

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.07 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 заочная

СОДЕРЖАНИЕ

- 1. Конспект лекций.....3**
- 2. Методические указания по проведению практических занятий.**

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 тотипотентности клеток в клонировании животных; создания генетически идентичных стабильных микроклонов 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 соматоклональной 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.

1.5. Методы и этапы микроклонального размножения.

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.

5. Методы и этапы микроклонального размножения.

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.

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.

Термо- и хемотерапия маточных растений.

1.3. Лекция №3 (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, «липкие 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, кокультивирование агробактерий с протопластами и листовыми дисками, электропорация, микроинъекция ДНК, липосомный перенос вектора.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

2.1 Практическое занятие № 1 (2 часа).

Тема: Методы работы с суспензионными культурами клеток.

2.1.1 Задание для работы:

1. Ознакомиться с описанием методов получения суспензионных культур и контроля качества суспензии.

2. По ЭУП «Биотехнология» изучить предмет и задачи биотехнологии.

2.1.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Используя объяснение преподавателя дать описание методике получения каллусной ткани из тканей растения.

2. Дать описание принципа приготовления суспензионных культур, пассирования, определения жизнеспособности суспензии, составления кривых роста, метода плейтинга.

3. Изучить по ЭУП «Биотехнология» тему: Предмет и задачи биотехнологии» (составить конспект).

Материал, включающий описание методов работы с суспензионными культурами.

Работа 1. Получение суспензионной культуры из каллуса

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

Объяснение. Обычно суспензию 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 суспензионной 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 суспензии), обеспечивающий клеточное размножение в суспензии, обычно составляет 10—20% от общего объема суспензии 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 кончиком, 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 5×10^4 – 10^5 до 5×10^6 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) сливается в одну емкость. К 1 объему исследуемой суспензии добавить 2 объема хромовой кислоты. Поставить в термостат при 60° 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 показателя 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. Профильтровать 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 попользуют 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 суспензии на твердую агаризованную среду (метод плейтинга)

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

Объяснение. Для проведения клеточной селекции обычно применяют высев мелкоагрегированной суспензии 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. Суспензию налить в стерильный цилиндр и поставить на 5 мин. Отобрать пипеткой 5 мл верхней фракции суспензии (она обогащена одиночными клетками) и смешать в 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 парафином. Через 3-5 недель подсчитать колонии диаметром более 1мм. Эффективность высева характеризует репродуктивный потенциал суспензии:

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

2.1.3 Результаты и выводы: Знать основные методы работы с суспензионными 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 Практическое занятие № 2 (2 часа).

Тема: Методы клеточной селекции.

2.2.1 Задание для работы:

1. Ознакомиться с методами получения клеточных клонов в клеточной селекции.
2. Ознакомиться с методами получения гаплоидов и преодоления постгамной несовместимости при отдаленной гибридизации.

2.2.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Используя объяснение преподавателя дать описание методике получения клеточных клонов, из которых регенерируют солеустойчивые и засухоустойчивые растения.
2. Дать описание принципа получения гаплоидов методом андрогенеза *in vitro* и культивирования зародышей аллополиплоидов *in vitro*.

Материал, включающий описание методов работы с селективными средами.

Работа 6. Высев суспензии на селективные среды с добавлением NaCl

Материалы и оборудование: суспензия 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). Среда 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 суспензию 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 повышен-

ному осмотическому давлению питательной среды, т. е. отбираются клетки, обладающие высокой водоотнимающей и водоудерживающей способностью.

Ход работы. Суспензию налить в стерильный цилиндр и дать отстояться 5 минут. Отобрать 10 мл верхней фракции суспензии (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 провести со средой, содержащей 0,5; 1,0; 1,5; 2,0% NaCl. Обычно плотность посева равняется 1×10^4 клеток в 1 мл. Через 4 недели подсчитать в каждой чашке колонии размером более 1 мм. Сравнить количество колоний на селективных средах и на контрольной среде, приняв контроль за 100%. Определить эффективность посева при каждой концентрации NaCl.

Эффективность посева = (количество посеянных 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.

Индукция 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 по 5 пыльников в культуральный сосуд. Извлечение неповрежденных пыльников из очень маленьких цветочных почек следует проводить под бинокулярной лупой. У мелких бутонов 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 пыльца.

Поврежденные пыльники обязательно отбрасывают, так как в противном случае это ведет к гибели всего пыльника и, кроме того, каллус может образоваться не из пыльца, 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 пыльца с дефектами.

При культуре пыльников образующиеся из пыльца 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 повышена 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 вычлняют 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 диацита или сулемы 10 мин. Раствор слить во флакон для повторных стерилизации, 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 парафилма. Через 1 мес. рассмотреть результаты опыта.

2.2.3 Результаты и выводы: Иметь представление о моделировании селективных сред, получении гаплоидов *in vitro*, преодолении постгамной несовместимости у аллополиплоидных зародышей и практическом значении данных технологий.

2.3. Практическое значение №3 (2 часа)

**Тема: Биотестирование регуляторов роста и развития растений.
Фитогормональная регуляция в с/х производстве**

2.11.1 Задание для работы:

1. Ознакомиться с цитогенетическим анализом на луке-батуне.
2. Ознакомиться с морфометрическим анализом на пшенице.
3. Определить роль фитогормональной регуляции в производстве с/х культур.

2.11.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Используя объяснение преподавателя дать описание фиторегуляторам и методике биотестирования фиторегуляторов.
2. Дать описание молекулярного механизма взаимодействия ретардантов с клетками растений и методике выявления механизма с помощью экзогенных гиббереллинов.
3. Изучить по ЭУП «Биотехнология» тему: Основы клеточной инженерии (составить конспект).

Материал, включающий описание методов работы с биотестами.

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, триазолпроизводным, этиленпродуцентам и гидразинпроизводным. 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 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°С.

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 обуславливается 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 слабом 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°С.

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 (х, у) 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 $1 + НСР_{05}/x_{cp}$ - компоненты действуют синергично

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

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

Работа 12. Оценка мутагенного действия фитогормонов и фиторегуляторов

Материалы и оборудование: семена лука-батун; 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 aberrаций.

Прекрасную модель для первичного скрининга химического соединения на мутагенную активность представляет лук-батун. Меристематические клетки корней лука-батун 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-батун. 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-батун. 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 aberrаций хромосом. Данные цитогенетических исследований заносят в специальную таблицу (табл. 1, 2).

При оценке индукции aberrантных клеток в проростках лука-батун вычисляют долю (%) (А) aberrантных клеток (М) 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 $t_d > t_{st}$

2.11.3 Результаты и выводы: Иметь представление о фитотестировании как способе выявления токсичности, мутагенности веществ, а также методе распознавания молекулярных механизмов воздействия фиторегуляторов на растения.

2.4 Практическое занятие № 4 (2 часа).

Тема: Защита рефератов. Итоговое занятие.

2.4.1 Задание для работы:

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

2.4.2 Краткое описание проводимого занятия:

Подготовиться в устному опросу по содержанию реферата.

2.4.3 Результаты и выводы: Итоговая аттестация знаний.