

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ,
НАУКИ И КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ОРДЕНОВ ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ
И ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

БИОТЕХНОЛОГИЯ

*Учебно-методическое пособие
для студентов, обучающихся по специальностям
1-74 02 03 Защита растений и карантин,
1-74 02 05 Агрохимия и почвоведение,
1-74 02 04 Плодоовощеводство,
1-74 02 01 Агрономия,
1-74 02 02 Селекция и семеноводство,
1-33 01 06 Экология сельского хозяйства*

Горки
БГСХА
2021

УДК 581.08:573.6(075.8)

ББК 31.19

Б75

*Рекомендовано методическими комиссиями
агроэкологического факультета 23.11.2021 (протокол № 3),
агрономического факультета 23.11.2021 (протокол № 3)
и Научно-методическим советом БГСХА 24.11.2021 (протокол № 3)*

Авторы:

кандидат биологических наук, доцент *Т. В. Никонович*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *А. Н. Иванистов*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *М. О. Моисеева*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *М. М. Добродькин*;
старший преподаватель *Н. А. Невестенко*;
кандидат сельскохозяйственных наук *Т. В. Кардис*;
кандидат биологических наук, доцент *О. Г. Бабак*;
доктор биологических наук, академик *А. В. Кильчевский*

Рецензенты:

кандидат сельскохозяйственных наук *И. М. Коваль*;
кандидат биологических наук, доцент *П. Ю. Колмаков*

Биотехнология : учебно-методическое пособие / Т. В. Нико-
вич [и др.]. – Горки : БГСХА, 2021. – 58 с.
ISBN 978-985-882-179-1.

Приведены теоретический материал и лабораторные работы по биотехнологии.

Для студентов, обучающихся по специальностям 1-74 02 03 Защита растений и карантин, 1-74 02 05 Агрохимия и почвоведение, 1-74 02 04 Плодоовощеводство, 1-74 02 01 Агрономия, 1-74 02 02 Селекция и семеноводство, 1-33 01 06 Экология сельского хозяйства.

УДК 581.08:573.6(075.8)

ББК 31.19

ISBN 978-985-882-179-1

© УО «Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2021

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование изолированных клеток и тканей растений в условиях *in vitro* – метод сохранения жизнеспособности и размножения органов или их частей, участков тканей или отдельных клеток вне организма растения. В асептических условиях клетки и ткани служат в качестве биологических моделей, на которых в строго контролируемых условиях, близких во многих случаях к естественным, представляется возможность изучения механизмов межклеточных взаимодействий, их регуляторных функций, а также регенерационных процессов.

В основе методических приемов культивирования клеток и тканей *in vitro* лежат следующие принципы:

- изолирование клеток, фрагмента ткани или органа от исходного растения;
- перенос в строго контролируемые, тщательно подобранные условия;
- соблюдение стерильных условий выращивания материала.

Метод культуры изолированных клеток, тканей и органов растений в условиях *in vitro* является самостоятельной отраслью биотехнологии. Это связано как с увеличением роли клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике и молекулярной биологии, физиологии и цитоэмбриологии растений, так и с возможностями практического использования клеточных и тканевых технологий в агропромышленном комплексе, фармацевтической и пищевой промышленности.

В учебно-методическом пособии по биотехнологии приведены лабораторные работы по выполнению различных манипуляций с клетками и тканями, а также культивированию растительных объектов в условиях *in vitro*: особенности создания и работы в абсолютно стерильных условиях, приготовление искусственных питательных сред, индукция и выращивание каллусной ткани, суспензионные культуры, микроклональное размножение, оздоровление посадочного материала, культура изолированных зародышей, проведение ДНК-анализа, анализ полиморфизма генов методом секвенирования, генетическая трансформация растительных клеток.

ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

Лабораторные работы проводят в специально оборудованной биотехнологической лаборатории. При работе необходимо знать и строго соблюдать установленные правила. Работать разрешается только после ознакомления с правилами по технике безопасности и правилами работы в лаборатории.

1. В лаборатории не разрешается работать без специальной одежды. Рабочее место содержится в чистоте и порядке, не загромождается посторонними предметами.

2. Не допускается попадания химических реактивов на кожу и одежду. Нельзя брать вещества руками и пробовать на вкус.

3. Запрещается пользоваться реактивами без этикеток или с сомнительными этикетками.

4. Во всех опытах используется дистиллированная вода. Сухие реактивы берутся только чистым шпателем. Нельзя путать пробки от склянок с различными реактивами. Излишки реактивов не высыпаются и не выливаются в склянки, из которых они взяты.

5. Особая осторожность соблюдается при работе с ядовитыми и вредными веществами, с концентрированными кислотами и щелочами. Работать с ними следует в вытяжном шкафу.

6. После опытов остатки реактивов сливаются в раковину после разбавления водой. Металлы, остатки агрессивных и дорогостоящих реактивов собираются в специальные склянки.

7. Нельзя трогать, включать и не выключать без разрешения рубильники и электрические приборы.

ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ НЕСЧАСТНЫХ СЛУЧАЯХ

В лаборатории бывают случаи, требующие неотложной медицинской помощи: порезы рук стеклом, ожоги горячими предметами, кислотами, щелочами. В особо серьезных случаях необходимо обратиться к врачу. Для оказания первой помощи в лаборатории имеется аптечка.

1. При ранении стеклом удалите осколки из раны, смажьте края раны раствором йода и перевяжите бинтом.

2. При ожоге рук или лица реактивом смойте реактив большим количеством воды, затем либо разбавленной уксусной кислотой (в случае ожога щелочью), либо раствором соли (в случае ожога кислотой), а затем опять водой.

3. При ожоге горячей жидкостью или горячим предметом обожженное место обработайте свежеприготовленным раствором перманганата калия, смажьте обожженное место мазью от ожога или вазелином. Можно присыпать ожог содой и забинтовать.

4. При химических ожогах глаз обильно промойте их водой, а затем обратитесь к врачу.

Лабораторная работа 1. УСТРОЙСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Материалы и оборудование: лабораторная посуда, инструменты, ламинарные боксы, климатические камеры, автоклавы, дистилляторы, термостаты.

Объяснение. Основой планирования помещения для работы с культурой клеток, тканей и органов является специальная лаборатория, состоящая из моечной комнаты, помещения для приготовления искусственных питательных сред, комнаты для стерилизации питательных сред, инструментов и материалов, асептического помещения с ламинарными боксами, световой комнаты для культивирования объектов *in vitro*.

Моечная комната должна быть укомплектована мойками, снабженными холодной и горячей водой, бутылками с дистиллированной водой. Мойки изготавливают из кислотоупорного материала, рассчитывая на то, что при мытье посуды могут применяться кислоты и щелочи. В данном помещении устанавливаются стеллажи для сушки посуды, сушильные шкафы, шкафы для хранения посуды.

Комната для приготовления искусственных питательных сред оборудуется лабораторными столами, шкафами для хранения реактивов, холодильниками и морозильными камерами, весами различного класса точности, магнитными мешалками, электрическими или газовыми плитами.

Помещение для стерилизации питательных сред, инструментов и материалов оборудуется автоклавами (рис. 1), сушильными шкафами для стерилизации сухим жаром (рис. 2), аппаратами для дистилляции воды, столами для размещения стерилизуемых питательных сред и материалов, шкафами для их хранения. В этом помещении следует предусмотреть надежную обновляемость воздуха с установкой соответствующих вентиляторов.

Стерильное помещение с ламинарными боксами (ламинарная комната) используется для изоляции и пересадки культур. Данное помещение следует располагать как можно дальше от источников заражения, сквозняков, нагревательных устройств и мест с усиленным движением людей. Асептическое помещение должно, по возможности, не иметь наружных стен здания, быть большим (около 15 м²), не иметь окон.



Рис. 1. Автоклав



Рис. 2. Сушильный шкаф

В зависимости от объема выполняемых работ в помещении устанавливается несколько ламинарных боксов (рис. 3). Двери, которые

ведут в асептическую комнату, должны закрываться герметично. В стерильном боксе не должно быть лишних предметов во избежание заражения изолируемых тканей. Желательно использовать рабочие столы, покрытые гладким, легко стерилизующимся материалом. Пол, потолок, стены и другие поверхности должны быть покрыты материалами, на которые мало садится пыль, и их можно легко мыть и дезинфицировать. В бокс должен поступать стерильный кондиционированный воздух. Для этой цели используют специальные многослойные фильтры. Стерильность воздуха достигается также с помощью бактерицидных ламп.



Рис. 3. Ламинарный бокс

В термостатированном помещении (*культуральная*) с кондиционированным воздухом, строго регулируемой температурой (для большинства культур $+20-24\text{ }^{\circ}\text{C}$) и относительной влажностью воздуха 70 % на стеллажах и полках размещают изолированные культуры (рис. 4). В этой же комнате можно поместить различные установки для накопительного культивирования клеточных суспензий. Отдельные культуральные помещения необходимы для выращивания культур при искусственном освещении с регулируемой интенсивностью и спек-

тральным составом света. Недопустимо поступление в культуральную комнату различных летучих веществ (фенол, формалин).



Рис. 4. Культуральная комната

Лабораторная химическая посуда

В биотехнологической лаборатории очень часто приходится работать с посудой из стекла и фарфора. Лабораторную посуду можно подразделить на следующие виды:

1. Посуда общего назначения.

Пробирки используются для проведения химических опытов с небольшим количеством веществ. Они могут быть цилиндрические и конические. Хранятся пробирки в штативах. Перемешивание веществ в них проводится встряхиванием пробирки, нанося небольшой удар пальцем по ее нижней части.

Колбы бывают разной вместимости (от 1–2 литров до 25 миллилитров) и разной формы: плоскодонные, круглодонные, конические, колбы Вюрца.

Стаканы могут быть разной вместимости (от 1 литра до 25 миллилитров), разной формы, разные по высоте и ширине, термостойкие и нетермостойкие.

Воронки бывают различной формы и размеров, и, в зависимости от этого, имеют разное назначение.

2. Мерная посуда.

Мерной называют посуду, применяемую для измерения объема жидкости с разной точностью. Для измерения объема с небольшой точностью применяют мерные цилиндры и мензурки. Для точного измерения объема жидкости используются пипетки, бюретки и мерные колбы. Мерная посуда может быть разной вместимости. В зависимости от объема, который должен быть измерен, подбирается посуда соответствующей вместимости. Мерная посуда градуируется в миллилитрах (мл) или литрах (л). 1 мл соответствует 1 см^3 , а 1 л – 1 дм^3 . При измерении объема жидкости мерный сосуд необходимо держать в вертикальном положении, а отсчеты вести по нижней части вогнутой поверхности мениска жидкости. Причем глаз наблюдателя должен находиться на одной горизонтальной линии с нижним краем мениска.

Для отбора нужного объема жидкости могут использоваться автоматические пипетки или степеры (рис. 5).



Рис. 5. Пипетки автоматические одноканальные механические и электронные с переменным объемом (а) и степеры (б)

3. Фарфоровая посуда.

К фарфоровой посуде относят тигли, чашки, ступки, кружки, стаканы и т. д. Чашки и тигли используются для выпаривания жидкостей и прокаливания твердых веществ. Они выдерживают температуру выше $1000 \text{ }^\circ\text{C}$. Для измельчения твердых веществ используют ступки.

Инструменты

К инструментам, применяемым при работе с клеточными, тканевыми культурами в стерильных условиях, относят: пинцеты, скальпели, ножницы, препаровальные иглы, щипцы, держатели, лезвия, зажимы (рис. 6). Инструменты, производимые из специальной и нержавеющей стали, должны отвечать определенным требованиям: сопротивление малой пластической деформации, твердость и износостойкость. Они должны сопротивляться коррозии, соответствовать высоким гигиеническим требованиям (вступать в минимальный контакт с растительным организмом и выдерживать требования стерильности) и не терять свои свойства после одного-двух использований. Чтобы комплексно соответствовать высоким требованиям, инструменты производят из специальной или нержавеющей стали, в составе которой есть легирующие добавки, влияющие на характеристики готового изделия в зависимости от его назначения. Кроме железа, основными компонентами нержавеющей стали являются никель и хром.



Рис. 6. Инструменты для работы с культурой *in vitro*

Ход работы. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории. Освоить принципы работы и особенности использования для культуры *in vitro* ламинарных боксов, дистилляторов, автоклавов, термостатов, климатических камер.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 1

Помещение	Оборудование	Условия

Лабораторная работа 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА

Материалы и оборудование: стаканы химические на 250 мл, мерные пипетки, цилиндры, весы аналитические, электроплитка, дистиллированная вода, регуляторы роста, колбы 50 мл или 100 мл.

Объяснение. Согласно современным представлениям о регуляторах роста и развития растений, *фитогормонами* называют вещества, которые синтезируются в растениях, транспортируются по ним и в малых концентрациях способны вызывать ростовые или формообразовательные эффекты по месту образования и на расстоянии от него.

В настоящее время известно семь групп фитогормонов: ауксины, цитокинины, гиббереллины, этилен, абсцизовая кислота, брассиностероиды, фузикококцины.

Ауксины открыты в 20-е годы XX века как фактор тропизмов растений. В начале 30-х годов Ф. Кегль выделил в чистом виде и установил химическое строение природного ауксина – индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Основным местом синтеза ауксинов являются апикальные меристемы стебля, откуда они поступают в другие органы. В меньшей степени синтез этих фитогормонов происходит в листьях. Физиологические эффекты ауксинов связаны с их действием на клеточном уровне, которое проявляется в регуляции растяжения, деления и дифференцировки. Ауксины создают условия, необходимые для репликации ДНК, включающие в себя стимулирование дыхания, синтеза РНК и белков. Они способны стимулировать дифференциацию меристематических или дедифференцированных клеток в клетки проводящих тканей.

Цитокинины открыты в 1955 г. как факторы, стимулирующие деление клеток. Цитокинины синтезируются главным образом в апикальных меристемах корня. Особенно много их обнаруживается в активных меристемах и семенах. Основной физиологический эффект цитокининов заключается в активации клеточных делений, они стиму-

лируют работу РНК-полимераз, образование РНК и синтез белков. Цитокинины обладают аттрагирующим действием, которое обуславливает стимулирование роста клеток листьев и семядолей, снятие апикального доминирования, задержку старения листьев и регуляцию передвижения веществ в растении.

Значительную роль цитокинины играют в регуляции органогенеза. Преобладающая концентрация этих гормонов задерживает образование корней и ускоряет закладку стеблевых почек.

Под действием цитокининов покоящиеся семена и клубни ряда культур выходят из состояния покоя. Важным свойством цитокининов является их способность повышать устойчивость клеток растения к различным неблагоприятным воздействиям – повреждающим температурам, недостатку влаги, повышенной засоленности, рентгеновскому излучению, фитотоксичным воздействиям пестицидов.

Гиббереллины были открыты в 1926 г. и выделены в 1938 г. В настоящее время известно около 70 представителей гиббереллинов, в том числе 45 выделены из растений.

Физиологическое действие гиббереллинов проявляется главным образом в стимуляции ростовых процессов за счет усиления растяжения клеток и повышения митотической активности меристематических тканей. Гиббереллины играют большую роль в процессах перехода растения к формированию генеративных органов и зацветанию. Введение гиббереллинов извне часто вызывает угнетение развития семян и формирование партенокарпических плодов. Эти фитогормоны способны выводить семена и клубни растений из состояния покоя.

Браassinостероиды – это гормоны растений стероидной природы. Известно, что малые количества этих фитогормонов содержат ткани цветка, листья и молодые стебли растений. Максимальная концентрация браassinостероидов отмечена в пыльце. Они стимулируют растяжение клеток. Микроколичества браassinостероидов, попадая с пыльцой в семяпочку, стимулируют ее развитие и образование семян. Большой интерес вызывает обнаруженный у них эффект стимулирования устойчивости растений к стрессам и грибным заболеваниям.

Первый представитель группы браassinостероидов – браассинолид – был выделен американскими учеными в 1979 году в виде кристаллического вещества в количестве 4 мг из 40 кг собранной пчелами пыльцы рапса (*Brassica napus*). К настоящему времени известно более шестидесяти браassinостероидов: из каштана (*Castanea sativa*) был выделен кастастерон, из рогоза (*Typha*) – тифастерол, из чая (*Thea*) – теастерон,

из катарантуса (*Catharanthus*) – катастерон и т. д. Первым брассино-стероидом, полученным синтетическим путем, стал эпибрассинолид, абсолютно идентичный природному растительному гормону. Высокой биологической активностью из известных в настоящее время брассино-стероидов обладают три представителя этой группы соединений – брассинолид, эпибрассинолид, гомобрассинолид. Характерной особенностью указанных соединений является широкий спектр их действия в малых концентрациях.

Этилен – единственный известный газообразный фитогормон очень простого строения. Способностью к биосинтезу этилена обладают практически все живые клетки растения. В онтогенезе характер образования этого фитогормона резко изменяется. У ювенильного растения этилен синтезируется главным образом в меристематических тканях. В дальнейшем наибольшее его количество образуют созревающие плоды. Биосинтез этилена резко усиливается при травмах или стрессовых воздействиях на растение. Этилен вызывает формирование отделительного слоя, что приводит к опадению листьев, цветков, завязей и плодов. Он также ускоряет созревание плодов.

Абсцизовая кислота (АБК) впервые выделена в 1964 г. из молодых коробочек хлопчатника. АБК синтезируется во всех органах растения. Интенсивность ее образования увеличивается по мере старения растения, а также при неблагоприятных воздействиях, особенно при недостатке влаги. Наибольшее содержание этого фитогормона в хлопчатнике содержится в старых листьях, зрелых плодах, покоящихся семенах и почках. Абсцизовая кислота – фитогормон с мощным ингибиторным действием. Она ускоряет распад нуклеиновых кислот, белков, хлорофилла. АБК регулирует покой семян, почек и клубней, а также вызывает опадение листьев и плодов.

Фиторегуляторы негормональной природы. Хлорхалинхлорид (ССС). Препарат хлорхалинхлорида – ТУР содержит 58–62 % действующего вещества. Наиболее широко применяется в качестве ретарданта яровой и озимой пшеницы. При обработке растений в фазе кущения соломина становится заметно короче и прочнее, что облегчает комбайновую уборку и уменьшает потери урожая. Существует мнение, что положительное влияние хлорхалинхлорида на растения проявляется в некотором повышении содержания хлорофилла и улучшении развития корневой системы. Возможна также предпосевная обработка семян пшеницы хлорхалинхлоридом. В этом случае наряду с некоторым укорочением стебля углубляется узел кущения и улучшается раз-

витие корней, что повышает устойчивость растений к неблагоприятным воздействиям. Он используется для обработки некоторых плодовых деревьев, у которых под влиянием препарата формируется более компактная крона и укорачивается период ювенильного развития. Ретардант оказывает очень благоприятное влияние на рассаду многих овощных растений, в частности томатов, на некоторые ягодные культуры.

Ход работы. Приготовить по 100 мл различных растворов регуляторов роста. Для этого необходимо взвесить по 100 мг соответствующего регулятора. Поместить отдельно в колбы на 100 мл. Важно учитывать следующие особенности приготовления: 1) ауксины и абсцизовую кислоту (АБК) растворяют в небольшом количестве этанола; 2) цитокинины растворяют в небольшом количестве 0,5 н HCl или KOH. В каждую колбу в зависимости от находящегося в ней регулятора добавлять по капле этанол или 0,5 н HCl (KOH) до полного растворения фитогормона. Затем дистиллированной водой довести объемы в каждой колбе до 100 мл. Таким образом, в 1 мл приготовленного раствора будет содержаться 1,0 мг регулятора роста. Полученные растворы хранят в холодильнике или морозильной камере в зависимости от частоты применения.

С помощью литературных источников, интернет ресурса подготовить информацию об особенностях влияния регуляторов роста на физиологические процессы в растении.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 2

Фитогормон	Место синтеза	Действие на растение

Лабораторная работа 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧИЙ В СПОСОБЕ ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН

Материалы и оборудование: чашки Петри, семена, линейки, плотная бумага.

Объяснение. Природные фитогормоны и синтетические регуляторы роста и развития растений, или фиторегуляторы, являются мощным

химическим средством управления онтогенезом растений. Поэтому они широко применяются в биотехнологии и практическом растениеводстве. Фиторегуляторы – важное средство регулирования дифференцировки клеток, клеточных делений, образования новых тканей и органов, темпов роста и развития растений, их продуктивности и качества урожая.

В современном растениеводстве фиторегуляторы применяются в целях повышения урожайности и устойчивости агроценозов к неблагоприятным факторам среды, позволяют существенно облегчить ряд технологических операций.

Ход работы. Отобрать 120 здоровых, без повреждений, выполненных семян. Промыть их дистиллированной водой три раза. В стерильные чашки Петри поместить по 20 семян. При помощи пипетки в каждую чашку залить по 5 мл соответствующего раствора регулятора роста в концентрации 5 мг/л, после чего чашку подписать.

Чашки с семенами поместить в термостат на 7 дней на прорастивание при температуре +25 °С, после чего необходимо проанализировать полученные результаты.

Проросшие семена осмотреть, определить их всхожесть (%), измерить длину проростков и корней. Полученные результаты проанализировать и сделать выводы о действии регуляторов роста на прорастание семян.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 3

Вариант	X_1	X_2	%	Дп	Дк	Ср. Дп	Ср. Дк
Контроль							
ГК							
АБК							
2,4-Д							
ТУР							

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

Лабораторная работа 4. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПРИ РАБОТЕ С КУЛЬТУРОЙ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Материалы и оборудование: семена, чашки Петри (10 шт.) с фильтровальной бумагой, стаканы химические на 100 мл (2 шт.), колба на 1 л с дистиллированной водой, пинцеты, ножницы, бумага фильтровальная, порошок хлорамина, сулема (двухлористая ртуть), карандаш по стеклу.

Объяснение. Одним из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей, клеток и протопластов является соблюдение строгой стерильности, поскольку на искусственных питательных средах хорошо развиваются и микроорганизмы, что представляет двойную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред, во-вторых, изолированные от растения ткани, клетки и в особенности протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому все опыты проводят в стерильных условиях. Стерилизуют ламинарные боксы, инструменты, посуду, растительный материал, питательные среды, ватные пробки и все другие материалы.

Стерилизация ламинарного бокса. Ламинарные боксы предназначены для выполнения различных работ с культурой изолированных клеток и тканей, требующих стерильности. Стерильность обеспечивается с помощью бактериальных фильтров, установленных в ламинарном боксе, через которые нагнетается воздух. За 2 часа до начала работы ламинарный бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре размещают спиртовую или газовую горелки, спички, фарфоровый стакан с 96%-ным спиртом, а при вычленении меристем – и бинокулярную лупу. Внутреннюю поверхность ламинара, спиртовку, лупу, пробирки с питательной средой протирают 70%-ным спиртом.

Работающий должен вымыть руки с мылом, надеть стерильный халат, завязать волосы стерильной косынкой. Непосредственно перед началом работы в ламинарном боксе нужно протереть руки спиртом.

Стерилизация посуды. Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов, а также раствора двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпик). Вымытую посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, перед стерили-

зацией их заворачивают в оберточную бумагу (у стаканов и колб достаточно обернуть только горлышко).

Затем посуду помещают в сушильный шкаф и прогревают при 160 °С в течение 2 часов (с момента установки нужной температуры). За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Температура выше 175 °С недопустима, так как при этом ватные пробки буреют, а бумажные обертки становятся ломкими. Еще более строгой стерилизации можно добиться в автоклаве, поскольку влажный пар (120–125 °С) под давлением губителен для микроорганизмов и их спор. Посуду (стаканы с крышками, чашки Петри, пипетки) заворачивают в фольгу или оберточную бумагу; верхнюю часть градуированных пипеток закрывают ватой, каждую заворачивают в бумагу. Автоклавируют под давлением 1 добавочная атмосфера в течение 25–30 минут.

Стерилизация инструментов. Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т. д.) заключается в нагревании сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 часов при температуре 170–200 °С. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. Металлические предметы стерилизуются в автоклаве при соответствующем режиме. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели, микробиологические петли) еще раз стерилизуют в ламинаре, помещая их в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом и обжигая в пламени горелки. Стерильный инструмент используют только для одной манипуляции. Очень тонкие инструменты (иглы, кусочки лезвий) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт. Возможно применение электрических стерилизаторов.

Стерилизация материалов. Вату, марлю, ватные пробки, фильтровальную бумагу, халаты, косынки стерилизуют в автоклаве под давлением 1 добавочная атмосфера в течение 25–30 мин.

Стерилизация растительного материала. Для стерилизации семян, апексов, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы: 0,1%-ный сулемы (двухлористая ртуть), 0,1%-ного диацита, 13–20%-ного пергидроля (перекись водорода), 10%-ного хлорамина, 3–8%-ного гипохлорита натрия или кальция.

Диацит готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолртутихлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (около 300 мл), затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента Твин-80, хранят в плотно закрытой колбе в темноте.

Перед стерилизацией ткань растения предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена – на 1–2 мин) в 70%-ный этиловый спирт. Обработка тканей этанолом повышает эффект основного стерилизующего раствора. Затем растительные объекты многократно ополаскивают стерильной дистиллированной водой.

Пергидроль рекомендуется использовать для фасоли, люпина, подсолнечника (с очищенной кожурой), сулему – для томатов, тыквы и др. Продолжительность стерилизации семян сулемой – 10–15 мин, пергидролем – 30 мин, для меристем и кусочков тканей требуется примерно в 2 раза меньше времени. Опушенные семена (хлопчатник) обрабатывают концентрированной серной кислотой в течение 5 минут.

Семена томатов, яблони, тыквы, бобов, табака ко времени созревания заключены в мясистые, деревянистые или костянквидные покровы. Поэтому здоровые, с неповрежденной поверхностью плоды этих культур, достаточно тщательно промыть водой, затем – несколько раз спиртом, после чего в строго асептических условиях их разрезают. Стерильным пинцетом вынимают семена и помещают их в стерильные чашки Петри для проращивания.

Стерилизация питательных сред. Разлитые в пробирки питательные среды закрывают ватными пробками и автоклавируют при температуре 120 °С и давлении 1 добавочная атмосфера в течение 20 минут.

Холодная стерилизация. Органические жидкости, не выносящие нагревания (например, гиббереллины, аскорбиновая кислота, кокосовое молоко), освобождаются от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Ход работы. Простерилизовать инструменты, посуду и воду, необходимые для проведения работ по введению семян в культуру *in vitro*.

Завернуть в плотную бумагу и простерилизовать в автоклаве под давлением 1 добавочная атмосфера в течение 25–30 минут чашки Петри с фильтровальной бумагой, химические стаканы на 100 мл (2 шт.).

Подвергнуть предварительной стерилизации в сушильном шкафу скальпели и пинцеты. Перед помещением в сушильный шкаф завернуть их в плотную бумагу.

Для получения стерильной воды налить дисциллированную воду в колбы необходимого объема, закрыть ватной пробкой или фольгой, сверху – плотной бумагой. Автоклавируют при давлении 1 добавочная атмосфера в течение 20 минут.

Отобрать 200 здоровых семян, промыть их водопроводной и дистиллированной водой.

Приготовить следующие стерилизующие растворы:

1) 10%-ный раствор хлорамина путем добавления к 90 мл дистиллированной воды 10 г хлорамина, после чего на магнитной мешалке тщательно перемешать;

2) 0,1%-ный раствор сулемы путем добавления к 100 мл дистиллированной воды 100 мг двуххлористой ртути, после чего на магнитной мешалке тщательно перемешать.

По 100 семян погрузить в каждый подготовленный стерилизующий раствор и стерилизовать в течение 15 мин, перемешивая на магнитной мешалке. Все последующие работы выполнять в условиях ламинарного бокса.

Семена промыть стерильной дистиллированной водой три раза. В стерильные чашки Петри со стерильной фильтровальной бумагой поместить по 20 семян и при помощи пипетки залить по 5 мл дистиллированной воды, после чего чашки подписать. На каждый вариант стерилизации следует подготовить по пять чашек Петри.

Чашки с семенами установить на проращивание в термостат на 7 дней при температуре +25 °С, после чего необходимо проанализировать полученные результаты и сделать выводы об эффективности стерилизующих растворов.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 4

Вариант	Количество семян всего, шт.	Количество стерильных семян, шт.	Степень зараженности, %	Количество проросших семян, шт.	Всхожесть, %	Примечание
Хлорамин						
Сулема						

Лабораторная работа 5. ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИСКУССТВЕННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Материалы и оборудование: соли макроэлементов, микроэлементов и витамины.

Объяснение. Все живые клетки нуждаются в экзогенных источниках питания, содержащихся в питательных средах. Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост и развитие биообъектов. Прежде чем начинать работы по культивированию разных типов клеток, необходимо точно знать их питательные потребности и зависимости. Постоянным компонентом питательных сред является вода, в которой нуждаются все живые клетки.

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям *макроэлементы*: азот, фосфор, калий, кальций, серу, магний, железо; *микроэлементы*: бор, цинк, медь, марганец, кобальт, йод, молибден; *витамины*: тиамин (В₁), пиридоксин (В₆), никотиновая кислота (РР), а также *углеводы и фитогормоны* (рис.7). Некоторые питательные среды включают гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах рН.

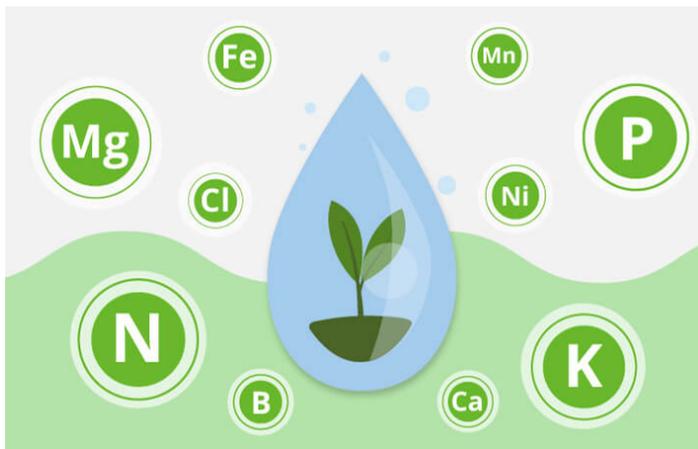


Рис. 7. Макро- и микроэлементы в жизни растения

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

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

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

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар. Он представляет собой полисахарид, получаемый из красных и бурых морских водорослей. Наименьшее количество нежелательных примесей содержит бактериальный агар (*Bacto Agar*). Обычно в питательную среду добавляют 0,5–0,7% агара.

Ход работы. Используя литературные источники и интернет ресурс, изучить основные элементы минерального питания растений. Выявить их значимость для роста и развития растительных клеток. Описать физиологическое действие макроэлементов, микроэлементов и витаминов, входящих в состав искусственных питательных сред. Оценить особенности, происходящие в клетках при отсутствии одного из элементов.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 5

Компонент	Физиологическое действие на клеточном уровне
Макроэлементы	
Азот	
Фосфор	
Калий	
Кальций	
Сера	
Магний	
Железо	
Микроэлементы	
Бор	
Цинк	
Медь	
Марганец	
Кобальт	
Йод	
Молибден	
Витамины	
Тиамин (В ₁)	
Пиридоксин (В ₆)	
Никотиновая кислота (РР)	

Лабораторная работа 6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАТОЧНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Материалы и оборудование: стаканы химические, мерные пипетки, цилиндры, весы аналитические, магнитная мешалка, дистиллированная вода, минеральные соли, органические соединения, колбы 50 мл или 100 мл.

Объяснение. С целью экономии времени растворы макроэлементов, микроэлементов, витаминов, фитогормонов готовят концентрированными (маточными), что позволяет многократно их использовать. Концентрация растворов макроэлементов должна быть больше необходимой в 10–20 раз, микроэлементов – в 100–1000 раз, витаминов – в 1000 раз. Раствор FeSO и Na₂ ЭДТА, необходимый для образования хелата железа, следует нагреть до кипения. Полученные маточные растворы сливают в емкости с притертой пробкой (хелат железа – в темной посуде), снабжают этикеткой и хранят в холодильнике при температуре +4 °С не больше месяца, для хранения витаминов и регуляторов роста необходима отрицательная температура.

Ход работы. Приготовить маточный раствор макроэлементов согласно прописи (табл. 1). Для этого взять навеску каждой соли, растворить в небольшом объеме дистиллированной воды, слить растворы в мерный цилиндр и довести водой до 1000 мл. Раствор хлористого кальция (CaCl_2) можно готовить и хранить отдельно. На 1 л среды использовать 100 мл маточного раствора. Приготовить маточный раствор микроэлементов согласно прописи (табл. 1). Для этого навеску каждой соли растворить в небольшом объеме дистиллированной воды, слить растворы в мерный цилиндр и довести водой до 200 мл. На 1 л среды использовать 10 мл маточного раствора.

Т а б л и ц а 1. Состав питательной среды Мурасиге-Скуга

Компоненты среды	Навеска для маточного раствора, г или мг	Количество маточного раствора для приготовления 1 л среды, мл
Макроэлементы, г на 1000 мл:		100,0
KNO_3	19,0	
NH_4NO_3	16,5	
KH_2PO_4	1,7	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7	
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,4	
Fe-хелат, г/л:		5,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,57	
$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,45	
Микроэлементы, мг на 200 мл:		10,0
H_3BO_3	124,0	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	312,0	
ZnSO_4	172,0	
KI	16,6	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,0	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,5	
Витамины, мг на 200 мл:		10,0
Пиридоксин HCl (B_6)	10,0	
Тиамин – HCl (B_1)	2,0	
Никотиновая кислота (PP)	10,0	

Приготовить маточный раствор хелата железа. Для приготовления 557 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 745 мг $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворить по отдельности при нагревании (не доводя до кипения) в 30–40 мл дистиллированной воды. Затем растворы объединить и довести до

общего объема 1000 мл. На 1 л среды использовать 5 мл раствора.

Приготовить маточный раствор витаминов. Для этого навески каждого витамина растворить последовательно в небольшом количестве дистиллированной воды. С помощью цилиндра объем раствора довести водой до 200 мл. На 1 л среды следует использовать 10 мл раствора.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 6

Компоненты маточного раствора	Концентрация 10-кратная, мг	Концентрация 20-кратная, мг	Концентрация 100-кратная, мг
Макроэлементы			
Количество маточного раствора макроэлементов на 1 л питательной среды, мл			
Микроэлементы			
Количество маточного раствора микроэлементов на 1 л питательной среды, мл			
Витамины			
Количество маточного раствора витаминов на 1 л питательной среды, мл			

Лабораторная работа 7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Материалы и оборудование: стаканы химические на 250 мл, мерные пипетки, цилиндры, весы аналитические, электроплитка, колбы с приготовленными маточными растворами, сахараза, агар-агар.

Объяснение. Для культивирования клеток, тканей и органов тех или иных растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяются среды Мурасиге-Скуга (табл. 2), Уайта (табл. 3), Гамборга и Эвелеге (B₅) (табл. 4), Нагата-Такебе, Хеллера, Нича-Нича, Кнудсона. Применение питательных сред строго определенного состава позволяет точно регистрировать и регулировать протекающие в культуральной среде процессы, добиваясь их оптимизации.

Т а б л и ц а 2. Среда Мурасиге-Скуга (*Murashige, Skoog, 1962*)

Компоненты питательной среды, мг/л			
NH ₄ NO ₃	1650	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
KNO ₃	1900	KI	0,83
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Na ₂ ЭДТА · 2H ₂ O	37,3
KH ₂ PO ₄	170	Тиамин – HCl	0,1
H ₃ BO ₃	6,2	Пиридоксин – HCl	0,5
MnSO ₄ · H ₂ O	15,6	Никотиновая кислота	0,5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	Мезо-инозит	100
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	Глицин	2,0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	Сахароза	30000
PH 5,6–5,8			

Т а б л и ц а 3. Среда Уайта (*White, 1943*)

Компоненты питательной среды, мг/л			
Ca(NO ₃) ₂	200	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02
MgSO ₄	360	ZnSO ₄	1,5
Na ₂ SO ₄	200	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0025
KNO ₃	80	KI	0,75
KCl	65	Пиридоксин – HCl	0,1
NaH ₂ PO ₄	16,5	Тиамин – HCl	0,1
H ₃ BO ₃	1,5	Никотиновая кислота	0,5
MnSO ₄	4,5	Глицин	3,0
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5	Сахароза	20000
PH 5,6–5,8			

Т а б л и ц а 4. Среда Гамборга и Эвелегга (B₅) (*Gamborg, Eveleigh, 1968*)

Компоненты питательной среды, мг/л			
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	150	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
KNO ₃	2500	KI	0,75
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	FeSO ₄ · 7H ₂ O	28,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250	Тиамин – HCl	10,0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	150	Пиридоксин – HCl	1,0
H ₃ BO ₃	3,0	Никотиновая кислота	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10,0	Мезо-инозит	100
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	2,4-Д	2,0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	Сахароза	20000
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,0		
pH 5,5			

Примечание. На основе маточных растворов готовят питательную среду МС.

Ход работы. Приготовить 100 мл питательной среды Мурасиге-Скуга (МС). В химический стакан емкостью 250 мл поместить 3 г сахарозы, залить дистиллированную воду примерно до 30 мл и после растворения сахарозы добавить 10 мл маточного раствора макроэлементов, 1 мл микроэлементов, 1 мл витаминов, 0,5 мл хелата железа. Довести в мерном цилиндре объем питательной среды до 100 мл. Необходимо обязательно измерить pH раствора, который устанавливают на уровне 5,6–5,8, используя 0,1н. КОН или 0,1%-ный раствор HCl. В предварительно нагретую питательную среду (+60–70 °С) добавить 0,7 грамма агар-агара и довести до кипения, периодически помешивая.

Горячую питательную среду разлить в пробирки примерно до 1/3 объема, закрыть ватно-марлевыми пробками или алюминиевой фольгой и стерилизовать в автоклаве.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 7

Маточный раствор	Количество на 50 мл питательной среды	Количество на 200 мл питательной среды	Количество на 1000 мл питательной среды

Лабораторная работа **8. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ**

Материалы и оборудование. Стерильное растение, стерильный пинцет и скальпель, стерильные листы бумаги, газовая горелка или спиртовка, спирт, маточные растворы для приготовления питательной среды Мурасиге-Скуга, растворы 2,4-Д и 6-БАП, чашки Петри, колбы Эрленмейера на 100 мл, мерный цилиндр, пипетки.

Объяснение. В ответ на ранение паренхимные клетки, расположенные под эпидермисом, дедифференцируются, переходят к делению и образуют недифференцированную ткань, получившую название каллуса. **Каллус** – это неорганизованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных клеток. Основа формирования каллуса – дедифференцировка растительных клеток экспланта, их возврат в меристематическое, пролиферирующее состояние. Для этого должно произойти следующее: 1) модификация тех элементов структуры клетки, которые мешают процессу деления (прежде всего – истончение толстой вторичной клеточной стенки); 2) экспрессия генов, ответственных за процесс митоза. Образование и рост каллуса регулируется ауксинами и цитокининами. Успех получения каллусной ткани в большей мере зависит от удачного подбора регуляторов роста. В настоящее время каллусные культуры индуцируются практически из любого органа и ткани растения.

Ход работы. Работу выполнить в четырех вариантах. Различие вариантов обусловлено содержанием фитогормонов в питательных средах, приготовленных на основе питательной среды Мурасиге-Скуга.

В каждой из четырех колб Эрленмейера приготовить по 50 мл питательной среды Мурасиге-Скуга. В колбу прилить небольшое количество дистиллированной воды и следующие маточные растворы: 5 мл макроэлементов; 0,5 мл микроэлементов; 0,25 мл хелата железа; 1,0 мл витаминов; 5,0 мл мезо-инозита. Затем в каждую колбу внести по 3 г сахарозы. После этого в три колбы добавить следующие регуляторы роста: 1 вариант – 2,4-Д (1 мл/л); 2 вариант – 6-БАП (1мл/л); 3 вариант – 2,4-Д + 6-БАП (по 1 мл/л). В четвертую колбу фитогормоны не добавлять (контроль). Полученные растворы перелить в мерные цилиндры и довести дистиллированной водой объем до 50 мл, pH установить на уровне 5,6–5,8, используя 0,1н. КОН, или 0,1%-ный раствор HCl. Затем добавить агар-агар по 0,4 г на каждый вариант питательной среды. Горлышки колб с питательной средой закрыть колпачками из

фольги, сверху двухслойным кусочком оберточной бумаги и закрепить резинкой, затем стерилизовать в автоклаве.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 8

Регулятор роста, концентрация на 1 л питательной среды	Количество регулятора роста на 50 мл питательной среды
2,4Д 1 мг/л	
ББАП 1 мг/л	

Лабораторная работа 9. ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ РАСТЕНИЯ

Материалы и оборудование: стерильное растение в пробирке, стерильный пинцет и скальпель, стерильная бумага и чашки Петри, спиртовка, спирт, стерильная питательная среда в колбе для получения и культивирования каллуса, парафилм, ножницы, спички.

Объяснение. Образование и рост каллусной ткани контролируются фитогормонами из группы ауксинов и цитокининов. Под действием ауксинов и цитокининов из-за высокой интенсивности клеточных делений не происходит дифференцировка тканей, в результате чего образуется каллус. Для индукции каллусообразования используются питательные среды с высоким соотношением ауксинов к цитокининам (до 10:1).

Каллусную ткань можно получить на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, используя фрагменты самых разных частей растения: стеблей, корней, тканей клубня, листьев, зародышей, пыльцы и других, которые являются эксплантами.

Эксплант – это часть растения, культивируемая на искусственной питательной среде в условиях *in vitro*.

Ход работы. Нагреть стерильную питательную среду на плитке до расплавления агар-агара. Одновременно подготовить ламинарный бокс к работе – протереть внутри спиртом.

Открыть колбу с питательной средой, обжечь горлышко колбы над пламенем и в стерильные чашки Петри разлить питательную среду по 15–30 мл. Чашки Петри держать открытыми минимальное время. Дать питательной среде застыть в течение 10–15 минут.

Пробирку с растением протереть спиртом, горлышко обжечь над пламенем. Пинцетом вынуть стерильное растение из пробирки и вы-

ложить его на стерильную бумагу или чашку Петри. Придерживая растение пинцетом, с помощью скальпеля или ножниц вырезать участки стебля длиной 5–10 мм, листочки, участки корня. Надсечь экспланты острым скальпелем в нескольких местах, в которых в дальнейшем начнется каллусогенез.

Подготовленные экспланты разместить на поверхности застывшей питательной среды, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой. В одну чашку поместить 5–10 эксплантов. Закрыть чашку Петри и заклеить парафином или пищевой пленкой в два слоя. Парафин следует равномерно натягивать для предотвращения разрывов при его усыхании. Поставить чашки Петри в термостат без освещения при температуре +22–25 °С и влажности 70 %. Через три недели рассмотреть, описать и зарисовать образовавшийся каллус.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 9

Рисунок	Характеристика каллуса

Лабораторная работа 10. ПАССИРОВАНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ НА СВЕЖУЮ ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ

Материалы и оборудование: культура каллусной ткани, чашки Петри со стерильной агаризованной питательной средой, стерильные пинцеты, стерильные скальпели, спиртовая или газовая горелка, спички, стерильные чашки Петри, 96%-ный спирт.

Объяснение. Клетки каллусной ткани имеют свой цикл развития и повторяют развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает старение и отмирание. Кривая роста каллусной ткани имеет S-образную форму и включает шесть фаз (рис. 8). Во время 1-й латентной или лаг-фазы увеличения числа или массы клеток не происходит. Клетки в этот период подготавливаются к делениям. Следующая, 2-я фаза логарифмическая или экспоненциального роста – характеризуется наибольшей митотической активностью и увеличением массы каллусной культуры, кроме того, рост происходит с ускорением. 3-я фаза – линейная, в которой скорость роста клеток постоянна. Далее наступает 4-я фаза – замедленно-

го роста, когда митотическая активность клеток резко снижается. В 5-й – стационарной фазе – начинается деградация клеток, однако она еще уравновешивается возрастанием числа клеток за счет их деления. В целом же скорость нарастания клеточной массы равна нулю. После стационарной фазы наступает отмирание (фаза деградация) клеток, во время которой число и масса живых клеток уменьшается. Обычно этот процесс сопровождается потемнением тканей каллуса. Старение клеток каллуса обусловлено не только естественной цикличностью в развитии клеток и тканей, но и изменениями, происходящими в составе питательной среды (расходование питательных веществ, выделение каллусом метаболитов, в том числе токсичных). Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания каллусных клеток, первичный каллус, возникающий на эксплантах, через 4–6 недель переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют *пассированием*. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет. Однако при многократном его повторении возможно «привыкание», которое выражается в приобретении автономности по отношению к экзогенным гормонам и утрате, или значительному ослаблению способности каллусных клеток к регенерации целого растения.

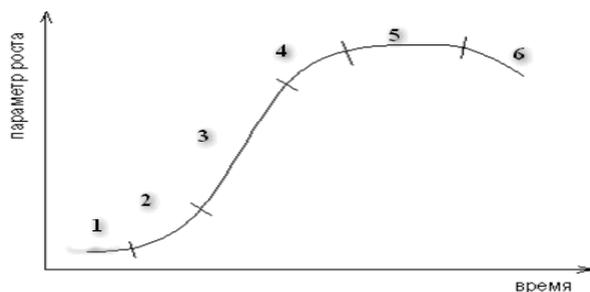


Рис. 8. S-образная кривая роста каллусной ткани:
 1 – латентная фаза (видимый рост не наблюдается);
 2 – экспоненциальная фаза (рост с ускорением);
 3 – линейная фаза (скорость роста постоянна);
 4 – фаза замедленного роста;
 5 – стационарная фаза;
 6 – фаза деградации клеток

Ход работы. Перенести, соблюдая строгую стерильность, каллус в стерильную чашку Петри. Отделить некротизированные участки и кусочки старой агаризованной питательной среды. Затем каллусную ткань разделить на равные части и асептически поместить в чашки Петри со стерильной питательной средой. Чашки Петри поставить в термостат с температурой 25 °С и влажностью 60 % на 3–4 недели. В конце этого срока рассмотреть, описать и зарисовать каллусную ткань.

По результатам лабораторной работы оформите отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 10

Рисунок	Описание каллуса

Лабораторная работа 11. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ (ЭМБРИОКУЛЬТУРА)

Материалы и оборудование: набухшие зерновки озимой ржи или другой (замачиваются в воде в течение 24 ч до проведения работ), про- автоклавированные пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга, стерильная бумага, хлорамин, дистиллированная вода, стерильный стаканчик, скальпель, пинцеты.

Объяснение. Эмбриокультура представляет собой культуру изолированных зиготических зародышей и имеет ряд достоинств:

1) получение клонов растений-перекрестноопылителей с эффективной системой самонесовместимости. В дальнейшем часть растений клона можно хранить при низкой температуре (0...+2 °С), а часть испытывать на общую комбинационную способность с перспективой создания синтетических популяций;

2) преодоление постгамной (после оплодотворения) несовместимости, проявляющейся как несовместимость зародыша и эндосперма при отдаленной гибридизации;

3) устранение влияния эндосперма на проявление генетического потенциала зародыша.

Ход работы. Приготовить на магнитной мешалке 3%-ный раствор хлорамина. В раствор поместить набухшие зерновки. Время стерилизации – 30 минут при постоянном перемешивании.

Последующие манипуляции проводить в условиях ламинарного бокса. Семена промыть 3 раза автоклавированной дистиллированной водой в стерильном стаканчике.

На стерильном листе бумаги или чашке Петри, придерживая зерновку, выделить зародыш, надавливая скальпелем в зоне щитка.

После этого зародыш необходимо поместить в пробирку с питательной средой. Пробирки с эксплантами перенести в культуральную комнату и культивировать при температуре +20–24 °С, освещенности 2000–4000 лк и 16-часовом фотопериоде.

Через 7, 14, 21 день отметить количество регенерировавших зародышей.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 11

День	Количество регенерировавших зародышей	Примечание
7		
14		
21		

Лабораторная работа 12. ВЫЧЛЕНЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ РАСТЕНИЙ

Материалы и оборудование: клубни картофеля с ростками или зубчики чеснока, бинокулярная лупа, скальпели, препаровальные иглы, лезвия в держателях, пробирки со стерильной питательной средой.

Объяснение. Культура изолированных апикальных меристем используется для получения свободного от вирусов посадочного материала. Метод основан на том, что апикальная меристема, представляющая собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1мм (100 мкм) и шириной 0,25 мм, обычно свободна от вирусов (рис. 9).



Рис. 9. Расположение апикальных меристем в растении

Поскольку меристему бывает трудно вычлениить без повреждения, часто ее отделяют с 1–2 листовыми примордиями (апексы размером 100–250 мкм). Для повышения эффективности оздоровления ратений применяют сочетание метода верхушечной меристемы с термо- и химиотерапией. Тепловая обработка вызывает инактивацию вирусов, химические вещества ингибируют их развитие. Выращенные из апикальных меристем безвирусные растения могут быть размножены и высажены в теплицы для получения безвирусных побегов, клубней, луковиц. Для ускоренного размножения оздоровленного посадочного материала, например, картофеля, используются также микроклубни, образующиеся на безвирусных растениях в условиях *in vitro*.

Ход работы. Приготовить модифицированную питательную среду для культивирования апикальных меристем растений (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Модифицированная питательная среда
Мурасиге-Скуга (МС)

Компоненты питательной среды, мг/л			
Минеральные компоненты	МС*	ГК	
Сахароза	20000	Никотиновая кислота	2
Глюкоза	20000	Фолиевая кислота	0,5
Гидролизат казеина	10000	Кинетин	0,5
Мезо-инозит	100	Пантотенат Са	10
Тиамин	1	Рибофлавин	0,5
Пиридоксин	1	Биотин	1
Аденин	40	Активированный уголь	10000
Витамин В ₁₂	0,015	Агар-агар	7000
РН 5,7–5,8			

*По прописи Мурасиге-Скуга.

Работы по вычленению проводить в простерилизованном с помощью бактерицидных ламп ламинарном боксе. Рабочее место (стол, бинокулярная лупа) и штативы с пробирками протереть спиртом. Инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) стерилизовать перед каждым использованием, погружая в спирт, с последующим обжиганием над пламенем.

Использовать для вычленения апикальных меристем ростки картофеля, полученные в результате проращивания клубней в темноте в течение 30–45 дней при температуре +20–22 °С или зубчики чеснока, очищенные от наружных чешуй. Вначале их следует простерилизовать, опустив в химический стакан с 5%-ным раствором гипохлорита

кальция или натрия на 3–5 мин. Затем не менее 3 раз промыть стерильной водой, поместить в стерильную чашку Петри и добавить несколько капель автоклавированной воды для предупреждения подсыхания. Перед вычленением с помощью препаровальной иглы под бинокулярным микроскопом с верхушки ростка удалить покровные листочки, последовательно обнажая меристему с примордиальными листочками. Меристему размером 100–250 мкм отделить тонкой иглой, зажатой в цанговый держатель. Каждую операцию проводить отдельным простерилизованным инструментом. Меристему на острие иглы перенести на поверхность питательной среды в пробирку, которую закрыть пробкой над пламенем горелки. Штатив с пробирками поместить в культуральную комнату.

Через 2, 3, 4 недели последовательно наблюдать за развитием из меристем побега.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 12

Количество высаженных меристем, шт.	Количество образовавшихся растений-регенерантов, шт.	Примечание

Лабораторная работа 13. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ ЧЕРЕНКОВАНИЕМ ПОБЕГОВ

Материалы и оборудование: пробирочные растения картофеля, пробирки со стерильной питательной средой Мурасиге-Скуга, стерильные скальпели, пинцеты, чашки Петри, стерильные листы бумаги.

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

Ход работы. В ламинарном боксе пробирочное растение картофеля вынуть из пробирки, поместить в чашку Петри, разрезать на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой), часть стебля над листом при этом должна быть в 2–3 раза меньше, чем часть ниже листа. Необходимо соблюдать строгую стерильность. Черенки высадить на питательную среду Мурагиге-Скуга в пробирки. Для предотвращения попадания микроорганизмов следует обжечь горлышко пробирки и ватную пробку в пламени спиртовки или газовой горелки. Пробирки с черенками поставить в культуральную комнату. Наблюдать за развитием побега через 7 и 14 дней.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 13

Номер черенка	День наблюдения	Высота растения-регенеранта, см	Количество листьев, шт.	Примечание

Лабораторная работа 14. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ПЛОДОВЫХ, ЯГОДНЫХ И ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ

Материалы и оборудование: однолетние побеги плодовых или декоративных растений, гипохлорит кальция, твин-20, стерильная вода и стаканчики, стерильные листы бумаги, магнитная мешалка, ламинар и оборудование, необходимое для работы со стерильной культурой, питательные среды в пробирках.

Объяснение. Микроклональное размножение – это разновидность вегетативного размножения, осуществляемого в культуре *in vitro*. В настоящее время большое число видов растений выращивается в условиях *in vitro* по следующим соображениям:

- для поддержания и размножения небольшого числа ценных генотипов;
- для ускоренного размножения новых ценных сортов плодовых и декоративных растений;
- для получения большого количества оздоровленного посадочного материала;
- для быстрого размножения некоторых гетерозиготных садовых образцов, обычно размножаемых семенами;

- для получения из клонированных родительских форм семян гибридов F_1 .

Ход работы. С маточных растений заготовить активно растущие побеги длиной 5–10 см и перенести в лабораторию. Все листья удалить. Для стерилизации использовать 3–9%-ный (в зависимости от чистоты материала) раствор гипохлорита кальция. Для лучшего смачивания тканей экспланта стерилизующим раствором следует использовать детергент Твин-20 (1 капля на каждые 50 мл раствора).

В 200–250 мл стерилизующего раствора поместить экспланты и перемешать на магнитной мешалке в течение 20–30 минут. В условиях ламинарного бокса экспланты отмыть в стерильной воде 3–4 раза для удаления остатков антисептика. С помощью пинцета экспланты по 2–5 шт. поместить на стерильный лист бумаги или в чашку Петри, после чего с помощью скальпеля удалить 0,5–1,0 см поврежденной ткани. Побеги разрезать на экспланты длиной 2–4 см и поместить на питательную среду (табл. 6). Для культивирования на первом этапе микро-размножения использовать только пробирки, поскольку в этом случае удастся избежать перезаражения эксплантов. Культивирование эксплантов осуществлять в культуральной комнате при длине светового дня 16 часов, освещенности 1000–4000 люкс, температуре +25–27 °С в течение 3–4 недель. После окончания культивирования инфицированные экспланты удалить, оставшиеся использовать для переноса на второй этап. Как правило, после прохождения первого этапа из пазушных почек и непосредственно из каллуса, который часто образуется в нижней части экспланта, формируются пазушные и придаточные (адвентивные) побеги, которые используют как экспланты для переноса на второй этап. Культивирование на втором этапе осуществлять в банках или колбах объемом 300–500 мл. В течение культивирования на втором этапе (6–8 недель) экспланты формируют новые побеги, которые, в свою очередь, могут быть использованы для размножения (пересадка на второй или последующие пассажи) или для укоренения.

Укоренение микропобегов осуществляется на питательной среде с ауксинами. Для укоренения использовать микропобеги длиной 2 см и более, которые помещаются вертикально на агаризованную питательную среду. В течение 3–4 недель в нижней части микропобегов формируется каллус, из него образуются первичные корешки. Акклиматизацию микрорастений осуществлять в смеси торфа (рН 5,5–6,0) с песком или перлитом в соотношении 3:1 с использованием туманообразующей установки или в теплице. В случае появления очагов инфек-

ции на растениях или субстрате следует произвести обработку раствором фунгицида. После прохождения периода адаптации и укоренения *ex vitro* (3–4 недели) микрорастения пикируют в горшки с субстратом и дорастивают в пленочной теплице до реализации или высадки в открытый грунт.

Т а б л и ц а 6. Составы искусственных питательных сред

№ п/п	Компоненты	Объемы смеси, мл			
		1000	500	200	100
1	2	3	4	5	6
Для микроразмножения герберы					
1	Макросоли МС	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
2	Микросоли МС	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
3	Fe-хелат	5 мл	2,5 мл	1 мл	0,5 мл
4	Витамины	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
5	Мезо-инозит	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
6	Аденин	20 мл	10 мл	4 мл	2 мл
7	Кинетин	3 мл	1,5 мл	0,6 мл	0,3 мл
8	ИУК	0,1 мл	0,05 мл	0,02 мл	0,01 мл
9	Сахароза	30 г	15 г	6 г	3 г
10	pH	5,8	5,8	5,8	5,8
11	Агар	7 г	3,5 г	1,4 г	0,7 г
Для микроразмножения фукуса Бенджамина					
1	Макросоли МС	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
2	Микросоли МС	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
3	Fe-хелат	5 мл	2,5 мл	1 мл	0,5 мл
4	Витамины	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
5	Мезо-инозит	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
6	2 ip	5 мл	2,5 мл	1 мл	0,5 мл
7	Сахароза	30 г	15 г	6 г	3 г
8	pH	5,6	5,6	5,6	5,6
9	Агар	7 г	3,5 г	1,4 г	0,7 г
Для микроразмножения лилий					
1	Макросоли МС	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
2	Микросоли МС	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
3	Fe-хелат	5 мл	2,5 мл	1 мл	0,5 мл
4	Витамины	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
5	Мезо-инозит	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
6	НУК	0,5 мл	0,25 мл	0,1 мл	0,05 мл
7	Сахароза	60 г	30 г	12 г	6 г
8	pH	5,8	5,8	5,8	5,8
9	Агар	7 г	3,5 г	1,4 г	0,7 г

В отдельных случаях укоренение микропобегов может осуществляться в нестерильных условиях. В качестве вещества, индуцирующего ризогенез, использовать ростовую пудру на основе ИУК или ИМК. Микропобеги размером 2 см и более отделить друг от друга, и поместить в емкость с водой для предотвращения подсыхания. Затем нижний конец каждого обработать ростовой пудрой и побеги поместить в субстрат для укоренения. Укоренение происходит через 2–3 недели, если температура поддерживается в пределах +25–27 °С, освещенность – 2000–3000 люкс, при 100% влажности воздуха. Через 8–10 недель после постановки на укоренение микрорастения готовы для пикировки.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 14

Вид	Этап	Количество эксплантов / растений-регенерантов, шт.	Примечание

Лабораторная работа 15. ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ДНК-АНАЛИЗА РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Материалы и оборудование: центрифуга для микропробирок, вортекс, автоматические микропипетки-дозаторы со сменными накопечниками на 200 и 1000 мкл, пластиковые пробирки объемом 1,5 мл (количество образцов × 2), штативы для пробирок, бумажные салфетки или полотенце, ступки и пестики для растирания растительного материала, зеленые части растений.

Растворы

- Буфер для экстракции: на 100 мл буфера (10.0 мл 1М трис-НСl ($C_4H_{12}ClNO_3$) рН 8,0, 10 мл 0.5 М ЭДТА ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), 12.5 10 % SDS (лаурилсульфат натрия $Na C_{12}H_{25}SO_4$), доводим до 100 мл дистиллированной водой, рН 7,5–8,0, в конце добавляем 0,38 г *Sodiumbisulfite* (Na_2HSO_3).

- Хлороформ ($CHCl_3$).

- 96 % и 70 % этиловый спирт (C_2H_5OH).

- ТЕ: 10 мМ трис-НСl, рН 8.0, 1 мМ ЭДТА или дистиллированная вода.

Объяснение. Разработка и применение методов анализа ДНК позволили отбирать материал с точной наследственной детерминацией интересующих признаков, т. е. проводить **ДНК-типирование** образцов на наличие селекционно-ценных генов с помощью ДНК-маркеров. Это стало возможным благодаря определению молекулярной основы таких генов. Геном ряда основных сельскохозяйственных культур полностью расшифрован (секвенирован). Данные достижения позволили значительно повысить эффективность селекционного процесса посредством **маркер-сопутствующего отбора**, позволяющего осуществить отбор по признаку на основании маркера, ассоциированного с генотипом, а не фенотипа признака непосредственно. **Генетический маркер** – это короткая последовательность ДНК (как правило до 1000 п.н.), тесно связанная с локусом-мишенью (интересуемым участком ДНК). Для синтеза маркируемого участка проводят ПЦР с использованием 1–2 праймеров – коротких последовательностей ДНК (около 30 п.н.). Преимуществами ДНК маркеров при отборе являются: оценка большого объема материала на ранних этапах развития; возможность отбора по признакам, которые проявляются фенотипически только в определенных условиях (например, на искусственных инфекционных фонах); подбор пар для гибридизации с точно установленным наличием аллелей ценных генов, что существенно сокращает селекционный процесс и повышает его эффективность.

ДНК-типирование образцов на наличие определенных фрагментов проводят в четыре или пять (в случае использования CAPS-маркеров) этапов:

- 1) подготовка проб (растительного материала) для выделения ДНК;
- 2) выделение и очистка препаратов ДНК, включающая:
 - а) собственно выделение и очистку препаратов ДНК;
 - б) определение качества очистки ДНК и содержания (концентрации) ДНК в препарате;
- 3) проведение ПЦР со специфическими праймерами;
- 4) анализ амплифицируемых фрагментов ДНК: горизонтальный или вертикальный электрофорез продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном гелях и визуализация продуктов амплификации с помощью трансиллюминатора (системы гель-документирования).

При использовании для идентификации генов CAPS-маркеров добавляется пятый этап, включающий обработку продуктов амплифика-

ции соответствующими рестриктазами, после которой повторно проводится этап 4.

Для проведения работ желательно создание в лаборатории трех рабочих зон:

- 1) зона выделения и очистки ДНК;
- 2) зона подготовки проб для амплификации и рестрикции и проведения ПЦР и рестрикции;
- 3) зона приготовления агарозных гелей, проведения электрофореза и визуализации продуктов амплификации (ампликонов) после электрофореза.

Возможно размещение нескольких зон в одной комнате, например, подготовка проб, выделение ДНК, амплификация и рестрикция ДНК, могут проводиться в одном помещении. Для этапа выделения и очистки ДНК в помещении необходимы вытяжной шкаф, холодильник с хранящимися реактивами, электронные весы, термобокс или термостат (их может заменить водяная баня), центрифуга, вортекс (вихревой смеситель). Если требуемые растворы готовятся здесь же, то важно иметь оборудование для их приготовления: дистиллятор, магнитные мешалки с функцией подогрева, pH-метр. Для амплификации необходим термоциклер (амплификатор), желательно наличие специального ПЦР-бокса для подготовки амплифицируемых проб ДНК и вытяжного шкафа с центрифугами (рис. 10–12).



Рис. 10. Зона для выделения ДНК и амплификации



Рис. 11. Амплификаторы для проведения полимеразной цепной реакции



Рис. 12. Вытяжной шкаф с центрифугами

Для выделения ДНК лучше использовать ткани свежих листьев или проростки, сформировавшие необходимую массу (световые или темновые). Возможно хранить растительный материал в холодильнике при температуре +4 °С в течение 2–3 дней. Можно также использовать

замороженный и хранившийся в течение нескольких месяцев при температуре -20°C материал. При использовании пробирочных растений для выделения ДНК лучше брать только листочки и верхушечную почку, поэтому требуется 3–5 пробирочных растений. На одну пробу берут 70–100 мг тщательно промытого растительного материала.

В настоящее время существует множество методов выделения ДНК из растительной ткани. Рядом фирм выпускаются наборы для выделения ДНК. При выборе метода выделения ДНК, учитываются цели анализа, а также стоимость и трудоемкость метода.

В целом, методы выделения ДНК включают в себя гомогенизацию анализируемого материала, инкубирование с соответствующими буферами, отделение раствора ДНК от примесей, осаждение ДНК из раствора, отмывку и растворение ДНК в буфере пригодном для проведения ПЦР-анализа.

При отсутствии готовых наборов можно использовать методику, описанную *Plaschke* и др. с модификациями.

Ход работы.

1. Разрушение тканей и лизис клеток

Для выделения ДНК взять листья индивидуальных образцов, например, томата весом 70–80 мг (рис. 13, 14).



Рис. 13. Индивидуальные образцы растений томата



Рис. 14. Навеска растительного материала

Для выделения и очистки ДНК требуется два набора пробирок для центрифугирования типа «*Eppendorf*». Перед работой необходимое количество пробирок для каждого из наборов расставить в штативах и

подписать в соответствии с принятой для материала маркировкой перманентными маркерами сбоку пробирок и на крышечках. Растительный материал измельчить в присутствии жидкого азота, суспензировать в экстракционном буфере (рис. 15, 16). При отсутствии жидкого азота небольшое количество проб можно измельчить механически в специальных ступках при помощи пестиков с добавлением 500 мкл экстракционного буфера. Материал перенести в пробирки (аккуратно пестиком или стеклянной палочкой) объемом 1,5 мл и инкубировать 45 минут при +65 °С в термостате (*Thermo block heating thermostat TDB-120*) (рис. 17).



Рис. 15. Измельчение материала с применением жидкого азота



Рис. 16. Измельченный материал с экстракционным буфером



Рис. 17. Подготовленный в пробирках материал для инкубирования

2. Отделение раствора ДНК от примесей.

После инкубирования в пробирки при помощи пипетмана и сменного наконечника на 1000 мкл добавить по 600 мкл хлороформа (приблизительно 1v содержимого пробирки: 1v хлороформа), не касаясь стенок пробирок и тщательно перемешивать в течение 5–10 минут на специальном встряхивателе или вручную в закрытой подставке, переворачивая вверх и вниз. Пробирки поместить равномерно в центрифугу (рис. 18) и центрифугировать при оборотах 10000 в течение 15 минут. Осторожно вынуть пробирки в штатив и перенести из них верхнюю прозрачную фракцию в новые пробирки (рис. 19). Перенос осуществляется пипетманами с наконечниками 200 мкл (приблизительно 2 раза по 150 мкл), меняя наконечник для каждого образца.



Рис. 18. Равномерное размещение пробирок в центрифуге



Рис. 19. Перенос фазы с растворенной ДНК в новые пробирки

3. Собственно выделение и очистка препаратов ДНК.

Для осаждения ДНК из раствора добавить в выделенную фазу 800 мкл ледяного 96 % этилового спирта (хранящегося в морозильнике при -20°C). Дать постоять. Не трясги. Через 5–7 минут медленно аккуратно поворачивают пробирку, не разбивая связавшийся комплекс (для лучшего осаждения можно поставить пробирки в холодильник на 10–15 минут). После связывания ДНК пробирки центрифугируют 10 минут при 3000 оборотах в минуту. Аккуратно слить остатки раствора и переворачивать пробирку на чистую салфетку для удаления капель (рис. 20). ДНК при этом остается на дне или стенке пробирки.

Затем ДНК промыть в 70%-ном этиловом спирте, добавляя по 400 мкл в каждую пробирку. После добавления содержимое пробирки хорошо перемешать на вортексе (рис. 21) до образования однородной суспензии, после чего центрифугировать 2–3 минуты при 3000 оборотах в минуту и отмывочный раствор аккуратно слить. Процедуру можно повторить дважды. ДНК подсушить в открытых пробирках (для испарения остатков спирта) и добавить по 100 мкл бидистиллированной воды.



Рис. 20. Удаление остаточного количества промывочного раствора



Рис. 21. Перемешивание раствора на вортексе

4. Определение чистоты и концентрации ДНК.

Концентрацию ДНК в образце определить на спектрофотометре. Оптическая плотность раствора ДНК $D = 1A$ соответствует приблизительно 50 мкг/мл. Чистоту определяют по коэффициенту экстинкции, показывающему соотношение поглощенного света с длинами волн 260/280 нм в растворе ДНК. Чистые препараты имеют его значение не менее 1.67. Концентрированные растворы ДНК хранить при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. При длительном хранении для определенных целей применяют методы криосохранения. Для проведения ПЦР готовят разбавленный раствор ДНК с концентрацией 30–100 нг/мкл.

Полимеразная цепная реакция.

Для проведения ПЦР приготовить реакционную смесь, которая включает: препараты ДНК, праймеры, нуклеотидтрифосфаты, полимеразу, реакционный буфер. В зависимости от типа полимеразы, праймеров реакционный буфер может быть различным. Основными его компонентами являются Трис-*HCl*, *KCl*, *MgCl₂*. Каждый из компонентов влияет на ход ПЦР и имеет свою оптимальную концентрацию. Современные компании по производству реагентов и материалов для молекулярной биологии предлагают широкий выбор указанных компонентов. Оптимальные количества компонентов реакционной смеси могут быть рассчитаны с помощью компьютерной программы «ПЦР-калькулятор». Смесь компонентов за исключением ДНК называется премиксом. Премикс готовят непосредственно перед амплификацией, смешивая компоненты в определенном порядке: бидистиллированная вода, реакционный буфер, нуклеотидфосфаты, праймер (праймеры), полимеразы.

Для подготовки исследуемого материала в каждую пробирку разнести ДНК и добавить премикс (рис. 22). После завершения амплификации полученные продукты хранить в холодильнике или морозильнике.

ПЦР проводить на приборе – термоциклере (амплификаторе) в специальных тонкостенных полипропиленовых пробирках, совместимых по размеру с амплификатором. Прибор контролирует температурные и временные характеристики этапов ПЦР. Общий вид программы ПЦР на амплификаторе представлен на рис. 23. Состоит из следующих этапов:

1. Первичная длительная денатурация ДНК.
- 2–4. Быстрая денатурация ДНК. Отжиг праймеров. Элонгация в течение 30–45 циклов.
- 5–6. Длительная элонгация. Охлаждение реакционной смеси.

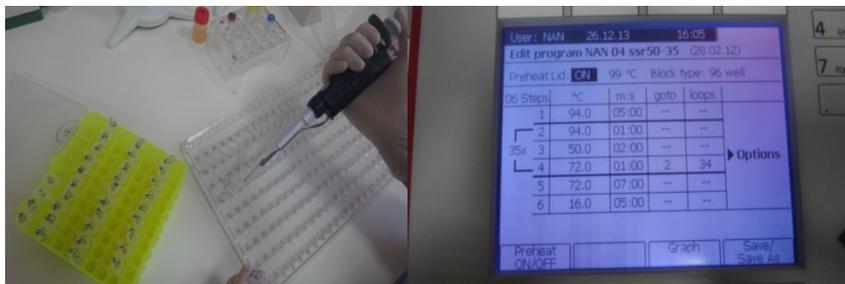


Рис. 22. Внесение ДНК в ПЦР пробирки

Рис. 23. Общий вид программы ПЦР на амплификаторе

Каждый цикл ПЦР состоит из трех этапов: денатурация, отжиг, элонгация. *Денатурация* – раскручивание двухцепочечной молекулы ДНК на две одноцепочечные. *Отжиг* – присоединение праймеров к комплементарным участкам молекулы ДНК. *Элонгация* – достраивание комплементарной цепи маркируемого участка с помощью ДНК-полимеразы. В ходе каждого цикла реакции из исходного участка молекулы образуется две копии, каждая из них может служить матрицей для синтеза новых копий в следующем цикле, в результате чего возрастание количества ампликона (копируемого участка) идет в геометрической прогрессии.

Анализ амплифицируемых фрагментов ДНК.

Основной метод анализа типизируемых фрагментов ДНК – электрофоретическое разделение продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном геле.

Горизонтальный электрофорез (анализ в агарозном геле).

Для анализа используют специальные камеры, в которых гелевая пластинка помещается в раствор горизонтально. Силы электрического поля, создаваемые в камере, заставляют внесенные в гель фрагменты ДНК мигрировать через него. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

Заливочный раствор – Трис-ЭДТА-Боратный (ТВЕ) или Трис-ЭДТА-Ацетатный буфер (ТАЕ). Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул.

кул ДНК под действием приложенного электрического поля. На выбранном растворе готовят гель с использованием агарозы (0,8–2 %) и добавлением этидиум бромида. Для получения гелевой пластинки используют специальные заливочные столики (рис. 24), где при помощи гребенок создаются отверстия для амплифицированной ДНК. Застывшие гели помещают в раствор в электрофоретической камере (рис. 25). На специальных пластиковых плашках готовят смесь ампликонов и красителя (рис. 26, 27). Краситель необходим для визуализации разделяемых продуктов в процессе электрофореза, а также для удобства внесения ДНК в гель (рис. 28, 29). При определении размера фрагментов в отдельные лунки геля добавляют маркер молекулярного веса – стандартные смеси фрагментов ДНК с точно установленными размерами.



Рис. 24. Заливочный столик с гребенками для агарозного геля

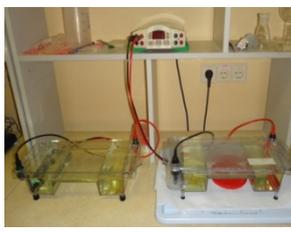


Рис. 25. Камеры для горизонтального электрофореза



Рис. 26. Подготовка продуктов амплификации для внесения в гель

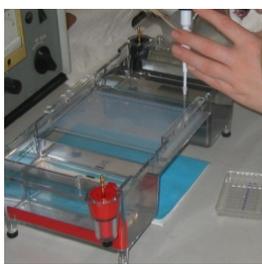


Рис. 27. Внесение подготовленного ампликона в гель

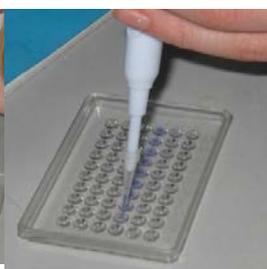


Рис. 28. Добавление красителя к амплифицированной ДНК



Рис. 29. Перенос геля в трансиллюминатор Gel Doc 2000

Агарозные гели фотодокументируют с помощью трансиллюминатора и системы геледокументирования (рис. 30). Трансиллюминаторы предназначены для просмотра гелей в видимом и УФ-диапазоне. Особым образом обработанные УФ-фильтры и специальные рефлекторные мембраны внутри трансиллюминатора позволяют создать в области просмотрочного экрана равномерное интенсивное излучение с заданной длиной волны. При экспозиции в ультрафиолетовом свете комплекс «ДНК-этидиум бромид» флуоресцирует, образуя яркие полосы для определенных фрагментов ДНК в геле. Полученные изображения документируются и анализируются (рис. 31).



Рис. 30. Трансиллюминатор Gel Doc 2000 и система геледокументирования

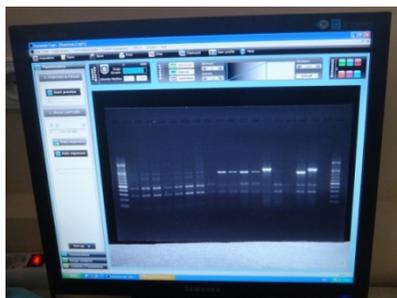


Рис. 31. Изображение флуоресцирующих полос в геле

Электрофорез в агарозном геле не позволяет увидеть разницу между амплифицируемыми фрагментами в 1–10 пар нуклеотидов, для этого используют полиакриламидный гель. Различия между фрагментами даже в 1–2 пары нуклеотидов четко выявляют современные генетические анализаторы (рис. 32, 33). При проведении амплификации используют праймеры, один из которых имеет флуоресцентную метку.

При анализе на автоматическом секвенаторе *Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500* амплификации также были идентифицированы формы с нормальным и мутантным аллелями гена *nor*.



Рис. 32. Автоматический секвенатор Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500



Рис. 33. Программа для генетического анализа

При амплификации с данной парой праймеров у линии с нормальным аллелем Мо 948 и линия 19/1 получены продукты амплификации размером 161 п.н., у образца Мо 950 фрагмент длиной 159 п.н. (рис. 34).

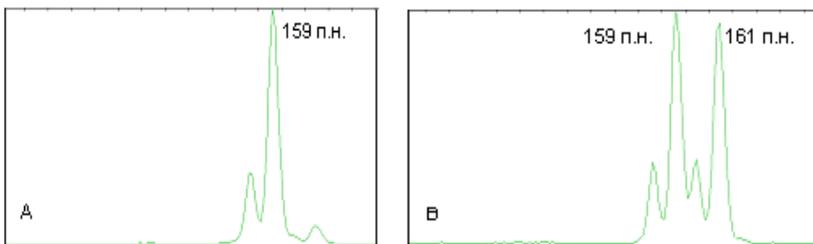


Рис. 34. Результаты фрагментного анализа растений Бония x Мо 948: А – двойная гомозигота по *por*/*por*; В – гетерозигота по *por*⁺/*por*

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 15

Этап ДНК анализа	Описание	Применяемое оборудование	Примечание

Лабораторная работа 16. ПРИМЕНЕНИЕ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Материалы и оборудование: термостат, термостатируемая качалка, ламинар-бокс, стерильные пробирки с жидкой средой *YEP* с селективными антибиотиками (2 шт.), чашки Петри с бактериальными колониями, бактериальная петля, спиртовка, вата, спички, фарфоровый стакан, этанол (96 и 70 %), лента лабораторная *Parafilm*, маркеры.

Объяснение. *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) – грамотрицательная, облигатно аэробная палочковидная почвенная бактерия рода *Agrobacterium*.

Условия культивирования и использования агробактерий. *A. tumefaciens* оптимально растет при температуре +28 °С. Время удвоения может варьироваться от 2,5 до 4 часов в зависимости от условий среды, формата культивирования и уровня аэрации. При температуре выше +30 °С *A. tumefaciens* начинает испытывать тепловой шок, который приводит к ошибкам в делении клеток.

При культивировании *in vitro* клетки опухоли могут расти в отсутствие гормонов, необходимых для роста нормальных растительных клеток. Известно, что опухолевый рост связан с более высокими уровнями ауксинов и цитокининов, детектируемых в клетках корончатых галлов. Кроме того, было показано, что если после заражения все агробактерии инактивировать добавлением антибиотика, то клетки корончатых галлов сохраняют способность к неограниченному и неконтролируемому росту в месте заражения. Если фрагмент опухолевой ткани, не содержащей агробактерий, привить на незараженное растение, то в месте прививки также развивается опухоль, т. е. присутствие агробактерии необходимо только для индуцирования образования опухоли. Помимо повышенного синтеза фитогормонов, опухолевые клетки начинают синтезировать необычные для растения соединения – опины (производные аминокислоты аргинина), которые используются агробактериями в качестве источника азота и углерода. Агробактерии сами синтезировать опины не могут, так как промежуточные продукты синтеза ингибируют рост бактериальной клетки и используют растительные клетки как «фабрики» по производству опинов.

Эффективность агробактериальной трансформации зависит от многих факторов. При использовании любых методов агробактериальной трансформации большое значение имеют температура, при которой производилась трансформация, состав питательной среды для иноку-

ляции, концентрация бактериальных клеток, использование индукторов генов вирулентности, штамм агробактерий, тип векторной конструкции и генотип растения.

Температурный диапазон, подходящий для агробактериальной трансформации, ограничивается чувствительностью к температуре белков, участвующих в переносе Т-ДНК. Влияние температуры на эффективность агробактериальной трансформации изучалось в условиях культуры растительных клеток. При этом температуры ниже +15 °С и выше +29 °С наиболее критичны для трансформации *in vitro*. Температура, при которой проводят инокуляцию агробактериями, обычно колеблется от +22 до +26 °С.

Обычно для трансформации используют молодые бактериальные культуры, полученные после выращивания в жидкой среде до стационарной фазы (в течение 8–12 часов с аэрацией) при температуре +28 °С. Использование агробактериальных клеток, культивируемых на твердых питательных средах, не оказывает существенного влияния на эффективность трансформации, даже если культуры до использования хранились при температуре +4 °С в течение недели. При приготовлении суспензии клеток агробактерий можно использовать среды – *YEP* или *LB*. При этом агробактерии, выращенные на богатой питательной среде, затем можно ресуспендировать просто в воде. После выращивания на богатой среде бактерии собирают центрифугированием, а затем ресуспендируют в инокуляционной среде до плотности суспензии. При использовании суспензий большей или меньшей плотности эффективность трансформации практически не меняется. В то же время для инокуляции растений агробактериями часто используют среду, подходящую для роста растений, например, *MS*.

Ход работы. Приготовить питательную среду *YEP*: NaCl 0,5 г, дрожжевой экстракт 1 г, триптон (или пептон) 1 г, растворить в 100 мл воды. Для агаризованной среды добавить 1,5 г агара. Автоклавировать при 1,2 атм при температуре +127 °С в течение 1 ч.

В условиях ламинарного бокса с помощью стерильной микробиологической петли перенести отдельную бактериальную колонию *A. tumefaciens* со свежей чашки с селективными антибиотиками в пробирку, содержащую 3 мл стерильной жидкой среды *YEP*, содержащей те же антибиотики (выбор антибиотика зависит от штамма бактерий). Агробактерию наращивать в течение 20–48 ч при температуре +28 °С на термостатируемой качалке с круговым вращением (амплитуда 5–10 см и скорость вращения 150–200 об./мин).

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 16

Антибиотик	Описание колоний	Примечание

Лабораторная работа 17. ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЗЕРНОВОГО МИЦЕЛИЯ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Материалы и оборудование: стерильный маточный мицелий Вешенки обыкновенной, стерильные колбы на 500 мл, зерно злаков (овес, пшеница, рожь, ячмень), мел, весы, автоклав, электрическая плитка, ламинарный бокс, стерильные пинцет и скальпель.

Объяснение. Для того чтобы вырастить грибы в искусственных условиях, субстрат необходимо инокулировать (заразить) мицелием. Зерновой мицелий представляет собой мицелий, выращиваемый стерильно на специально подготовленном зерне хлебных злаков. От качества мицелия, представляющего собой посевной материал для производства грибов, зависит их последующий выход. Поэтому мицелий должен соответствовать ряду основных требований: иметь высокую жизнеспособность; устойчивость к болезням и вредителям; принадлежать к отселектированному штамму (сорт), обладающему высокой урожайностью, хорошими товарными свойствами и пр.

По сортовым качествам мицелий классифицируется на три категории: споровый, маточный, коммерческий.

Споровый мицелий получается из спор, заготавливаемых из плодовых тел, соответствующих требованиям данного штамма. Культивируется на агазированной питательной среде с отваром зерна хлебных злаков.

Маточный мицелий получается путем инокуляции стерильного зернового субстрата споровым мицелием.

Коммерческий мицелий используется, как правило, для инокуляции субстрата на основе соломы для выращивания товарных грибов. Получается путем инокуляции стерильного зернового субстрата маточным мицелием в соотношении 1:15–20.

Ход работы. Зерно хлебных злаков 0,5 литра отваривать в небольшом количестве воды в течение 15–30 мин, после чего воду слить. Горячее зерно высыпать на поверхность стола, разравнять тон-

ким слоем для просыхания. Затем зерно засыпать в колбы объемом 0,5 л на 2/3 от полного объема, туда же добавить мел в количестве 0,7 г для оптимизации кислотности зернового субстрата. Колбы закрыть и слегка встряхнуть для перемешивания зерна и мела. Стерилизацию осуществлять в автоклаве при температуре +125 °С в течение 30 мин. После охлаждения, колбы перенести в ламинарный бокс, где производить инокуляцию зернового субстрата маточным мицелием. Расход маточного мицелия 1:15–20. После инокуляции и в процессе культивирования колбы периодически встряхивать для равномерного распределения инокулята по всему объему зерна и поставить на зарастание (культивирование) в термостат. Культивирование осуществлять в течение 10–15 дней при температуре +25 °С до полного зарастания зернового субстрата. После коммерческий мицелий использовать для инокуляции солоmistых субстратов с целью получения товарных грибов.

По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 17

Номер колбы	День культивирования	Описание состояния мицелия

Лабораторная работа 18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Материалы и оборудование: пластиковые емкости объемом 1,5–2 л, чашки Петри, линейки, весы лабораторные аналитические, фарфоровые ложки, металлические шпатели, биопрепараты (биоудобрения, микробные регуляторы роста растений), дистиллированная вода, воздушно-сухая почва, мерные цилиндры, колбы, химические стаканы, маркеры.

Объяснение: Перечень биотехнологических продуктов – микробных препаратов для растениеводства за последние десятилетия значительно расширился и включает препараты, созданные на основе свободноживущих, ассоциативных, симбиотрофных азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий, а также препаратов бинарного действия, получаемых в результате сочетания различных микроорганизмов.

Биологические препараты (удобрения) – это препараты, разрешенные для использования в органическом хозяйстве для получения экологически чистой продукции. Они обладают следующими преимуществами: ускоряют прорастание семян и повышают их всхожесть, улучшают рост растения и развитие корневой системы, увеличивают урожайность и биохимический состав продукции, повышают устойчивость растений к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Среди общих требований к созданию биопрепаратов важны следующие: высокий титр активных клеток, необходимый срок хранения, транспортабельность, технологичность (растворимость, способность удерживаться на семенах и т. д.), а также экономичность их производства.

Ход работы. В стеклянные стаканы поместить по 100 г субстрата (смеси или почвы), субстрат увлажнить до 70 % от полной влагоемкости (и такую влажность поддерживают в течение всего опыта). В каждый сосуд высеять по 20 семян тест-культуры. На 4-е сутки стаканы поместить на световой стеллаж с освещением 16 ч в сутки. В этих условиях тест-культуры выращивают в течение двух недель. Полив тест-культуры осуществлять согласно варианту опыта: 1 вариант – вода, 2, 3, 4 варианты – биологические препараты в концентрациях, рекомендуемых разработчиками.

В процессе опыта провести наблюдения по следующим показателям: время появления всходов и их число на каждые сутки; общая всхожесть (к концу опыта); по окончании опыта растения осторожно вынуть, просушить, стряхнуть остатки почвы и измерить длину надземной части растений, длину корней; взвесить надземные части и корни. Все результаты пересчитать на сосуд или на одно растение. По результатам лабораторной работы оформить отчет.

Форма отчета по лабораторной работе 18

Вариант	Процент – всхожих семян	Проросток		Корни		Особенности растений
		Средняя масса, г	Средняя длина, см	Средняя масса, г	Средняя длина, см	

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Артамонов, В. И. Биотехнология – агропромышленному комплексу / В. И. Артамонов. – Москва: Наука, 1989. – 160 с.
2. Басинская, Е. А. Методические разработки и указания по выполнению лабораторно-практических занятий дисциплины «Биотехнология в растениеводстве» / Е. А. Басинская, Р. К. Янкелевич. – Гродно: ГГАУ, 2002. – 40 с.
3. Бекер, М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис. – Москва: Агропромиздат, 1990.
4. Биотехнология биологически активных веществ: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / под ред. д-ра биол. наук, проф. МГУПП И. М. Грачевой и д-ра техн. наук, проф. МГУПП Л. А. Ивановой. – Москва: Изд-во НПО «Элевар», 2006. – 453 с.
5. Биотехнология. Принципы и применение / пер. с англ.; под ред. И. Хиггинса. – Москва: Мир, 1988. – 480 с.
6. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р. Г. Бутенко – Москва: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 328 с.
7. Бутенко, Р. Г. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Р. Г. Бутенко. – Москва: Наука, 1991.
8. Генетические основы селекции растений. Т4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск: Белорусская наука, 2014. – 653 с.
9. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – Москва: Мир, 1991.
10. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва: Мир, 2002. – 236 с.
11. ДНК-типирование генов качества плодов и устойчивости к болезням томата: методические рекомендации / А. В. Кильчевский [и др.]; Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2016. – 41 с.
12. Егорова, Т. А. 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.
13. Ермишин, А. П. Биотехнология. Биобезопасность. Биозтика / А. П. Ермишин. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 147 с.
14. Биотехнология. Биобезопасность. Биозтика. / А. П. Ермишин [и др.]; под ред. А. П. Ермишина. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 430 с.
15. Ермишин, А. П. Генетически модифицированные организмы: мифы и реальность / А. П. Ермишин. – Минск, 2004. – 118 с.
16. Калашникова, Е. А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева, О. Ю. Миронова. – Москва: Колос, 2006. – 144 с.
17. Картель, Н. А. Генетика: Энциклопедический словарь / Н. А. Картель, Е. Н. Макеева, А. М. Мезенко. – Минск: Тэхналогія, 1999. – 497 с.
18. Картель, Н. А. Фитогормоны и фитопатогенность бактерий / Н. А. Картель, Е. В. Лобанок, В. В. Фомичева. – Минск: Навука і тэхніка, 1994. – 110 с.
19. Картель, Н. А. Биоинженерия: методы и возможности / Н. А. Картель. – Минск: Ураджай, 1989. – 143 с.

20. Картель, Н. А. Биотехнология в растениеводстве / Н. А. Картель, А. В. Кильчевский. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 309 с.
21. Коледа, К. В. Семеноводство картофеля на безвирусной основе: учеб.-метод. пособие / К. В. Коледа. – Гродно: ГГАУ, 2007. – 76 с.
22. Кузнецов, А. Е. Научные основы экобиотехнологии: учеб. пособие / А. Е. Кузнецов, Н. Б. Градова. – Москва: Мир, 2006. – 119 с.
23. Лабораторно-практические занятия по сельскохозяйственной биотехнологии: метод. указания / под ред. В. С. Шевелухи. – Москва: Изд-во МСХА, 1991. – 94 с.
24. Биотехнология – сельскому хозяйству / А. Г. Лобанок [и др.]. – Минск: Ураджай, 1988.
25. Лутова, Л. А. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений / Л. А. Лутова, Т. А. Матвеева. – СПб., 2016. – 168 с.
26. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев [и др.]. – Москва: Агропромиздат, 1990. – 384 с.
27. Никонович, Т. В. Биотехнология в растениеводстве: курс лекций / Т. В. Никонович, А. Н. Иванистов, В. В. Французёнок. – Горки: БГСХА, 2017. – 85 с.
28. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений / Г. С. Муромцев [и др.]. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 383 с.
29. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: методические указания / А. П. Ермишин [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2010. – 60 с.
30. Полевой, В. В. Физиология растений: учебник для биотехнологических специальностей вузов. / В. В. Полевой. – Москва: Высш. шк., 1989. – 464 с.
31. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев [и др.]. – Москва, 1998. – 416 с.
32. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]. – Москва: Высш. шк., 2003. – 467 с.
33. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В. С. Шевелуха, [и др.]; под ред. В. С. Шевелухи. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва: Высш. шк., 2008. – 710 с.
34. Харченко, П. Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П. Н. Харченко, В. И. Глазко. – Москва: Воскресенье, 2006. – 480 с.
35. Шацкий, А. Д. Основы генетической инженерии. Лекция / А. Д. Шацкий, Р. К. Янкелевич. – Минск, 2001. – 51 с.
36. Edwards K., Johnstone C., Thomson C. A. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – P. 1349.
37. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012, vol. 13, article 134. pp.1–11. doi: 10.1186%2F1471-2105-13-134.
38. Изучение полиморфизма генов Мув-факторов на основе сравнительной геномики овощных пасленовых культур (томат, перец, баклажан) для поиска ДНК-маркеров, дифференцирующих образцы по накоплению антоцианов / О. Г. Бабак [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси, 2019. – Т. 63. – № 6. – С. 721–729. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-6-721-729>.
39. Сельскохозяйственная экотоксикология: учеб. пособие / А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2018. – 190 с.
40. Сельскохозяйственная экотоксикология. Лабораторный практикум: учеб. пособие / Т. В. Никонович [и др.]. – Минск, 2018. – 124 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Общие правила работы в лаборатории.....	4
Первая помощь при несчастных случаях	4
Лабораторная работа 1. Устройство биотехнологической лаборатории.....	5
Лабораторная работа 2. Приготовление растворов регуляторов роста	11
Лабораторная работа 3. Определение различий в способе действия регуляторов роста растений на прорастание семян	14
Лабораторная работа 4. Методы стерилизации при работе с культурой изолированных клеток и тканей растений	16
Лабораторная работа 5. Основные компоненты искусственной питательной среды.....	20
Лабораторная работа 6. Приготовление маточных растворов для искусственных питательных сред.....	22
Лабораторная работа 7. Приготовление искусственных питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений	25
Лабораторная работа 8. Культура каллусной ткани	27
Лабораторная работа 9. Получение и культивирование каллусной ткани из различных эксплантов растения.....	28
Лабораторная работа 10. Пассирование каллусной ткани на свежую питательную среду.....	29
Лабораторная работа 11. Культивирование изолированных зародышей (эмбриокультура).....	31
Лабораторная работа 12. Вычленение и культивирование апикальных меристем растений.....	32
Лабораторная работа 13. Микрклональное размножение картофеля черенкованием побегов	34
Лабораторная работа 14. Микрклональное размножение плодовых, ягодных и декоративных растений.....	35
Лабораторная работа 15. Изучение методики проведения ДНК-анализа растительного материала.....	38
Лабораторная работа 16. Применение <i>Agrobacterium tumefaciens</i> для генетической трансформации растительных клеток	50
Лабораторная работа 17. Получение и культивирование зернового мицелия вешенки обыкновенной	52
Лабораторная работа 18. Определение влияния биологических препаратов на рост и развитие растений.....	53
Библиографический список	55

Учебное издание

Никонович Тамара Владимировна
Иванистов Александр Николаевич
Моисеева Мария Олеговна и др.

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Редактор *Е. П. Савчиц*
Технический редактор *Н. Л. Якубовская*

Подписано в печать 13.12.2021. Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Ризография. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 3,48. Уч.-изд. л. 2,57.
Тираж 70 экз. Заказ .

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Свидетельство о ГРИИРПИ № 1/52 от 09.10.2013.
Ул. Мичурина, 13, 213407, г. Горки.

Отпечатано в УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки.