцип ПЦР-диагностики (полимеразной цепной реакции)?

3) Пояснить в чем заключается принцип метода ИФА?

4) Перечислить какие растительные объекты используются для проведения ИФА?

5) Пояснить, что показывает образующийся комплекс антиген-антитело-фермент?

6) Указать каким образом, возможно провести оценку результатов ИФА?

### **ВОПРОСЫ К СЕМИНАРУ ПО ТЕМАМ 5, 6**

#### ***«КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ. ПОЛУЧЕНИЕ ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР, МЕТОДЫ ЕГО ОЦЕНКИ»***

1. Пояснить в чем заключается значение метода культуры изолированных меристем в системе получения оздоровленного посадочного материала?

2. Назвать основные компоненты питательных сред, наиболее часто используемых для клонального микроразмножения.

3. Перечислить используемые методы биотехнологии в оздоровлении посадочного материала.

4. Перечислить физические факторы, влияющие на процесс микроклонального размножения.

5. Перечислить достоинства и недостатки клонального микроразмножения растений.

6. Указать условия культивирования растений-регенерантов.
7. Перечислить и охарактеризовать основные этапы клonalного микроразмножения.
8. Пояснить в чем заключается выбор и подготовка экспланта для культивирования на питательной среде.
9. Перечислить и охарактеризовать основные технологические процессы на этапе «введение в стерильную культуру».
10. Перечислить и охарактеризовать основные технологические процессы на этапе «собственно микроразмножение».
11. Пояснить, что означает метод индукции возникновения адвентивных почек непосредственно на экспланте?
12. Перечислить и охарактеризовать основные технологические процессы на этапе «укоренение в пробирках».
13. Перечислить и охарактеризовать основные технологические процессы на этапе «адаптация к нестерильным условиям».
14. Указать какие Вы знаете экспресс-диагностики анализа и оценки оздоровленного материала?
15. Пояснить в чем заключается принцип метода ИФА?

## **ТЕМА 7. ВТОРИЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ. ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ**

**Работа 1. ИНДУКЦИЯ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ.**

**Цель работы:** научиться выращивать эмбриоды из каллусной ткани моркови, цветочных растений.

### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

В каллусной ткани моркови при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л 6-БАП, индуцируется образование почек или эмбриоидов. Через 2...3 недели в каллусах развиваются зеленые почки или эмбриоиды размером 0,5...2,0 мм. Их образованию предшествует возникновение на светлой

поверхности каллусной ткани зеленых очагов, которые появляются через несколько дней после пересадки. Почки или эмбриоиды могут развиваться одновременно на одном каллусе.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить методику пересадки каллусной ткани, выращивания эмбриоидов или зеленых почек из каллусной ткани моркови и цветочных культур.

**Задание 2.** Предварительно охарактеризовать и зарисовать сформировавшуюся каллусную ткань растений.

**Задание 3.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Зарисовать в лабораторной тетради схему процесса пересадки каллусной ткани.

**Материалы и оборудование.** Культура каллусной ткани цветочных растений; стерильные пробирки или банки с питательной средой МС; стерильные инструменты (пинцет и скальпели); фарфоровый стаканчик с 96%-й этиловым спиртом; стерильные бумажные матрасики; спиртовка; спички; 70%-й этиловый спирт; вата для стерилизации рук и поверхности стола ламинар-бокса.

### **Ход работы № 1**

1. Пересадку каллусной ткани проводят в ламинар-боксе, предварительно простерилизовав руки и рабочую поверхность стола ламинар-бокса ватой, смоченной в 70%-м этиловом спирте.

2. Подготовить инструменты - стерильные скальпели и пинцет поместить в фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом и установить на столе ламинар-бокса в отдалении от спиртовки. Зажечь спиртовку.

3. Прежде чем извлечь каллус, горлышко пробирки или банки, стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки.

4. С помощью пинцета вынуть каллус из пробирки или банки и поместить на стерильный бумажный матрасик.

5. Стерильные скальпели обжечь на пламени спиртовки, с их помощью каллус разделить на кусочки размером 5×5 мм.

6. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью пинцета перенести кусочки каллуса в пробирки или банки с питательной средой МС.

7. Горлышко пробирки или банки с высаженным каллусом предварительно обжечь на пламени спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.

8. Маркером на пробирке или банке указать дату и шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной среды.

9. Разместить в климатической культуральной комнате с температурным режимом 23 — 25°C, влажностью воздуха 70%, при освещенности 5000 — 10000 Лк.

## ***Работа 2. ИНДУКЦИЯ СТЕБЛЕВОГО ОРГАНОГЕНЕЗА В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ. ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ.***

***Цель работы:*** научиться выращивать из эмбриодов каллусной ткани растения-регенеранты цветочных растений.

### ***КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.***

Для получения растений-регенерантов сформировавшиеся зародыши стеблей и эмбриоидов помещают на среду без гормонов, где через 2...3 недели формируются растения. Иногда может наблюдаться нарушение нормального развития растений (образование каллусной ткани, преобладание корня или побега, утолщение различных органов). В этом случае материал следует пересаживать на среду без гормонов и с уменьшенной вдвое концентрацией всех входящих в нее компонентов. Срок, необходимый для прохождения всех стадий процесса регенерации растений из тканевых культур (глобулярную, сердечка, торпетовидную, соматического зародыша), составляет около 2 месяцев.

***Задание 1.*** Используя представленный теоретический материал освоить методику пересадки зеленых почек (эмбриоидов) цветочных культур.

***Задание 2.*** Предварительно охарактеризовать и зарисовать сформировавшиеся эмбриоды растений.

**Задание 3.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Зарисовать в лабораторной тетради схему процесса пересадки эмбриодов для последующего выращивания растений-регенерантов.

**Материалы и оборудование.** Культура сформировавшихся почек или эмбриоидов цветочных культур; стерильные пробирки или банки с питательной средой МС; стерильные инструменты (пинцет и скальпели); фарфоровый стаканчик с 96%-й этиловым спиртом; стерильные бумажные матрасики; спиртовка; спички; 70%-й этиловый спирт; вата для стерилизации рук и поверхности стола ламинар-бокса.

### **Ход работы № 2**

1. Пересадку эмбриодов проводят в ламинар-боксе, предварительно простерилизовав руки и рабочую поверхность стола ламинар-бокса ватой, смоченной в 70%-м этиловом спирте.
2. Подготовить инструменты - стерильные скальпели и пинцет поместить в фарфоровый стакан с 96%-й этиловым спиртом и установить на столе ламинар-бокса в отдалении от спиртовки. Зажечь спиртовку.
3. Прежде чем извлечь конгломерат почек, горлышко пробирки или банки, стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки.
4. С помощью пинцета вынуть почки из пробирки или банки и поместить на стерильный бумажный матрасик.
5. Стерильные скальпели обжечь на пламени спиртовки, с их помощью почки отделить друг от друга.
6. Стерильный пинцет обжечь на пламени спиртовки. С помощью пинцета перенести почки в пробирки или банки с питательной средой МС.
7. Горлышко пробирки или банки с высаженным каллусом предварительно обжечь на пламени спиртовки и закрыть крышкой, ватной пробкой или замотать пищевой пленкой.
8. Маркером на пробирке или банке указать дату и шифр, который включает в себя наименование культуры, сорта, варианта питательной варианта

питательной среды.

9. Разместить в климатической культуральной комнате с температурным режимом 23 — 25°C, влажностью воздуха 70%, при освещенности 5000 — 10000 Лк.

### *Контрольные вопросы к теме 7*

- 1) Указать, что означает вторичная дифференцировка и морфогенез в культуре каллусных тканей?
- 2) Перечислить этапы выращивания эмбриоидов или зеленых почек из каллусной ткани.
- 3) Пояснить через какой период времени растущая каллусная ткань подлежит пересадке на свежую питательную среду?
- 4) Пояснить в чем заключается индукция стеблевого органогенеза в каллусной ткани?
- 5) Перечислить этапы выращивания растений-регенерантов из куллусной ткани.

## **ТЕМА 8. АДАПТАЦИЯ СТЕРИЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ К ПОЧВЕННЫМ УСЛОВИЯМ ВЫРАЩИВАНИЯ *EX VITRO***

### **Работа 1. АДАПТАЦИЯ СТЕРИЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ К ПОЧВЕННЫМ УСЛОВИЯМ ВЫРАЩИВАНИЯ *EX VITRO*.**

**Цель работы:** научиться адаптировать стерильные растения к почвенным условиям *ex vitro* теплицы (парника).

#### **КРАТКИЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.**

*Ex vitro* — это термин в области биотехнологии, который означает организмы (растения), извлечённые из культуры тканей и пересаженные в почву или горшечную смесь с закрытой корневой системой.

Пересадка растений-регенерантов в почвенные условия является ответственным этапом, завершающим процесс микроклонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений — это весна или начало лета. Растения с двумя-тремя

листьями и хорошо развитой корневой системой способны адаптироваться к почвенным нестерильным условиям *ex vitro*. Почвенный субстрат предварительно стерилизуют сухим жаром при 85-90°C в течение 1 — 2 часов. Для большинства культур в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики, торфяные горшочки или пластиковые стаканчики. После пересадки горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом и влажностью 90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками, пластиковыми стаканчиками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают по мере адаптации растений. Размещают горшочки в световой комнате на стеллажах с освещенностью 4 — 5 тыс. лк на 2 — 3 недели. Первую подкормку растений проводят через 4-7 дней раствором минеральных солей Кнудсона, Кнопа, Мурасиге-Скуга. Через 2 недели оценивают приживаемость растений в % к почвенным условиям.

**Задание 1.** Используя представленный теоретический материал освоить методику пересадки (адаптации) стерильных растений-регенерантов к почвенным условиям *ex vitro*.

**Задание 2.** Результаты выполненной лабораторной работы законспектировать в тетради. Зарисовать в лабораторной тетради схему процесса пересадки растений.

**Материалы и оборудование.** Стерильные растения-регенеранты земляники садовой, малины; пинцеты; 0,1% р-р перманганата калия; пикировочные ящики или пластиковые стаканчики; почвенный субстрат; прозрачные пластиковые стаканчики.

### **Ход работы № 1**

1. Набить субстратом пикировочные ящики или пластиковые стаканчики.

2. Для обеззараживания субстрата, пролить его горячим раствором перманганата калия.

3. Подготовить емкость с раствором перманганата калия (комнатной температуры) для отмычки корней.

4. Растения с хорошо развитой корневой системой и листьями осторожно вынуть из пробирки или банки при помощи пинцета.

5. Корни хорошо отмыть от остатков питательной среды (агара) в растворе перманганата калия.

6. Пересадить растения в горшочки со стерильным почвенным субстратом, почву вокруг растения слегка утрамбовать.

7. Накрыть сверху каждое растение пластиковым стаканчиком и разместить пикировочные ящики в световой комнате.

### ***Контрольные вопросы к теме 8***

1) Пояснить в чем заключается принцип адаптации стерильных растений к нестерильным условиям *ex vitro*?

2) Поясните, что обозначает термин «*ex vitro*».

3) Перечислить этапы адаптации стерильных растений.

4) Указать какие условия должны поддерживаться в адаптационном помещении.

5) Сколько времени проходит этап адаптации стерильных растений?

### **ВОПРОСЫ К СЕМИНАРУ ПО ТЕМАМ 7, 8**

#### **«МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РАЗВИТИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ. ФИТОГОРМОНЫ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ».**

1. Указать, что означает понятие гормональная система растений?
2. Назвать классификацию фитогормонов.
3. Указать какими свойствами обладают фитогормоны?
4. Пояснить, что обозначает термин фитогормоны, охарактеризовать механизм их действия?

5. Указать в чем заключается значение 6-БАП в процессе регенерации растений?
6. Указать в чем заключается значение ИМК в процессе регенерации растений?
7. Указать в чем заключается значение кинетина в процессе регенерации растений?
8. Дать характеристику фитогормонов стимулирующего действия.
9. Дать характеристику фитогормонов ингибирующего действия.
10. Пояснить каким образом осуществляется регуляция органогенеза *in vitro* с помощью синтетических регуляторов роста?
11. Пояснить, как происходит регуляция роста и развития растений?
12. Указать в чем заключается различие между понятием фитогормон и фиторегулятор?
13. Указать от каких процессов зависит уровень фитогормонов в определенном органе?
14. Указать роль фитогормонов и регуляторов роста в клonalном микроразмножении растений.
15. Пояснить в чем заключается экологическая и генетическая безопасность применения регуляторов роста?
16. Дать характеристику гормононезависимым растительным тканям.
17. Пояснить, каково значение фиторегуляторов в системе защиты растений?
18. Перечислить аналоги и антагонисты цитокининов.
19. Перечислить аналоги антагонисты гиббереллинов.
20. Перечислить аналоги и антагонисты ауксинов.

## **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТА**

На заключительном занятии студенты представляют ИДЗ (индивидуальные домашние задания), выполненные в виде докладов, рефератов или презентаций по указанным ниже, либо интересующим студента темам.

Содержание ИДЗ:

1. Название темы, ФИО студента, курс, группа.
2. Содержание работы.
3. Текст работы.
4. Заключение (резюме) студента по теме ИДЗ.
5. Список используемых источников литературы.

**Примерный перечень тем ИДЗ:**

1. Проблема биобезопасности в биотехнологии?
2. Какие критерии и показатели биобезопасности применяются в биотехнологии и биоинженерии?
3. Получение трансгенных растений.
4. Перспективы использования трансгенных растений.
5. Критерии, показатели и методы оценки биобезопасности генетически модифицированных организмов (ГМО) и получаемых из них продуктов.
6. ГМО — польза или вред?
7. Стандартизация в биотехнологии и биоинженерии.
8. Криосохранение генофонда растений
9. Темы на усмотрение студента, по интересующей его проблематике.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### ПРИЛОЖЕНИЕ 1

#### Состав маточных растворов по Мурасиге-Скуга (МС) для приготовления питательной среды

Компоненты питательных сред	Количество
Макросоли:	г/1 л маточного раствора
KNO <sub>3</sub>	38
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	7,4
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	8,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4
Микросоли:	мг/100 мл маточного раствора
MnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	2230
ZnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	860
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620
KJ	83
CuSO <sub>4</sub> *5 H <sub>2</sub> O	2,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	25,0
CoCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	2,5
Хелат железа	мг/100 мл маточного раствора
FeSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	557
NaEDTA*2 H <sub>2</sub> O	745
Витамины	мг/10 мл маточного раствора
Тиамин — HCl	10
Пиридоксин — HCl	10
Никотиновая кислота	10
Глицин	10
Фолиевая кислота	10
Биотин	10
Регуляторы роста	мг/10 мл маточного раствора
ИУК	10
НУК	10
Кинетин	10
БАП	10

## ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биотехнология : Учебник и практикум / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Живухина, Е. А. Калашникова. — 3-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2021. — 381 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-13546-6. — EDN EYFOPB.
2. Биотехнология : Учебник и практикум / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Живухина, Е. А. Калашникова. — 3-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2022. — 381 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-13546-6. — EDN NTPRJZ.
3. Биотехнология. В 2 Ч. Часть 1 : Учебник и практикум / Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина, Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2019. — 162 с. — (Бакалавр. Академический курс). — ISBN 978-5-534-07410-9. — EDN CAUYUI.
4. Биотехнология. В 2 Ч. Часть 1 : Учебник и практикум / Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина, Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2020. — 1 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-07410-9. — EDN NSHQEZ.
5. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. — М.: Наука, 1986.
6. Бъядовский, И. А. Клональное микроразмножение плодовых культур : Методические рекомендации / И. А. Бъядовский, М. Т. Упадышев. — Москва : Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, 2020. — 69 с. — ISBN 978-5-521-15845-4. — EDN YIOHDA.
7. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Живухина Е.А. Биотехнология: теория и практика. - М.: Оникс, 2014. - 496 с.
8. Калашникова Е.А., Кошиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. — М.: КолосС, 2006, — 144 с.
9. Калашникова, Е. А. Клеточная инженерия растений: учебник: практикум / Е. А. Калашникова. - Москва: Юрайт, 2021.
10. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. // М. Наука. — 1983, — 96 с.
11. Клеточная инженерия / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин // Биорхнология. Т. 3. — М.: Высшая школа, 1987.
12. Культура тканей и клеток растений. (Бакалавриат). Учебник. Е. А. Калашникова, Р. Н. Киракосян [и др.]. — Москва : Общество с ограниченной ответственностью "Издательство "КноРус", 2023. — 183 с.
13. Культура тканей и клеток растений. Практикум. (Бакалавриат). Учебное пособие. Е. А. Калашникова, М. Ю. Чередниченко, Р. Н. Киракосян [и др.]. — Москва : Общество с ограниченной ответственностью "Издательство "КноРус", 2023. — 160 с.
14. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. Изд. 2-е. М.: Изд-во МСХА, 2004, — 116 с.
15. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. Учебник. — СПб.: Изд. С.-Петербург. ун-та, 2003.
16. Методические указания по экспресс-диагностике вирусов на ягодных культурах. / под ред. академика РАСХН В.И. Кашина. — М.: ВСТИСП, 2002, — 36 с.

17. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. — М.: «Агропромиздат», 1990.
18. Основы биотехнологии. Практикум / Е. А. Калашникова, М. Ю. Чередниченко, Р. Н. Киракосян [и др.]. — Москва : Общество с ограниченной ответственностью "Издательство "КноРус", 2023. — 160 с. — ISBN 978-5-406-10722-5. — EDN NGLUXR.
19. Основы биотехнологии: Учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 208 с.
20. Панкратова А.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для студентов направления подготовки 35.03.04 «Агрономия» очной и заочной форм обучения. — Кострома, КГСХА, 2019 — 62 с.
21. Панкратова А.А. Сборник лабораторных работ по биотехнологии. Учебно-методическое пособие. — Кострома, КГСХА, 2010. — 42 с.
22. Регуляторы роста растений (с практикумом). (Бакалавриат). Учебник. Е. А. Калашникова, М. Ю. Чередниченко, Р. Н. Киракосян [и др.]. — Москва : Общество с ограниченной ответственностью "Издательство "КноРус", 2023. — 345 с.
23. Сельскохозяйственная биотехнология. - М.: Высшая школа, 2008. — 205 с.
24. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология. / В.С. Шевелуха. Изд.: Высшая школа. Серия: Для высших учебных заведений, 2008 - 712 с.
25. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтярев С.В и др. Сельскохозяйственная биотехнология. // Учебник. — М.: Высшая школа, 1998,– 416 с.

*Электронные ресурсы удалённого доступа*

1. <http://www.biotechnolog.ru>
2. <http://traditio-ru>
3. <http://www.lib.ua-ru.net/diss/cont/64030.html>
4. <http://www.bio-x.ru>
5. <http://www.biomolecula.ru.ru>
6. <http://www.biotechnology-journal.ru>

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

- 2,4-Д**
- 6-БАП**
- In vitro**
- In vivo**
- Адвентивные почки**
- Апекс**
- Апикальное доминирование**
- Ауксины**
- Гиббереллины**
- ГК**
- Гормональная система растений**
- Гормональный статус**
- Дедифференциация**
- Дифференциация**
- Дифференцировка**
- Изолированный протопласт**
- Инокулюм**
- ИУК**
- Каллус**
- Клеточная селекция**
- 2,4-дихлорфеноксикусусная кислота
  - 6-бензиламинопурин
  - выращивание растительных объектов «в стекле» (пробирке, колбе, биореакторе) на искусственных питательных средах, в асептических условиях.
  - выращивание живого материала в естественных условиях.
  - почки на растениях, возникшие из клеток и тканей, обычно их не образующих.
  - верхушечная часть стебля или корня.
  - явление подавления роста верхушечных почек побегов гормонами, вырабатываемыми в апикальной меристеме.
  - фитогормоны (ИУК, НУК, 2,4-Д), активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие образование корней у проростков.
  - фитогормоны, активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян (ГК и др.).
  - гибберелловая кислота.
  - регуляторный комплекс, состоящий из фитогормонов, их рецепторов и вторичных посредников.
  - состояние гормональной системы в онтогенезе растений, уровни гормонов и соотношение между ними в процессах образования, передвижения, использования и инактивации в ответ на эндогенные и экзогенные воздействия.
  - переход специализированных, неделящихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток (утрата клетками специализации).
  - комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.
  - состояние специализации клеток, отличающее их от других.
  - растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического разрушения.
  - часть клеточной суспензии, используемая для переноса на свежую питательную среду.
  - β-индолилуксусная кислота.
  - неорганизованная пролиферирующая ткань, возникшая *in vivo* или *in vitro*, состоящая из дедифференцированных клеток.
  - метод выделения мутантных клеток и сомаклональных вариаций с помощью селективных условий в условиях *in vitro*.

<b>Клон</b>	– популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.
<b>Клональное микроразмножение или микроклональное размножение</b>	– получение <i>in vitro</i> неполовым путем растений, генетически идентичных исходному (метод вегетативного размножения растений в культуре <i>in vitro</i> ).
<b>Клонирование</b>	– совокупность методов, приводящих к получению генетически идентичных популяций организмов.
<b>Культура «привыкших» тканей</b>	– выращивание тканей, возникших путем редифференциации или мутации клеток нормальных каллусных тканей, и способных расти на питательных средах без гормонов.
<b>Культура изолированных протопластов</b>	– 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.
<b>Культура каллусов <i>in vitro</i></b>	– выращивание в длительной пересадочной культуре каллусов, возникших путем дедифференциации и пролиферации клеток, тканей, органов растений.
<b>Культура меристем <i>in vitro</i></b>	– асептическое выращивание на искусственной питательной среде изолированного апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.
<b>Культура органов <i>in vitro</i></b>	– асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней, стеблевых апексов, незрелых частей цветка, незрелых плодов.
<b>Культура супензионная или культура клеток <i>in vitro</i></b>	– асептическое выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде.
<b>Культура тканей</b>	– выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.
<b>Линия</b>	– культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.
<b>Меристема</b>	– образовательные ткани с активно делящимися клетками.
<b>Морфогенез <i>in vitro</i></b>	– процесс формирования, т.е. заложения роста и развития органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез, или клеточная дифференцировка) в культуре клеток и тканей <i>in vitro</i> .
<b>НУК</b>	– $\alpha$ -нафтилуксусная кислота.
<b>Органогенез</b>	– процесс возникновения в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней и

	побегов).
<b>Пролиферация</b>	– новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.
<b>Регенерация</b>	– восстановление целостного организма из клетки, ткани, органа.
<b>Редифференциация</b>	– переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями.
<b>Ризогенез</b>	– процесс заложения, роста и развития корней.
<b>Ростовой цикл</b>	– 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.
<b>Слияние изолированных протопластов</b>	– формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.
<b>Сомаклональная вариабельность</b>	– частота колебаний в различии признаков у растений, регенерированных из культивируемых соматических клеток.
<b>Сомаклоны</b>	– растения-регенеранты, полученные из соматических клеток и имеющие определенные отличия от исходных форм.
<b>Соматический гибрид</b>	– растение, полученное путем слияния (гибридизации) изолированных протопластов, соматических клеток.
<b>Соматический эмбриогенез</b>	– процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток.
<b>Субкультивирование</b>	– перенос трансплантов (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.
<b>Субпротопласт</b>	– изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, сохранивший ядро.
<b>Суспензионная культура</b>	– суспензия клеток или их агрегатов (небольших групп) во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде, выращивают с помощью аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.
<b>Тотипотентность</b>	– свойство соматических клеток растений полностью реализовывать наследственную программу онтогенетического развития с образованием целого организма.
<b>Трансплантант (инокулюм)</b>	– часть каллусной (суспензионной) культуры, используемой для пересадки на свежую питательную среду.
<b>Фитогормоны</b>	– (гормоны растений) — биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.
<b>Фиторегуляторы</b>	– природные препараты, вызывающие различные ростовые

	или формативные эффекты и не обладающие действием удобрений и гербицидов.
<b>Цибрид</b>	– растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с цитопластом, протопластом с инактивированным ядром или с энуклеированным протопластом.
<b>Цикл выращивания (пассаж)</b>	– период от помещения клеточного инокулюма или каллусного транспланта на питательную среду до последующего субкультивирования.
<b>Цитокинины</b>	– фитогормоны, активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек (кинетин, БАП и др.).
<b>Цитопласт</b>	– ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.
<b>Штамм</b>	– культура, возникшая после первого субкультивирования, и состоящая из многих клеточных линий, возникших из клеток первичного каллуса.
<b>Эксплант</b>	– фрагмент ткани или органа, культивируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.
<b>Эмбриоидогенез</b>	– процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) неполовым путем в культуре тканей и клеток <i>in vitro</i> .

*Учебно-теоретическое издание*

**Биотехнология садовых культур : учебное пособие / сост. А.А. Панкратова. — Караваево : Костромская ГСХА, 2024. — 65 с. ; 20 см. — 50 экз. — Текст непосредственный.**

*Учебное пособие издается в авторской редакции*

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Костромская государственная сельскохозяйственная академия"  
156530, Костромская обл., Костромской район, пос. Караваево, уч. городок, д. 34

Компьютерный набор. Подписано в печать \_\_\_\_\_. Заказ № 1179.  
Формат 60x84/16. Тираж 50 экз. Усл. печ. л. 3,78. Бумага офсетная.  
Отпечатано \_\_\_\_\_.

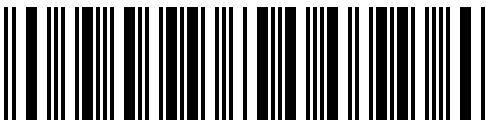
вид издания: первичное (электронная версия)  
(редакция от 30.10.2024 № 1179)

Отпечатано с готовых оригинал-макетов в академической типографии  
на цифровом дубликаторе. Качество соответствует предоставленным  
оригиналам.  
(Электронная версия издания - I:\подразделения\рио\издания 2024\1179.pdf)



2024\*1179

ФГБОУ ВО КОСТРОМСКАЯ ГСХА



2024\*1179

(Электронная версия издания - I:\подразделения\рио\издания 2024\1179.pdf)