

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБОУ ВО «ИНГУШСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ФИЛИАЛ
ФГБОУ ВО «ИНГУШСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**АГРОИНЖЕНЕРНЫЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА «ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА И ПЕРЕРАБОТКИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ»**

Кафедра «Технология производства и переработки
сельскохозяйственной продукции»

**М.А. Хашагульгова, У.А. Хашагульгов,
Ф.М. Баркинхоева, М.Б. Погоров**

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ
ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ**

(направления подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки
сельскохозяйственной продукции, 35.03.04 Агрономия)

НАЗРАНЬ 2026

УДК 631.147
ББК 65.7.11

Составители:

канд. биол. наук, доцент М.А. Хашагульгова,
канд. с.-х. наук, доцент У.А. Хашагульгов,
ассистент Ф.М. Баркинхоева,
ассистент М.Б. Погоров

Рецензент:

д-р биол. наук, профессор кафедры «Биология» ФГБОУ ВО «Ингушский государственный университет» А.М. Плиева

Методические указания к выполнению лабораторно-практических занятий по дисциплине «Основы биотехнологии» предназначены для бакалавров, обучающихся по направлениям подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции, 35.03.04 Агрономия очной и заочной форм обучения.

Методические указания к выполнению лабораторно-практических занятий рассмотрены и рекомендованы к изданию и использованию в учебном процессе кафедрой «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» (протокол № 6 от 13.02.2026 г.), учебно-методической комиссией агроинженерного факультета (протокол № 2 от 20.02.2026 г.), редакционно-издательским советом ИнГГУ (протокол № 03/26 от 25.03. 2026 г.).

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ингушский государственный университет», 2026.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Лабораторная работа № 1. Изучение методов стерилизации при работе с культурой изолированных клеток и тканей.....	5
Лабораторная работа № 2. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений.....	8
Лабораторная работа № 3. Основные компоненты искусственной питательной среды	14
Лабораторная работа № 4. Способы стерилизации растительных эксплантов.....	16
Лабораторная работа № 5. Культура каллусной ткани.....	18
Лабораторная работа № 6. Вычленение и культивирование апикальных меристем картофеля.....	18
Лабораторная работа № 7. Культивирование изолированных зародышей (эмбриокультура) озимой ржи....	21
Лабораторная работа № 8. Получение каллусной ткани.....	22
Лабораторная работа № 9. Получение и культивирование каллуса из различных эксплантов картофеля.....	24
Лабораторная работа № 10. Пассирование каллусной ткани на свежую питательную среду.....	25
Лабораторная работа № 11. Клональное микроразмножение картофеля черенкованием побегов.....	26
Лабораторная работа № 12. Микроразмножение плодовых, ягодных и декоративных растений.....	27
Лабораторная работа № 13. Приготовление растворов регуляторов роста.....	36
Лабораторная работа № 14. Определение различий в способе действия регуляторов роста растений на прорастание семян озимой пшеницы.....	39
Лабораторная работа № 15. Определение влияния биологических препаратов на рост и развитие растений.....	40
Литература.....	42

ВВЕДЕНИЕ

Новейшая биотехнология (биоинженерия) – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных и микроорганизмов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

В традиционном, классическом смысле биотехнологию можно определить как науку о методах и технологиях производства, транспортировки, хранения и переработки сельскохозяйственной и другой продукции с использованием обычных, нетрансгенных (природных и селекционных) растений, животных и микроорганизмов, в естественных и искусственных условиях.

Высшим достижением новейшей биотехнологии является генетическая трансформация, перенос чужеродных (природных или искусственно созданных) донорских генов в клетки-реципиенты растений, животных и микроорганизмов, получение трансгенных организмов с новыми или усиленными свойствами и признаками. По своим целям и возможностям в перспективе это направление является стратегическим. Оно позволяет решать принципиально новые задачи по созданию растений, животных и микроорганизмов с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, высокой продуктивностью и качеством продукции, по оздоровлению экологической обстановки в природе и всех отраслях производства.

Для достижения этих целей предстоит преодолеть определенные трудности в повышении эффективности генетической трансформации и, прежде всего, в идентификации и клонировании генов, создании их банков, расшифровке механизмов полигенной детерминации признаков и свойств биологических объектов, создании надежных векторных систем и обеспечении высокой устойчивой экспрессии генов. Во многих лабораториях мира с помощью методов генетической инженерии созданы принципиально новые трансгенные растения, животные и микроорганизмы, используемые в коммерческих целях.

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПРИ РАБОТЕ С КУЛЬТУРОЙ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Материалы и оборудование: зерновки озимой пшеницы, чашки Петри (5 шт.) с фильтровальной бумагой, стаканы химические на 100 мл (2 шт.), колба на 1 л с дистиллированной водой, растворы регуляторов роста (ТУР, 2,4-Д, АБК, ГК), пинцеты, скальпели, целлофан, ножницы, бумага фильтровальная, порошок хлорамина.

Пояснения к заданию. 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 ламинар-бокс, инструменты, посуду, растительный материал, питательные среды, ватные пробки и все другие материалы.

Стерилизация ламинар-бокса. Ламинар-боксы предназначены для выполнения различных работ с культурой изолированных клеток и тканей, требующих стерильности. Стерильность обеспечивается с помощью бактериальных фильтров, установленных в ламинар-боксе, через которые нагнетается воздух. За 2 часа до начала работы ламинар-бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре размещают спиртовую или газовую горелки, спички, фарфоровый стакан с 96%-ным спиртом и стерильной водой, 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 марлевой косынкой. Непосредственно перед началом работы в ламинар-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 стерилизацией их заворачивают в оберточную бумагу (у стаканов и колб достаточно обернуть только горлышко).

Затем посуду помещают в сушильный шкаф и прогревают при 160°C в течение 2 часов (с момента установки нужной температуры). За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Температура выше 175°C 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°C) под давлением губителен для

микроорганизмов и их спор. Посуду (стаканы с крышками, чашки Петри, пипетки) заворачивают в фольгу или оберточную бумагу, сверху – в целлофан; верхнюю часть градуированных пипеток закрывают ватой, каждую заворачивают в бумагу. Автоклавировуют под давлением 2 атм 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 140°C. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. Металлические предметы нельзя автоклавировать: под действием пара они ржавеют и тупятся. 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.

Стерилизация материалов. Вату, марлю, ватные пробки, бумажные "матрасики", фильтровальную бумагу, халаты, косынки стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм в течение 25 – 30 мин.

Стерилизация растительного материала. Для стерилизации семян, апексов, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы: сулемы (двухлористая ртуть), диацид, пергидроля (перекись водорода), хлорамина, гипохлорита натрия или кальция.

Диацид 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 прополаскивают в стерильной воде.

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 костяковидные 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, заворачивают в целлофан и автоклавируют при температуре 120°C и давлении 1 атм 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.

Порядок выполнения работы. Простерилизовать инструменты, посуду и растворы регуляторов роста, необходимые для проведения работ по введению в культуру *in vitro* зерновок озимой пшеницы.

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

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

3. Для получения стерильной воды и растворов регуляторов роста налить их в колбы необходимого объема, закрыть ватной пробкой или фольгой, сверху – плотной бумагой. Автоклавируют при давлении 1 атм в течение 20 минут.

4. Отобрать 110 – 120 здоровых семян, промыть их водопроводной и дистиллированной водой.

5. Приготовить стерилизующий (10%-ный) раствор хлорамина путем добавления к 180 мл дистиллированной воды 20 г хлорамина, после чего на магнитной мешалке тщательно перемешать.

6. Семена погрузить в стерилизующий раствор и стерилизовать в течение 30 мин, перемешивая на магнитной мешалке. Все последующие работы выполнять в условиях ламинар-бокса.

7. Семена промыть стерильной водой три раза. В стерильную чашку Петри поместить по 20 семян озимой пшеницы, после чего чашку подписать и при помощи пипетки в нее залить 5 мл соответствующего раствора регулятора роста.

8. Чашки с семенами поместить на проращивание в термостат на 7 дней при температуре 25°C, после чего необходимо проанализировать полученные результаты.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2 **ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ** **КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ** **РАСТЕНИЙ**

Материалы и оборудование: стаканы химические на 250 мл, колбы для хранения маточных растворов, мерные пипетки, цилиндры, весы аналитические и ВЛКТ-500, электроплитка, химреактивы (табл.1).

Пояснения к заданию. 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. Некоторые питательные среды включают гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах рН.

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

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

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

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

Кроме ауксинов и цитокининов, отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту (ГК). Присутствие ГК в среде не является обязательным, но в некоторых случаях она стимулирует рост изолированной ткани, способствует образованию более вытянутых побегов.

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 морских водорослей. Наименьшее количество нежелательных примесей содержит бактериальный агар (Bacto Agar). Обычно к среде добавляют 0,5 – 0,7% агара.

С целью экономии времени растворы макросолей, микросолей, витаминов, фитогормонов готовят концентрированными, что позволяет многократно их использовать. Концентрация растворов макросолей должна быть больше необходимой в 10 – 20 раз, микросолей – в 100 – 1000 раз, витаминов – в 1000 раз. Маточные растворы хранят в холодильнике, причем для хранения витаминов и фитогормонов нужна отрицательная температура.

Для культивирования клеток, тканей и органов тех или иных растений используют питательные среды различного гормонального состава. Наиболее широко применяются среды Мурасиге-Скуга (табл.1), Уайта (табл.2), Гамборга и Эвелеге (B5) (табл.3).

Порядок выполнения работы. Приготовить 100 мл питательной среды Мурасиге-Скуга (МС). Состав питательной среды приведен в табл.1.

Прежде всего необходимо приготовить маточные растворы макро-, микросолей, хелата железа (раствор FeSO_4 и $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 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°C не больше месяца.

Для приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10-кратные навески и растворяют их в 10 мл воды; 1 мл содержит порцию витаминов, необходимую для приготовления 1л питательной среды по прописи Мурасиге-Скуга. Хранят растворы во флакончиках из-под пенициллина в замороженном состоянии.

Т а б л и ц а 1. Среда Мурасиге-Скуга

Компоненты питательной среды, мг/л

NH_4NO_3

1650

KI

0,83

KNO_3

1900

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

27,8

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

440

$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

37,3

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

370

Тиамин - HCl

0,1

KH_2PO_4

170

Пиридоксин HCl

0,5
MnSO₄ · 4H₂O
24.1
Никотиновая кислота
0,5
CoCl₂ · 6H₂O
0,025 Мезоинозит
100
ZnSO₄ · 7H₂O
8,6
Глицин
2,0
CuSO₄ · 5H₂O
0,025
Сахароза
3000
Na₂MoO₄ · 2H₂O
0,25
PH 5,6 - 5,8

Т а б л и ц а 2. Среда Уайта
Компоненты питательной среды, мг/л
Ca(NO₃)₂
200
CuSO₄ · 5H₂O
0,02
MgSO₄
360
ZnSO₄
1,5
Na₂SO₄
200
Na₂MoO₄ · 2H₂O
0,0025
KNO₃
80
KI
0,75
KCl
65
Пиридоксин HCl
0,1
NaH₂PO₄
16,5
Тиамин - HCl

0,1
H₃BO₃
1,5
Никотиновая кислота
0,5
MnSO₄
4,5
Глицин
3,0
Fe₂(SO₄)₃
2,5
Сахароза
2000
РН 5,6 -5,8

Т а б л и ц а 3. Среда Гамборга и Эвелега (B5)

Компоненты питательной среды, мг/л

NaH₂PO₄
150
Na₂ЭДТА. 2H₂O
KNO₃
1500
Na₂MoO₄. 2H₂O
0,25
(NH₄)₂SO₄
134
KI
0,75
MgSO₄. 7H₂O
250
FeSO₄. 7H₂O
28
CaCl₂. 2H₂O
150
Тиамин - HCl
10,0
H₃BO₃
3,0
Пиридоксин HCl
1,0
MgSO₄. 7H₂O
10,0
Никотиновая кислота
1,0
CoCl₂. 6H₂O

0,025 Мезоинозит

100

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,025

2,4-Д

2,0

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2,0

Сахароза

2000

РН 5,8

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

На основе маточных растворов готовят питательную среду МС.

Т а б л и ц а 4. Состав питательной среды Мурасиге-Скуга

Компоненты среды

Маточный раствор, г/л

Количество маточного раствора для приготовления 1л среды, мл

1

2

3

Макросоли, г/л:

100

KNO_3

19,0

NH_4NO_3

16,5

KH_2PO_4

17,0

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3,7

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

4,4

Fe-хелат, г/л:

5

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5,57

$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

7,45
Микросоли, мг на 200 мл:
10
H₃BO₃
124
MnSO₄ · 4H₂O
482
ZnSO
172
KI
16,6
Na₂MoO₄ · 2H₂O
5,0
CuSO₄
0,5
CoCl₂ · 2H₂O
0,5
Витамины, мг на 200 мл:
10
Пиридоксин HCl (B₆)
10
Тиамин - HCl (B₁)
2
Никотиновая кислота (PP)
10

В химический стакан емкостью 250 мл помещают 3 г сахарозы, доливают дистиллированную воду примерно до 30 мл и после растворения сахарозы добавляют 10мл маточного раствора макросолей, 1мл микросолей, 1мл витаминов, 0,5 хелата железа. Доводят в мерном цилиндре объем раствора 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 среду (60 – 70°C) добавляют 0,7 грамма агара и доводят до кипения периодически помешивая.

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 ***ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИСКУССТВЕННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ***

Материалы и оборудование: соли макроэлементов, микроэлементов и витамины.

Пояснения к заданию. 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 фитогормон. Некоторые питательные среды включают гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах рН.

Углеводы являются незаменимыми компонентами питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние 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, опухолевые, содержат активные гидролитические ферменты (амилазу). Они могут расти на средах с растворимым крахмалом.

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

Порядок выполнения 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

Компонент	Физиологическое действие на клеточном уровне
Макроэлементы	
Азот	
Фосфор	
Калий	
Кальций	
Сера	
Магний	
Железо	
Микроэлементы	
Бор	
Цинк	
Медь	
Марганец	
Кобальт	
Йод	
Молибден	
Витамины	
Тиамин (B1)	
Пиридоксин (B6)	
Никотиновая кислота (PP)	

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4 ***СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТОВ***

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

Пояснения к заданию. Целью работы является изучение характера стерилизующих растворов и способов стерилизации растительных эксплантов. Для получения каллусной культуры, пробирочных растений, используют стерильные экспланты. Их в свою очередь получают путем вычленения из растительных объектов.

Растительные объекты перед стерилизацией тщательно отмывают проточной водой, иногда с моющими средствами, очищают от излишних тканей.

С корнеплодов снимают кожуру, с побегов и корней – кору, с почек – почечные чешуи; промывают дистиллированной водой и помещают на несколько секунд в 70 % спирт (семена на одну – две минуты). После этого сегменты корней, побегов, стеблей, клубней или семена переносят в стерилизующий раствор.

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

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

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

Гипохлорит натрия используется в виде 0,5–5% раствора для обработки любых эксплантов в течение 1–20 минут. Это вещество является клеточным ядом, поэтому время стерилизации и концентрацию подбирают экспериментально. Например: для изолированных зародышей используют 2–3% раствор в течение 10–15 минут, а для сухих семян 3–5% раствор в течение часа. Остатки гипохлорита натрия сначала удаляют 0,01 н соляной кислотой (HCl), а затем восемь раз промывают дистиллированной водой. Хлорамин применяют в концентрации 1–6%. Пыльники и молодые зародыши обрабатывают в течение 1–3 мин., сухие семена – 30–60 минут, затем промывают стерильной дистиллированной водой два – три раза. Растворы, содержащие активный хлор, используются один раз и готовят непосредственно перед работой.

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

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

После стерилизации материал переносят в стерильную дистиллированную или бидистиллированную воду, выдерживают десять минут, затем меняют воду еще два раза, выдерживают по 10 минут. На стерильной рабочей поверхности (чашки Петри, листы бумаги, оргстекло) обрезают стерильным скальпелем концы сегментов исходного материала, где клетки могут быть повреждены, и из средних зон нарезают кусочки тканей, которые помещают на питательную среду для образования каллуса. При стерилизации отрезков стебля или верхушечных почек в растворах гипохлорита рекомендуется парафинировать срезы, чтобы стерилизующий раствор не проник в сосуды, что может привести к

интоксикации ткани. Перед началом работы со стерильными объектами, работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат.

Порядок выполнения работы.

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5 КУЛЬТУРА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

Материалы и оборудование. Стерильное растение картофеля в пробирке, стерильный пинцет и скальпель, стерильные бумажные "матрасики", газовая горелка или спиртовка, спирт, маточные растворы для приготовления среды Мурасиге-Скуга, растворы 2,4-Д и 6-БАП (1 мг/л), чашки Петри, колбы Эрленмейера на 100 мл, мерный цилиндр, пипетки.

Пояснения к заданию. В ответ на ранение паренхимные клетки, расположенные под эпидермисом, дедифференцируются, переходят к делению и образуют недифференцируемую ткань, получившую название каллуса. Образование и рост каллуса регулируется ауксинами и цитокининами. Успех получения каллусной ткани в большой мере зависит от удачного подбора регулятора роста. В настоящее время каллусные культуры индуцируются практически из любого органа ткани или растения.

Порядок выполнения работы. Работа выполняется в четырех вариантах. Различие вариантов обусловлено содержанием фитогормонов в питательных средах, приготовленных на основе среды Мурасиге-Скуга.

В каждую из четырех колб Эрленмейера на 50 мл прилить небольшое количество дистиллированной воды и следующие маточные растворы: 5 мл макросолей; 0,5 мл микросолей; 0,25 мл хелата железа; 1,0 мл витаминов; 5,0 мл мезоинозита. Затем в каждую колбу добавить 3 г сахарозы. После этого в три колбы добавляют по одному из следующих фитогормонов: 2,4-Д (1мл/л), 6-БАП (1мл/л), 2,4-Д + 6-БАП. В четвертую колбу фитогормоны не добавляют (контроль). Полученные растворы переливают в мерные цилиндры и доводят объем до 50 мл, pH – до 5,6 – 5,8, используя 0,1н. КОН. Затем добавляют агар-агар (по 0,4 г на каждый вариант среды) и в колбах автоклавируют среду.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

ВЫЧЛЕНЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ КАРТОФЕЛЯ

Материалы и оборудование: клубни картофеля, бинокулярная лупа, скальпели, препаровальные иглы, лезвия, зажатые в держатели, пробирки со стерильной средой.

Пояснения к заданию. 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 (100мкм) и шириной 0,25 мм, обычно свободна от вирусов. Поскольку меристему бывает трудно вычленить без повреждения, часто ее отделяют с 1-2 листовыми примордиями (апексы размером 100 – 250 мкм). Для повышения эффективности оздоровления картофеля 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 клубней. Для ускоренного размножения оздоровленного материала используются также микроклубни, образовавшиеся на безвирусных растениях *in vitro*.

Порядок выполнения работы. Клубни картофеля хранят при температуре 4 – 6°C, затем проращивают в темноте в течение 30 – 45 дней при 20 – 22°C. Работы по вычленению проводят в простерилизованном с помощью бактерицидных ламп ламинар-боксе. Рабочее место (стол, бинокулярная лупа) и штативы с пробирками протирают спиртом. Инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) стерилизуют перед каждым вычленением, погружая в спирт, с последующим обжиганием.

Ростки картофеля опустить в химический стакан и залить на 3 – 5 мин 5%-ным раствором гипохлорита кальция или натрия. Затем не менее 3 раз промыть их 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. Вычленить можно как верхушечную, так и боковые меристемы. Каждую операцию проводят отдельным простерилизованным инструментом. Меристему на острие иглы

перенести на поверхность питательной среды в пробирку. Пробирку закрыть пробкой над пламенем горелки и поставить в штатив. Штатив с пробирками поместить в культуральную комнату.

В качестве питательной среды используют модифицированную питательную среду МС, заранее приготовленную и простерилизованную в автоклаве при давлении 1 атм. в течение 20 мин.

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

Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга (МС) для культивирования апикальных меристем картофеля

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 В12

0,015

Агар-агар

7000

РН 5,7-5,8

*- по прописи Мурасиге-Скуга

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ
(ЭМБРИОКУЛЬТУРА) ОЗИМОЙ РЖИ

Материалы и оборудование: набухшие зерновки озимой ржи (замачиваются в воде в течение 24 ч до проведения работ), проавтоклавированные пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга,

стерильные бумажные "матрасики", хлорамин, дистиллированная вода, стерильный стаканчик, скальпель, пинцеты.

Пояснения к заданию. Эмбриокультура представляет собой культуру изолированных зиготических зародышей и имеет ряд достоинств:

1) получение клонов растений-перекрестноопылителей с эффектом системой самонесовместимости. В дальнейшем часть растений клона можно хранить при низкой температуре ($0+2^{\circ}\text{C}$), 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 генетических потенций зародыша.

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

Последующие манипуляции проводить в условиях ламинар-бокса. Семена промыть 3 раза в автоклавированной дистиллированной воде в стерильном стаканчике.

На стерильных "матрасиках", придерживая зерновку, вычленивают зародыш, надавливая скальпелем в зоне щитка. После этого зародыш необходимо поместить в пробирку с питательной средой. Пробирки с эксплантами поместить в культуральную комнату.

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8 **ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ**

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

Порядок выполнения работы. Ознакомиться с видами каллусной ткани, способами их получения и культивирования.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Порядок выполнения работы. Работа проводится в стерильном ламинар-боксе

1. Семена фасоли поместить в чашки Петри (по 15 штук в чашку), залить раствором хлорамина до полного погружения семян в жидкость и оставить на 20 минут.

2. Промыть семена стерильной дистиллированной водой три раза.

3. Стерильные семена залить стерильной водой и оставить для набухания на 24 часа.

4. Семена с разрушенной кожурой удалить, а жизнеспособные простерилизовать повторно 6 % хлорамином в течение 20 минут.

5. Промыть семена стерильной дистиллированной водой три раза.

6. Семена перенести в стерильные чашки Петри (по пять штук в каждую чашку).

7. Надрезать оболочку семени стерильным скальпелем, придерживая семя стерильным пинцетом.

8. Стерильным скальпелем и препарировальной иглой изолировать корешки (2–3 мм) и перенести в чашки Петри со стерильной дистиллированной водой (по 15 штук в чашку).

9. Корешки стерильной препарировальной иглой поместить на поверхность агаризованной среды и слегка вдавить в агар для обеспечения хорошего контакта со средой (среда Гамборга и Эвелега).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9 ***ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КАЛЛУСА ИЗ РАЗЛИЧНЫХ*** ***ЭКСПЛАНТОВ КАРТОФЕЛЯ***

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

Пояснения к заданию. Каллус – это неорганизованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных клеток. 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 (экспланты) самых разных частей растений: стеблей, корней, тканей клубня, листьев, зародышей и др.

Порядок выполнения работы. Пробирки с растениями протереть спиртом, горлышко обжечь. Пинцетом вынуть стерильное растение из пробирки и выложить его на стерильный бумажный "матрасик". Придерживая растение пинцетом, вырезать скальпелем участки стебля длиной 5–10мм, листочки, участки корня. Надсечь экспланты острым скальпелем в нескольких местах, в которых в дальнейшем начнется каллусогенез.

Нагреть стерильную питательную среду на плитке до расплавления агара. Одновременно подготовить ламинар-бокс к работе (протереть изнутри спиртом).

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

Надсеченные экспланты разместить на поверхности застывшей питательной среды, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой. В одну чашку помещают 10–20 эксплантов. Закрыть чашку Петри и заклеить парафином в два слоя. Парафин следует равномерно натягивать для предотвращения разрывов при его усыхании. Поставить чашки Петри в термостат без освещения при температуре 22–25°C и влажности 70%. Через три недели рассмотреть и зарисовать образовавшийся каллус.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10 **ПАССИРОВАНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ НА СВЕЖУЮ ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ**

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

Пояснения к заданию. Кривая роста каллусной ткани носит S-образный характер. Она состоит из следующих фаз: начальной лаг-фазы, фазы логарифмического роста, во время которой идет активное деление клеток, фазы замедленного роста, стационарной фазы и фазы деградации. Для того чтобы сохранить способность к делению и дальнейшему росту, кусочек каллусной ткани переносят на свежую питательную среду. Этот прием поддержания клеточных делений носит название пассирования каллусных тканей. Пассировать каллусную ткань можно неограниченное число раз. 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.

Порядок выполнения работы. Перенести, соблюдая строгую стерильность, каллус в стерильную чашку Петри. Отделить некротизированные участки и кусочки старой агаризованной среды. Затем каллусную ткань разделить на равные части и асептически перенести в чашки Петри со стерильной питательной средой. Чашки Петри поместить в термостат с температурой 25⁰С и влажностью 60% на 3–4 недели. В конце этого срока пронаблюдать и зарисовать каллусную ткань.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11 КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ ЧЕРЕНКОВАНИЕМ ПОБЕГОВ

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

Пояснения к заданию. Одним из наиболее распространенных способов размножения картофеля является черенкование в пробирочной культуре. Для этого растение разрезают на части. Черенки пересаживают в пробирки с питательной средой МС. 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.

Порядок выполнения работы. Пробирочное растение картофеля вынуть в ламинаре 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 МС в пробирки. Для предотвращения попадания микроорганизмов в пробирку обжечь горлышко пробирки и ватную пробку в пламени спиртовки. Пробирки с черенками поставить в культуральную комнату. Наблюдать за развитием побега через 7 и 14 дней.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12 МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ПЛОДОВЫХ, ЯГОДНЫХ И ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ

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

Пояснения к заданию. Клональное микроразмножение – это разновидность вегетативного размножения, осуществляемого в культуре *in vitro*. В настоящее время большое число видов растений выращивается *in vitro* по следующим соображениям:

- для поддержания и размножения небольшого числа ценных генотипов;
 - для ускоренного размножения новых ценных сортов плодовых и декоративных культур;
 - для получения большого количества оздоровленного посадочного материала;
 - для быстрого размножения некоторых гетерозиготных садовых форм, обычно размножаемых семенами;
 - для получения из клонированных родительских форм семян гибридов F1.
- Клональное микроразмножение включает в себя следующие этапы:

- 1) введение в культуру *in vitro*;
- 2) пролиферация побегов или собственно микроразмножение;
- 3) укоренение и акклиматизация побегов *in vivo*.

Порядок выполнения работы. С маточных растений заготавливаются активно растущие побеги длиной 5 – 10 см и переносятся в лабораторию. Все листья удаляются. Для стерилизации используется 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).

В 200 – 250 мл стерилизующего раствора помещаются экспланты и перемешиваются на магнитной мешалке в течение 20 – 30 минут. В условиях ламинар-бокса экспланты отмываются в стерильной воде 3 – 4 раза для удаления остатков антисептика. С помощью пинцета экспланты по 2 – 5 шт. помещаются на стерильные бумажные "матрасики", после чего с помощью скальпеля удаляются 0,5 – 1,0 см поврежденной ткани. Побеги разрезаются на экспланты длиной 2 – 4 см и помещаются на питательную среду. Для культивирования на первом этапе микроразмножения используются только пробирки, поскольку в этом случае удастся избежать перезаражения эксплантов. Культивирование эксплантов осуществляется в культуральной комнате при длине дня 16 часов,

освещенности 1 – 6000 люкс, температуре 25 – 27°C в течение 3 – 4 недель. После окончания культивирования инфицированные экспланты удаляются, оставшиеся используются 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 используются как экспланты для переноса на второй этап. Культивирование на втором этапе осуществляется 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 используются 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 которого образуются первичные корешки. Акклиматизация микрорастений осуществляется 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 инфекции на растениях или субстрате следует произвести обработку раствором фунгицида. После прохождения периода акклиматизации и укоренения *in vivo* (3 – 4 недели) микрорастения пикируются в горшки с субстратом и доращиваются в пленочной теплице до реализации или высадки в открытый грунт.

В отдельных случаях укоренение микропобегов может осуществляться в не стерильных условиях. В качестве вещества, индуцирующего ризогенез, используется ростовая пудра на основе ИУК или ИМК. Микропобеги размером 2 см и более отделяются друг от друга и помещаются в емкость с водой для предотвращения подсыхания. Затем нижний конец каждого обрабатывается ростовой пудрой и побеги помещаются в субстрат для укоренения. Укоренение происходит через 2-3 недели, если температура поддерживается в пределах 25 – 27°C, освещенность – 2000 – 3000 люкс, а поверхность листочков постоянно смачивается водой. Через 8-10 недель после постановки на укоренение микрорастения готовы для пикировки.

Таблица 1. Составы питательных сред

№ п/п

Компаненты

Объемы смеси, мл

1000

500

200

100

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

Мезоинозит

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 фикуса 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

Мезоинозит

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

Мезоинозит

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.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13 **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.

Порядок выполнения работы. 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, фузикокцины.

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. Основным физиологический эффект цитокининов заключается в активации клеточных делений, они стимулируют 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.

Брассиностероиды – это гормоны растений стероидной природы. Известно, что малые количества этих фитогормонов содержат ткани цветка, листья и молодые стебли растений. Максимальная концентрация брассиностероидов отмечена в пыльце. Они стимулируют растяжение клеток. Микроколичества брассиностероидов, попадая с пылью 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 брассиностероидов – брассинолид – 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 брассиностероидов: из каштана (*Castanea sativa*) был выделен кастастерон, из рогоза (*Typha*) – тифастерол, из чая (*Thea*) – теастерон,

из катарантуса (*Catharanthus*) – катастерон и т. д. Первым брассиностероидом, полученным синтетическим путем, стал эпибрассинолид, абсолютно идентичный природному растительному гормону. Высокой биологической активностью из известных в настоящее время брассиностероидов 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 хлоропластах старых листьев, 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. Хлорхолинхлорид (ССС). Препарат хлорхолинхлорида – 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 хлорхолинхлорида на растения проявляется в некотором повышении содержания хлорофилла и улучшении развития корневой системы. Возможна также предпосевная обработка семян пшеницы хлорхолинхлоридом. В этом случае наряду с некоторым укорочением стебля углубляется узел кущения и улучшается развитие 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.

Порядок выполнения 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 КОН. В каждую колбу в зависимости от находящегося в ней регулятора.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧИЙ В СПОСОБЕ ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРОВ** **РОСТА РАСТЕНИЙ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ**

Материалы и оборудование: чашки Петри с асептически проросшими зерновками озимой пшеницы, линейки, плотная бумага.

Пояснения к заданию. Целью работы является изучение действия регуляторов роста: абсцизовая кислота (АБК), гиббереллин (ГК), 2,4-Д, ретардант хлорхолинхлорид (ТУР) – на прорастание семян озимой пшеницы.

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

Порядок выполнения работы. Семена озимой пшеницы, проросшие в асептических условиях, осматриваются, определяется их всхожесть (%), измеряется длина проростков и корней. Данные заносятся в таблицу (табл.1). Полученные результаты анализируются и делаются выводы о действии регуляторов роста на прорастание зерновок озимой пшеницы.

Т а б л и ц а 1. Влияние регуляторов роста на прорастание семян озимой пшеницы

Вариант

X1

X2

%

Дп

Дк

Ср. Дп

Ср.Дк

Контроль

К

АБК

2,4-Д

ТУР

П р и м е ч а н и е. Здесь X1 – количество проросших семян, X2 – общее количество семян, % – всхожесть, Дп – общая длина проростков, Дк – общая длина корней, Ср.Дп – средняя длина проростков, Ср.Дк – средняя длина корней.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 15 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.

Пояснения к заданию. 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.

Порядок выполнения 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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Грязева, В. И. Основы биотехнологии: учебное пособие / В. И. Грязева. - - Пенза: ПГАУ, 2022. — 217 с. — Текст: электронный // Лань
2. Ильина Г.В. Основы биотехнологии переработки с.-х. продукции: учебное пособие /Г.В.Ильина, Д.Ю.Ильин.- Пенза: РИО ПГСХА, 2016.-116с.
3. Калашникова Е.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие/Е.А.Калашникова, М.Ю.Чередниченко, Р.Н.Киракосян.-М.: Изд-во КноРус, 2022.-278 с.
4. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений: учебное пособие /Е.А.Калашникова.- М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012.-312 с.
5. Степанова Н.Ю. Основы биотехнологии переработки растительной продукции: учебное пособие/Степанова Н.Ю.- СПбГАУ, 2019.-91с.
6. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник-В.С.Шевелуха [и др.]; под ред. В.С.Шевелухи .-2-е изд.,перераб.и доп.-М.:Высш.шк.,2003.-469с.
7. Биотехнология переработки с.-х. продукции: учебно-методическое пособие/ Р.Р.Шайдуллин [и др.]; под ред. Шайдуллина Р.Р. - Казанский ГАУ, 2018.- 128 с.
8. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник - В.С.Шевелуха [и др.]; под ред. В.С.Шевелухи .-2-е изд., перераб. и доп.-М.:Высш. шк., 2003.-469с.
9. Биотехнология переработки с.-х. продукции: учебно-методическое пособие/ Р.Р.Шайдуллин [и др.]; под ред. Шайдуллина Р.Р. - Казанский ГАУ, 2018.- 128 с.