Л. В. Мазницына, Ю. А. Безгина,
О. В. Шарипова, В. Ю. Величко

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра химии и защиты растений

Л. В. Мазницына, Ю. А. Безгина, О. В. Шарипова, В. Ю. Величко

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
по выполнению лабораторных работ
для студентов всех форм обучения

Направление 35.04.09 Ландшафтная архитектура
«Современный ландшафтный дизайн урбанизированной среды»

Ставрополь
2022

УДК 633/635
ББК 41/42
М13

Авторы:
Л. В. Мазницына, Ю. А. Безгина, О. В. Шарипова, В. Ю. Величко

Рецензенты:
И. В. Каргалёв – кандидат биологических наук,
доцент кафедры почвоведения им. В. И. Тюльпанова;

О. В. Мухина – кандидат биологических наук, доцент базовой
кафедры общего земледелия, растениеводства,
селекции и семеноводства им. профессора Ф. И. Бобрышева

Мазницына, Л. В.

М13 Основы биотехнологии растений : учебно-методическое пособие / Л. В. Мазницына, Ю. А. Безгина, О. В. Шарипова, В. Ю. Величко ; Ставропольский гос. аграрный ун-т. – Ставрополь, 2022. – 56 с.

Предназначено для выполнения лабораторно-практических работ студентами очной и заочной форм обучения по направлению 35.04.09 Ландшафтная архитектура.

УДК
ББК

Рекомендовано к изданию учебно-методической комиссией факультета экологии и ландшафтной архитектуры СтГАУ

.

© ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

1. Общие положения 4
2. Порядок проведения лабораторных работ 4
3. Содержание лабораторных работ 5
Лабораторная работа 1. Организация биотехнологической лаборатории 5
Лабораторная работа 2. Действие регуляторов роста растений на прорастание семян 7
Лабораторная работа 3. Способы стерилизации в биотехнологии 8
Лабораторная работа 4. Способы стерилизации растительных эксплантов 11
Лабораторная работа 5. Приготовление питательных сред для культивирования клеток и тканей растений 14
Лабораторная работа 6. Техника работы в ламинар-боксе при культивировании стерильных проростков 17
Лабораторная работа 7. Клональное микроразмножение растений 20
Лабораторная работа 8.Диагностики вирусных болезней методом иммуноферментного анализа 26
4. Порядок проведения интерактивных занятий 28
Технологии получения декоративных культур методами in vitro (круглый стол) 28
Применение методов биотехнологии в декоративном растениеводстве (круглый стол) 28
5. Содержание отчета по лабораторной работе 29
6. Рекомендации по проведению занятий в интерактивной форме 29
7. Рекомендации по подготовке докладов, рефератов 32
8. Глоссарий 35
9. Тесты 37
Список литературы 43
Приложение 49

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

Дисциплина «Основы биотехнологии растений» является дисциплиной базовой части.

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

ОПК-1 Способен анализировать современные проблемы науки и производства, решать сложные (нестандартные) задачи в профессиональной деятельности.

ОПК-1.1 Использует знание достижений науки и производства для решения конкретных задач в области профессиональной деятельности.

Знания: достижений науки и производства для решения конкретных задач в области биотехнологии растений.

Умения: осуществлять поиск современной информации в области биотехнологии.

Навыки и/или трудовые действия: решать ряд задач в области биотехнологии; осуществлять поиск современной информации в области биотехнологий.

ОПК-1.2 Применяет информационно-коммуникационные технологии для решения задач профессиональной деятельности.

Знания: возможностей информационно-коммуникационных технологий.

Умения: применять информационно-коммуникационные технологии в поиске информации по заданной тематике.

Навыки и/или трудовые действия: работы с информационно-коммуникационными технологиями.

2. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Лабораторные (исследовательские) работы помогут студентам систематизировать знания по учебной дисциплине «Основы биотехнологии растений», освоить методы культивирования растений in vitro, научиться осуществлять поиск современной информации в области биотехнологий.

Перед занятием рекомендуется ознакомиться с изучаемой темой по источникам, которые указаны в Рабочей программе курса, изучить тему лекции, соответствующей данной лабораторной работе. Если в процессе подготовки у студента появляются вопросы, студент может задать их лектору или

преподавателю, ведущему лабораторные занятия в консультационные часы или в начале занятия.

Освоение материала и выполнение заданий вынесенных на самостоятельное изучение перед лабораторным занятием является обязательным требованием.

Лабораторная работа выполняется в соответствии с методическими указаниями в присутствии преподавателя / лаборанта. В рабочую тетрадь записываются основные пункты выполнения работы, вносятся рисунки (если таковые требуются), результаты и выводы.

В завершении работы преподаватель делает вывод о правильности выполнения работы и оценивает ее соответственно ФОС.

3. СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1
ОРГАНИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Цель занятия: *ознакомиться с организацией биотехнологической лаборатории.*

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

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

Оборудование комнаты для приготовления питательных сред: лабораторные столы; холодильники для хранения маточных растворов солей, гормонов и витаминов; аналитические и торсионные весы; иономер; магнитные мешалки; плитки, газовые горелки; набор посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, мензурки, пробирки и др.).

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

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

Оборудование культуральных комнат: *световое отделение* – источники освещения со спектром близким к спектру дневного света (от 3 до 10 kLx), температура (25^{o}C) и влажности воздуха (70%), стеллажи для штативов с культивируемым материалом (рис. 1.1); *темновое отделение* – с тем же обо-

рудованием, исключая источники освещения. Для культивирования эксплантов на питательной среде желательно использовать термостаты или хладотермостаты, способные с высокой точностью поддерживать задаваемые режимы температуры и влажности воздуха.

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

Рисунок 1.1. Световая культуральная комната (https://lourizan.xunta.gal/en/node/218)

Ход работы.

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

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2
ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН

Цель занятия: *изучить действие регуляторов роста из класса ауксинов, гиббереллинов, цитокининов и ингибиторов роста на прорастание семян.*

Объяснение. *Ауксины* - фитогормоны преимущественно индольной природы: индолилуксусная кислота и ее производные, вызывают растяжение клеток, активируют рост отрезков колеоптилей, стеблей, листьев и корней, вызывают тропические изгибы, стимулируют образование корней у черенков растений. *Гиббереллины* - преимущественно гиберелловая кислота $ГК_3$ и другие гиббереллины (их известно более 50), стимулируют деление или растяжение клеток, индуцируют или активируют рост стебля, прорастание семян, образование партенокарпических плодов, нарушают период покоя и индуцируют цветение длиннодневных видов. *Цитокинины* - фитогормоны, главным образом производные пуринов, стимулируют деление клеток, прорастание семян, способствуют заложению почек у целых растений и изолированных тканей. *Ингибиторы роста* - соединения, подавляющие или тормозящие физиологические или биохимические процессы в растениях, ростовые процессы, прорастание семян и распускание почек. К ним относятся вещества фенольной и терпеноидной группы гормональной и негормональной природы.

Ход работы.

1. Отсчитывают по 150-200 зерен озимой пшеницы (редиса, огурцов, гороха и пр.). Стерилизуют их в 6% ном растворе хлорамина в течение 1-2 минут с последующим промыванием в стерильной дистиллированной воде.
2. Отдельно в мерных цилиндрах готовят растворы регуляторов роста.
3. Зерна замачивают в приготовленных растворах, заранее оставляя контрольный вариант (вода).
4. Через 30 минут семена раскладывают на двух-трех слоях увлажненной бумаги в чашках Петри по 25 шт в каждую, этикетирут и помещают в растильни, а затем в термостаты с температурой 20^{o}С.
5. Всхожесть и энергия прорастания (%) определяются согласно ГОСТ 12038-84; измеряется длина проростков и корней. Данные заносятся в таблицу (табл. 2.1).

Таблица 2.1 - Влияние регуляторов роста на прорастание семян

Вариант	X_1	X_2	%	Дп	Дк	Ср. Дп	Ср.Дк
Контроль							
Ауксин							
Цитокинин							
Гиббереллин							
Ингибитор роста							

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

6. Полученные результаты анализируются и делаются выводы о действии регуляторов роста на прорастание зерновок озимой пшеницы (редиса, огурцов, гороха и пр.).

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3
СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ

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

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

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

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

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

2. При сухом способе стерилизации чашки Петри, колбы, стаканы, завернутые в плотную бумагу, стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 140°С в течение двух часов, при температуре 180°С – 30 минут (рис. 3.1).

Рисунок 3.1. – Хранение стерильной посуды в ламинар-боксах (http://bio-x.ru/articles/trebovaniya-k-laboratorii)

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

Рисунок 3.2. – Стерилизация инструментов в ламинар-боксе (Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M., 2013)

Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду, питательные среды стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1–2 атмосферы и при

температуре 120°С в течение 20-60 мин, в зависимости от объёма стерилизуемого материала.

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

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

Стерилизация ламинар-бокса. Чаще всего для стерилизации помещений (ламинар-боксов, культуральных комнат) используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5 – 2 часов (в зависимости от площади помещения). Работы в облученном помещении начинают через 15–20 минут после отключения бактерицидных ламп, так как под действием ультрафиолетового излучения (UV) двухатомный кислород воздуха (O_2) становится трехатомным озоном (O_3) – газом, токсичным для человека. Для достижения максимальной стерильности перед обработкой ультрафиолетом все поверхности тщательно отмываются моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ. Поверхности ламинар-бокса обрабатывают 96% спиртом.

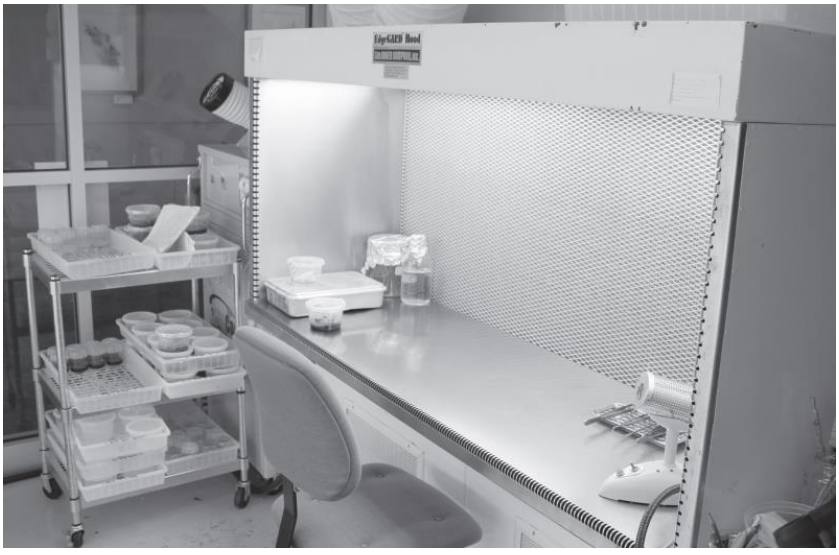

Рисунок 3.3. – Подготовка ламинар-бокса к работе (Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M., 2013)

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

Ход работы.

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

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

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

4. Автоклав привести в рабочее состояние: закрыть плотно крышку, воду залить до метки. Включить автоклав, давление пара довести до метки 1,2 атм. (в паровой камере), заполнить паром стерилизационную камеру, вытеснить конденсат в течение десяти минут, при этом давление пара в стерилизационной камере должно быть на уровне 0,1–0,2 атм. Довести давление в стерилизационной камере до 1 атм., включить автоматический режим.

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

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

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

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4
СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТОВ

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

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

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

Растительные экспланты стерилизуют растворами веществ, содержащими активный хлор (хлорамином (NH_2Cl), гипохлоритом кальция ($Ca(ClO)_2$), и натрия ($NaClO$)), бром (бромной водой (Br_2)), перекисью водорода (H_2O_2), спиртом (C_2H_5OH), 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), левомицитин, каномицин и другие.

После стерилизации материал переносят в стерильную дистиллированную или бидистиллированную воду, выдерживают десять минут, затем меняют воду еще два раза, выдерживают по 10 минут (рис. 4.1). На стерильной рабочей поверхности (чашки Петри, листы бумаги, оргстекло) обрезают стерильным скальпелем концы сегментов исходного материала, где клетки могут быть повреждены, и из средних зон нарезают кусочки тканей, которые помещают на питательную среду для образования каллуса. При стерилизации отрезков стебля или верхушечных почек в растворах гипохлорита рекомендуется парафинировать срезы, чтобы стерилизующий раствор не проник в сосуды, что может привести к интоксикации ткани. Перед началом работы со

стерильными объектами, работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат.

Рисунок 4.1 – Стерильные ростки картофеля перед началом работы (оригинальный)

Ход работы

1. Отобрать 30 здоровых зерновок пшеницы (тритикале, огурца, редиса).

2. В ламинар-боксе поместить семена в чашки Петри со стерилизующими растворами (6 % хлорамин, 6 % гипохлорит кальция, 96 % спирт, ампициллин 400 мг/л, вода) по пять семян в каждую. Время стерилизации подобрать экспериментально.

3. Отмыть семена от стерилизующих растворов дистиллированной автоклавированной водой.

4. Поместить семена для проращивания в стерильные чашки Петри на стерильную фильтровальную бумагу в небольшое количество стерильной дистиллированной воды. Чашки Петри закрыть и перенести в термостат для проращивания при температуре 25–26°С.

5. Результаты опыта зарисовать через неделю. Сделать выводы об эффективности стерилизующих растворов.

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5.
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

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

Объяснение. Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы: азот, фосфор, калий, кальций, серу, магний, железо; микроэлементы: цинк, медь, марганец, бор, кобальт, йод, молибден; витамины: тиамин (B_1), пиридоксин (B_6), 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 pH.

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

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

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

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

Отдельные питательные среды кроме ауксинов и цитокининов, включают гиббереллловую кислоту (ГК). Присутствие гиббереллинов в среде не

является обязательным, но для образования более вытянутых побегов, они необходимы.

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

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

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

Для культивирования растительных клеток, тканей и органов используют питательные среды различного гормонального состава. Наиболее широко применяются среды Мурасиге и Скуга (MS, МС) (табл.5.1), Уайта (табл. 5.2), Гамборга и Эвелега (B_5) (табл.5.3).

Таблица 5.1 - Компоненты питательной среды Мурасиге и Скуга

Компонент	Кол-во (мг/л)	Компонент	Кол-во (мг/л)
NH_4NO_3	1650	KI	0,83
KNO_3	1900	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	Na_2ЭДТА$\cdot 2H_2O$	37,3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	Тиамин - HCl	0,1
KH_2PO_4	170	Пиридоксин HCl	0,5
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	24.1	Никотиновая кислота	0,5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	Мезоинозит	100
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	Глицин	2,0
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	Сахароза	3000
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	***РН 5,6 - 5,8***	

Таблица 5.2 - Компоненты питательной среды, Уайта

Компонент	Кол-во (мг/л)	Компонент	Кол-во (мг/л)
$Ca(NO_3)_2$	200	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,02
$MgSO_4$	360	$ZnSO_4$	1,5
Na_2SO_4	200	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,0025
KNO_3	80	KI	0,75
KCl_2	65	Пиридоксин HCl	0,1
NaH_2PO_4	16,5	Тиамин - HCl	0,1
H_3BO_3	1,5	Никотиновая кислота	0,5
$MnSO_4$	4,5	Глицин	3,0
$Fe_2(SO_4)_3$	2,5	Сахароза	2000
РН 5,6 - 5,8			

Таблица 5.3 - Компоненты питательной среды Гамборга и Эвелега (B_5)

Компонент	Кол-во (мг/л)	Компонент	Кол-во (мг/л)
NaH_2PO_4	150	$Na_2ЭДТА \cdot 2H_2O$	
KNO_3	1500	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$(NH_4)_2SO_4$	134	KI	0,75
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	28
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	Тиамин - HCl	10,0
H_3BO_3	3,0	Пиридоксин HCl	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10,0	Никотиновая кислота	1,0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	Мезоинозит	100
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	2,4-Д	2,0
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0	Сахароза	2000
PH 5,8			

Ход работы.

Приготовить 100 мл питательной среды Мурасиге-Скуга (табл. 5.1).

Перед непосредственным приготовлением питательной среды, готовят маточные растворы макро-, микросолей, хелата железа (раствор $FeSO_4$ и NA_2ЭДТА, 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 приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10-кратные навески и растворяют их в 10 мл воды; 1 мл содержит порцию витаминов, необходимую для приготовления 1 л питательной среды по прописи Мурасиге-Скуга. Хранят растворы в стеклянных флаконах / колбах (на 10-20 мл) в замороженном состоянии.

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

На основе маточных растворов готовят питательную среду МС (таблица 5.4).

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

Таблица 5.4 - Состав питательной среды Мурасиге-Скуга

Компоненты среды	Маточный раствор, г/л	Количество маточного раствора для приготовления 1л среды, мл
Макросоли, г/л:		100
KNO_3	19,0	
NH_4NO_3	16,5	
KH_2PO_4	17,0	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,7	
$CaCl_2 \cdot H_2O$	4,4	
Fe-хелат, г/л:		5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5,57	
Na_2ЭДТА$\cdot 2H_2O$	7,45	
Микросоли, мг на 200 мл:		10
H_3BO_3	124	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	482	
ZnSO	172	
KI	16,6	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	5,0	
$CuSO_4$	0,5	
$CoCl_2 \cdot 2H_2O$	0,5	
Витамины, мг на 200 мл:		10
Пиридоксин HCl (B_6)	10	
Тиамин - HCl (B_1)	2	
Никотиновая кислота (РР)	10	

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

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6
ТЕХНИКА РАБОТЫ В ЛАМИНАР-БОКСЕ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОРОСТКОВ

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

Объяснение. При культивировании растительных эксплантов, стерильных проростков работы проводятся в ламинар-боксе, обеспечивающем условия асептики. Перед работой все поверхности ламинара обрабатываются 70-96% спиртом, простерилизованные инструменты (в водопрочной бумаге), материалы, растительный материал помещают на стол ламинара и включают УФ-излучение. Через 20 минут выключают УФ и включают биофильтры на

10-15 мин. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат и шапочку, руки обрабатывают 70-96% спиртом. Пинцеты, скальпели и препаровальные иглы помещают в химический стакан со спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигают на пламени спиртовки. Во избежание ожогов тканей рекомендуется несколькими наборами инструментов (рис.6.1).

Ход работы

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

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

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

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

Рисунок 6.1. – Техника работы в ламинар-боксе (Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M., 2013)

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Теоретические

1. Биотехнология как отрасль науки и отрасль производства.
2. Этапы развития биотехнологии
3. Связь биотехнологии с другими науками
4. Разделы современной биотехнологии
5. Основные направления и задачи современной биотехнологии.
6. Коммерциализация современной биотехнологии
7. Классификация регуляторов и их влияние на растения.
8. Представители группы регуляторов и стимуляторов роста растений.
9. Организация биотехнологической лаборатории (о*борудование моечной комнаты; оборудование комнаты для приготовления питательных сред; оборудование помещения для стерилизации; оборудование комнаты для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды; оборудование культуральных комнат (световая, темновая)*; н*еобходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории)*.
10. Создание условий асептики в биотехнологии
11. Питательные среды (виды, назначение, состав)
12. Рост клеток в культуре
13. Получение каллуса и его культивирование. Характеристика каллусной ткани, виды каллусной ткани
14. Физические факторы культивирования
15. Способы стерилизации в биотехнологии
16. Значение витаминов и фитогормонов в питательных средах
17. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения

Практико-ориентированные задания

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

27. Описать способы стерилизации посуды / Подготовить посуду к стерилизации

28. Описать способы стерилизация инструментов / Подготовить инструменты к стерилизации

29. Описать технологию и методики стерилизации питательных сред.

30. Описать способы стерилизации растительных эксплантов / Провести стерилизацию растительных эксплантов

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7
КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

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

7.1 ЧЕРЕНКОВАНИЕ ПОБЕГОВ

Объяснение. Одним из наиболее распространенных способов размножения картофеля является черенкование в пробирочной культуре. Для этого растение разрезают на части. Черенки переносят в пробирки с питательной средой Мурасиге и Скуга (рис. 8.1). Размножение черенкованием основано на подавлении апикального доминирования и активации путем удаления верхушечного побега пазушных меристем, из которых при помещении на питательную среду развивается новый побег. Черенкование проводят с интервалом 14 – 21 день. Из одного растения, как правило, получают 5–8 черенков, за 2–3 месяца количество растений составит 3–5 тысяч растений, а за 7 месяцев – 30 – 40 тысяч.

Ход работы.

1. Работа проводится в стерильном ламинар-боксе с соблюдением техники работы на всех этапах (УФ обработка ламинара, стерилизация инструментов, путем обжига в пламени горелки и т.д.).

2. Пробирочное растение картофеля (хризантемы, гвоздики, яблони, и т.д.) достать из пробирки, поместить на рабочую поверхность (чашка Петри, оргстекло, стерильная бумага), разрезать на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Часть стебля над листом при этом должна быть в 2–3 раза меньше, чем часть ниже листа.

3. Черенки поместить в пробирки на питательную среду МС/ WPM и пр..

4. Пробирки с черенками поместить в световую культуральную комнату.

5. Наблюдать за развитием побегов через 7 и 14 дней.

Рисунок 7.1 – Черенки пробирочных растений картофеля перед посадкой на питательную среду

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

7.2 ИНДУКЦИЯ КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ РАСТЕНИЙ.

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

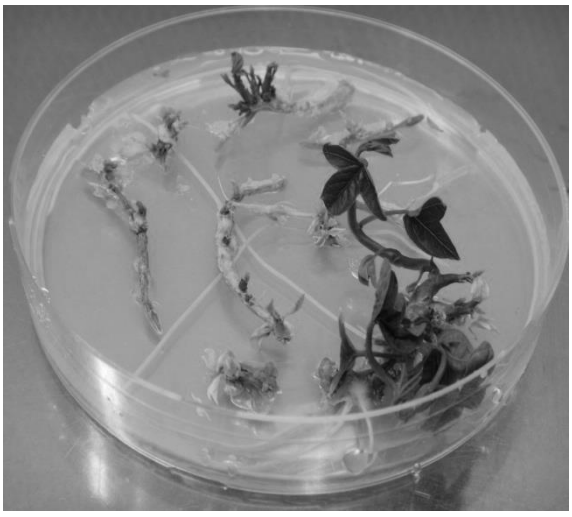

Рисунок 7.2 – Регенерация растений пассифлоры (https/bmcresnotes.biomedcentral.com/articles)

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

Ход работы.

1. В стерильных условиях проростки извлечь из пробирок и стерильным пинцетом перенести в пробирки с питательными средами для укоренения.

2. Пробирки с пересаженными растениями поставить в штативы и перенести в культуральную комнату с освещением 5 кLx, температурой 25 + 2^{o}C и влажностью воздуха 70 %.

3. Результаты укоренения оценить через 1–4 недели, сделать рисунки.

4. Укоренившиеся растения перенести в ящики или вегетационные сосуды с торфом и песком (3:1).

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

7.3 АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ – РЕГЕНЕРАНТОВ В УСЛОВИЯХ ЗАЩИЩЕННОГО ГРУНТА

Цель занятия: *изучить способы адаптации растений – регенерантов.*

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

На приживаемость растений – регенерантов влияют следующие факторы:

– Наличие и состав фитогормонов.

– Действие физических факторов (спектральный состав света, магнитно-импульсное воздействие).

– Состав грунтов.

– Удобрения и агрохимикаты.

Влияние фитогормонов и препаратов из группы элиситоров

На этапе адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям повышению приживаемости и ускорению дальнейшего роста способствуют фитогормоны и препараты группы элиситоров. Для стимуляции корнеобразования, черенки / растения – регенеранты обрабатывают 3-индолилуксусной

кислотой (60 мг/л) в течение 24 ч)). Для укоренения плодовых и ягодных культур используют ИМК в концентрации 0,5…1,0 мг/л. Для ускорения ризогенеза вводят в питательную среду α-НУК в концентрации 1,0 мг/л.

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

Действие физических факторов на ускорение микроразмножения растений

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

В исследованиях, проведенных Л.В. Беляковой, В.А. Высоцким, Л.В. Алексеенко (2010) отмечено влияние элиситоров, добавленных в питательную среду при культивировании растений под лампами белого света на этапе укоренения, на основные биометрические показатели и приживаемость растений при адаптации (рис. 7.3).

Рисунок 7.3 - Растения земляники сорта Редгонтлет на этапе адаптации: 1 – белый свет (контроль), 2 – белый свет (опудривание экостом), 3 – красный свет, 4 – красный свет (опудривание экостом), 5 – синий свет, 6 – синий свет (опудривание экостом) (Белякова Л. В., Высоцкий В. А., Алексеенко Л. В., 2010).

Магнитно-импульсное воздействие оказывает разнообразные физиологические эффекты на растения, влияет на активность ферментов и проницаемость клеточных мембран, что приводит к повышению регенерационной способности. Сочетание магнитной обработки разнонаправленными импульсами с последующим культивированием побегов на свету с долями излуче-

ния 87,5 % в красной области и 12,5 % – в синей улучшает ризогенез плодово-ягодных культур. (Упадышев М.Т., 2011)

Влияние состава грунтов на адаптацию растений ex vitro

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

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

1. Торф и песок (1:1). Растения укореняют в течение 6 недель под пленкой, в условиях повышенной влажности. Растения содержат под освещением люминесцентных ламп с низкой интенсивностью освещения при 16-часовом фотопериоде и температуре 23 ± 2°C. Далее адаптированные растения пересаживают в горшки диаметром 10 см с почвенной смесью и переносят в теплицу. Для прохождения первого этапа адаптации растений в условиях in vivo можно использовать вегетационные сосуды, полиэтиленовые сосуд-пакеты.
2. Песок (стерилизованный, промытый водой, перманганатом калия, и др.). В качестве субстрата используется для адаптации растений, предпочитающих песчаные почвы (например, виноград). Для пересадки в сосуд - пакет на песчаный субстрат используют только те растения, которые интенсивно растут. Через 8–10 дней после посадки сосуд - пакеты периодически раскрывают для адаптации к условиям in vivo. Период укоренения составляет в среднем 50–90 дней.
3. Субстраты (БИОНА 111, Биогрунт, кокосовый субстрат чистый, минеральный цеолитовый, торфяной и др.) обладают различной степенью влияния на приживаемости растений – регенерантов. Состав субстратов, соотношение компонентов, в разной степени влияют на ризогенез растений сельскохозяйственных, плодово-ягодных и декоративно-древесных культур.
4. Гидропоника. Данный прием устраняет необходимость в этапе in vitro корнеобразования и фазы акклиматизации на твердом субстрате. Питательный раствор для гидропонной установки готовят на основе питательной среды Андерсона, уменьшив в два раза концентрацию микро- и макроэлементов и исключив все органические компоненты (сахарозу, витамины и пр.). Для интенсивного корнеобразования и адаптации в гидропонной установке используют двухстадийную методику, предложенную Н.А. Вечерниной с соавторами (2008). Кювету гидропоники заполняют по очереди двумя растворами: №1 – раствор с повышенным содержанием фосфатов и №2 – раствор с повышенным содержанием нитрата аммония (Зайцева Ю.А., 2015).
5. Минераловатные кубики / почвенный грунт используются для дальнейшего укоренения растений в сочетании с регуляторами роста аукси-

новой природы (β-индолилмасляной (ИМК) и β-индолилуксусной (ИУК) кислот).

Рисунок 7.4 - Адаптация растений-регенерантов земляники к почвенному субстрату в условиях адаптационой комнаты (развитие микрорастений земляники садовой на 20 сутки после посадки) (Князева И. В., 2017).

Рисунок 7.5 - Прошедшие адаптацию растения земляники через 2 месяца после высадки в нестерильные условия (Князева И. В., 2017).

Повышение адаптационной способности микрорастений в зависимости от применяемых удобрений и агрохимикатов

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

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

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

Ход работы.

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

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

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

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

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8
ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

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

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

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

После промывания буфером в ячейки добавляют антитела в комплексе с ферментами: фосфотазой и пероксидазой. В присутствии вируса на поверхности плата образуется комплекс «антиген-антитело-фермент». Если матери-

ал стерилен, комплексы не образуются, а остатки фермента отмываются буфером. После всех описанных выше манипуляций в лунки плата добавляют субстрат, на котором работает фермент (для фосфотазы необходимы эритроциты крови, которые разрушаются в ее присутствии). В результате реакции между ферментом и субстратом окраски растворов в лунках плата изменяются в зависимости от степени заражения вирусом: нет окраски – «-» – вирус отсутствует, светло-коричневая окраска – «+» – среднее заражение вирусом, ярко-коричневая окраска –«++» – высокая степень заражения вирусом (рис. 10.1).

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

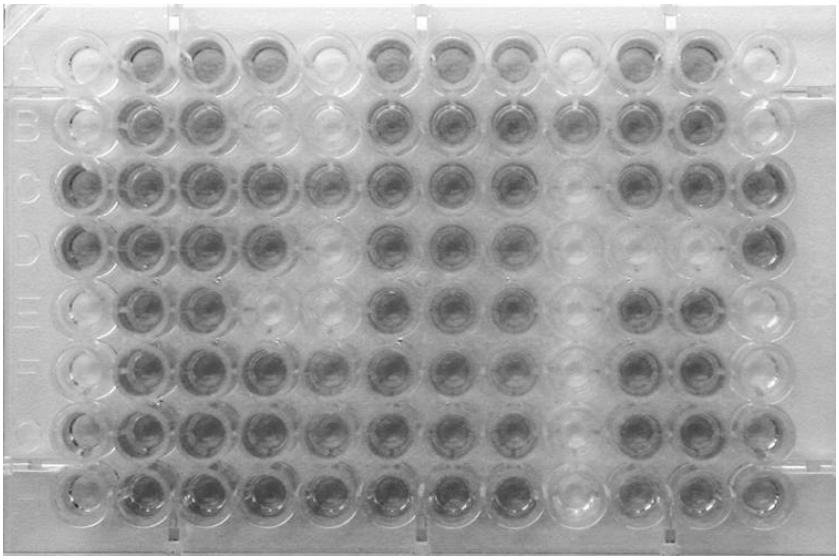

Рисунок 10.1. – Результаты иммуноферментного анализа в лунках платы (http://www.phytoengineering.ru/studies/molecular-methods/immunofermentnyy-analiz/)

Ход работы.

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

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

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИНТЕРАКТИВНЫХ ЗАНЯТИЙ

ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР МЕТОДАМИ IN VITRO (КРУГЛЫЙ СТОЛ)

Цель занятия: изучить технологии клонального микроразмножения декоративных растений.

Вопросы для обсуждения

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

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В ДЕКОРАТИВНОМ РАСТЕНИЕВОДСТВЕ (КРУГЛЫЙ СТОЛ)

Цель занятия: изучить методы биотехнологии, применяемые в декоративном растениеводстве

Вопросы для обсуждения

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

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Теоретические

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

Практико-ориентированные задания

11. Иммуноферментный анализ: этапы проведения анализа
12. ПЦР – анализ: этапы проведения анализа
13. Описать технологию получения биологических удобрений.
14. Описать технологию получения азотных биоудобрений.
15. Описать технологию получения биологических препаратов (бактериальных, грибных, вирусных).

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

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

6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ЗАНЯТИЙ В ИНТЕРАКТИВНОЙ ФОРМЕ

Для решения учебных и воспитательных задач в рамках дисциплины «Основы биотехнологии растений» используются следующие активные и интерактивные формы:

1) лекции - дискуссии;
2) лекция – визуализация;
3) круглый стол;
4) исследовательская работа;

Лекция - дискуссия. Преподаватель по ходу изложения учебного материала вовлекает студентов в диалог через анализ проблемных ситуаций, тем самым и приводит к необходимым выводам.

Лекция-визуализация. Передача информации студентам сопровождается показом различных рисунков, видеороликов, структурно-логических схем, диаграмм и т.п. с помощью технических средств обучения и мультимедийного оборудования.

«Круглый стол» – одна из форм организации дискуссии, в которой участвует весь состав группы / подгруппы. В ходе нее происходит обмен мнениями между всеми участниками. Основная цель данного метода - свободное, нерегламентированное обсуждения поставленных вопросов. При проведении «круглого стола» участники располагаются по кругу, что позволяет вовлечь в процесс обсуждения каждого и располагает к обмену мнениями.

Исследовательская работа – одна из форм командной работы, где группа разбивается на малые группы (по 2-3 человека). В ходе работы каждой команде предлагается задание. Основная цель данного метода - научиться работать в команде, где каждый участник имеет равные права.

Принципы работы на интерактивном занятии:

– все участники равны независимо от возраста, социального статуса, опыта, места работы.

– каждый участник имеет право на собственное мнение по рассматриваемому вопросу.

– нет места прямой критике личности (подвергнуться критике может только идея).

– все сказанное на занятии – не руководство к действию, а информация к размышлению.

Алгоритм проведения интерактивного занятия:

1. Подготовка к занятию:

Ведущий преподаватель производит подбор темы, ситуаций, для каждого активного и интерактивного занятия. При подготовке к занятию должны быть решены следующие организационные вопросы:

– четко определена цель занятия;
– подготовлены раздаточные материалы / ссылки на источники информации;
– обеспечено техническое оборудование (при необходимости);
– определены основные вопросы, их последовательность;
– обозначение перспективы реализации полученных знаний;
– определен практический блок

2. Вступление студента:

Преподаватель знакомит студентов с темой и целью занятия, информирует участников об условиях проведения занятия, правилах работы в группе.

Примерные правила работы в группе:

– быть активным.

– уважать мнение участников.
– быть доброжелательным.
– быть пунктуальным, ответственным.
– не перебивать.
– быть открытым для взаимодействия.
– быть заинтересованным.
– стремится найти истину.
– придерживаться регламента.
– креативность.
– уважать правила работы в группе.

3. Основная часть:

Особенности основной части определяются формой интерактивного занятия, и включает в себя:

3.1. Выяснение позиций участников.

3.2. Формирование целевых групп (сегментирование). Затем – организация коммуникации между сегментами. Этот шаг является особенно эффективным, если занятие проводится с большой аудиторией. В этом случае при сегментировании повышается интенсивность и эффективность коммуникации.

4. Выводы (заключение)

Занятие заканчивается формулировкой выводов, заключения. Как правило, их делает преподаватель.

Примерный перечень вопросов для проведения заключительной части:

– что произвело на вас наибольшее впечатление?
– что вам помогало в процессе занятия для выполнения задания, а что мешало?
– есть ли что-либо, что удивило вас в процессе занятия?
– чем вы руководствовались в процессе принятия решения?
– учитывалось ли при совершении собственных действий мнение участников группы?
– как вы оцениваете свои действия и действия группы?
– если бы вы играли в эту игру еще раз, чтобы вы изменили в модели своего поведения?

Роль преподавателя в интерактивных занятиях заключается в следующем:

– стимулирование личного вклада студентов в подготовку к занятию, и свободный обмен мнениями в ходе работы;
– обеспечение дружеской атмосферы для студентов и стимулирование ответной реакции;
– определение значимости занятия в образовательном контексте;
– обеспечение доверительных отношений в группе;
– подготовка вопросов, которые можно ставить на обсуждение по

ходу занятия, чтобы не дать погаснуть дискуссии, обсуждению;

– вовлечение в разговор как можно большего количества студентов;

– не давать сразу же правильный ответ на неверное суждение; к этому следует подключать учащихся, переадресовав вопрос;

– следить за тем, чтобы объектом критики являлось мнение, а не участник, выразивший его.

– проанализировать и оценить проведенное занятие, подвести итоги, вынести решения, оценить результаты, выявить их положительные и отрицательные стороны.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ ДОКЛАДОВ, РЕФЕРАТОВ

Написание реферата / доклада является

- одной из форм обучения студентов, направленной на организацию и повышение уровня самостоятельной работы студентов;
- одной из форм научной работы студентов, целью которой является расширение научного кругозора студентов, ознакомление с методологией научного поиска.

1. РЕФЕРАТ

Реферат, как форма обучения студентов, - это краткий обзор максимального количества доступных публикаций по заданной теме, с элементами сопоставительного анализа данных материалов и с последующими выводами.

Темы рефератов определяются разделом / темой дисциплины и содержатся в программе курса. Преподаватель рекомендует литературу, которая может быть использована для написания реферата.

Целью написания рефератов является:

– привитие студентам навыков библиографического поиска необходимой литературы (на бумажных носителях, в электронном виде);

– привитие студентам навыков компактного изложения мнения авторов и своего суждения по выбранному вопросу в письменной форме, научным языком и в хорошем стиле;

– приобретение навыка грамотного оформления ссылок на используемые источники, правильного цитирования авторского текста;

– выявление и развитие у студента интереса к определенной научной и практической проблематике с тем, чтобы исследование ее в дальнейшем продолжалось в подготовке и написании курсовых и дипломной работы и дальнейших научных трудах.

Основные задачи студента при написании реферата:

- использование учебной и научной литературы по выбранной теме (как рекомендуемую, так и самостоятельно подобранную) для правильного понимания авторской позиции;
- передача авторской позиции в своей работе;

- изложение причины своего согласия (несогласия) с тем или иным выводом автора по данной проблеме.

Требования к содержанию реферата:

– материал, используемый в реферате, должен относиться строго к выбранной теме;

– изложение основных аспектов проблемы необходимо проводить в хронологическом (тематическом, логическом) порядке;

– идеи разных авторов при изложении следует сгруппировать по общности точек зрения или по научным школам;

– реферат должен заканчиваться подведением итогов проведенной исследовательской работы: содержать краткий анализ-обоснование преимуществ той точки зрения по рассматриваемому вопросу, с которой Вы солидарны.

Структура реферата.

– Начинается реферат с *титульного листа (приложение 2)*.

– За титульным листом следует *Оглавление / содержание*. Оглавление / содержание - это план реферата, в котором каждому разделу должен соответствовать номер страницы, на которой он находится.

– Текст реферата. Он делится на три части: *введение, основная часть и заключение*.

а) *Введение* - раздел реферата, посвященный постановке проблемы, которая будет рассматриваться и обоснованию выбора темы.

б) *Основная часть* - это раздел работы, в котором последовательно раскрывается выбранная тема. Основная часть может быть представлена как цельным текстом, так и разделена на главы. При необходимости текст реферата может дополняться иллюстрациями, таблицами, графиками, но ими не следует «перегружать» текст.

в) *Заключение* - данный раздел реферата должен быть представлен в виде выводов, которые готовятся на основе подготовленного текста. Выводы должны быть краткими и четкими. Также в заключении можно обозначить проблемы, которые были выявлены в ходе работы над рефератом, но не были раскрыты в работе.

– *Список источников и литературы*. В данном списке указываются источники, на которые ссылается студент при подготовке реферата. В работе должно быть использовано не менее 5 различных источников (учебная, научная, справочная литература). Работа, выполненная с использованием материала, содержащегося в одном источнике, является явным плагиатом и не принимается. Оформление Списка литературы должно соответствовать требованиям библиографических стандартов (приложение 3).

При цитировании литературных источников необходимо соблюдать следующие правила:

- текст цитаты приводится без изменений, без произвольного сокращения цитируемого фрагмента (пропуск слов, предложений или абзацев допус-

кается, если не влечет искажения всего фрагмента, и обозначается многоточием, которое ставится на месте пропуска) и без искажения смысла;

– каждая цитата должна сопровождаться ссылкой на источник, библиографическое описание которого должно приводиться в списке литературы в соответствии с требованиями библиографических стандартов (Приложение 2).

Оценивая реферат, преподаватель обращает внимание на:

– соответствие содержания и текста выбранной теме;

– соблюдение структуры и объема работы;

– умение работать с учебной, научной и справочной литературой, выделить главное;

– культуру письменной речи;

– способность верно, без искажения передать используемый авторский материал;

– аккуратность и правильность оформления текста, а также технического выполнения работы;

– сроки сдачи реферата для проверки.

2. ДОКЛАД

Доклад, - это краткий обзор материала по заданной теме, с элементами сопоставительного анализа данных материалов и с последующими выводами.

Темы докладов определяются темой занятия и содержатся в программе курса. Преподаватель рекомендует литературу, которая может быть использована для подготовки доклада.

Целью подготовки доклада является:

– привитие студентам навыков библиографического поиска необходимой литературы (на бумажных носителях, в электронном виде);

– привитие студентам навыков компактного изложения мнения авторов и своего суждения по выбранному вопросу в письменной форме, научным языком и в хорошем стиле. По требованию доклад может быть дополнен презентационным материалом.

Основные задачи студента при написании доклада:

- использование учебной и научной литературы по выбранной теме (как рекомендуемую, так и самостоятельно подобранную);

- передача авторской позиции в своей работе и изложение причины своего согласия (несогласия) с тем или иным выводом автора по данной проблеме.

Требования к содержанию доклада:

– материал, используемый в докладе, должен относиться строго к выбранной теме;

– изложение основных аспектов проблемы необходимо проводить в соответствии с тематикой доклада и поставленными задачами;

– доклад должен содержать краткий анализ приведенной информации.

Структура доклада.

– Заголовок.

– Текст доклада. Он делится на три части: *введение, основная часть и заключение.*

а) *Введение* – краткая постановка проблемы, которая будет рассматриваться и обоснование выбора темы.

б) *Основная часть* - это раздел доклада, в котором последовательно раскрывается выбранная тема.

в) *Выводы, заключение* - готовятся на основе подготовленного текста и проработанного объема литературы.

8. ГЛОССАРИЙ

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

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

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

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

6-БАП – 6-бензиламинопурин

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

Апекс – верхушечная часть стебля или корня.

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

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

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

ГК – гиббереллловая кислота

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

Дифференциация – комплекс процессов, приводящих к различиям между клетками.

Дифференцировка – состояние специализации клеток, отличающее их от других.

ИУК – β-индолилуксусная кислота

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

Клон – культура, возникшая из одной клетки.

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

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

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

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

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

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

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

Меристема – образовательная ткань с мелкими, активно делящимися клетками.

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

НУК – α-нафтилуксусная кислота

Пролиферация – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

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

Ризогенез – процесс заложения, роста и развития корней.

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

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

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

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

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

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

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

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

9. ТЕСТЫ

Всплеск исследований по биотехнологии в мировой науке произошел в годах

1. 60-х 20 в.
2. 70-х 20 в.
3. 80-х 20 в.
4. 90-х 20 в.

Термин «биотехнология» был предложен в
1. 1900 году
2. 1917 году
3.1919 году
4.1924 году

Термин «биотехнология был предложен ученым:
1. Р. Кох
2. Л. Пастер
3. Г. Хаберландт
4. К. Эреки

Имена ученых, определивших структуру молекулы ДНК
1. Мурасиге и Скуг
2. Шенк и Хилдебрандт
3. Уотсон и Крик
4. Гамборг и Эвелег

Назовите функциональные отделы лаборатории биотехнологии:

_____

_____

Отметьте оборудование, необходимое в моечной комнате:
1. мойки с горячей и холодной водой
2. дистилляторы и бидистилляторы
3. вытяжной шкаф
4. сушильные шкафы
5. шкафы для хранения чистой посуды и инструментов
6. иономер

7. термометры

8. электрические плиты

9. емкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы с эксикаторами для хромпика (H_2SO_4 + K_2CrO_7)

Укажите оборудование, необходимое для приготовления питательных сред:

1. холодильники для хранения маточных растворов солей, гормонов и витаминов

2. вытяжной шкаф

3. аналитические и торсионные весы

4. иономер

5. магнитные мешалки

6. электрические плиты

7. дистилляторы и бидистилляторы

8. лабораторная посуда

9. автоклав

Укажите оборудование, необходимое в помещении для стерилизации

1. автоклавы

2. холодильники

3. вытяжные шкафы

4. стеллажи для штативов с питательными средами

5. шкафы для хранения стерильных материалов

6. сушильные шкафы

Укажите оборудование комнаты для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды.

1. ламинар-боксы

2. шкафы для материалов и оборудования

3. шкафы для спецодежды

4. лабораторные столы

5. бактерицидные лампы

6. шкафы для стерилизующих растворов

Укажите оборудование световой культуральной комнаты -

_____

_____

Укажите необходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории.

_____

_____

Стерилизацией в биотехнологии называется:

1. выделение бактерий из природного источника
2. уничтожение патогенных микроорганизмов
3. уничтожение всех микроорганизмов и их покоящихся форм
4. уничтожение спор микроорганизмов
5. создание условий препятствующих размножению продуцентов

Технологический воздух для биотехнологического производства стерилизуют:

1. нагреванием
2. фильтрованием
3. облучением
4. ультразвуком
5. химическими реагентами

Ауксины - термин, под которым объединяются специфические стимуляторы роста:

1. растительных тканей
2. актиномицетов
3. животных тканей
4. эубактерий
5. гибридом

_____ — это органические соединения, вызывающие стимуляцию (усиление) или ингибирование (ослабление) процессов роста и развития.

Назовите классы регуляторов роста и развития растений _____

Фитогормоны вызывающие растяжение клеток, активирующие рост отрезков колеоптилей, стеблей, листьев и корней, вызывающие тропические изгибы, стимулирующие образование корней у черенков растений называются

1. *Ауксины*
2. *Цитокинины*
3. *Гиббереллины*
4. *Ингибиторы роста*

Фитогормоны, стимулирующие деление *или* растяжение клеток, индуцирующие или активирующие рост стебля, прорастание семян, образование партенокарпических плодов, нарушающие период покоя и индуцирующие цветение длиннодневных видов называются.

1. *Ауксины*
2. *Цитокинины*

3. *Гиббереллины*
4. *Ингибиторы роста*

Фитогормоны, стимулирующие деление клеток, прорастание семян, способствующие заложению почек у целых растений и изолированных тканей называются:

1. *Ауксины*
2. *Цитокинины*
3. *Гиббереллины*
4. *Ингибиторы роста*

*С*оединения, подавляющие или тормозящие физиологические или биохимические процессы в растениях, ростовые процессы, прорастание семян и распускание почек называются

1. *Ауксины*
2. *Цитокинины*
3. *Гиббереллины*
4. *Ингибиторы роста*

Регуляторы роста, активирующие отдельные фазы роста и органогенеза растений, называются

1. *Стимуляторы роста*
2. *Ингибиторы роста*
3. *Активаторы роста*

Абсцизовая кислота относится к

1. *Ауксинам*
2. *Цитокининам*
3. *Гиббереллинам*
4. *Ингибиторам роста*

Укажите соединения относящиеся к ауксинам

1. *α - нафтилуксусная кислота (α - НУК)*
2. *6-бензиламинопурин (6-БАП)*
3. *β-индолилмасляная кислота (β-ИМК)*
4. *калийная соль β - индолилуксусной кислоты (К- β -ИУК)*
5. *2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д)*
6. *кинетин*

Укажите соединения относящиеся к цитокининам

1. *α - нафтилуксусная кислота (α - НУК)*
2. *6-бензиламинопурин (6-БАП)*
3. *Зеатин*
4. *β-индолилмасляная кислота (β-ИМК)*
5. *2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д)*
6. *Кинетин*

Укажите соединения относящиеся к ингибиторам роста

1. *6-бензиламинопурин (6-БАП)*
2. *Хлорхолинхлорид*
3. *Зеатин*
4. *2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д)*
5. *Абсцизовая кислота*

Гиббереллины были выделены из

1. *Бактерии рода Gibberellins*
2. *Гриба рода Gibberellins*
3. *Растения рода Gibberellins*
4. *Водоросли рода Gibberellins*

При выполнении работ по культивированию растений *in vitro* стерилизации не подвергаются (отметить нужное)

1. *питательные среды*
2. *автоклав*
3. *посуда, используемая для культивирования объектов*
4. *операционная комната, в которой производят изоляцию и посадку культур*
5. *одежда и руки работающего персонала*
6. *вода*
7. *инструменты и материалы*
8. *объекты культивирования*
9. *стерилизующие растворы*

Автоклавированием стерилизуются (отметить необходимое)

1. *Питательные среды*
2. *Инструменты (пинцеты, скальпели, иглы)*
3. *Дистиллированная вода*
4. *Бумага*
5. *Посуда*
6. *Объекты культивирования*
7. *Одежда*

В состав питательных сред обязательно входят (отметьте нужное)

1. *макроэлементы*
2. *микроэлементы*
3. *источники углевода*
4. *органические добавки*
5. *витамины*
6. *антиоксиданты*
7. *фитогормоны*
8. *активированный уголь*
9. *аминокислоты*

Для растительных клеток оптимальной pH среды культивирования является

1. 5.0 - 5.8
2. 6.5 - 7.0
3. 9.0 - 10.0

Для получения каллусной ткани используют экспланты из фрагментов (отметить нужное)

1. *Корней*
2. *Корнеплодов*
3. *Листьев*
4. *Стеблей*
5. *Тычинок*
6. *Лепестков*
7. *Плодов*

Фрагмент ткани или органа, помещенный на питательную среду, называется _____.

Возраст экспланта влияет на успех клонального микроразмножения

1. да
2. нет
3. непринципиально

В качестве экспланта при микроклональном размножении лучше использовать органы, содержащие

1. паренхиму
2. меристему
3. проводящие пучки
4. паренхиму с проводящими пучками

Для обеспечения генетической стабильности клонируемого материала в качестве экспланта предпочтительнее брать ткани

1. старые
2. молодые

Коэффициент размножения для кустарников и лиственных древесных растений составляет

1. 1:1 000
2. 1:10 000
3. 1:100 000
4. 1:1 000 000

Снять апикальное доминирование можно добавляя в питательную среду

1. ауксины
2. абсцизовую кислоту
3. цитокинины
4. гиббереллины

К ауксинам принадлежит
1. БАП
2. НУК
3. АБК

Адвентивные почки образуются при соотношении **цитокинины : ауксины**
1. 10 : 1
2. 1 : 1
3. 1 : 10

Подавление роста и развития пазушных почек при наличии верхушечной меристемы называется _____.

Назовите способы оздоравливания растений от вирусной инфекции
_____

Результаты ИФА оцениваются
1. *Количественно*
2. *Визуально*
3. *Фотометрически*
4. *Электрофоретически*
5. *При помощи высокочастотного трансиллюминатора с видеосистемой*

В основе полимеразной цепной реакции лежит - _____

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести ГОСТ 12038-84 (с изменениями) [Электронный ресурс] // Юридическая фирма «Интернет и Право». URL: https://internet-law.ru/gosts/gost/12883. (дата обращения 22.11.2022).
2. **ЭБ «Труды ученых СтГАУ»:** Сельскохозяйственная биотехнология [электронный полный текст] : учеб.-метод. пособие по выполнению лабораторно-практ. работ для студентов всех форм обучения / Л. В. Мазницына, Ю. А. Безгина, А. Н. Шипуля, О. В. Шарипова ; СтГАУ. - Ставрополь, 2016. - 21,5 МБ.

3. **ЭБ «Труды ученых СтГАУ»**: Ченикалова, Е. В. Биотехнология в защите растений [электронный полный текст] : практикум по выполнению лабораторных работ ; учебное пособие для бакалавров и магистров, обучающихся по направлению 110400 «Агрономия» / Е. В. Ченикалова, М. В. Добронравова, Д. А. Павлов ; СтГАУ. - Ставрополь : АГРУС, 2013. - 2,95 МБ.

4. **ЭБС «Znanium»:** Биотехнология. Практикум по культивированию клеточных культур : учебное пособие / М. Ш. Азаев, Т. Н. Ильичева, Л. Ф. Бакулина [и др.]. — Москва : ИНФРА-М, 2020. — 142 с.

5. **ЭБС «Лань»:** Плотникова, Л. Я. Сельскохозяйственная биотехнология : практикум / Л. Я. Плотникова. – Омск: изд-во ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, 2014. – 80 с.

6. **ЭБС «Лань»:** Исаков, И.Ю. Биотехнология в лесном хозяйстве [Электронный ресурс] : учебное пособие / И.Ю. Исаков, А.И. Сиволапов, М.Ю. Нечаева. — Электрон. дан. — Воронеж : ВГЛТУ, 2017. — 208 с.

7. **ЭБС «Лань»:** Калмыкова М.С. Основы полимеразной цепной реакции с разными форматами детекции: учеб. пособие / М.С. Калмыкова, М.В. Калмыков, Р.В. Белоусова. – СПб.: Издательство «Лань», 2009. – 94 с.

8. **ЭБС «Лань»:** Чернодубов, А. И. Биотехнология в лесных культурах : учебное пособие / А. И. Чернодубов. — Воронеж : ВГЛТУ, 2014. - 26 с.

9. Азарова О.П. Основы биотехнологии: методические указания / О. П. Азарова, С.Б. Чачина. – Омск, 2008. – 44 с.

10. Белякова, Л.В. Влияние некоторых факторов культивирования на развитие эксплантов земляники в процессе клонального микроразмножения / Л.В. Белякова, В.А. Высоцкий, Л.В. Алексеенко // Садоводство и виноградарство. – 2010. - №2. – С. 23-27.

11. Биотехнология : учебник для студентов вузов по с.-х., естественнонауч., пед. специальностям и магистерским программам / под ред. Е. С. Воронина. - СПб. : ГИОРД, 2008. - 704 с.

12. Биотехнология в защите растений. Практикум по выполнению лабораторных работ : учеб. пособие для бакалавров и магистров по направлению 110400 «Агрономия» / сост.: Е. В. Ченикалова, М. В. Добронравова, Д. А. Павлов ; СтГАУ. - Ставрополь : АГРУС, 2013. - 108 с. - (Гр. УМО).

13. Биотехнология растений : учебник и практикум для вузов / Л. В. Назаренко, Ю. И. Долгих, Н. В. Загоскина, Г. Н. Ралдугина. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2020. — 161 с.

14. Браткова, Л.Г. Приемы адаптации мериклонов винограда к условиям in vitro / Л.Г. Браткова, А.Н. Малыхина, Н.Н. Цаценко // Плодоводство и виноградарство Юга России. -2015. -№34(4). – С. 14-29.

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

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

17. Вечернина, Н.А. Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники / Н.Г. Вечернина, О.К. Таварткиладзе, И.Д. Бородулина, А.А. Эрст // Известия АлтГУ, 2008. – № 3 – С. 7-10.

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

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

20. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для студентов вузов по специальности «Биология» / Т.А. Егорова. - 4-е изд., стер. - М. : Академия, 2008. - 208 с.

21. Зайцева, Ю.Г. Особенности морфогенеза и размножения in vitro некоторых представителей рода Rododendron L. : автореф. … дис. канд. биол. наук: 03.02.01 / Зайцева Юлианна Геннадьевна. - Новосибирск, 2015. - 20 с.

22. Калинин Ф. Л. Технология микроклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.

23. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 232 с.

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

25. Князева, И.В. Адаптация полученных in vitro растений земляники садовой к нестерильным условиям / И.В. Князева // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2017. - №45(03). – С. 159-166.

26. Князева, Т. В. Регуляторы роста растений в Краснодарском крае: монография / Т. В. Князева.- Краснодар: ЭДВИ, 2013.- 128 с.

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

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

29. Нетрусов А. И. Введение в биотехнологию : учебник для студентов вузов по направлению «Биология» и смежных направлениям / А.И. Нетрусов. - Москва : Академия, 2014. - 288 с.

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

31. Плотникова, Л. Я. Сельскохозяйственная биотехнология: практикум / Л.Я. Плотникова. – Омск: Изд-во ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина., 2014. – 80 с. : ил.

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

33. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник для студентов вузов по с.-х., естественнонауч. и пед. специальностям, и магист. программам / под ред. В. С. Шевелухи. - М. : Высш. шк., 1998. - 416 с. - (Гр.).

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

35. Тимофеева, С.Н. Технологии микроразмножения in vitro / С.Н. Тимофеева, Ю.В. Смолькина, Н.В. Апанасова, О.И. Юдакова: Учебно-метод. пособие. – Саратов, 2016. - 38 с.

36. Упадышев, М.Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур: дисс. доктора с.-х. наук 06.01.07 / Упадышев Михаил Тарьевич. – М., 2011. - 479 с.

37. Упадышев, М.Т. Роль фенольных соединений в процессах жизнедеятельности садовых растений / М.Т. Упадышев– М.: Изд. Дом МСП, 2008. – 320 с.

38. Биотехнология (периодическое издание).

39. Генетика (периодическое издание).

40. Защита и карантин растений (периодическое издание).

41. Международная реферативная база данных SCOPUS. http://www.scopus.com/

42. Международная реферативная база данных Web of Science. – http://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=D1pA5xVwJ2ohFIO7GYz&preferencesSaved

43. Сельскохозяйственная биология (периодическое издание).

44. Anderson W. C. and G. W. Meagher. Cost of propagating plants through tissue culture using lilies as an example. Corvallis, Oregon: Oregon State University, Ornamentals Short Course. 1978.

45. Anderson W. C. and Haner G. Strawberry Tissue Culture Formula. Mount Vernon, Washington: Washington State University, Northwestern Washington Research Unit. 1978.

46. Anderson W. C. Rooting of tissue cultured rhododendrons. Proceedings of the International Plant Propagator's Society28: 1978, p. 135–139.

47. de Fossard R. A. Tissue Culture for Plant Propagators. Armidale, Australia: University of New South Wales. 1976a.

48. de Fossard, R. A. Progress toward clonal propagation of Eucalyptus species by tissue culture techniques. Proceedings of the International Plant Propagator's Society 27. 1977. P. 546.

49. de Fossard, R. A. Vegetative propagation of Eucalyptus fi cifolia F. Muell. by nodal culture in vitro. Proceedings of the International Plant Propagator's Society 26. 1976b. P. 373–378.

50. Driver John & Kuniyuki A.H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience. 19. 1984. P. 507-509.

51. Eriksson T. Studies on the growth requirements and growth measurements of cell culture of Haplopappus gracilis. Physiol. Plant. 1965. Vol. 18. P. 976-983.

52. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. 1968. Vol. 50. P. 151-158.

53. Gamborg O. L., Murashige T., Thorpe T. A. and Vasil I. K.. Plant tissue culture media. In Vitro12. 1976. P. 473–478.

54. Gautheret R. J. Manuel Technique de Culture des Tissus Vegetaux. Paris: Masson. 1942.

55. Haberlandt G. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitzungsber. Akademie der Wis-senschaften in Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse111. 1902. P. 69–92.

56. Knop W. Quantitative Untersuchungen uber die Ernahrungsprocesse der Pflanzen. Land-wirtsh. Vers. Stn. 1865. P. 70–140.

57. Knudson L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin15. 1946. P. 214–217.

58. Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M. Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropogation. Fourth Edition. — Timber Press, 2013. - 273 p.

59. Linsmaier E. M. and Skoog F.. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum18. 1965. P. 100–128.

60. Lloyd G. and McCown B. Commercially fea-sible micropropagation of mountain laurel, Kal-mia latifolia, by use of shoot-tip culture. Proceedings of the International Plant Propagator's Society30. 1980. P. 421–427.

61. Morel G. Tissue culture: A new means of clonal propagation of orchids. American Orchid Society Bulletin33. 1964.P. 473–478.

62. Mullis K. B. The unusual origin of the poly-merase chain reaction. Scientifi c American262(4). 1990. P. 56–65.

63. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum15. 1962. P. 473–497.

64. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol.Plant. 1962. Vol. 15. P. 473-497.

65. Nitsch J. P. and Nitsch C. Haploid plants from pollen grains. Science163: 1969. P. 85–87.

66. Nitsch J. P., Nitsch C. Haploid plants from pollen grains // Science. 1969. Vol. 163. P.85-87.

67. Quoirin M., Lepoivre P. Improved media for in vitro culture of Prunus species. Acta Horticulturae 78. 1977. P. 437–442.

68. Schenk R. U. and Hildebrandt A. C. Medium and techniques for induction and growth of mono-cotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany50. 1972. P. 199–204.

69. Vacin E. F. and Went F. W. Some pH changes in nutrient solutions. Botanical Gazette110. 1949. P. 605–613

70. White P. R. The Cultivation of Animal and Plant Cells. 2nd ed. New York: Ronald. 1963.

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

1. Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии [Электронный ресурс]. URL: http://niilgis.ucoz.ru/. (Дата обращения 11.11.2022 г.).
2. Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства (ВСТИСП) [Электронный ресурс]. URL: https://vstisp.org/vstisp/. (Дата обращения 12.10.2022 г.).
3. Иммуноферментный анализ [Электронный ресурс]. URL: http://www.phytoengineering.ru/studies/molecular-methods/immunofermentnyy-analiz/.(Дата обращения 22.11.2022).
4. Интернет – портал по биотехнологии [Электронный ресурс]. URL: http://bio-x.ru/. (Дата обращения 10.11.2022 г.).
5. Отдел биотехнологии Никитского ботанического сада [Электронный ресурс]. URL: http://nikitasad.ru/otdel-biologii-razvitiya-rastenij-biotehnologii-i-biobezopasnosti/. (Дата обращения 11.11.2022 г.).
6. Сборник научных трудов Никитского ботанического сада [Электронный ресурс]. URL: http://scbook.nbgnscpro.com/. (Дата обращения 11.11.2022 г.).
7. Санкт-Петербургский НИИ лесного хозяйства [Электронный ресурс]. URL: http://spb-niilh.ru/scientific-activities/directions/forest-biotechnology. (Дата обращения 10.11.2022 г.).
8. Centro de Investigación Forestal de Lourizán (CIF) [Электронный ресурс]. URL: https://lourizan.xunta.gal/en/node/218. (Дата обращения 22.11.2022).
9. In vitro regeneration of Ugandan passion fruit cultivars from leaf discs. BMC Research Notes [Электронный ресурс]. URL: https/bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-019-4469-8. (Дата обращения 23.11.2022).
10. Western Flower Thrips in Greenhouses: A Review of its Biological Control and Other Methods [Электронный ресурс]. URL: http://biocontrol.ucr.edu/wft.html. (Дата обращения 22.11.2022).

Приложение 1

Составы питательных сред

Таблица 1 - Составы питательных сред Мурасиге-Скуга, Уайта, Гамборга, Гамборга и Эвелега, Блейдза, Potato II

Компоненты	Концентрация в питательной среде, мг/л						
	Мураси-ге и Скуга, 1962	Gam-borg et al., 1976	Гамбор-га (Б5),	Уайта, 1963	Блейдза	Potato II	Potato II (без-горм.)
Макросоли							
NH_4NO_3	1650	-	2500	-	2000	1650	850
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	150	150	16,5	-	-	-
KNO_3	1900	2500	-	80	2000	1900	900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	150	150	-	-	440	200
Na_2SO_4	-	-	-	200	-	-	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-	300	-	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	250	250	720	144	200	-
$MgCl_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	-	-	7,0
$MgSO_4 \cdot H_2O$	-	10	-	-	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	134	130	-	-	-	-
KH_2PO_4	170	-	-	-	600	170	100
KCl	-	-	-	65	-	-	-
Хеллат железа (5 мл.)							
Na_2ЭДТА $\cdot 2H_2O$	37,3	37,3	37,3	-	7,46	37,3	37,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	27,8	27,8	-	5,59	27,8	27,8
Микросоли							
$Fe_2(SO_4)_3$	-	-	-	2,5	-	-	-
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	-	-	22,3	-	-	-	-
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-	7,0	-	-	-
$MnSO_4$	-	-	-	-	44	-	-
$MnSO_4 \cdot H_2O$	16,9	10	-	-	-	-	-
$ZnSO_4$	-	-	-	-	15	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	2	2	3,0	-	-	-
H_3BO_3	6,2	3	3	1,5	16	-	-
KI	0,83	0,75	0,75	0,75	8	-	-
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,25	-	-	-	-
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,025	-	-	-	-
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	0,025	-	-	-	-
Органические добавки							
Мезо-инозит /мио-инозитол	100	100	100	-	100	-	-
Аскорбиновая кислота	-	-	-	-	1	-	-
Тиамин – HCl	0,4	10	10	0,1	0,5	0,1	1
Пиридоксин HCl	0,5	1,0	1,0	0,1	0,5	0,5	-
Никотиновая кислота	0,5	1,0	1,0	0,5	1	-	-
Глицин	-	-	-	3,0	-	-	-
2,4-Д	-	-	0,1-1	-	-	-	-
ИУК	1,3	-	-	-	-	2,0	
Кинетин	0,04-10	-	0,1	-	-	0,2	

Картофельный экстракт	-	-	-	-	-	400	400
Сахароза	30000	30000	30000	20000	20000	20000	30000
Агар	7000-8000	7000	7000	7000	7000	7000	7000

Таблица 2 - Составы питательных сред Андерсона, Кворина-Лепуавра (QL), Lloyd & McCown (Woody Plant medium (WPM)), Драйвера и Каннуки (DKW) и Кнудсона

Компоненты	Концентрация в питательной среде, мг/л				
	Андерсон, 1978	QL, 1977	WPM, 1980	DKW, 1984	Кнудсо-на, 1946
Макросоли					
NH_4NO_3	400	400	400	1416	-
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	380	-	-	-	-
KNO_3	480	1800	-	-	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	-	96	147	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	833,8	556	1811	1000
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $MgSO_4 \cdot H_2O$	370 16,9	0,76 или 175,8	370 22,3	740 -	250
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	500
KH_2PO_4	-	270	170	258	250
K_2SO_4	-	-	990	1560	-
Хеллат железа					
Na_2ЭДТА	74,5	37,3	37,3	36,7	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	55,7	27,8	27,8	-	25
Микросоли					
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	7,5
$MnSO_4 \cdot H_2O$	16,9	-	-	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	8,6	8,6	21,2	-
H_3BO_3	6,2	6,2	6,2	12,4	-
KI	-	0,08	-	1,66	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,025	0,5	-
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,05	-
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	-	0,05	-
Мезо-инозит / инозитол	100	100	100	100	-
Аскорбиновая кислота	-	1,5	-	-	-
Тиамин – HCl	0,4	0,5	1,0	-	-
Аденин сульфат	80		-		
Пиридоксин HCl	-	0,5	0,5	-	-
Никотиновая к-та	0,5	0,5	0,5	-	-
6-(γ,γ-диметилал-лиламино)пурин (2iP)	5,0		1,0		
Индолилуксусная кислота	1,0				
Глицин	-	-	2,0	-	-
Сахароза	30000	30000	20000	20000	-
Агар	6000	7000-8000	6000		-

Таблица 3 - Составы питательных сред Gautheret, Hildebrandt, Hoagland, Knop, Morel & Muller, Vacin & Went

Компоненты	Концентрация в питательной среде, мг/л					
	Gautheret, 1942	Hilde-brandt, Riker & Duggar, 1946	Hoagland, 1950	Knop, 1865	Morel & Muller (1964)	Vacin & Went, 1949
Макросоли						
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	1000	500
$(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	-	-	-	-	-	200
$NaNO_3$	600	-	-	-	-	-
$NH_4 H_2PO_4$	-	-	115	-	-	-
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	125	132	-	-	-	-
KNO_3	125	160	607	125-200	-	525
Na_2SO_4	-	100	-	-	-	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	500	800	945	500-800	500	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	125	250	250	125-200	125	250
$MgSO_4 \cdot H_2O$	3,0	-	-	-	-	-
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	-	4,5	-	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	-	-
KH_2PO_4	125	-	-	125-200	125	250
KCl	-	130	-	-	1000	-
$Fe_2(C_4H_4O_6)_3$	-	5	-	-	-	28
Хеллат железа						
Na_2ЭДТА$\cdot 2H_2O$	-	-	-	16,8	37,3	37,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	5	5	13,9	27,8	27,8
Микросоли						
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	-	7,5
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	-	-	1,81	-	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,18	3,0	-	-	-	-
H_3BO_3	0,05	3,0	2,86	-	-	-
KI	0,5	0,375	-	-	-	-
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,05	-	-	-	-	-
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,05	-	-	-	-	-

Таблица 4 - Составы питательных сред Нича и Нич, Као и Михайлюка, Шенка и Хильдельбрандта, Ли де Фоссарда, Лина и Стабы, китайские среды

Компоненты	Концентрация в питательной среде, мг/л						
	Нича и Нич, 1969	Као и Михай-люка*	Шенка и Хиль-ден-брандта, 1972	Ли де Фоссарда, 1976	Китайские среды		Лина и Стабы
					N6 (Chu), 2008	с экстрактом картофеля	
Макросоли							
NH_4NO_3	720	600	-	800	-	-	725
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	-	300	138	-	-	-
KNO_3	950	1900	2500	1010	2830	1000	950
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	166	-	200	-	166	-	170
$CaCl_2$	-	-	-	29,4	-	-	-
Na_2SO_4	-	-	-	63,9	-	-	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-		-	100	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185	300	400	370	185	125	190
$MgSO_4$	-	-	-	-	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	463	100	-
KH_2PO_4	68	170	-	-	400	200	70
KCl	-	300	-	-	-	35	-
Хеллат железа							
$Na_2ЭДТА \cdot 2H_2O$	37,3	-	20	16,8	37,3	37,3	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	5	15	13,9	27,8	27,8	-
Микросоли							
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	25	-	-	-	-	4,4	-
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	10	10	-	3,3	-	-
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	-	2	10	11,1	-	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10	-	1	5,8	1,5	1,5	-
H_3BO_3	10	3.6	5,0	3,1	1,6	1,6	-
KI	-	-	1,0	0,4	0,8	-	-
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0.25	0,1	0,024	-	-	-
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0.025	0,2	0,025	-	-	-
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	-	0.025	0,1	0,118	-	-	-
Органические добавки							
Мезо-инозит/мио-инозитол	100	100	1000	-	100	200	-
Аскорбиновая кислота	-	-	-	1	-	-	10
Тиамин – HCl	0,5	0,005	5	0,5	1	1	-
Пиридоксин HCl	0,5	0,005	0,5	0,5	0,5	-	-
Никотиновая кислота	5	-	5,0	5,0	0,5	-	-
Глицин	2,0	-	-	-	-	-	-
Биотин	0,05	-	-			-	
Индолилуксусная кислота	0,1	-	-	-	-	-	-
Сахароза	20000	125	-	30000	50000	20000	10000
Агар	8000	7000-8000					

**1 литр среды Као и Михайлюка содержит дополнительно: рибозы, ксилозы, маннозы, рамнозы, целлобиозы, сорбита по 125 мг; витамина $Д_3$ -0,5 мг; кальция–пантотената – 0,01 мг; витамина B_{12} – 0,2 мг; п-аминобензойной кислоты – 0,01 мг; биотина – 0,005 мг; холинхлорида – 0,5мг; рибофлавина – 0,1 мг; 2,4-Д – 0,2 мк; зеатина – 0,5 мг; НУК – 1 мг; гидролизата казеина – 125 мг; кокосового молока – 10 мл; глюкоза – 68400 мг; пирувата натрия – 5 мг; лимонной кислоты – 10 мг; яблочной кислоты – 10 мг; фумаровой кислоты – 10 мг.*

Таблица 5 - Составы питательных сред Harvais IA, Van Waes &Deberg, Грессхофф-Доу, Линдсмайера и Скуга, Филипса и Колинс, Хеллера, Эриксона

Компоненты	Концентрация в питательной среде, мг/л						
	Harvais IA	Van Waes & Deberg	Грес-схофф-Доу	Линдс-майера и Скуга, 1965	Филип-са и Ко-линс	Хелле-ра,1953	Эрик-сона, 1965
Макросоли							
NH_4NO_3	400	-	-	1650	1000	-	1200
$Na\ NO_3$	-	-	-	-	-	600	
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	-	90	-	85	125	-
KNO_3	200	-	1000	1900	2100	-	1900
$CaCl_2 \cdot H_2O$	-	-	-	-	-	-	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	-	-	150	400	600	75	440
$CaCl_2$	-	-	-	-	-	-	-
Na_2SO_4	-	-	-	-	-	-	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	400	-	-	-	-	-	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	100	250	370	435	250	370
$MgSO_4$	-	-	-	-	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	200	-	-	125	-
KH_2PO_4	200	240	-	170	325	-	340
K_2SO_4	-	-	-	-	-	-	-
KCl	100	-	-	-	-	750	-
$Fe_2(SO_4)_3$	-	-	-	-	-	50	
Хеллат железа (5 мл.)							
$Na_2ЭДТА \cdot 2H_2O$	37,23	37,23	37,3	37,3	-	-	37,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,95	27,95	27,8	27,8	25,0	-	27,8
Микросоли							
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,5	25	10	22,3	-	0,1	2,23
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	-	-	10	15	-	-
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	-	-	-
$ZnNa_2ЭДТА$	-	-	-	-	-	-	15
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	80,5	10	3	8,6	5	1,0	-
H_3BO_3	60,5	10	3	6,2	5	1,0	0,63
KI	0,1	-	0,75	0,33	1	0,1	-
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,04	0,25	0,25	0,25	0,4	-	0,025
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,5	0,025	0,25	0,025	0,1	0,03	0,0025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,02	-	0,25	0,025	0,1	-	0,0025
Органические добавки							
Мезо-инозит/мио-инозитол	-	1200	10	100	250	-	-

Аскорбиновая кислота	-	-	-	-	-	-	-
Тиамин – HCl	5	0,5	0,1	-	2	-	0,5
Пиридоксин HCl	0,5	0,5	0,1	-	0,5	-	0,5
Никотиновая кислота	5	5	1,0	-	-	-	0,5
Фолиевая кислота	-	0,5	-	-	-	-	-
Биотин	-	0,05	-	-	-	-	-
Глицин	-	2	2,0	-	-	-	2
Гидролизат казеина	-	500	-	-	-	-	
L-глютамин	-	100	2,0	-	-	-	
НУК						-	1
Индолтлуксусная кислота				1,3			
6-БАП	-	0-0,2	-	-	-	-	-
Кинетин	-	-	-	0,001-10,0	-	-	0,02
Картофельный экстракт	100 мл	-	-	-	-	-	
Сахароза	-	20000	20000	30000	25000	-	40000
Агар	10000	6000		10000		-	7000
pH	6-6,4	5,8		5,8		-	5,8

Примечания: Это базовый состав питательных сред, в которые можно дополнить микроэлементами, витаминами, фитогормонами и другими соединениями.

В прописях питательных сред опущены соединения бериллия, титана, никеля и фолиевой кислоты, все они указаны в некоторых оригинальных формулах, но используются крайне редко.

Приложение 2

Пример оформления титульного листа для написания реферата

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Факультет экологии и ландшафтной архитектуры
Кафедра химии и защиты растений

РЕФЕРАТ

по дисциплине

«_____»

название дисциплины

_____

тема реферата

Работу выполнил(а) студент(ка)
_ курса _ группы направления

_____

название направления

_____

ФИО

Работу проверил:

_____

_____

Ставрополь, 202_

Приложение 3

Требования к оформлению реферата

Реферат, объемом 12-20 страниц должен быть напечатан через 1,0 интервал на белой писчей бумаге стандартного размера А-4. Гарнитура Times New Roman, шрифт №14. Размер полей: слева - 3,0 см, вверху - 2, справа - 1 см, внизу - 2; абзац отступления - 1,27 см., выравнивание по ширине.

Разделы должны быть пронумерованы арабскими цифрами. После номера раздела ставится точка. Введение и заключение не нумеруются.

Заголовки разделов начинаются на отдельной строке прописными буквами, например: «ВВЕДЕНИЕ», «ЗАКЛЮЧЕНИЕ» и т.д. Заголовки подразделов пишутся строчными буквами (кроме первой прописной). В конце заголовка точку не ставят. Подчеркивание и переносы в заголовках не допускаются.

Расстояние между заголовком и последующим текстом должно быть равно 2-м строчным интервалам, расстояние между последней строкой и новым заголовком (размещаются на одной странице) — 3-м межстрочным интервалам.

Каждый раздел следует начинать с новой страницы, а подразделы продолжают на той же странице.

Нумерация страниц должна быть сквозной: первой страницей является титульный лист, второй - оглавление и т.д. Номер страницы проставляется арабскими цифрами, желательно в правом верхнем углу. На титульном листе номер страницы не ставят. Приложения и список литературы также включаются в сквозную нумерацию.

Таблицы, иллюстрации оформляются в соответствие с общепринятыми требованиями.

Библиографический список выполняется согласно ГОСТу (7.1-2003 или Р 7.0.5 -2008) начинается с официально-документальных материалов. Нумерация источников сплошная.

Сведения об отечественной литературе располагаются строго в алфавитном порядке авторов книг, статей в журналах и сборниках научных трудов, а если автор отсутствует, то заглавия книг, сборников и т.д.

Перечень иностранной литературы дается в порядке латинского алфавита.

Список электронных носителей оформляется в соответствие с требованиями ГОСТ. Библиографический список должен содержать не менее 5-7 литературных источников, которые были использованы при написании реферата.

Подписано в печать 24.11.2022.
Формат 60x84$^{1}/_{16}$. Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».
Усл. печ. л. 3,26. Тираж 20 экз. Заказ № 332.
Отпечатано с готового оригинал-макета в типографии издательско-полиграфического комплекса СтГАУ «АГРУС», г. Ставрополь, ул. Пушкина, 15. Тел. 35-06-94.

Л. В. Мазницына, Ю. А. Безгина,
О. В. Шарипова, В. Ю. Величко

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие