

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б.2.В.ОД.3, Сельскохозяйственная биотехнология**

**Направление подготовки:** 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции

**Профиль подготовки:** Хранение и переработка сельскохозяйственной продукции

**Квалификация выпускника:** бакалавр

**Форма обучения:** очная

## **СОДЕРЖАНИЕ**

<b>1. Конспект лекций .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Методические указания по проведению лабораторных работ.....</b>	<b>8</b>

## **Лекция №1 (2 часа)**

**Тема: «Введение в Сельскохозяйственную биотехнологию»**

### **1.1.1. Вопросы лекции:**

1. Предмет и методы биотехнологии. История развития биотехнологии.
2. Связь биотехнологии с другими науками.
3. Приоритетные направления и мировой уровень биотехнологии как науки и отрасли производства.
4. Проблемы и задачи генетической и клеточной инженерии.

### **1.1.2. Краткое содержание вопросов**

1. Предмет и методы биотехнологии. История развития биотехнологии. Современное и традиционное представление биотехнологии как науки. Основы современной биотехнологии – генетическая и клеточная инженерия. История развития генетической и клеточной инженерии.

2. Связь биотехнологии с другими науками.

Связь биотехнологии с генетикой, молекулярной и клеточной биологией, микробиологией, физиологией, экологией, биохимией.

3. Приоритетные направления и мировой уровень биотехнологии как науки и отрасли производства.

Биотехнология 21 века. Развитие биотехнологий в экологии, медицине, сельском хозяйстве, пищевом производстве.

4. Проблемы и задачи генетической и клеточной инженерии.

Проблемы идентификации и полезных генов; создания банков клонирования, эффективных векторов, стабильных рекомбинантных ДНК; экспрессии трансгенов и создания безопасной трансгенной продукции.

Проблемы totipotentности клеток в клонировании животных; создания генетически идентичных стабильных микр клонов растений с минимализацией затрат на их производство; создания биопрепаратов на основе полезной микрофлоры для терапии и профилактики заболеваний животных, повышения плодородия почв, борьбы с техногенными загрязнениями; повышение сомаклональной вариабельности в клеточной селекции и т.д.

## **1.2. Лекция №2 (2 часа)**

**Тема: «Культивирование клеток и тканей растений *in vitro*»**

### **1.2.1. Вопросы лекции:**

- 1.1. Техника культивирования изолированных клеток, тканей, органов и протопластов на искусственных питательных средах.
- 1.2. Получение каллусной ткани.
- 1.3. Суспензионные культуры. Качественные характеристики суспензионных культур.
- 1.4. Вторичная дифференцировка и морфогенез в культуре изолированных клеток, тканей и органов растений.

### **1.2.2. Краткое содержание вопросов**

1. Техника культивирования изолированных клеток, тканей, органов и протопластов на искусственных питательных средах.

Описание обязательных условий для внедрения техники культивирования *in vitro* (методы стерилизации боксов, ламинар-боксов, питательных сред, посуды, защитной

одежды, эксплантов; состав питательных сред, роль фитогормонов, антиоксидантов, сорбентов в средах; назначение предкультивирования эксплантов).

## 2. Получение каллусной ткани.

Факторы каллусообразования. Консистенции каллуса, особенности каллусных тканей (генетическая нестабильность, физиологическая асинхронность, аморфность).

3. Суспензионные культуры. Качественные характеристики суспензионных культур.

Динамика развития суспензионной культуры. Методы выявления жизнеспособности клеточных линий. Получение клеточных клонов.

4. Вторичная дифференцировка и морфогенез в культуре изолированных клеток, тканей и органов растений.

Морфогенез в каллусной ткани (индуцирование стеблевого, корневого органогенеза, эмбриогенеза). Компетентные клетки. Аттрагирующее действие меристемы в моно- и биполярных структурах. Внутриклеточные превращения при морфогенезе.

### **1.3. Лекция №3 (2 часа)**

**Тема: «Культивирование клеток и тканей растений *in vitro*»**

#### **1.3.1. Вопросы лекции:**

1. Особенности культивирования одиночных клеток.
2. Методы клеточной селекции. Использование сомаклонов в селекции.
3. Вспомогательные методы *in vitro* в селекции.
4. Изолированные протопласти растений, их получение, культивирование, слияние.
5. Гибридизация и цибридизация соматических клеток. Генетические изменения клеток в процессе соматической гибридизации и их практическое значение в селекции. Цибридизация как способ переноса цитоплазматических генов

#### **1.3.2. Краткое содержание вопросов**

1. Особенности культивирования одиночных клеток.  
Метод «нняньки», метод культивирования в микрокапле.
2. Методы клеточной селекции. Использование сомаклонов в селекции.  
Причины генетического разнообразия каллусных клеток. Селективные среды. Этапы клеточной селекции. Сомаклоны как источники мутантных линий.
3. Вспомогательные методы *in vitro* в селекции.  
Методы преодоления програмной и постгамной несовместимости, размножения носителей уникальных генотипов, получения гаплоидов, криосохранения.
4. Изолированные протопласти растений, их получение, культивирование, слияние.  
Свойства протопластов, применяемые в соматической гибридизации, цибридизации, генетической инженерии. Методы получения протопластов механическим и ферментативным путем. Условия слияния и идентификация протопластов. Гомоциты, кардиоциты. Маркирование гетерокариоцитов. Культивирование гетерокариоцитов и цибридных клеток.
5. Гибридизация и цибридизация соматических клеток. Генетические изменения клеток в процессе соматической гибридизации и их практическое значение в селекции. Цибридизация как способ переноса цитоплазматических генов.  
Ускоренное получение носителей ЦМС, эффективных плазмогенов – факторов фотосинтеза, иммунитета, репродукции.

## **1.4. Лекция №4 (2 часа)**

**Тема: «Клональное микроразмножение и оздоровление растений»**

### **1.4.1. Вопросы лекции:**

1. Применение методов *in vitro* для размножения и оздоровления посадочного материала.
2. Классификация методов клонального микроразмножения.
3. Этапы клонального микроразмножения. Техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения.
4. Термо- и хемотерапия маточных растений.

### **1.4.2. Краткое содержание вопросов**

3.1. Применение методов *in vitro* для размножения и оздоровления посадочного материала.

Преимущества микроклонального размножения растений.

3.2. Классификация методов клонального микроразмножения.

Принцип микроклонального размножения на основе активации уже существующей на растении меристемы, на основе индукции адвентивных почек в клетках экспланта, на основе индукции соматического эмбриогенеза, на основе индукции адвентивных почек в каллусной ткани.

3.3. Этапы клонального микроразмножения. Техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения.

Техника культивирования на четырех этапах культивирования: получение стерильной хорошо растущей культуры, получение мериклонов, укоренение мериклонов, адаптация пробирочных растений к субстратам.

3.4. Термо- и хемотерапия маточных растений.

Практическая значимость и эффективность терапии маточных растений.

## **1.5. Лекция №5 (2 часа)**

**Тема: «Принципы и методы генетической инженерии»**

### **1.5.1. Вопросы лекции:**

1. Сущность метода генетической инженерии. Доноры, реципиенты, векторы.
2. Особенности организации ДНК прокариот и эукариот. Интроны, экзоны, сплайсинг. Причины, препятствующие экспрессии гена эукариот в прокариотическом реципиенте.
3. Методы получения генов. Рестриктазы, лигазы, сигнальные последовательности, «клипкие концы» фрагментов ДНК.
4. Требования, предъявляемые векторным молекулам. Синтез векторов.
5. Методы переноса трансгена.

### **1.5.2. Краткое содержание вопросов**

1. Сущность метода генетической инженерии. Доноры, реципиенты, векторы.

Векторы – плазмиды бактерий. Их роль в природе трансгеноза. Схема генно-инженерной программы.

2. Особенности организации ДНК прокариот и эукариот. Интроны, экзоны, сплайсинг. Причины, препятствующие экспрессии гена эукариот в прокариотическом реципиенте.

Проблемы экспрессии трансгенов эукариотического происхождения в геноме прокариот. Созревание м-РНК в эукариотической клетке. Ревертаза.

3. Методы получения генов. Рестриктазы, лигазы, сигнальные последовательности, «липкие концы» фрагментов ДНК.

Химический и химико-ферментативный методы получения генов. Роль рестриктаз, лигаз в формировании вектора.

4. Требования, предъявляемые векторным молекулам. Синтез векторов.

Молекулы ДНК, применяемые для создания рекомбинантных ДНК. Требования к векторам.

5. Методы переноса трансгена.

Биобаллистика, кокульттивирование агробактерий с протопластами и листовыми дисками, электропорация, микроинъекция ДНК, липосомный перенос вектора.

## **Лекция №6 (2 часа)**

### **1.6. Тема: «Фитогормональная регуляция в сельскохозяйственном производстве»**

#### **1.6.1. Вопросы лекции:**

1. Понятие о фитогормонах, фиторегуляторах, фитогормональном статусе. Роль фитогормонов в онтогенезе растений.

2. Становление гормональной системы растений в онтогенезе.

3. Использование фиторегуляторов для регуляции покоя, стеблевого и корневого морфогенеза.

#### **1.6.2. Краткое содержание вопросов**

1. Понятие о фитогормонах, фиторегуляторах, фитогормональном статусе. Роль фитогормонов в онтогенезе растений.

Фитогормоны как факторы органогенеза, роль гиббереллинов, ауксинов, цитокининов, этилена, абсцизовой кислоты, брацисиостероидов.

2. Становление гормональной системы растений в онтогенезе.

Роль фитогормонов с момента прорастания семян до окончания вегетации растений.

3. Использование фиторегуляторов для регуляции покоя, стеблевого и корневого морфогенеза.

Регуляция покоя клубней, корнеплодов, луковиц, зерна с помощью этиленпродуцентов, стимуляция прорастания семян овощных и технических культур; индукция ризогенеза.

## **1.7. Лекция №7 (2 часа)**

### **Тема: «Фитогормональная регуляция в сельскохозяйственном производстве»**

#### **1.7.1. Вопросы лекции:**

1. Использование фиторегуляторов для регуляции фотосинтеза, репродукции. Использование аттрагирующего действия гомонов для перераспределения питательных веществ в тканях растений.

2. Применение фиторегуляторов в технологиях возделывания с/х культур (зерновых, технических, плодово-ягодных, овощных, лекарственных).

### **1.7.2. Краткое содержание вопросов**

1. Использование фиторегуляторов для регуляции фотосинтеза, репродукции. Использование аттрагирующего действия гомонов для перераспределения питательных веществ в тканях растений.

Применение активаторов фотосинтеза, аналогов цитокинина, этиленпродуцентов, ауксинов и цитокининов. Действие ретардантов на морфологию листа, стебля, корня и закладку генеративных почек.

2. Применение фиторегуляторов в технологиях возделывания с/х культур (зерновых, технических, плодово-ягодных, овощных, лекарственных).

Борьба с полеганием и ЭМИ зерновых культур, повышение конкретности культурных растений относительно сорняков, изменение фаз развития растений относительно фазы развития насекомых-вредителей, фитопатогенных грибов, рационализация плантаций земляники, борьба с предуборочным опадением плодов и избыточной завязью, стимуляция корнеобразования при черенковании, стимуляция каллусообразования при прививках, улучшение качества кроны гибридных сеянцев, обработка маточных растений перед отбором черенков, перераспределение потока алкалоидов у лекарственных растений и т.д.)

## **1.8. Лекция №8 (2 часа)**

**Тема: «Методы биотехнологии в животноводстве»**

### **1.8.1. Вопросы лекции:**

1. Клонирование животных.
2. Понятие донора и реципиента и предъявляемые к ним требования.
3. Получение трансгенных животных.

### **1.8.2. Краткое содержание вопросов**

1 Клонирование животных.

Близнецовый метод, метод трансплантации соматических ядер взрослых животных в энуклеированные яйцеклетки. Применение в качестве доноров ядер клеток эмбрионов и стволовых клеток.

2. Понятие донора и реципиента и предъявляемые к ним требования.

Синхронизация доноров и реципиентов.

3. Получение трансгенных животных.

Метод микроинъекции ДНК. Ретровирусы.

## **1.9. Лекция №9 (2 часа)**

**Тема: «Методы биотехнологии в кормопроизводстве»**

### **1.9. 1. Вопросы лекции:**

1.1. Понятие о незаменимых аминокислотах. Проблема рационального использования кормов.

1.2. Источники высокоценного белка.

1.3. Современные технологии получения аминокислот, белков, витаминов, липидов.

### **1.9.2. Краткое содержание вопросов**

1. Понятие о незаменимых аминокислотах. Проблема рационального использования кормов.

Незаменимые аминокислоты. Проблема рационализации кормления животных.

2. Источники высокоценного белка.

Альтернативные источники белка, применяемые в производстве комбикормов. Экологизация производства.

3. Современные технологии получения аминокислот, белков, витаминов, липидов.

Технологии получения белка из дрожжей, водорослей, бактерий. Преимущества бактериального белка перед растительным. Трансгенные штаммы. Глубинное и поверхностное культивирование микроорганизмов.

## 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

### 2.1 Лабораторная работа № 1 (2 часа).

**Тема: «Методы работы с супензионными культурами клеток»**

**2.1.1 Цель работы:** Ознакомление с методикой работы с супензионными культурами каллусных клеток и ролью супензионных культур клеток в получении вторичных метаболитов клеток

**2.1.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику получения и контроля качества супензионных каллусных культур по методическому пособию;
2. Выполнить самостоятельную работу по Электронному учебному пособию «Биотехнология».

**2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.1.4 Описание (ход) работы:**

1. Ознакомиться с описанием методов получения супензионных культур и контроля качества супензии.
2. По ЭУП «Биотехнология» ознакомиться с занятиями 1-2, выполнить интерактивное задание.

Материал, включающий описание методов работы с супензионными культурами.

*Работа 1. Получение супензионной культуры из каллуса*

**Материалы и оборудование:** картофельный каллус; колбы с жидкой питательной средой, стерильные пинцет, скальпель, стерильная чашка Петри, спиртовка, спички.

**Объяснение.** Обычно супензию получают из рыхлой каллусной ткани, помещая ее в жидкую (без агара) питательную среду того же состава, что и для каллуса, и выращивают в колбах на качалке (100 оборотов в 1 мин). Успех работы зависит от того, насколько удачно выбрана или подготовлена каллусная ткань: она должна быть рыхлой, легко распадающейся на небольшие клеточные агрегаты и отдельные клетки. Для получения супензионной культуры берется жизнеспособная, интенсивно пролиферирующая каллусная ткань. При переносе клеток на свежую питательную среду необходимо избавиться от крупных агрегатов. Минимальный объем инокулята (критическая концентрация клеток в супензии), обеспечивающий клеточное размножение в супензии, обычно составляет 10—20% от общего объема супензии в начале культивирования. Повышенные количества инокулята приводят к угнетению роста

клеточной популяции вследствие недостатка кислорода и накопления в среде токсических продуктов метаболизма.

**Ход работы.** Открыть чашку Петри с каллусом, стерильным пинцетом выложить кусочки рыхлого каллуса на стерильную чашку Петри, отобрать светлые участки и поместить их в колбочки со стерильной средой для суспензии, из расчета 3—5 г каллуса на 100 мл жидкой среды. Объем суспензии должен составить 10—20% объема колбы (например, в колбу объемом 500 мл наливают 50—100 мл суспензии). Закрыть колбу ватно-марлевой пробкой с целлофаном и фольгой и поставить на качалку на 3—4 недели (оптимальная длительность первого пассажа).

### *Работа 2. Оценка жизнеспособности клеток и степени агрегированности суспензии*

**Материалы и оборудование:** колбочка с суспензией, стерильная пипетка с отрезанным концом, резиновая груша, пенициллиновый пузырек, краситель — 0,1%-я синяя Эванса или метиленовая синяя, предметное стекло, стеклянная палочка, камера для подсчета элементов крови, микроскоп.

**Объяснение.** Суспензия состоит из одиночных клеток и агрегатов, которые вместе называются культивируемыми единицами. Для определения жизнеспособности клеток и агрегатов применяют прижизненную окраску суспензии. Живые клетки не окрашиваются, в них видно движение цитоплазмы. В мертвые клетки краска проникает, они окрашиваются в темно-синий цвет. Существует следующее правило: если половина (50%) или большее количество клеток в агрегате не окрашивается, он считается живым. Степень агрегированности суспензии устанавливают под микроскопом. Обычно подсчет ведут так: смотрят одиночные клетки, агрегаты от 2 до 5, от 6 до 20, от 21 до 50 клеток. Анализируют не менее 1000 культивируемых единиц.

**Ход работы.** Для подсчета жизнеспособных клеток на предметное стекло нанести каплю суспензии, рядом — каплю краски. Смешать стеклянной палочкой. Сосчитать под микроскопом не менее 1000 культивируемых единиц. Вычислить процент жизнеспособных клеток. Результаты записать. Для определения степени агрегированности суспензии на предметное стекло нанести каплю суспензии. Подсчет вести, как описано в объяснении, результаты записать в виде таблицы.

### *Работа 3. Подсчет плотности клеток в суспензионной культуре*

**Материал и оборудование:** колбочка с суспензией, стерильная пипетка с отрезанным копчиком, резиновая груша, пенициллиновый пузырек, 20% хромовая кислота, пипетка с оттянутым носиком, камера Фукса-Розенталя (гемоцитометр), камера для подсчета элементов крови, микроскоп, покровные стекла.

**Объяснение.** Одним из основных показателей, характеризующих состояние клеточной системы в суспензии, является плотность клеточной популяции. Число клеток определяют в счетной камере под микроскопом после мацерации (разделение клеток) суспензии. В качестве мацерирующего вещества применяется 10—20% хромовая кислота, которая гидролизует срединные пластинки, соединяющие клетки. Смесь ставят в термостат при температуре 60°C на 10—30 мин в зависимости от особенности суспензии (агрегированности, химического состава клеточных стенок и т. д.). Непосредственно перед подсчетом для лучшего разделения клеток ее несколько раз пропускают через шприц с толстой иглой (пипетирование).

Хорошо растущая суспензия имеет S-образную кривую роста. Различают три фазы ростового цикла суспензии: лаг-фаза (2 - 3 сут), фаза экспоненциального роста (2 – 10 сут) и стационарная фаза (10 - 15 сут). Продолжительность фаз зависит от вида растения и органа, из которого получена культура каллуса и затем суспензия, от начального количества клеток (первичного инокулята), от условий выращивания. Обычно

длительность пассажа (время до пересадки) составляет 14—16 дней. При этом плотность возрастает от  $5 \times 10^4$ — $10^5$  кл/мл. Для субкультивирования (пересадки) суспензия берется в конце экспоненциальной фазы. Для каждой культуры надо подбирать условия, при которых рост суспензии оптимален: реализуется S-образная кривая при высокой (70—80%) жизнеспособности.

**Ход работы.** Отобрать пипеткой со срезанным кончиком несколько миллилитров суспензии, предварительно взболтав ее в колбе. Для предварительного подсчета можно пользоваться суспензией из 1 колбочки, а для построения ростовой кривой нужно 3 повторности, т. е. суспензия из 3 колбочек (например, по 2 мл из каждой) сливаются в одну емкость. К 1 объему исследуемой суспензии добавить 2 объема хромовой кислоты. Поставить в термостат при  $60^\circ$  на 10 мин. Затем пропустить смесь через шприц с большой иглой 3 раза. Все операции проводят с большой осторожностью, так как хромовая кислота оставляет пятна на руках, одежде и рабочих поверхностях. Камеру Фукса-Розенталя и покровное стекло тщательно промыть, высушить. Притереть покровное стекло к камере до появления колец Ньютона. Пипеткой с узким носиком набрать мацерируемый раствор и поднести к краю покровного стекла, при этом жидкость заполняет весь объем камеры. Клетки считают под микроскопом, в 4 больших квадратах по диагонали или во всей камере. При каждом заполнении суспензией считать клетки в верхней и нижней сетках. Подсчет повторить 3 - 4 раза (обычно 1000 клеток) для получения достоверных данных.

Для построения кривой роста показатели снимаются ежедневно в процессе всего культивирования. Плотность суспензии определяют по формуле:  $x = (m \times n \times 1000) / 3,2$  где  $x$  — число клеток, мл;  $m$  — среднее из 6 - 8 повторностей число клеток в камере;  $n$  — разведение.

#### *Работа 4. Пересадка суспензии (пассирование)*

**Материалы и оборудование:** колбочка с суспензией, колбочки со стерильной средой для пассирования суспензии, стерильная пипетка с отрезанным концом, резиновая груша, спиртовка, спички.

**Объяснение.** Длительность первого цикла выращивания суспензии обычно равна 3 - 4 неделям в зависимости от сорта растения, из которого она получена, состава среды, выращивания, скорости вращения качалки. Последующие циклы сокращаются до 2 недель. Все это время часть клеток отмирает, происходят дезагрегация каллуса и интенсивное деление живых клеток. Суспензию надо пересаживать после появления на стенках колбы ободка из живых клеток.

**Ход работы.** Пересев суспензии осуществляется одним из следующих способов.

1. Поставить суспензию на 1-2 мин, чтобы осели крупные агрегаты. Стерильной пипеткой взять несколько миллилитров суспензии из верхней части ее объема.

2. Профильтировать суспензию через капроновую ткань или нейлоновый фильтр и добавить свежую среду.

3. Дать отстояться суспензии 1-2 мин и отлить 5-10 мл в колбу со свежей средой. Горлышко колбы необходимо обжигать над пламенем спиртовки до и после пересадки.

Обычно для хорошо растущей суспензии пользуют разведение 1 : 10, т. е. в колбу на 500 мл помещают 5 мл суспензии и 45 мл свежей среды. Более точно разведение определяют исходя из ростовых характеристик.

Пересадив суспензию одним из перечисленных способов, обжечь горлышко колбы, закрыть ее ватно-марлевой пробкой или фольгой с целлофаном и поставить колбу на качалку до следующей пересадки.

## *Работа 5. Высев сусpenзии на твердую агаризованную среду (метод плейтинга)*

**Материалы и оборудование:** сусpenзия, стерильные чашки Петри, стерильный цилиндр, среда для роста сусpenзии с двойным содержанием агара (1,2-1,4%).

**Объяснение.** Для проведения клеточной селекции обычно применяют высев мелкоагрегированной сусpenзии на агаризованную среду. При этом одиночные клетки и мелкие агрегаты дают начало клеточным клонам. Конечная цель клеточной селекции — получение растений из клеточных клонов.

**Ход работы.** Сусpenзию налить в стерильный цилиндр и поставить на 5 мин. Отобрать пипеткой 5 мл верхней фракции сусpenзии (она обогащена одиночными клетками) и смешать и чистом стерильном цилиндре с 5 мл теплой (36° С) питательной среды для роста каллуса. Эта среда должна содержать двойное количество агара, т. е. 1,4%. Быстро разлить содержимое цилиндра в чашки Петри, дать застыть и закрыть парафиллом. Через 3-5 недель подсчитать колонии диаметром более 1мм. Эффективность высева характеризует репродуктивный потенциал сусpenзии:

Эффективность высева = (количество высеванных клеток/количество образовавшихся колоний) ×100.

**2.1.3 Результаты и выводы:** Знать основные методы работы с сусpenзионными культурами растительных клеток и практическое значение данной технологии. Иметь представление о первичных и вторичных метаболитах клеток растений; о практическом значении биотехнологий, позволяющих выделять вторичные продукты синтеза для получения препаратов пищевого, сельскохозяйственного, медицинского назначений.

## **2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа).**

### **Тема: «Методы работы с сусpenзионными культурами клеток растений»**

**2.2.1 Цель работы:** Обобщение знаний по теме «Методы работы с сусpenзионными культурами клеток. Получение вторичных метаболитов»

**2.2.2 Задачи работы:**

1. Подготовить устный ответ по методам получения и контроля качества сусpenзионных культур клеток растений.
2. Подготовить устный ответ по использованию вторичных метаболитов в производстве препаратов пищевого, медицинского, с/х назначения и косметических средств.
3. Подготовить устный ответ по материалу самостоятельной работы по ЭУП «Биотехнология»

**2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.2.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Дать описание получения каллуса из экспланта. Назвать факторы каллусообразования в питательной среде.
2. Составление кривых роста. Охарактеризовать каждую фазу роста.
3. Определение жизнеспособности клеточной популяции. Пассирование.
4. Метод плейтинга. Что такое клеточный клон?

## 2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа).

### Тема: «Методы клеточной селекции. Вспомогательные методы *in vitro* в селекции растений»

**2.3.1 Цель работы:** Ознакомиться с методикой работы в клеточной селекции растений и некоторыми вспомогательными методами *in vitro*.

#### 2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить методику получения клеточных клонов для клеточной селекции растений.

2. Изучить метод преодоления постгамной несовместимости при отдаленной гибридизации растений и метод получения гаплоидов путём андрогенеза *in vitro*.

2. Выполнить самостоятельную работу по Электронному учебному пособию «Биотехнология».

#### 2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии

2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

#### 2.3.4 Описание (ход) работы:

1. Ознакомиться с методами получения клеточных клонов в клеточной селекции.

2. Ознакомиться с методами получения гаплоидов и преодоления постгамной несовместимости при отдаленной гибридизации.

2. По ЭУП «Биотехнология» ознакомиться с занятиями 3-4, выполнить интерактивное задание.

Материал, включающий описание методов работы с селективными средами и метод получения гаплоидов *in vitro*.

#### *Работа 6. Высев супензии на селективные среды с добавлением NaCl*

**Материалы и оборудование:** супензия табака или картофеля; стерильные чашки Петри, стерильный цилиндр, среда для роста каллуса без NaCl, с 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0% NaCl (всего 5 вариантов). Среду для роста каллуса разливают в 5 стаканчиков и в каждый добавляют нужное количество NaCl. Затем измеряют pH, доводят его до 5,8; добавляют агар до концентрации 1,2% (двойное количество).

**Объяснение.** В основе клеточной селекции лежит генетическая неоднородность каллусных клеток. Для проведения клеточной селекции на солеустойчивость высевают супензию клеток *методом плейтинга* на агаризованную питательную среду, содержащую повышенные количества хлористого натрия. В этом случае выявляется устойчивость клеток как к токсическому действию хлористого натрия, так и к повышенному осмотическому давлению питательной среды, т. е. отбираются клетки, обладающие высокой водоотнимающей и водоудерживающей способностью.

**Ход работы.** Супензию налить в стерильный цилиндр и дать отстояться 5 минут. Отобрать 10 мл верхней фракции супензии (она обогащена одиночными клетками) и смешать в стерильном цилиндре с 10 мл среды без NaCl (контроль), расплавленной и охлажденной до 40°. После этого быстро разлить содержимое цилиндра в 5 чашек Петри диаметром 6 см, дать застыть и закрыть парафином. Ту же самую операцию пронести со средой, содержащей 0,5; 1,0; 1,5; 2,0% NaCl. Обычно плотность высева равняется  $1 \times 10^4$  клеток в 1 мл. Через 4 недели подсчитать в каждой чашке колонии размерим более 1 мм. Сравнить количество колоний на селективных средах и на контрольной среде, приняв контроль за 100%. Определить эффективность высева при каждой концентрации NaCl.

Эффективность высева = (количество высеванных клеток/количество образовавшихся колоний)  $\times 100$ .

Колонии, выросшие на 1,5 и 2,0% NaCl, пересадить на среду для морфогенеза, в которую может быть добавлен хлористый натрий. Растения проверить на устойчивость к NaCl (1%) и сравнить их с исходными (из которых был получен каллус для суспензии) или с растениями, регенерировавшими из клеточных линий, которые росли без NaCl.

### *Работа 7. Культура изолированных пыльников. Получение гаплоидных растений*

**Материалы и оборудование:** цветочные бутоны растений; бинокулярная лупа, стерильные пинцеты, скальпели, пробирки, чашки Петри с питательной средой для пыльников, центрифуга на 10000 об/мин, гипохлорит кальция или диацид, колба со стерильной водой, стерильный стаканчик, стакан для слива, спиртовка, спички.

**Объяснение.** Культивирование *in vitro* пыльцы и пыльников позволяет получать гаплоидные растения и каллусные ткани. Это представляет большой интерес для генетики и селекции, так как у гаплоидов легче выявить и отобрать ценные мутации, а с помощью колхицина можно получить полностью гомозиготные диплоидные растения.

В условиях культуры индукция роста микроспор и образования эмбриоидов происходит 2 способами — прямым эмбриогенезом или через образование каллуса и индуцирование органогенеза. В обоих случаях процесс протекает совершенно не так, как в условиях *in vivo*. Образование гамет после 1-2 делений блокируется, в то время как вегетативная клетка делится как зигота и дает начало эмбрионам. Более желателен прямой андрогенез, при котором микроспора ведет себя как зигота и проходит целый ряд этапов эмбриогенеза, вплоть до образования на пыльнике растений. В случае непрямого андрогенеза микроспора дает начало каллусу, в котором на этой же среде начинается образование эмбриоидов.

Индуцирование андрогенеза в наибольшей степени зависит от состояния пыльцы в момент введения ее в культуру. Пыльники рекомендуется брать в момент первого митоза или сразу после его прохождения. Пригодны нераспустившиеся цветочные бутоны с пыльниками, содержащими одноклеточные микроспоры.

У многих видов наилучший выход микроспор обеспечивается при предобработке культивируемых пыльников низкими температурами. У ячменя, например, обработка в течение 28 дней при 4° или 14 дней при 7° дает оптимальные результаты.

**Ход работы.** Микроспоры, выделенные из пыльников, окрасить 3%-м ацетокармином и определить под микроскопом стадию развития пыльцы в пыльниках. Отобрать бутоны с пыльниками, содержащими преимущественно одноядерные микроспоры.

Отделить цветочные почки, поместить по 25 шт. в 2,5 - 5%-и раствор гипохлорита кальция или диацита на 5 - 10 мин, затем 2-3 раза промыть стерильной водой. Сделать надрез на одной стороне почки и с помощью пинцета с тонкими копчиками собрать тычинки в стерильные чашки Петри. От тычинок отделить, тычиночные нити и поместить но 5 пыльников в культуральный сосуд. Извлечение неповрежденных пыльников из очень маленьких цветочных почек следует проводить под бинокулярной лупой. У мелких бутона удалить только венчик и посадить целую почку с интактными тычинками таким образом, чтобы пыльники были в контакте со средой. Наличие других частей цветка не влияет на развитие пыльцы.

Поврежденные пыльники обязательно отбрасывают, так как в противном случае это ведет к гибели всего пыльника и, кроме того, каллус может образоваться не из пыльцы, а из соматических диплоидных клеток. Пыльники культивируют на агаризованной среде в стеклянных пробирках или маленьких чашках Петри. Культуры инкубируют при 24...27° и экспонируют при освещенности около 2000 лк и 14-часовом дне. Важно, чтобы пыльники были отобраны из относительно молодых растений, выросших в нормальных условиях освещения. У старых растений к концу цветения

образуются мелкие бутоны, которые содержат пыльники с гетерогенной смесью микроспор, и больше пыльцы с дефектами.

При культуре пыльников образующиеся из пыльцы растения за 3-8 недель достигают высоты около 5 см, после чего их вынимают из агара и пересаживают в горшки со стерильной почвой (первое время нужно накрывать стаканом).

Для образования эмбриоидов необходимы сахароза и железо. Сахарозу вводят в питательную среду в концентрации 2-4%, но для некоторых пыльников (ячменя, томатов, пшеницы) она должна быть повышенна до 6-12%. Железо лучше всего применять в комплексе с хелатами (FeЭДТА).

### Работа 8. Культура изолированных зародышей

**Материалы и оборудование:** зрелые зерновки пшеницы, замоченные в воде за 1 сут до занятия; пробирки со стерильной питательной средой М-С, стерильные пинцет, скальпель, стерильные матрасики или чашки Петри с вложенной фильтровальной бумагой, колба со стерильной водой, спиртовка, спички, марлевые стерильные мешочки.

**Объяснение.** При отдаленной гибридизации наблюдается так называемая постгамная несовместимость, в результате чего зародыш остается недоразвитым. Если даже этого не происходит, из-за слабого развития эндосперма зародыш не способен к нормальному прорастанию. Даже у зрелой щуплой зерновки можно извлечь зародыш и вырастить его на питательной среде. Она должна быть простой, без добавления гормонов, например, среда М-С. При более отдаленных скрещиваниях нарушения в развитии зародыша иногда наблюдаются уже на ранних этапах, что выражается в замедленных темпах роста, отсутствии дифференцировки. Культура такого зародыша состоит из 2 этапов — эмбрионального роста, во время которого продолжается дифференциация, и его прорастания. Для первого этапа требуется более сложная питательная среда. Незрелые зародыши вычленяют обычно через 2 недели после опыления, но этот срок может быть другим в зависимости от комбинаций скрещивания и погодных условий. Лучше всего уже с 9-10-го дня после опыления начать наблюдение за развитием гибридных зерновок и, обнаружив замедление или остановку роста, ухудшение внешнего вида зерновок, немедленно приступить к изолированию и высадке зародышей на питательную среду.

**Ход работы.** Всю работу проводить в ламинаре. Предварительно замоченные семена, простерилизовать спиртом в течение 2-3 мин, затем поместить по 10-20 шт. в марлевые мешочки и стерилизовать в растворе диацида или суплемы 10 мин. Раствор слить во флакон для повторных стерилизаций, а семена промыть в том же стакане, в котором проводилась стерилизация, 3-5 раз стерильной водой. Пинцетом перенести зерновки на стерильный матрасик или в стерильную чашку Петри с вложенной фильтровальной бумагой. Положить зерновку бороздкой вниз и, придерживая пинцетом, остро отточенным скальпелем или иглой рассечь оболочку и выделить зародыш. Щитком вниз зародыш перенести в пробирку с питательной средой М-С без гормонов. Через 2-3 недели зарисовать образовавшиеся из зародыша проростки.

### Работа 9. Использование каллусов из зрелых зародышей пшеницы для клеточной селекции на засухоустойчивость

**Материалы и оборудование:** каллусы из зрелых зародышей пшеницы; жидкая проавтоклавированная среда М-С, содержащая 15% ПЭГа (молекулярная масса 6000), стерильные чашки Петри с ватой, стерильные матрасики, скальпели, пинцеты, спиртовка.

**Объяснение.** Одним из важнейших показателей засухоустойчивости растений является их водоудерживающая способность. Устойчивые растения в условиях засухи сохраняют в клетках значительные количества воды, тогда как неустойчивые легко ее

теряют и обезвоживаются. Исключение составляют полуксерофиты (люцерна, верблюжья колючка и др.), имеющие глубокую корневую систему, достигающую грунтовых вод, благодаря чему даже во время интенсивной транспирации клетки не обезвоживаются.

Для имитации засухи в культуре в питательную среду добавляют высокие концентрации осмотика - ПЭГа. При этом преимущество получают те клетки, которые способны противостоять водоотнимающему действию ПЭГа, они продолжают делиться и расти. На последующих этапах селекции из них отбирают засухоустойчивые формы растений.

**Ход работы.** В ламинаре стерильно перенести кусочки каллусной ткани на матрасик. Стерильным скальпелем разрезать каллус на приблизительно равные маленькие кубики. В стерильную чашку Петри с ватой налить из колбы питательную среду до обильного смачивания ваты. Стерильным пинцетом перенести 10 кусочков каллусной ткани на смоченную питательной средой вату. Закрыть чашки Петри и загерметизировать с помощью паракордера. Через 1 мес. рассмотреть результаты опыта.

## **2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа).**

**Тема: «Методы клеточной селекции.  
Вспомогательные методы *in vitro* в селекции растений»**

**2.4.1. Цель работы:** Обобщение знаний по теме «Методы клеточной селекции. Вспомогательные методы *in vitro* в селекции растений»

**2.4.2. Задачи работы:**

1. Подготовить устный ответ по методам получения и контроля качества супензионных культур клеток растений.
2. Подготовить устный ответ по использованию вторичных метаболитов в производстве препаратов пищевого, медицинского, с/х назначения и косметических средств.
3. Подготовить устный ответ по материалу самостоятельной работы по ЭУП «Биотехнология»

**2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.4.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Дать описание принципа моделирования селективных сред. Практическое значение клеточной селекции, Этапы клеточной селекции.
2. Описать получение гаплоидов методом андрогенеза *in vitro*.
3. Описать метод преодоления постгамной несовместимости при отдаленной гибридизации.

## **2.5 Лабораторная работа № 5 (2 часа).**

**Тема: «Биотестирование фиторегуляторов»**

**2.5.1 Цель работы:** Ознакомление с методикой биотестирования безопасности фиторегуляторов

### **2.5.2 Задачи работы:**

1. Изучить методики цитогенетического и морфометрического анализа по методическому пособию;
2. Выполнить самостоятельную работу по Электронному учебному пособию «Биотехнология».

### **2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

### **2.5.4 Описание (ход) работы:**

1. Ознакомиться с описанием методов биотестирования фиторегуляторов;
2. По ЭУП «Биотехнология» ознакомиться с занятиями 5,6, выполнить интерактивное задание.

Материал, включающий описание методов работы с суспензионными культурами

#### *Работа 10. Определение различного действия ретардантов на проростках пшеницы*

**Материалы и оборудование:** зерновки пшеницы сорта Мироновская 808; гиббереллин, ретарданты (хлорхолинхлорид, 2-хлорэтилфосфоновая кислота и др.), перманганат калия, двухъярусные растильни или чашки Петри, марля, фильтровальная бумага, пинцеты, мерная посуда для приготовления растворов, термостат, весы, линейки.

**Объяснение.** 13 сельскохозяйственном производстве в настоящее время широкое распространение получили ретарданты—вещества, замедляющие линейный рост побегов. С их помощью можно бороться с полеганием зерновых, ограничивать избыточный рост картофеля, технических, овощных, плодовых культур и винограда, одновременно стимулируя развитие генеративных органов.

Действие ретардантов связано с их влиянием на гормональную систему растений. Вегетативный рост побегов контролируется комплексом фитогормонов, среди которых основное стимулирующее влияние оказывают гиббереллины. Ретардантный эффект обусловлен способностью подавления активности гиббереллинов.

Большинство ретардантов, применяемых в современном растениеводстве, относится к 4 группам веществ—четвертичным солям аммония, триазолприводным, этиленпродуцентам и гидразинприводным. Эти и другие известные в настоящее время ретарданты обладают антигиббереллиновым эффектом, однако их действие проявляется неодинаково. Некоторые ретарданты блокируют биосинтез гиббереллина, другие препятствуют его связыванию со специфичным рецептором, т. е. становится невозможным образование и (или) дальнейшее проявление активности гиббереллин-рецепторного комплекса.

Установить, каким действием обладает ретардант, можно с помощью экзогенных, гиббереллинов. Если при их добавлении устраняется вызванное ретардантами торможение роста, значит, они относятся к блокирующим биосинтез. При блокировании ретардантами гормон-рецепторного комплекса такого явления не наблюдается.

Моделью для проведения подобных опытов служат проростки пшеницы сорта Мироновская 808, обладающие повышенной реакцией как на обработку ретардантами, так и на обработку гиббереллином. Кроме того, на данной модели удобно изучать рострегулирующее действие новых препаратов, а также определять эффективность совместного действия ретардантов и разрабатывать оптимальные смеси.

**Ход работы.** Семена пшеницы сорта Мироновская 808 пропарить в слаборозовом растворе марганцовокислого калия, тщательно промыть водой. Промытые

семена выложить в чашки Петри, обильно смочить дистиллированной водой и выставить на 24 ч в термостат при температуре 26° для проращивания.

Приготовить растворы фиторегуляторов (концентрации указывает преподаватель) и вылить в растильни или чашки Петри, затем вложить марлю или фильтровальную бумагу. На подготовленной таким образом растильне разложить 30 одномерных зерновок, после чего растильни на 7 сут поместить) в термостат при температуре 24°C.

После экспозиции в термостате отрезать проростки, измерить их длину и массу. Определить число и массу корней. По полученным данным сделать выводы о рострегулирующем действии гиббереллина, ретардантов и различиях ретардантного действия.

#### *Работа 11. Определение степени взаимодействия ретардантов в смесях на проростках пшеницы*

**Материалы и оборудование:** зерновки пшеницы сорта Мироновская 808; гиббереллин, ретарданты (хлорхолинхлорид, 2-хлорэтилфосфоновая кислота и др.), перманганат калия, двухъярусные растильни или чашки Петри, марля, фильтровальная бумага, пинцеты, мерная посуда для приготовления растворов, термостат, весы, линейки.

**Объяснение.** Рострегулирующая активность смесей обусловливается различиями в действии ретардантов. Так, при применении ретардантов, входящих в смеси с одинаковым действием, наблюдается, как правило, аддитивный (суммирующий эффект). Если их действие различается, проявляется синергизм (взаимоусиливающее влияние), связанный с одновременным подавлением биосинтеза гиббереллина и блокированием гормон-рецепторного комплекса. Синергические ретардантные смеси позволяют существенно уменьшить дозы препаратов без снижения уровня торможения роста и обеспечивают большую безопасность этих веществ для человека и природы,

**Ход работы.** Семена пшеницы сорта Мироновская 808 простерилизовать в слабо-розовом растворе марганцовокислого калия, тщательно промыть водой. Промытые семена выложить в чашки Петри, обильно смочить дистиллированной водой и выставить на 24 ч в термостат при температуре 26° для проращивания.

Приготовить растворы фиторегуляторов (концентрации указывает преподаватель) и вылить в растильни или чашки Петри, затем вложить марлю или фильтровальную бумагу. На подготовленной таким образом растильне разложить 30 одномерных зерновок, после чего растильни на 7 сут поместить) в термостат при температуре 24°C.

После экспозиции в термостате отрезать проростки, измерить их длину и массу. Определить число и массу корней. По полученным данным сделать выводы о рострегулирующем действии гиббереллина, ретардантов и различиях ретардантного действия.

Коэффициент взаимодействия компонентов ретардантных смесей ( $x, y$ ) определяют по формуле:  $(x,y) = (O-K)/(x+y-2K)$ .

Где **O** —длина проростка при совместном действии 2 ретардантов;  
**x, y**—длина проростка при действии соответственного первого и второго ретарданта;

**K**—длина проростка в контроле;

**x** — общая средняя длина проростков.

Если  $(x,y)$  больше  $1 + HCP_{05}/x_{cp}$  - компоненты действуют синергично

Если  $(x,y)$  больше  $1 - HCP_{05}/x_{cp}$  - компоненты действуют антагонистично.

Если  $1 - HCP_{05}/x_{cp} \leq (x,y) \leq 1 + HCP_{05}/x_{cp}$  - компоненты действуют аддитивно.

## Работа 12. Оценка мутагенного действия фитогормонов и фиторегуляторов

**Материалы и оборудование:** семена лука-батуна; чашки Петри, мерные цилиндры емкостью 25 и 100 мл, пенициллиновые флаконы, предметные и покровные стекла, термостат, холодильник, микроскоп с фазово-контрастным устройством, соляная кислота, уксусная кислота, ацетокармин, хлоралгидрат.

**Объяснение.** Фитогормоны являются регуляторами генной активности клетки. Изменение баланса фитогормонов при экзогенном внесении этих веществ или синтетических регуляторов роста вызывает нарушение в хромосомном аппарате клетки.

Для выявления мутаций на уровне хромосом существуют информативные методы цитогенетического анализа, позволяющего учитывать как качественные, так и количественные изменения в хромосомном аппарате клеток, происходящие под влиянием различных факторов, в том числе и химических веществ. Учитываются малейшие отклонения от нормы, причем сразу же после воздействия. Одним из разработанных и простых является анафазный метод учета хромосомных аберраций.

Прекрасную модель для первичного скрининга химического соединения на мутагенную активность представляет лук-батун. Меристематические клетки корней лука-батуна имеют ряд преимуществ перед другими, объектами: 1) материал доступен круглый год; 2) имеет незадержанный тип мутирования; 3) корневая меристема содержит большое число делящихся клеток; 4) кончики корешков подвергаются непосредственному влиянию изучаемых веществ; 5) достаточно высокая чувствительность к действию мутагенов.

**Ход работы.** Для проведения опытов отобрать выравненный материал. Семена должны быть одинаковыми по размеру, выполненные, типичные для данного тест-объекта, в нашем случае лука-батуна. Количество семян для проращивания определяют исходя из числа необходимых для анализа клеток: один вариант—до 1000 анафаз.

Семена проращивают в чашках Петри на смоченной водопроводной водой фильтровальной бумаге. Чашки Петри поместить в термостат при температуре 25...26° на 18 ч, что соответствует продолжительности одного митотического цикла лука-батуна. Для анализа отобрать проростки с корешками длиной 1,5-2 см.

Фиксацию проростков проводят фиксатором Кларка, состоящим из 3 частей этилового спирта и 1 части уксусной кислоты (3:1). Для фиксации удобно использовать пенициллиновые флаконы. Фиксатор должен по объему превосходить материал не менее чем в 2 раза. Зафиксированный материал перенести в холодильник при температуре 3...4° на 1 сут. Корешки тщательно отмыть от фиксатора в водопроводной воде, а затем в дистиллированной.

Гидролиз — в 3 и. соляной кислоте при комнатной температуре в течение 20 мин. Трижды тщательно отмыть корешки от кислоты. Перенести корешки в 45%-ю уксусную кислоту на 10 мин, затем залить свежим раствором и через 30 мин снова поменять кислоту и оставить на 2—3 ч. Слить кислоту и корешки поместить в ацетокармин. Красить в течение суток в термостате при температуре 25...26°. Окрашенный корешок поместить на предметное стекло, лезвием срезать и удалить корневой чехлик, сделать несколько поперечных срезов, 2—3 маленьких кусочка поместить на чистое предметное стекло в каплю хлоралгидрата, накрыть покровным стеклом, большим пальцем раздавить материал, стараясь не сместить покровное стекло. Остатки хлоралгидрата удалить фильтровальной бумагой.

Микроскопию хромосом, окрашенных ацетокармином, лучше вести методом фазового контраста. При анализе анафазных пластинок учитывают различные типы аберраций хромосом. Данные цитогенетических исследований заносят в специальную таблицу (табл. 1, 2).

При оценке индукции аберрантных клеток в проростках лука-батуна вычисляют долю (%) (A) аберрантных клеток (M) среди общего числа проанализированных анафаз (n):

$$A = M/n \times 100$$

Ошибку ( $m$ ) к показателю доли вычисляют по формуле:  $m = \sqrt{n/A(100-A)}$

Различия между вариантами считаются значимыми при  $t_d > t_{st}$

## **2.6 Лабораторная работа № 6 (2 часа).**

**Тема:** Биотестирование фиторегуляторов

**2.6.1. Цель работы:** Обобщение знаний по теме «Биотестирование регуляторов роста и развития растений»

**2.6.2. Задачи работы:**

1. Подготовить устный ответ по методу цитогенетического анализа в тестировании безопасности фиторегуляторов;
2. Подготовить устный ответ по методу морфометрической оценки реакции растений на фиторегуляторы;
3. Подготовить устный ответ по выявлению молекулярных механизмов взаимодействия ретардантов с клеткой;
4. Подготовить устный ответ по материалу самостоятельной работы по ЭУП «Биотехнология».

**2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.6.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Нарушения в хромосомном аппарате, выявляемые методом ЦГА.
2. Выявление токсических и регуляторных концентраций ретардантов.

Практическое значение ретардантов в с/х производстве.

3. Способы взаимодействия ретардантов в смесях, применение в практике создания безопасных препаратов синергизма компонентов.

## **2.7 Лабораторная работа № 7 (2 часа).**

**Тема:** «Техника безопасности на производстве биопрепаратов»

**2.7.1 Цель работы:** Обобщение знаний по теме «Техника безопасности на производстве биопрепаратов»

**2.7.2.Задачи работы:**

1. Изучить технику безопасности на производствах, специализирующихся на выпуске биологических средств защиты растений.
2. Изучить меры первой помощи.

**2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.7.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Техника безопасности при работе с автоклавами, облучателями, кислотами, ядовитыми и едкими веществами, сусpenзиями микроорганизмов, материалами, зараженными вирусами.
2. Меры первой помощи при химических и термических ожогах, отравлениях ядами, поражении биопрепаратами.

**2.8 Лабораторная работа № 8 (2 часа).**

**Тема: «Технологические карты для производства биологических средств защиты растений»**

**2.8.1. Цель работы:** Обобщение знаний по теме «Технологические карты производств биопрепаратов»

**2.8.2. Задачи работы:**

1. Изучить глубинный способ культивирования микроорганизмов.
2. Изучить поверхностный способ культивирования микроорганизмов.
3. Изучить способы получения вирусных препаратов для борьбы с насекомыми вредителями.

**2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.8.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Поверхностное культивирование, при этом дать описание этапам технологического процесса, оборудованию, специфике питательных средств.
2. Глубинное культивирование, при этом дать описание этапам технологического процесса, оборудованию, специфике питательных средств.
3. Способы получения вирусных препаратов на насекомых и в клетках насекомых *in vitro*, при этом дать описание этапам технологического процесса, оборудованию, специфике питательных средств

**2.9 Лабораторная работа № 9 (2 часа).**

**Тема: Диагностикумы в защите растений и селекции.**

**2.9.1. Цель работы:** Изучить современные диагностические методы, применяемые в выявлении фитопатогенов

**2.9.2. Задачи работы:**

1. Изучить технику и практическое значение иммуноферментного анализа.
2. Изучить технику и практическое значение ПЦР-анализа.

**2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Методическое пособие по курсу Сельскохозяйственной биотехнологии.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.9.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Техника и практическое значение иммуноферментного анализа
2. Техника и практическое значение ПЦР-анализа.

## **2.10 Лабораторная работа № 10 (2 часа).**

**Тема: «Культивирование клеток и тканей растений *in vitro*»**

**2.10.1. Цель работы:** Изучить современные методы, применяемые в получении безвирусного посадочного материала в растениеводстве

**2.10.2. Задачи работы:**

1. Изучить технику и практическое значение микроклонального размножения растений.
2. Изучить этапы и методы микроклонального размножения растений.
3. Получить представление о методах оздоровления маточных растений.

**2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Конспект лекций по теме коллоквиума.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.10.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Методы микроклонального размножения растений
2. Этапы микроклонального размножения растений
3. Термо- и хемотерапия маточных растений.

## **2.11 Лабораторная работа № 11 (2 часа).**

**Тема: «Принципы и методы генетической инженерии»**

**2.11.1. Цель работы:** Изучить современные методы, применяемые в получении трансгенных организмов

**2.11.2. Задачи работы:**

1. Изучить технику и практическое значение генетической инженерии.
2. Изучить проблемы трансгеноза и способы их разрешения.
3. Получить представление о методах выявления трансгенных клеток и тканей, об их маркировании и контроле безопасности продуктов генетической инженерии.

**2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Конспект лекций по теме коллоквиума.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.11.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Конструирование векторных молекул.
2. Синтез генов. Практическая значимость.
3. Методы доставки трансгенов в реципиентные клетки.
4. Методы селекции трансгенных клеток и ПЦР-анализ.

## **2.12-13 Лабораторная работа № 12-13 (4 часа).**

**Тема: «Фитогормональная регуляция в сельскохозяйственном производстве»**

**2.12-13.1. Цель работы:** Изучить современные методы, применяемые в регуляции продукционного процесса и онтогенеза растений

**2.12-13.2. Задачи работы:**

1. Изучить технику и практическое значение фитогормональной регуляции.
2. Изучить проблемы безопасности применения фиторегуляторов.
3. Получить представление о методах фиторегуляции как способе решения проблем защиты растений от фитопатогенов и вредителей, хранения растениеводческой продукции.

**2.12-13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Конспект лекций по теме коллоквиума.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.12-13.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Регуляция покоя растений;
2. Регуляция адаптивных реакций. Стressовые белки. Адаптогены.
3. Фиторегуляторы в защите растений;
4. Фиторегуляторы в решении частных проблем при возделывании зерновых, овощных, плодовых, технических культур и лекарственных растений.

## **2.14 Лабораторная работа № 14 (2 часа).**

**Тема: «Биотехнологии в животноводстве и кормопроизводстве»**

**2.14.1. Цель работы:** Изучить современные методы, применяемые в биотехнологии в животноводстве и кормопроизводстве

**2.14.2. Задачи работы:**

1. Изучить технику и практическое значение клонирования и получения трансгенных животных.
2. Изучить проблемы создания рациональных кормов для животных. Получить представления о незаменимых аминокислотах и их балансе.
3. Получить представление о методах получения высокогоценного белка на основе дрожжей, водорослей, бактерий.

**2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Конспект лекций по теме коллоквиума.
2. Компьютеры с программой ЭУП «Биотехнология».

**2.14.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Методы клонирования животных;
2. Получение трансгенных животных;
3. Роль незаменимых аминокислот в обмене веществ и методы пополнения кормов высокогоценным белком;
4. Технология получения кормовых дрожжей;
5. Технология получения белка из водорослей и бактериальной массы.

## **. 2.15 Лабораторная работа № 15 (2 часа).**

**Тема: «Конференция. Достижения и перспективы биотехнологии»**

**2.15.1. Цель работы:** Продемонстрировать аудитории наиболее важные направления развития биотехнологии во всех отраслях производства.

**2.15.2. Задачи работы:**

1. Охватить широкий спектр направлений развития биотехнологии в области конверсии отходов предприятий;
2. Раскрыть технологии получения альтернативной энергии на основе биологических процессов;
3. Получить представление о методах рекультивации земель на основе биотехнологий, о способах обогащения почв полезной микрофлорой.

**2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Презентации докладов.
2. Мультимедиа.

**2.15.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Подготовка докладов с презентациями на 7-10 минут
2. Обсуждение докладов.

## **2.16 Лабораторная работа № 16 (2 часа)**

**Тема: «Защита рефератов. Итоговое занятие»**

**2.16.1. Цель работы:** Продемонстрировать аудитории наиболее важные направления развития биотехнологии во всех отраслях производства.

**2.16.2. Задачи работы:**

1. Представить самостоятельную работу по заданной теме.
2. Защитить реферат.
3. Текущая аттестация знаний.

**2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Презентации докладов.
2. Мультимедиа.

**2.16.4 Описание (ход) работы:** Устный ответ по вопросам:

1. Подготовка к устному опросу по содержанию реферата
2. Аттестация знаний, получение допуска к экзамену.