

**УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОРДЕНОВ ОКТЯБРЬСКОЙ
РЕВОЛЮЦИИ И ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

АГРОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

**КАФЕДРА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ,
ЭКОЛОГИИ И РАДИОЛОГИИ**

СОГЛАСОВАНО

Председатель методической
комиссии агротехнологического
факультета Т. Н. Камедько

СОГЛАСОВАНО

Декан агротехнологического
факультета Н. А. Дуктова

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ
«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ»**

для специальности 1 – 33 01 06 Экология сельского хозяйства

Составители:

Никонович Т.В., кандидат биологических наук, доцент кафедры сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии

Иванистов А.Н., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии

Рассмотрен и утвержден на заседании научно-методического совета академии 26.06. 2024 г. протокол № 10

Рецензенты:

Живлюк Е.К. доцент кафедры растениеводства УО «Гродненский государственный аграрный университет», кандидат биол. наук, доцент;

Спиридович Е.В., заведующий лабораторией прикладной биохимии ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», кандидат биол. наук, доцент

РАССМОТРЕН на заседании кафедры сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии протокол № 12 от 17.06.2024 г.

РАССМОТРЕН И РЕКОМЕНДОВАН методической комиссией агротехнологического факультета протокол № 10 от 25.06 2024 г.

Биотехнология в растениеводстве: учебно-методический комплекс / Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия. Сост. Т. В. Никонович, А. Н. Иванистов. – Горки, 2024. 116 с.

© Учреждение образования
«Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Пояснительная записка.....	4
1. Теоретический раздел.....	6
1.1. Примерный тематический план лекций.....	6
1.2. Опорный конспект лекций.....	7
2. Практический раздел.....	62
2.1. Примерный тематический план лабораторных занятий.....	62
2.2. Методические материалы по учебной дисциплине для выполнения лабораторных занятий.....	63
3. Раздел контроля знаний.....	95
3.1. Вопросы текущей аттестации	95
3.2. Экзаменационные вопросы	97
3.3. Критерии оценок результатов учебной деятельности	99
4. Вспомогательный раздел.....	100
4.1. Учебная программа.....	100
4.2. Учебно-методическая литература.....	115

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Биотехнология является новой областью биологической науки. Успехи, достигнутые биологией за последние годы, позволили сознательно управлять биологическими процессами, сделали возможным направленное конструирование молекул наследственности, отдельных клеток и целых организмов, что и привело к созданию нового направления в науке – современной биотехнологии.

Современная биотехнология – это наука, изучающая использование организмов, биологических процессов и систем в производстве, включая превращение различных видов сырья в высококачественные продукты. В связи с этим современные специалисты, работающие в сельском хозяйстве должны в совершенстве владеть методами биотехнологии и биоинженерии, уметь использовать их для увеличения производства сельскохозяйственной продукции, улучшения её качества, защиты окружающей среды от загрязнения и повышения устойчивости всего агропромышленного производства. Поэтому важно, чтобы в процессе обучения студент освоил современные и перспективные биотехнологические методы и приобрел практические навыки их использования.

Учебно-методический комплекс (УМК) – совокупность взаимосвязанных и взаимодополняющих дидактических средств обучения по дисциплине учебного плана специальности, способствующих эффективному освоению студентами учебного материала дисциплины «Биотехнология в растениеводстве» и необходимых для организации и осуществления учебного процесса.

Цель УМК – повышение качества учебно-методического обеспечения учебного процесса, включая самостоятельную аудиторную и внеаудиторную работу студентов, путем обеспечения организационной и содержательной целостности дидактических средств обучения по учебной дисциплине «Биотехнология в растениеводстве» в целях достижения требований образовательных стандартов высшего образования.

Задачи УМК:

- целостное и качественное учебно-методическое обеспечение дисциплины, отвечающее современным требованиям в формировании системы профессиональных компетенций будущих специалистов;
- обеспечение учебного процесса современными учебными материалами, способствующими повышению качества подготовки специалистов;
- формирование навыков самостоятельной работы студентов с информацией, рациональной организации учебного труда, выработки оптимального алгоритма самостоятельного изучения материала;
- содействие реализации системы контроля и самоконтроля результатов обучения, их коррекции и оценки.

Функции УМК:

- реализация учебно-методического комплексного обеспечения дисциплины «Биотехнология в растениеводстве»;
- объединение различных дидактических средств обучения и подчинение их общим целям образовательного процесса;
- конкретизация требований к содержанию изучаемой дисциплины «Биотехнология в растениеводстве», к знаниям, умениям и навыкам студентов согласно образовательного стандарта специальности 1-33-01-06 Экология сельского хозяйства;
- стимулирование самостоятельного изучения студентами учебного материала.

При разработке УМК концептуальным является системно-деятельностный подход, с позиций которого, обучение рассматривается как целостный процесс с учетом требований современной дидактики:

- детерминирование и обеспечение учебно-познавательной деятельности студентов, согласно которому определяется целевая программа действий студентов и обеспечивается со-

ответствующими средствами обучения, а также создаются условия для самоконтроля знаний студентов и их возможной коррекции;

- эффективность позволяет обеспечить связь между целями и результатами обучения при непрерывном контроле над ходом достижения поставленных целей;

- единство инвариантного и вариативного обеспечивает возможность последовательного совершенствования содержания и формы УМК с целью соответствия современным требованиям к подготовке специалистов.

Учебно-методический комплекс по дисциплине «Биотехнология в растениеводстве» направлен на получение теоретических знаний и практических навыков по программе курса и имеет своей целью оказание учебно-методической помощи студентам в успешном изучении дисциплины. Учебно-методический комплекс является, прежде всего, набором учебно-методических материалов, лежащих в основе организации образовательного процесса по изучению биотехнологических приемов для создания и использования биологических объектов с целью интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения. Содержание учебно-методического комплекса по дисциплине построено на основе учебной программы учреждения высшего образования по учебной дисциплине для специальности 1-33-01-06 Экология сельского хозяйства.

Рекомендации по работе с УМК

Для формирования устойчивых знаний, умений и навыков по дисциплине «Биотехнология в растениеводстве» прежде всего, осуществляется знакомство с теоретическим разделом УМК, после чего навыки и умения закрепляются во время лабораторных занятий. Дополнительная информация, необходимая для расширенного восприятия вопросов, содержащихся в их перечне, может (и должна) быть получена при самостоятельной работе с литературными источниками, рекомендуемыми во вспомогательном разделе УМК, а также при обсуждении и закреплении материала на индивидуальных консультациях. УМК выполнен в печатном виде и на электронном носителе.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1. ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ЛЕКЦИЙ

№ п.п.	Темы лекций
	Введение
1.	Регуляторы роста и развития растений в биотехнологии и растениеводстве
2.	Клеточная инженерия
3.	Применение методов <i>in vitro</i> в селекции растений
4.	Применение методов <i>in vitro</i> для размножения растений
5.	Основы генетического анализа
6.	Генетическая инженерия
7.	Биотехнология микроорганизмов

ОПОРНЫЙ КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология – это наука о методах получения полезных для человека веществ и продуктов в управляемых условиях, используя микроорганизмы, клетки животных и растений или изолированные из клеток биологические структуры.

В современном представлении биотехнология – это промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами.

С древних времен известны отдельные биотехнологические процессы, используемые в различных сферах практической деятельности человека. К ним относятся хлебопечение, виноделие, приготовление кисломолочных продуктов и т. д. Однако биологическая сущность этих процессов была выяснена лишь в XIX в., благодаря работам Луи Пастера (открыл механизмы брожения – спиртовое брожение происходит только в присутствии дрожжей, причем живых).

Попытки культивировать изолированные клетки ткани растений делались давно, и в истории развития этого метода можно выделить несколько этапов.

I этап (1892–1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Хаберландт, Фёхтинг, Рехингер. Они пытались культивировать в растворе сахарозы различные растительные ткани. Для сегментов стеблей одуванчика и тополя был изучен первичный каллус. Не достигнув положительных результатов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, которые подтвердились позже. Так, Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки, то есть способности клеток реализовать свой потенциал развития и давать начало образованию целого растения при определенных условиях культивирования.

II этап (1902–1922 гг.) ознаменовался созданием первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти среды были природного происхождения и содержали плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались неудачными, так как использовались малоподходящие компоненты для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

III этап (1922–1932 гг.). Американский ученый Робинс и немецкий ученый Котте показали возможность культивирования на твердых питательных средах тканей растений. Однако через определенное время растительные ткани погибали.

IV этап (1932–1940 гг.). Французский ученый Р. Готре продемонстрировал возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересеивания их на свежую питательную среду. Впоследствии с помощью этого метода многие растения были введены в культуру.

V этап (1940–1960 гг.). Открытие в 1955 г. нового класса фитогормонов – цитокининов, позволило стимулировать деление клеток кусочка ткани сердцевины паренхимы табака, лишенного проводящих пучков и камбия. В зависимости от концентрации и соотношения стимуляторов роста можно было усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. Установлено положительное действие натуральных экстрактов типа эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений для поддержания неорганизованного клеточного роста, и стимуляции процессов морфогенеза в культуре каллусных тканей и клеточных суспензий.

VI этап (1960–1975 гг.). Профессор Ноттингемского университета Э. Коккинг разработал ферментативный метод получения изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях. Его сотрудником Пауэром было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию со-

матических гибридов. Французский ученый Ж. Морель разработал метод микроразмножения растений в условиях *in vitro* с использованием меристем культуры и применял его для получения оздоровленного посадочного материала орхидей.

VII этап (1975 г. – по настоящее время). Продолжается быстрое развитие технологий *in vitro*, изучение биологии культивируемых объектов, разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, методы мутагенеза и клеточной селекции, методы получения гаплоидных растений, совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе *Ti* – и *Ri* – плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*. С помощью методов генной инженерии разработан эффективный метод переноса генов для двудольных растений. Таким образом, за последние десятилетия был сделан большой шаг вперед в развитии технических приемов работы с изолированными тканями и клетками растений.

Значительные успехи, достигнутые во второй половине XX в. в фундаментальных исследованиях в области биохимии, биоорганической химии, молекулярной биологии, создали предпосылки для управления элементарными механизмами жизнедеятельности клетки, что явилось мощным импульсом для развития биотехнологии.

Новая биотехнология началась после открытия Дж. Уотсоном и Ф. Криком строения генетического материала – ДНК (1953 г.) – (установлена модель двойной спирали молекулы ДНК, расшифрован механизм действия генетического аппарата). Выяснение роли нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации, расшифровка генетического кода, раскрытие механизма индукции и репрессии генов, совершенствование технологии культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений и животных позволили разработать методы биотехнологии, с помощью которых можно искусственно создавать новые формы высокопродуктивных организмов.

Все эти достижения поставили биотехнологию на новый качественный уровень, отличающийся возможностью сознательно управлять клеточными процессами.

Биотехнологический процесс включает ряд этапов: подготовку объекта, его выделение, очистку, модификацию, культивирование и использование. Многоэтапность процесса обуславливает необходимость привлечения к его осуществлению самых различных специалистов: генетиков и молекулярных биологов, клеточных физиологов, цитологов, биофизиков, электронщиков, кибернетиков и др.

Биотехнология как наука включает основные разделы ее составляющие:

1. Клеточная инженерия.
2. Генетическая инженерия.
3. Учение о регуляторах роста.

Клеточная инженерия – в ее основе лежат различные манипуляции с клетками и тканями в культуре *in vitro* (*in vitro* – «в стекле» – выращивание клеток и тканей изолированно от организма на искусственной питательной среде в контролируемых условиях). Это сочетание методов соматической гибридизации (слияние двух неполовых – соматических – клеток); гаплоидии; клеточной селекции и микрклонального размножения (размножение растений в культуре *in vitro*).

Генетическая инженерия изучает проблемы изменения генетической программы клеток, то есть направленное конструирование новых живых организмов с заранее заданными свойствами. В круг интересов генетической инженерии входят *генная инженерия* – понятие более узкое, чем генетическая инженерия, и имеет отношение только к отдельному гену или генам; в ее задачу входят выделение, конструирование и клонирование новых рекомбинантных генов или молекул ДНК, создание банков генов; *генетическая трансформация* (передача чужеродных генов от донора реципиенту); *получение трансгенных организмов* (организмов, несущих чужеродную генетическую информацию).

Раздел биотехнологии о регуляторах роста и развития растений изучает свойства эндогенных и экзогенных регуляторов, их взаимодействие, действие на геном, использование в сельскохозяйственной практике.

Первоочередные задачи биотехнологии:

1) Получение новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормонов роста человека и т. д.), позволяющих осуществить в здравоохранении раннюю диагностику и лечение тяжелых заболеваний – сердечно-сосудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных.

2) Создание микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений; новых высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, полученных методами генетической и клеточной инженерии.

3) Создание ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов и др.) для повышения продуктивности животноводства; новых методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных; ускоренное размножение животных в результате пересадки эмбрионов; создание трансгенных животных.

4) Разработка новых технологий получения хозяйственных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности.

5) Разработка технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, использования сточных вод и газовоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений.

Применение методов биотехнологии в сельском хозяйстве

Применение методов биотехнологии в селекции. На сегодняшний день рост урожайности сельскохозяйственных культур на 30–40 %, а для кукурузы на 50 % обусловлен успехами селекции. Исследования последних лет убедительно показывают, что методы культуры тканей, клеток и протопластов играют значительную роль при создании новых образцов растений. Отбором новых форм растений на уровне клетки занимается *клеточная селекция*, благодаря которой возможно ускорять селекционный процесс, исключать сезонность в работе, увеличивать объем экспериментального материала, так как при переходе на клеточный уровень можно в одном опыте использовать до десятков миллионов клеток. Методом клеточной селекции были получены растения табака с более крупными листьями и стеблями; созданы формы картофеля, сочетающие высокую урожайность с устойчивостью листьев к фитофторозу.

Гибридизация соматических клеток позволяет скрещивать формы и виды растений, для которых скрещивание половым путем невозможно. Методами соматической гибридизации были получены внутривидовые (петунии, дурмана), межвидовые (моркови, дурмана, картофеля), межродовые (томат x картофель, дурман x белладонна) гибриды.

Используя методы биотехнологии, имеются возможности получать в условиях *in vitro гаплоиды* – растения с уменьшенным вдвое набором хромосом. Применение гаплоидов в селекции позволяет на 3–4 года сократить процесс получения гетерозисных гибридов. В Беларуси получены гаплоиды рапса, картофеля, кукурузы.

Эмбриокультура – выращивание зародыша, извлеченного из семени на искусственной питательной среде. Метод позволяет преодолевать постгамную (после оплодотворения) несовместимости при отдаленной гибридизации.

Использование методов *генетической инженерии* способствует получению трансгенных растений, в геном которых встроены гены других видов, например, сорта табака устой-

чивые к гербицидам.

Применение методов биотехнологии в семеноводстве. Используя методы культуры изолированных органов и тканей растений, можно получать в большом количестве оздоровленный (безвирусной) посадочный материал. Микрোকлональное размножение представляет собой массовое бесполое размножение растительных организмов, основанное на использовании метода культуры *in vitro*, который позволяет получать большое количество однородного посадочного материала. Например, одно растение герберы при размножении обычными способами может дать в год до 50–100 растений, а при микрোকлональном размножении – до 1 млн ед. посадочного материала. Из одной верхушки побега яблони за 8 месяцев выращивают до 60 тыс. побегов. Из одного растения картофеля можно получить до 14–15 тыс. растений в год. Такие технологии особенно актуальны для культур, размножаемых в производстве преимущественно вегетативно: картофель, плодовые, ягодные, декоративные, лесные растения. Поскольку при длительном их размножении традиционными способами (черенками, луковицами, клубнями и т. д.) дочерние растения накапливают вирусную, бактериальную и грибную инфекцию, что снижает качество посадочного материала.

Применение методов биотехнологии для защиты растений. Основателем микробиологического метода борьбы с вредными насекомыми является известный французский микробиолог Луи Пастер. В 1874 г. он предложил использовать бактерии против опасного вредителя винограда филлоксеры. Наряду с бактериями для борьбы с вредителями применяются вирусы, так как вирусные болезни достаточно широко распространены среди насекомых. Могут быть использованы также биологически активные вещества самих насекомых – феромоны (влияют на обмен веществ других особей того же вида, выделяются в окружающую среду), ювенильный гормон (предотвращает превращение личинки в куколку), гормон линьки и др.

В современном сельскохозяйственном производстве практически невозможно обойтись без гербицидов. И хотя гербициды нового поколения высокоэффективны в низких концентрациях и быстро разрушаются в почве, они не являются селективными и ингибируют рост как сорняков, так и культурных растений. Большинство гербицидов действуют на растения путем инактивации жизненно важных ферментов, связанных с фотосинтезом или другими биосинтетическими путями. Исходя из механизмов действия гербицидов на растения разработано три основных генно-инженерных подхода к созданию гербицидоустойчивых растений:

- модификация растительного фермента мишени, в результате которой он теряет чувствительность к гербициду;
- индуцирование повышенного синтеза фермента без нарушения его нормального метаболизма;
- введение в геном растения фермента, способного деградировать и детоксицировать гербицид в растении.

При возделывании устойчивой к Раундапу сои возможно ограничиваться лишь одной обработкой посевов этим гербицидом, традиционные же сорта требуют многократной обработки несколькими видами гербицидов. При этом затраты на химические средства защиты значительно сокращаются.

Многие насекомые, а также болезни, вызываемые грибной, бактериальной и вирусной инфекцией, наносят большой ущерб сельскохозяйственному производству. Хозяйства вынуждены тратить большие средства на закупку различных химических средств для борьбы с вредителями и патогенами. При этом вносимые химикаты загрязняют окружающую среду, оказывают вредное влияние на млекопитающих и полезных насекомых. Поэтому поиск и создание с помощью генно-инженерных методов устойчивых к вредителям и болезням форм растений сейчас одна из актуальнейших задач.

Известно, что бактерия *Bacillus thuringiensis* синтезирует белковые кристаллические структуры, обладающие сильным инсектицидным действием. Попадая в кишечник, белок

расщепляется под действием протеаз до активного токсина, который и вызывает гибель насекомого. Известно и уже изолировано много различных *Bt* генов (*cry* гены), кодирующих инсектицидные белки, которые очень специфичны для различных видов насекомых. Важно подчеркнуть, что эти белки совершенно нетоксичны для млекопитающих, рыб, беспозвоночных и полезных насекомых.

Созданные трансгенные растения баклажана полностью устойчивы к колорадскому жуку. Первый коммерческий сорт картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, создан фирмой Монсанто путем введения в геном картофеля, модифицированного *Bt* гена *cry III*.

Активно ведутся работы по клонированию генов и созданию трансгенных растений, устойчивых к грибным, бактериальным и вирусным инфекциям.

Применение методов биотехнологии для решения проблемы азотфиксации. Атмосферный азот могут усваивать особые микроорганизмы, называемые азотфиксаторами. К их числу, прежде всего, относятся клубеньковые бактерии. На 1 га посевов бобовых культур фиксируется от 100 до 250 кг атмосферного азота. Часть азота используется бобовыми для синтеза азотсодержащих соединений (аминокислот, нуклеиновых кислот, белков, азотистых оснований) и около 30 % усвоенного азота остается с пожнивными остатками в почве, что обеспечивает ее плодородие. В природе существуют и свободноживущие азотфиксаторы. В 1894 г. С. Н. Виноградский впервые выделил азотфиксирующую бактерию рода *кlostридиум*. *Азотобактер* еще активнее фиксирует атмосферный азот, а также сине-зеленые водоросли (цианобактерии) (до 50 кг N с 1 га).

Перед учеными поставлена задача – перенести гены азотфиксации из микроорганизмов в небобовые растения для придания им способности к усвоению атмосферного азота. Успешное решение этой проблемы открывает поистине фантастические возможности: пшеница, хлопчатник, подсолнечник, сахарная свекла смогут обходиться без внесения минерального азота, поскольку сами будут обеспечивать свои потребности в этом элементе. Работы в этой области стали возможны благодаря достижениям генетической инженерии. Однако система по переносу генов азотфиксации очень сложна, так как за этот процесс ответственны 17 ниф-генов. Тем не менее, этот путь повышения продуктивности растений имеет перспективу в будущем. Уже делаются попытки ввести гены бобовых растений в зерновые культуры.

Более реально на сегодняшний день – это применение бактериальных удобрений, представляющих собой препараты, содержащие почвенные микроорганизмы. Внесение их в почву улучшает корневое питание растений.

В качестве бактериальных удобрений особенно часто используются препараты клубеньковых бактерий. Наиболее перспективная форма таких препаратов – это *ризоторфин*, представляющий собой простерилизованный гамма-излучением торф, пропитанный клубеньковыми бактериями. Достоверная прибавка урожая зернобобовых культур от обработки семян ризоторфином составила в среднем от 1,5 до 3,5 ц/га, зеленой массы – 18 ц/га, сена – до 7 ц/га.

Развитие биотехнологии положительно сказалось на получении бактериального препарата *азотобактерина*, производимого на основе использования свободноживущего микроорганизма *азотобактера*. В опытах с кукурузой было установлено, что заражение семян азотобактерином увеличивает урожайность на 14–18 ц/га. При этом сбор белка с 1 га возрастает с 39 до 53 кг (в пересчете на азот).

Применение методов биотехнологии для повышения плодородия почв и продуктивности растений. Быстрый рост народонаселения в мире, сокращение пахотных земель делают все более острыми вопросы производства продуктов питания. Генно-инженерные биотехнологии в сочетании с другими агроприемами способны помочь решить проблемы обеспечения людей продуктами питания в 21 веке. В последние годы большое значение приобретают работы по созданию растений, устойчивых к таким факторам среды, как холод, засуха, засоление почвы, повышенное содержание азота, тяжелых металлов и др.

Перспективным в плане улучшения фотосинтетических способностей может быть об-

мен различными компонентами фотосистем между различными растениями. Возможен обмен или модификация генов, кодирующих карбоксилазу, с целью более интенсивной фиксации CO₂ из воздуха.

Использование методов биотехнологии в животноводстве

В настоящее время методы биотехнологии начинают все шире проникать в практику разведения насекомых, рыб, крупного рогатого скота, других домашних животных.

Широкое распространение получил метод *трансплантации эмбрионов* – это биотехнологический метод воспроизводства, заключающийся в получении одного или нескольких эмбрионов из матки племенных животных (называемых донорами) и пересадке их в матку менее ценных животных (реципиентов), где эмбрионы развиваются до родов. С помощью пересадки эмбрионов можно резко увеличить численность ценного потомства.

Метод трансплантации эмбрионов открывает широкие возможности для манипуляций с генетическим материалом. Оказалось, что в оплодотворенную яйцеклетку методов микроинъекции можно ввести чужеродный ген. Например, самке мыши водилась яйцеклетка с геном, определяющим образование гормона роста. В результате была получена мышь в два раза большего размера.

Разработан метод *криоконсервирования* эмбрионов, который позволяет: хранить ценный в племенном отношении материал; дает возможность вести международную торговлю ценными формами сельскохозяйственных животных; используется для сохранения наследственного материала животных, находящихся под угрозой исчезновения.

Только с развитием биотехнологии и, в частности, генетической инженерии возникли предпосылки для надежды на успех в получении генетически одинаковых копий выдающихся животных, то есть на возможность осуществления клонального размножения эмбрионов, подобно клональному микроразмножению растений. Процесс заключается в следующем. Если на стадии четырех клеток из эмбриона удалить отдельные клетки и каждую из них снова культивировать до стадии четырех клеток, то получится 16 эмбрионов. При повторении процесса четыре раза возможно получить 4096 одинаковых в генетическом отношении эмбрионов. Культивирование этих эмбрионов до стадии, когда их можно заморозить, позволило бы в дальнейшем пересадить их 4 тыс. реципиентов.

Для лечения животных применяются антибиотики, однако в результате многократного и длительного использования антибиотиков в качестве добавок к корму скота для стимулирования роста животных и защиты их от инфекции возможна выработка резистентности к антибиотикам у патогенных видов бактерий животных, которая может распространяться на бактерии человека через промежуточные внехромосомные плазмидные элементы. Поэтому только антибиотики-ветераны, такие, как, хлортетрациклин или биомицин входят в ассортимент разрешенных антибиотиков.

В кормлении животных широко применяют продукты биотехнологического процесса. Так продуцентами кормового и пищевого белка являются микроорганизмы: дрожжи, бактерии, плесени, одноклеточные водоросли. При этом в качестве субстрата применяются отходы сельского хозяйства – солома, сточные воды. Резервом получения кормового белка являются микроскопические водоросли – хлореллы, которые с 1 га поверхности водоема позволяют получать до 16 тонн белка.

Ростовые *гормоны* в животноводстве ускоряют нарастание мышечной массы при откорме. Это не стероидные гормоны, которые сейчас ограничены в применении, а природные белковые, биосинтез которых налажен с помощью генно-инженерных микроорганизмов-продуцентов.

Кормовые аминокислоты. Для сельскохозяйственных животных к незаменимым аминокислотам относятся гистидин и аргинин, для молодняка птицы – пролин. Эти незаменимые аминокислоты не синтезируются организмом, а вносятся с кормом. При этом соотношение разных аминокислот должно примерно соответствовать соотношению их в белке мяса, яиц,

молока животных (в зависимости от направления животноводства). Если какая-то аминокислота имеет концентрацию гораздо большую, чем нужно по соотношению, прирост массы животного не изменится при кормлении такой смесью. Избыток оказывается «лишним». И наоборот, если концентрация какой-то одной аминокислоты будет меньше нужной по соотношению, то рост животного будет определяться именно этой аминокислотой. В белке зерна пшеницы (глютене) много различных аминокислот, но одна из них имеет концентрацию, на 30–40 % меньше. Эта аминокислота – лизин. Если ее добавить к корму, состоящему из зерна пшеницы, в относительно небольшом количестве, то белок станет почти в полтора раза более полноценным, и на таком сбалансированном корме соответственно будет в полтора раза больший рост животного без изменения количества самой пшеницы.

Пробиотики. Это полезные микроорганизмы пищеварительного тракта животных, которые добавляют в виде живого биопрепарата в корм. Для повышения усвояемости грубых кормов животным с одноsegmentным желудком в качестве микроорганизмов-пробиотиков используют микрофлору, выделенную из желудка грызунов, лосей, бобров, умеющих перерабатывать древесину.

Силосные закваски. Одним из перспективных приемов, способным снизить потери и сохранить основные питательные свойства натуральных кормов за счет подавления или прерывания биохимических, или микробиологических процессов, протекающих во влажном растительном сырье, является применение силосных заквасок (биологических консервантов). Они содержат высокую концентрацию полезных бактерий, способных быстро вытеснить условно-патогенную микрофлору, вызывающую порчу корма. К биологическим консервантам относятся продуценты органических кислот – лактобациллы, пропионовокислые бактерии, энтерококки. Они являются биологическими продуцентами органических кислот, а также биоцидов, губительно действующих на гнилостную микрофлору, в том числе на размножение плесневых грибов, вырабатывающих микотоксины. Биологические консерванты активно применяются при силосовании зерна, легко- и трудносилосующихся растений. Следует отметить, что консервирование кормов с использованием биологических консервантов отличается экологической чистотой, так как они не оказывают токсического действия на окружающую среду, на микрофлору желудочно-кишечного тракта животных, не требуют применения защитных средств при их внесении в консервируемое сырье, заметно снижают опасность коррозионного поражения техники.

Биотехнология и медицина

Литературные данные свидетельствуют, что в настоящее время с помощью генно-инженерных штаммов *Escherichia coli* получают более 70 протеинов, таких как инсулин, интерферон, антиген вируса гепатита С.

Раньше для получения гормонов использовались органы и ткани животных и человека (кровь доноров, удаленные при операциях органы, трупный материал), однако их требовалось много для получения небольшого количества продукта. Так, человеческий гормон роста *соматотропин* получали из гипофиза человека, каждый гипофиз содержит его не более 4 мг. В то же время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется около 7 мг соматотропина в неделю, а курс лечения должен продолжаться до половой зрелости. С применением генноинженерного штамма кишечной палочки *Escherichia coli K12* в настоящее время получают до 100 мг гормона роста на 1 литр среды культивирования. Соматотропин также способствует заживлению ран и ожогов, регулирует обмен кальция в костной ткани.

Инсулин – гормон поджелудочной железы, представляет собой основное средство лечения при сахарном диабете. Эта болезнь вызвана дефицитом инсулина и проявляется повышением уровня глюкозы в крови. Долгое время источником инсулина служили железы коров и свиней. Учитывая, что поджелудочная железа коровы весит 200–250 г, для получения 100 г кристаллического инсулина нужно 800–1000 кг исходного сырья. Инсулин построен из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот, последовательность которых бы-

ла установлена Сэнгером в 1955 г. В 1979 г. в США были синтезированы гены, кодирующие А и В цепи инсулина. Далее каждый синтетический ген встраивали в плазмиду *E. coli* в конце гена-галактозидазы. После этого синтезированные полипептиды отщепляли от фермента, проводили их очистку и цепи соединяли *in vitro* для получения полной молекулы инсулина. В клетках *E. coli* был также осуществлен биосинтез проинсулина, а не только отдельных ее цепей. Для этого на и-РНК проинсулина синтезировали ее ДНК-копию с помощью обратной транскриптазы (ДНК-полимераза). Этот способ имеет серьезное преимущество, поскольку различные этапы экстракции и выделения гормона сведены к минимуму. С помощью этого метода был получен высокий выход гормона – 200 г на 1000 л культуральной жидкости. Это эквивалентно количеству инсулина, выделенного из 1600 кг поджелудочной железы животных. Исследователям из компании «Генентек» потребовалось 10 месяцев, чтобы в сентябре 1978 г. получить инсулин человека в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Этот инсулин прошел самые серьезные и длительные испытания, которые показали, что он не вызывает никаких побочных явлений и отрицательных иммунологических реакций. Технология производства инсулина в бактериальных клетках имеет большие преимущества перед получением инсулина из поджелудочной железы животных: не зависит от перебоев или количества сырья, конечный продукт всегда имеет одинаковый состав и степень чистоты. В октябре 1982 г. был налажен выпуск «хемулина» (препарата синтетического инсулина человека) фирмой «Эли Лилли», которая затратила 100 млн долларов, чтобы начать поставку продукта на рынок.

Вакцины – специально выращенные болезнетворные микроорганизмы, вирусы и их компоненты, которые после специальной обработки вводят в виде ослабленной или убитой культуры в организм и обеспечивают за счет этого создание у человека иммунитета к данному заболеванию. Вакцины – это наиболее эффективное средство борьбы с инфекционными заболеваниями. В настоящее время выпускают живые вакцины, содержащие ослабленные живые клетки возбудителей инфекционных болезней, к тому же генетически измененные. Другая группа вакцин – убитые или инактивированные, клетки. Третья группа – «химические» вакцины, представляющие собой антигены, тем или иным способом извлеченные из микробных клеток. Четвертая группа – это специальным образом обезвреженные токсины, выделяемые некоторыми возбудителями заболеваний в культуральную жидкость (например, дифтерийный, столбнячный, ботулиновый и другие токсины).

Антибиотики – это не просто вещества, которые действуют против болезнетворных микроорганизмов, но это еще и вещества, получаемые с помощью микроорганизмов-продуцентов. В 1929 г. английский ученый Александр Флеминг обратил внимание на то, что вблизи плесени не растут многие болезнетворные микроорганизмы. Позднее было выделено вещество, синтезируемое плесенью, и названо – *пенициллином*. Во время Второй мировой войны было начато его производство и применение для лечения раненых. Эффект превзошел все ожидания; по некоторым данным, только в 1940-е и 1950-е годы с помощью пенициллина было спасено от смерти более 15 миллионов человек.

Сразу же после открытия пенициллина начались поиски и других антибиотиков. Обычно антибиотик не действует на все подряд микроорганизмы, да это и нежелательно: ведь наряду с болезнетворными будут уничтожаться полезные микробы, которые всегда есть в человеческом организме. Поэтому должен быть набор различных антибиотиков, пригодных для разных болезней. Но есть и другая сторона: болезнетворные микроорганизмы постепенно «привыкают» к действию антибиотиков; возникают микробы, которые вызывают заболевание, но нечувствительны к «старому» антибиотику. Конечно, такое «привыкание» происходит небыстро – в течение 10–15 лет. Но раз это все-таки происходит, ученым необходимо искать все новые и новые антибиотики и продуцирующие их микроорганизмы. Многие ученые в разных странах мира работают над этим. Сейчас существует уже более 3000 различных антибиотиков, все время ищут более продуктивные микроорганизмы для их биосинтеза и при этом достигают поразительных успехов. Например, плесень Флеминга давала актив-

ность по пенициллину не более 10 ед/мл. А современные штаммы микроорганизмов дают 50000 ед/мл того же пенициллина.

Витамины. Известно, что витамины сначала были найдены во фруктах и овощах, откуда их и получали. Позднее были открыты микроорганизмы, синтезирующие витамины гораздо быстрее, чем растения. Однако поскольку молекулы витаминов относительно просты, химики научились их синтезировать. Сейчас за биотехнологией осталось производство витаминов В₂ и В₁₂ и один из процессов в преимущественно химическом производстве витамина С.

Иммуномодуляторы. Физическое здоровье человека во многом определяется состоянием его иммунной системы. Найдены средства (интерфероны и интерлейкины), которые стимулируют иммунную систему. Их получали из крови человека. В настоящее время биотехнологи создали микроорганизмы, синтезирующие интерфероны с высокой скоростью.

Иммунодепрессанты. Бывают случаи, когда требуется не стимулировать иммунную систему, а наоборот, подавлять ее. Классический пример – пересадка органов: сердца, почек и других. Первые операции такого рода, несмотря на мастерство хирургов, заканчивались неудачно, так как чужеродный орган отторгался организмом. Сейчас после операций используют специальные вещества – иммунодепрессанты, многие из которых получают биотехнологическим путем, например, *циклоспорин А*. В результате больным удается жить с пересаженным органом полноценной жизнью.

Кровезаменители. Во многих случаях при операциях человеку необходимо переливание крови. В связи с этим созданы различные кровезаменители, например полиглюкин, которые синтезируют с помощью специальных микроорганизмов.

Стероидные гормоны. В детстве многие страдают диатезом, иногда возникает и более тяжелое заболевание – экзема. Для лечения этих болезней используют мази, основанные на стероидных гормонах, при получении которых применяют процесс биотрансформации.

Медицинские ферменты. С помощью биотехнологии получают ферменты, применяемые в медицине. Один из них – *стрептокиназа* – помогает растворять тромбы в кровеносных сосудах и тем самым спасает людей от преждевременной смерти. Другой фермент – *бета-галактозидаза* – помогает усваивать молочный сахар (лактозу) тем людям, у которых по генетическим причинам такой фермент в организме не вырабатывается. Фермент *протеазу* используют для очистки гнойных очагов, а также для лечения ожогов. *L-аспарагиназу* применяют для лечения рака: она лишает раковые клетки аминокислоты аспарагина; здоровым клеткам это не страшно – они сами синтезируют аспарагин. *Коферменты* – это вещества, которые усиливают деятельность многих собственных ферментов в организме человека. Но есть и другие коферменты, также получаемые с помощью биотехнологии, которые используют для лечения сердечных и других заболеваний, например, инозин, рибоксин, убихинон и др.

Медицинские аминокислоты. Известно, что белки состоят из аминокислот. Иногда заболевшего человека приходится «кормить» при помощи уколов. В этом случае вместо белкового питания дают смесь аминокислот, которую получают биотехнологическим путем – ферментативным расщеплением белка, или смесь аминокислот, каждую из которых получают специальным биосинтезом, когда аминокислота синтезируется особым штаммом микроорганизмов. Используют аминокислотные смеси и для питания спортсменов, наращивающих мышечную массу. Это не допинг, так как аминокислоты образуются и естественным путем при ферментативном расщеплении белка в желудке человека.

Подсластители. Биотехнология позволяет получать препараты на основе аминокислот, которые в 200 раз слаще сахара (аспартам) и при этом сахаром не являются. Они очень подходят больным диабетом и людям, склонным к полноте.

Биоразлагаемые полимеры. В хирургии применяют нити, которые позволяют сшить разрушенную ткань внутри организма человека и животного во время операции. Но необходимо, чтобы после того как шов заживет, сама эта нить разложилась и исчезла. Для этих це-

лей использовали «кетгут», представляющий собой кишку ягненка длиной около 30 м. Эта вымытая, скрученная и высушенная кишка и есть хирургическая нить. Она не совсем хороша, так как представляет собой чужеродный белок и вызывает иммунное отторжение – в виде воспаления. Биотехнология позволила создать биоразлагаемые полимеры в виде материала, напоминающего по свойствам полипропилен и способного к формированию нитей, штифтов для соединения костей, пленок и других необходимых компонентов. Такой материал называется *полигидроксibuтират* и получают его путем выращивания специальных бактерий. Этот прекрасный материал можно использовать и для создания лекарств более длительного действия (они выделяются из гранул с полигидроксibuтиратом по мере их растворения), а также для аппликаций на раны или ожоги.

Моноклональные антитела. В настоящее время развивается новое направление диагностирования различных заболеваний – применение моноклональных антител. Обычные поликлональные антитела содержатся в сыворотке крови иммунизированных животных. Но там, кроме целевых антител, есть и другие, что часто мешает диагностированию. По новому методу можно получать специфические антитела к клеткам разных органов одного человека, например, антитела к клеткам раковых опухолей, и появилась надежда на возможность лечения с помощью таких антител. Основанные на моноклональных антителах диагностикумы позволяют определять беременность, выявлять предрасположенность к диабету, ревматоидному артриту, устанавливать наследственные заболевания, сопровождающиеся утратой каких-то ферментов или белков.

Препараты против комаров. Наряду с различными химическими препаратами созданы биопрепараты, представляющие собой микроорганизмы, патогенные для личинок комаров и безвредные для человека и других животных. Этим препаратом обрабатывают места, где происходит размножение комаров (в частности, подвалы домов), что позволяет снизить их количество или полностью ликвидировать.

Нейропептиды. Ведется разработка биотехнологических методов получения естественных нейропептидов, которые ответственны в мозге человека за сон, боль, память, удовольствие и т. д. Подход тот же – с помощью генной инженерии «конструируют» микроорганизм, способный синтезировать соответствующий пептид.

Косметические токсины. В последнее время научились делать косметические средства, разглаживающие морщины и омолаживающие лицо, из ботулинов – сильнодействующих ядов паралитического действия, продуцируемых микроорганизмами.

Проект «Геном человека» и генная терапия. Сравнивая гены, ученые смогут выявить связи разных генетических вариаций и мутаций со всевозможными заболеваниями. Генотерапия постепенно начинает привлекать все большее внимание научно-популярных изданий и СМИ. Несколько десятков технологий генотерапии разных заболеваний прошли апробацию на тысячах больных и добровольцах в США, Англии, Франции и других странах. Первая фаза клинических испытаний, как известно, направлена на проверку безопасности нового средства (метода) лечения. Имеются сообщения о нескольких случаях возникновения лейкомиоподобных заболеваний после клинической апробации некоторых технологий генотерапии. Отмечается, что во всех таких случаях использовались векторы на основе ретровирусов. Сообщается также об отдельных случаях, когда введенный ген экспрессировался не столь длительно, как было запланировано.

Приведенные примеры, конечно, не исчерпывают всех перспектив биотехнологии в медицине, но они демонстрируют первостепенную важность биотехнологии для этого вида человеческой деятельности.

Использование биотехнологии в энергетике

Энергетический кризис побуждает искать новые источники энергии. Задача биотехнологов заключается в повышении эффективности получения энергии из биомассы на этапе её

накопления в процессе фотосинтеза и в процессе последующего получения из биомассы топлива в результате работы микроорганизмов, например, получение биогаза.

Наряду с прямым сжиганием древесины, соломы, навоза и других отходов животноводства, биотехнология позволяет получать более удобные для использования виды энергии различными способами.

Биотехнологическое получение метана из разнообразных органических отходов в настоящее время вполне реально. Уже сейчас во многих странах работают биогазовые установки. Процесс образования метана бактериями происходит в анаэробных условиях без доступа кислорода. В этом случае значительная часть углерода трансформируется в метан в результате брожения. Источниками органического вещества для биогазовых установок являются навоз или любые растительные остатки (ботва овощей, сорные травы, солома, листья деревьев, кустарников, хвоя, стебли кукурузы и др.), также отходы пищевой, микробиологической, лесной промышленности.

Достоинства навоза как сырья для биогазовых установок связаны с его высоким энергетическим потенциалом. Между тем при производстве биогаза качество навоза как удобрения сохраняется в так называемом шламе, образуемом в результате метанового брожения. Шлам оказался более ценным и эффективным удобрением, чем сам навоз, так как в ходе метанового брожения питательные элементы полностью сохраняются, а происходящие при этом превращения сложных органических соединений приводят к повышению доступности для растений питательных компонентов. Биоудобрения, производимые в биогазовых установках, повышают урожайность зерновых, пропашных и др. культур на 35–40 %, по сравнению с ее уровнем на полях, удобряемых необработанным жидким навозом.

Установки метанового брожения очень удобны для энергоснабжения в сельской местности, ввиду большой разбросанности потребителей энергии.

Сельскохозяйственные отходы – не единственный источник сырья для производства биогаза. В последнее время ставятся вопросы специального выращивания сырья для получения биогаза. Таким сырьем могут быть зеленая масса быстрорастущих растений и деревьев, водоросли и даже микроводоросли, которые растут быстрее. Существовал даже специальный проект «Биосоляр» для выращивания на поверхности моря в плавучих установках хлореллы, которая затем сразу же перерабатывается в биогаз, служащий энергетическим сырьем для снабжения прибрежных городов.

Получение водорода биофотоллизом воды. Водород, с точки зрения экологии, – идеальное топливо, имеющее высокую теплотворную способность ($12,8 \text{ кДж/м}^3$) и сгорающее без образования каких-либо вредных примесей. Однако получение водорода электролизом или химическим путем неэкономично. Существуют фототрофные бактерии, способные выделять водород под действием света. Пока они работают довольно медленно. Но в них заложены биохимические механизмы, содержатся ферменты, которые позволяют катализировать образование водорода из воды. Некоторые ферменты наряду с водородом образуют и кислород, то есть происходит биофотолиз воды. Это направление является перспективным в развитии биоэнергетики.

Биосинтез углеводов микроорганизмами. В настоящее время возможно получение жидких и твердых углеводов с помощью микроводорослей. Например, микроводоросль *Botriococcus braunii* (разновидности зеленого и красного цвета) под действием света накапливает до 75 % углеводов от сухой массы клеток. В США есть ферма, где на площади водоемов 52 тыс. гектаров выращивают микроводоросли, дающие около 4800 м^3 жидких углеводов в сутки. Существуют и другие виды микроорганизмов такого же типа. Например, в Израиле показана возможность культивирования микроводорослей *Dunaliella bardause* в пресных и соленых водах (вплоть до воды Мертвого моря) с получением глицерина в количестве до 85 % от сухой массы клеток. Клеточные остатки после выделения глицерина могут быть использованы как корм, содержащий к тому же биологически активный провитамин бета-каротин.

Биотехнология и защита окружающей среды от загрязнения

Биотехнология призвана внести весомый вклад в решение проблемы защиты природной среды от токсических примесей. Биотехнологической переработке могут быть подвергнуты отходы различных отраслей промышленности. Например, для выращивания различных микроорганизмов вместо дорогостоящей глюкозы могут быть использованы отходы текстильной, целлюлозно-бумажной промышленности.

Использование микроорганизмов как биологических агентов для получения биомассы, органических кислот, спиртов, аминокислот, ферментов, гормонов и других соединений, трансформации органических веществ (получение биогаза, очистка сточных вод и др.) является важной составной частью биотехнологии.

Генно-инженерные подходы позволяют создавать образцы сельскохозяйственных растений, более приспособленные к условиям внешней среды – засухе, засолению почвы, заморозкам и другим неблагоприятным факторам. Тем самым более эффективно используются экстремальные условия и территории для получения высоких урожаев, а сам факт выращивания растений на таких территориях способствует улучшению экологической обстановки. Создание и культивирование сортов, устойчивых к гербицидам, насекомым, грибным болезням, значительно снижают объемы внесения гербицидов, пестицидов и фунгицидов на поля, благодаря чему резко снижается загрязненность посевных площадей химическими веществами.

Некоторые методы генетической инженерии растений способствуют очистке территорий от загрязняющих веществ. Например, встраивание в геном растений гена синтеза белка животного происхождения *аллотиюнеина*, способного связывать многие тяжелые металлы, позволяет создать трансгенные растения, устойчивые к кадмию, цинку и другим металлам.

Для очистки сточных вод широко используются биофильтры – сооружения, заполненные крупнозернистым наполнителем, на поверхности которого развиваются микроорганизмы. В сельском хозяйстве при компостировании навоза применяется аэробное разложение твердых отходов. Широко используется биodeградация – процесс разрушения отходов, в том числе ксенобиотиков, – с помощью микроорганизмов.

Изделия из полиэтилена, полипропилена и других пластмасс окружают нас повсюду. Особенно много пластиковой упаковки, которую после использования чаще всего просто выбрасывают. И здесь ее свойство – устойчивость к разложению влагой, светом, холодом и теплом, почвенными микроорганизмами – играет отрицательную роль. Земной шар буквально переполнен использованной пластмассовой упаковкой. Взамен предлагается упаковка на основе полигидроксibuтирата или полилактата, или специальным образом обработанного крахмала в смеси с целлюлозой. Биотехнология может помочь в создании таких материалов, хотя они и будут дороже. Выброшенные пакеты или флаконы из таких материалов при взаимодействии с почвенными микроорганизмами будут превращаться в воду, диоксид углерода и биомассу этих самых микроорганизмов, предохраняя планету от отходов.

Стиральные порошки с ферментами появились чуть больше 30 лет назад. Ферменты для таких порошков – протеазы, производятся биотехнологическими методами.

Вермикультивирование и копрокультивирование. Многие отходы сельскохозяйственного производства и пищевой промышленности могут перерабатываться не только с помощью микроорганизмов (биокомпостирование или метановое брожение), но и с помощью низших организмов – червей. Среди них есть очень эффективные виды калифорнийских красных червей, которые «перемалывают» землю с разными органическими отходами в прекрасное удобрение. Это направление переработки отходов называют *вермикультивированием*. Если при этом поблизости иметь подсобное хозяйство для разведения птиц, то избыток червей вполне может служить пищей курам, гусям и прочей птице.

Копрокультивирование – это разведение личинок мух (нельзя давать им превращаться в летающих мух). Известно, что мухи откладывают большое количество яиц, которые весьма быстро растут, превращаясь в личинки мух и при этом перерабатывая всевозможные гнилые

отходы. Показано, что личинки являются превосходным кормом для птиц, а при определенной обработке – также для свиней и пушных зверей.

Мировой уровень биотехнологии как науки и отрасли производства. Развитие биотехнологии в Беларуси

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

Высшим достижением новейшей биотехнологии является генетическая трансформация, перенос чужеродных (природных или искусственно созданных) донорских генов в клетки-реципиенты растений, животных и микроорганизмов, получение трансгенных организмов с новыми или усиленными прежними свойствами и признаками. По своим целям и возможностям это направление является стратегическим. Оно позволяет решать принципиально новые задачи по созданию растений, животных и микроорганизмов с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, высокой продуктивностью и качеством продукции, по оздоровлению экологической обстановки в природе и всех отраслях производства. Для достижения этих целей предстоит преодолеть определенные трудности в повышении эффективности генетической трансформации и, прежде всего, в идентификации и клонировании генов, создании их банков, расшифровке механизмов полигенной детерминации признаков и свойств биологических объектов, создании надежных векторных систем и обеспечении высокой устойчивой экспрессии генов. В настоящее время во многих лабораториях мира с помощью методов генетической инженерии созданы принципиально новые трансгенные растения, животные и микроорганизмы, используемые в научных, производственных и коммерческих целях.

Клеточная биотехнология, основана на уникальном свойстве клеток – их тотипотентности (способности к регенерации целого организма), а также продуцировании ими важнейших соединений вторичного синтеза. Она обеспечила ускоренное получение новых ценных форм и линий сельскохозяйственных растений, используемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество; размножение ценных генотипов; оздоровление растений от вирусов и вириодов, получение биологически активных препаратов пищевого, кормового и медицинского назначения. В этой области также возникло много трудностей, главными из которых являются недостаточная частота регенерации клеток и нарушение нормального онтогенеза организмов, узкий спектр соматоклональных вариаций, слабая экспрессия генов, контролируемых важнейшими хозяйственно ценными признаками организмов и вторичный метаболизм веществ. Мощный всплеск исследований по биотехнологии в мировой науке произошел в 80-е годы, когда новые методологические и методические подходы обеспечили переход к эффективному их использованию в науке и практике и возникла реальная возможность извлечь из этого большой экономический эффект. Наибольших результатов в области сельскохозяйственной биотехнологии достигли научные учреждения и учебные заведения селекционного, ветеринарного и микробиологического профилей, разработавшие методы и технологии получения новых линий и форм растений, медицинских препаратов профилактического и терапевтического действия, а также штаммов микроорганизмов, вакцин и других лечебных препаратов на генно-инженерной основе.

По клеточной биотехнологии результаты исследований ученых нашей страны уже сегодня не уступают зарубежным, а по ряду важных направлений и превосходят их. В этот же период под влиянием критического отношения к биотехнологии в Западной Европе, Америке и России возникло заметное протестное движение общественности, оказавшее отрицательное влияние на темпы развития биотехнологии, особенно биоинженерии. В основе протестного движения общественности против генно-инженерных исследований лежит незнание

обществом существа новейшей биотехнологии, а в связи с этим интуитивное тревожное ожидание ее отрицательных последствий, основанных на исторических аналогах с использованием атомной энергии и на современных фактах возникновения очагов новых заболеваний неустановленной природы. Для преодоления этого временного препятствия в развитии биоинженерии ученым биотехнологам необходимо постоянно поддерживать высокий уровень просвещения и осведомленности граждан страны и мира в этой области, совершенствовать методы исследований и строго соблюдать законы, постановления и другие государственные нормативно-правовые акты по обеспечению биобезопасности в генно-инженерной деятельности.

Приоритетными исследованиями по сельскохозяйственной биотехнологии в Беларуси являются:

- создание и испытание трансгенных растений, несущих новые хозяйственно ценные признаки: устойчивость к болезням, насекомым, гербицидам, абиотическим стрессам;
- использование молекулярных маркеров для построения генетических карт растений, создание идентифицированных генетических коллекций и разработка новых технологий селекции с помощью генетических маркеров;
- исследования по соматической гибридизации растений для преодоления барьеров нескрещиваемости между видами;
- клеточная селекция, в первую очередь на устойчивость к абиотическим и биотическим факторам среды;
- разработка методов гаметной, зиготной селекции и эмбриокультуры;
- получение гаплоидов и дигаплоидов для быстрой гомозиготизации материала и ускорения селекционного процесса;
- создание и размножение в культуре *in vitro* уникальных генотипов растений, поддержание генетических коллекций, в том числе методом криосохранения;
- разработка, совершенствование и внедрение в практику методов микроклонального размножения растений для производства посадочного материала картофеля, плодовых, ягодных, овощных, декоративных культур;
- создание новых штаммов микроорганизмов и использование их для защиты растений, защиты окружающей среды, повышения плодородия почвы и др.;
- создание, испытание и внедрение в практику высокоэффективных и экологически безопасных регуляторов роста для повышения продуктивности и устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Современным специалистам, работающим в сфере АПК и других отраслях народного хозяйства необходимо в совершенстве владеть методами биотехнологии и биоинженерии, уметь использовать их для увеличения производства сельскохозяйственной продукции, улучшения ее качества, защиты окружающей среды от загрязнения и повышения устойчивости всего агропромышленного производства.

2. РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ И РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Понятие о фитогормонах их особенности и классификация

Впервые идею о существовании у растений веществ, обладающих регуляторной функцией, высказал в 1880 году Ч. Дарвин в книге «Способность к движению у растений». Изучая тропизмы растений, Ч. Дарвин предположил, что верхушки осевых органов растений способны изгибаться по направлению к свету в результате передачи химического вещества из верхней в нижнюю часть растения.

К природным регуляторам относятся *фитогормоны* или гормоны растений – соединения, образующиеся в малых количествах в одной части растения, обычно транспортирующиеся в другую его часть и вызывающие специфический ростовой или формообразователь-

ный эффект.

С помощью фитогормонов осуществляется взаимосвязь организма с окружающей средой, взаимодействие клеток, тканей и органов, запуск физиологических программ на отдельных этапах онтогенеза.

По характеру воздействия на те или иные процессы фитогормоны подразделяются на *стимуляторы* и *ингибиторы*. Стимуляторы ускоряют физиологические процессы, ингибиторы задерживают их. Деление — это условно, поскольку проявление действия одного и того же гормона в растении зависит от его концентрации, взаимодействия с другими гормонами, фазы онтогенеза. Гормоны могут выступать как стимуляторы одних процессов в растении и ингибировать другие. К примеру, этилен ускоряет созревание плодов и задерживает ростовые процессы. К *стимуляторам* относятся ауксины, цитокинины, гиббереллины, брассиностероиды; к *ингибиторам* — абсцизовая кислота, этилен.

Главными *особенностями* фитогормонов являются:

- 1) фитогормоны образуются в растениях эндогенно;
- 2) место синтеза фитогормонов удалено от места их функционирования, например, ауксины образуются в апикальных меристемах, а проявляют свое действие в зоне корней. Однако это не означает, что гормоны не проявляют активности в местах синтеза. К примеру, апикальное доминирование под действием ауксинов проявляется именно в точке роста побега. Ряд фитогормонов синтезируется не только растениями, но и микроорганизмами (индолилуксусная кислота, гиббереллины, цитокинины), что свидетельствует о возникновении гормональной системы регуляции на ранних ступенях развития организмов. У растений в отличие от животных нет специализированных органов, ответственных за образование гормонов, однако существует определенная приуроченность к органам растения. В апикальной меристеме стебля присутствуют в высокой концентрации ауксины, в корнях — цитокинины, в листьях — гиббереллины (рис. 1);

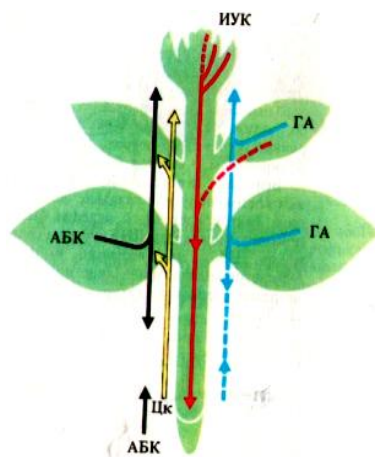


Рисунок 1 – Основные места образования фитогормонов и направления их транспорта в вегетирующем растении

- 3) фитогормоны способны к перемещению, т. е. к транспорту по проводящей системе растений, а также по межклеточному пространству;
- 4) фитогормоны проявляют физиологическую активность при очень низких концентрациях (10^{-13} – 10^{-15} моль/л);
- 5) в действиях фитогормонов проявляется специфичность, то есть определенный фитогормон действует на специфический процесс (этилен вызывает созревание плодов, гибберелловая кислота способствует удлинению стебля и т. д.).

Взаимодействие фитогормонов в растениях

Фитогормоны выполняют важную роль, обеспечивая связь организма с окружающей

средой. Изменение средовых условий приводит к преимущественному синтезу того или иного гормона. Гормон транспортируется к клеткам-мишеням, которые обладают компетентностью, то есть способностью реагировать на определенный гормон. Компетентность клетки связана с тем, что в ней вырабатывается специальный белок-рецептор, способный взаимодействовать с гормоном и образовывать активные гормон-рецепторные комплексы.

Регуляторный эффект на рост и развитие растений достигается двумя путями: 1) изменение дозы гормона; 2) взаимодействие фитогормонов. В зависимости от концентрации гормона его действие на один и тот же процесс может изменяться от стимуляции до ингибирования. Кроме того, изменение концентрации может привести и к изменению характера действия гормона и физиологического ответа. Например, в культуре *in vitro* ауксины при оптимальных концентрациях способствуют корнеобразованию, а при высоких – вызывают каллусогенез.

Взаимодействие фитогормонов может проявляться в двух формах: синергизм и антагонизм.

Синергизм – это положительное взаимодействие фитогормонов, когда под действием одного фитогормона усиливается действие другого. Например, ауксин и цитокинин совместно участвуют в регуляции того или иного физиологического процесса, дополняя друг друга. Так, они участвуют в формировании проводящих тканей в стебле и корне, в пробуждении почек и других процессах.

Антагонизм – это отрицательное взаимодействие фитогормонов, когда один фитогормон вызывает действие, противоположное действию другого фитогормона. Например, рассматривая явление апикального доминирования, следует отметить, что ауксины подавляют рост боковых побегов, а цитокинины наоборот снимают эффект апикального доминирования и вызывают рост боковых побегов. Например, антагонизм между гиббереллином и этиленом четко проявляется в регуляции роста стебля. Гиббереллин стимулирует рост стебля в длину, а этилен подавляет этот процесс и одновременно усиливает рост стебля в ширину, благодаря чему стебель становится укороченным и толстым.

Фитогормоны в онтогенезе растений

Рассматривая действие фитогормонов в онтогенезе растений, следует вспомнить основные этапы онтогенеза (*онтогенез* – это индивидуальное развитие организма от зиготы до естественной смерти).

Обычно развитие высших растений подразделяют на четыре этапа: 1) *эмбриональный* – развитие зародыша от образования зиготы до созревания семени; 2) *ювенильный* – этап от прорастания семян до формирования вегетативных органов; 3) *этап зрелости и размножения* – этап готовности к зацветанию и образованию органов генеративного размножения, цветения, формирования плодов и семян; 4) *этап старости и отмирания* – период от полного прекращения плодоношения до естественной смерти организма.

На *эмбриональном* этапе первые фазы развития зиготы идут под действием брассиностероидов, цитокининов и ауксинов, а при созревании семени их содержание уменьшается и увеличивается количество абсцизовой кислоты.

На *ювенильном* этапе снова усиливается синтез ауксинов, цитокининов и гиббереллина.

На этапе *зрелости и размножения* важную роль играют гиббереллины, которые обуславливают развитие цветоноса, а также развитие генеративных органов.

На этапе *старости и отмирания* уменьшается содержание ауксинов и цитокининов и накапливаются в растении абсцизовая кислота и этилен.

Физиологические функции отдельных фитогормонов

Ауксины являются важными регуляторами передвижения и распределения ассимилятов и минеральных веществ по растению. Ткани с высоким содержанием ауксинов становятся центрами притяжения питательных веществ и интенсивного метаболизма (аттрагирующий

эффект). На этом основано явление апикального доминирования, в результате которого верхушечная почка растет быстрее боковых и подавляет их развитие. При удалении верхушечной почки или изменении гормонального баланса в сторону цитокининов происходит развитие боковых почек. Ауксины задерживают старение тканей и органов.

Установлено, что ауксины обеспечивают механизм фототропизма – движение осевых органов растения (стеблей и корней) к свету (положительный фототропизм стебля) или от света (отрицательный фототропизм корня). Выявлено участие ауксинов и в проявлении растениями геотропизма – движения осевых органов растения под действием земного тяготения (положительный геотропизм корня и отрицательный геотропизм стебля). Ауксины выполняют важную роль в формировании корневой системы растений, вызывая инициацию образования боковых корней, а также адвентивных корней на стеблях.

Много лет назад японские фермеры обнаружили явление удлинения растений риса, в результате которого резко снижалась урожайность. Исследуя причины этого феномена, японский исследователь Е. Куросава в 1926 году установил, что вытягивание стеблей вызывается химическим веществом, выделенным из патогенного гриба *Gibberella fujikuroi*, поражающего растения риса.

Типичный эффект, вызываемый *гиббереллинами* у растений, – удлинение стебля, в основе которого лежит растяжение клеток и повышение митотической активности. Гиббереллины влияют на развитие генеративных органов растений. Под их действием усиливается рост цветоножек и пыльцевых трубок, стимулируется увеличение размеров цветков и соцветий, количество цветоносов, продлевается ювенильный период, вызывается цветение у длиннодневных растений в условиях короткого дня, у растений с раздельнопольными цветками сдвигается пол в сторону преобладающего формирования мужских цветков, индуцируется партенокарпия (образование бессемянных плодов), повышается завязываемость плодов, укрупняются их размеры.

Основным свойством *цитокининов* является стимуляция деления клеток в присутствии ауксинов. Цитокинины способствуют увеличению размера растущих семядолей и листьев, играют важную роль в развитии надземной части растений. Цитокинины участвуют в формировании хлоропластов, а также стимулируют синтез хлоропластных РНК и белков. Действие цитокининов на развитие корневой системы растений неоднозначно. При низких концентрациях может происходить стимуляция развития корней, при высоких – угнетение.

Абсцизовая кислота (АБК) задерживает рост в фазе растяжения и деления клеток, не проявляя токсического действия даже в высоких концентрациях. АБК ингибирует синтез и ускоряет распад ДНК, РНК, белков, хлорофилла. Она вызывает состояние покоя (зимний покой почек древесных пород, покой семян), ускоряет опадение листьев, цветков и плодов и старение клеток. АБК образуется в листьях в условиях короткого дня и служит для перехода почек осенью в состояние покоя. Достаточно хорошо изучена роль АБК в реакции растения на засушливые условия. Закрывание устьиц после обработки АБК наблюдается уже через 3 минуты.

На клеточном уровне *этилен* вызывает задержку митозов в меристемах побега и корня, что связано с ингибированием синтеза ДНК. Под действием этилена продольное направление роста клеток сменяется на поперечное, что приводит к утолщению стебля. Обработка этиленом индуцирует корнеобразование на стебле, у многих видов ускоряет прорастание пыльцы, семян, клубней и луковиц, устраняет апикальное доминирование, тормозит транспорт ауксинов, выступая как их антагонист. Этилен стимулирует процесс старения и отмирания растения и связанные с ним процессы деградации синтеза РНК, белков, хлорофилла.

Фитогормоны и регуляторы роста в условиях *in vitro*

Гормональный статус растения – это состояние фитогормональной системы в онтогенезе растений. Он зависит от биологии растения, этапа онтогенеза, условий внешней среды и может быть изменен воздействием экзогенных факторов (технологические приемы возделывания).

вания растений). Наиболее радикальный способ изменения гормонального статуса растений и регуляции онтогенеза – это воздействие экзогенными регуляторами роста.

Особую роль гормональный статус растения имеет в культуре *in vitro*. Например, состояние фитогормональной системы исходного растения и отдельных его органов определяет успех регенерации из эксплантов, взятых из растения.

Для роста культуры клеток и тканей растений *in vitro* необходимо наличие в составе питательной среды природных или синтетических гормонов. Их концентрация и взаимодействие обуславливают направление и скорость процессов морфогенеза (образование каллуса, корней, побегов и др.). Согласно правилу *Скуга-Миллера*, образование побегов стимулируется при преобладании в питательной среде цитокининов по отношению к ауксином, преобладание ауксинов вызывает образование корней. К наиболее часто употребляемым регуляторам относятся ауксины и цитокинины. Могут использоваться гиббереллины и абсцизовая кислота, а также brassinosteroids.

К *ауксином* относятся индоллил-3-уксусная кислота (ИУК), α -нафтилуксусная кислота (НУК), индоллилмасляная кислота (ИМК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Степень активности ауксинов возрастает от ИУК к 2,4-Д (2,4-Д в 30 раз активнее ИУК). Ауксины вызывают дедифференцировку клеток, растяжение клеточной оболочки, деление клеток и образование каллуса и корней, ингибируют формирование боковых побегов. При низких концентрациях ауксины образуют корни, при высоких – преобладает каллусогенез. 2,4-Д как самый активный ауксин вызывает образование каллуса, а также может индуцировать мутации.

Среди *цитокининов* используются аденин, кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин, 2-изопентиладенин (2ip). Они применяются в концентрациях от 1 до 10 мг/л и индуцируют процесс деления клеток, образования боковых побегов, подавляя при этом развитие корней. Цитокинины задерживают старение тканей *in vitro*.

Гиббереллины не являются обязательными компонентами питательных сред. Наиболее часто применяют гибберелловую кислоту (ГК₃). Гиббереллины выводят из состояния покоя изолированные зародыши и семена. Гиббереллины могут ингибировать образование придаточных побегов и корней.

Абсцизовая кислота может способствовать образованию микроклубней картофеля в условиях *in vitro*.

Фитогормон газообразной природы *этилен* может накапливаться в культуральных сосудах в результате выделения тканями растений. При этом возможно ингибирование ростовых процессов *in vitro*.

Браassinosteroids активно участвуют в процессах регенерации растений. К представителям этого класса относятся brassinolid, гомобраassinolid и эпибраassinolid. Наибольшей физиологической активностью обладает эпибраassinolid. Его препаративная форма с коммерческим названием «Эпин» широко применяется в сельскохозяйственной практике как антистрессовый препарат, для повышения устойчивости растений к различным биотическим и абиотическим факторам среды, для повышения качества и количества урожая.

Фитогормоны и регуляторы роста в растениеводстве

В растениеводческой практике под воздействием экзогенных регуляторов роста повышается активность метаболических процессов в растении, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, урожайность и качество продукции. Регуляторы роста весьма эффективны для полевых, плодовых, ягодных, овощных и декоративных культур. Использование соответствующих регуляторов роста определяется этапом онтогенеза, средовыми условиями и задачами, решаемыми с помощью фиторегуляторов (корнеобразование, выведение семян из состояния покоя, регуляция развития вегетативных и генеративных органов, регуляция плодообразования и созревания, регуляция устойчивости растения, качества продукции и др.).

Прореживание цветков и завязей у плодовых. Для борьбы с периодичностью плодоношения бывает необходимо удалять излишнее количество образовавшихся цветков. Для этого растворами синтетических ауксинов и, в частности, НУК в повышенных концентрациях (15–50 мл/л) обрабатывают кроны деревьев во второй половине цветения.

Для снижения полегания хлебов, а также для торможения вытягивания рассады овощей, декоративных культур, роста кустарников применяются ретарданты. Ретарданты – вещества синтетической природы, которые тормозят удлинения стебля. Механизм их действия состоит в ингибировании синтеза гиббереллинов в растительных организмах. В качестве ретарданта может использоваться ТУР (хлорхолинхлорид).

Для увеличения сроков хранения растительного материала. Предуборочное опрыскивания ботвы картофеля, моркови, свеклы, редьки, пастернака и др. (за 10–15 дней до уборки), когда растения начинают желтеть, приводит к задержке прорастания клубней и корнеплодов, повышает их лежкость, увеличивает устойчивость к болезням, уменьшает загнивание клубней и потерю ими крахмала при хранении. Для обработки применяют препарат ГМК (гидразит малеиновой кислоты) – белое кристаллическое вещество, плохо растворимое в воде, характеризуется слабой токсичностью. Количество используемого препарата 2,5 кг на 1000 л воды на 1 га.

Обработка лука и чеснока с целью задержки прорастания и повышения лежкости лукович проводят за 2–3 дня до начала полегания ботвы, или за 12–15 дней до появления у растений признаков уборочной спелости.

Для повышения морозоустойчивости и засухоустойчивости растений применяют brassinosteroids в форме «Эпина», а также ТУР. Для зерновых, в частности озимых, – намачивание семян в 4–8 % растворе ТУРа или опрыскивание растений осенью в начале фазы кущения из расчета 4–6 кг/га способствует повышению морозостойкости растений благодаря лучшему развитию корневой системы. Многократное (4–9 раз) опрыскивание рассады томата 0,1–0,2 % раствором ТУРа обеспечивает длительное на 20–30 % повышение устойчивости растений к заморозкам за счет уменьшения доли свободной воды в тканях, при этом увеличивается также устойчивость растений к недостатку влаги и заболеваниям, улучшается его водный режим.

Обработка плодовых деревьев ГМК в начале фазы дифференциации почек (конец июля) повышает зимостойкость растений, предохраняет от повреждения камбий однолетних побегов.

Дефолиация растений. Этилен является высокоэффективным дефолиантом мягкого действия. Он вызывает опадение листьев без повреждений, а растения при этом хорошо переносят зиму и растут нормально. Применяется для обработки яблони, груши, сливы, смородины, крыжовника, розы, шиповника и др.

Гидрел и кампосан применяются для дефолиации хлопчатника. Растения опрыскивают в период, когда на кусте раскрыто около половины коробочек. Препараты не снижают качество волокна и семян.

Для ускорения созревания зеленых плодов используется этилен. Как регулятор он применяется в герметичных камерах, куда попадает раз в сутки в таком количестве, чтобы обеспечить концентрацию его в воздухе 1:2000–1:5000 (по объему). В камеру помещают зеленые или недозревшие плоды и выдерживают их 2–3 суток в присутствии этилена при t 18–22°C и относительной влажности не ниже 85 %. Обработка плодов этиленом не влияет на их вкусовые и питательные качества.

Образование корней у черенков плодовых и ягодных растений индуцируется экзогенными ауксинами. К числу часто употребляемых препаратов относится гетероауксин (содержит ИУК). Перед посадкой в грунт черенки замачивают в 0,005–0,02%-ном растворе ИУК и выдерживают в течение 10–24 часов. Высокой эффективностью индукции корнеобразования обладают также ИМК и НУК. Эпибрассинолид (эпин) ускоряет развитие корневой системы у роз и тюльпанов. Хитодекстрин стимулирует корнеобразование у озимой ржи и пшеницы.

Эндогенная стимуляция прорастания семян и покоящихся органов связана с действием гиббереллинов, цитокининов, брассиностероидов. В списке разрешенных препаратов для повышения энергии прорастания рекомендованы бетастимулин для сахарной свеклы; ивин – для моркови, капусты, томатов, перцев, баклажанов, огурцов; мальтамин – для картофеля; оксидат торфа – для озимой ржи, тритикале, ячменя и картофеля; феномелан – для картофеля; хитодекстрин – для озимой ржи и пшеницы, огурцов, томатов и моркови; эмистим С – для пшеницы озимой, ячменя ярового, огурцов, томатов, перцев, лука; эпин – для капусты, томатов, огурцов и перцев.

Для регулирования процесса опыления и оплодотворения в семеноводстве гетерозисных гибридов (пшеница и др.) могут быть использованы гаметоциды (препараты, вызывающие мужскую стерильность). Для этих целей применяют этефон, гибберелловую кислоту, ТИБК (2,3,5–триодбензойная кислота). Для повышения завязываемости плодов в период цветения винограда, томата возможно использование гиббереллина и его соединений.

Устойчивость растения к абиотическим и биотическим стрессам определяется физиологическим состоянием организма, в том числе его гормональным статусом. Известно, что стрессоустойчивость растения повышается под действием брассиностероидов, цитокининов и абсцизовой кислоты.

К препаратам, повышающим устойчивость растений, относят: гидрогумат – повышает устойчивость к болезням зерновых культур, картофеля, гороха и бобов; гисинар и инкор – повышают засухоустойчивость зерновых; оксигумат – повышает устойчивость зерновых, картофеля, огурцов, томатов к болезням; иммуноцитифит – повышает иммунитет у озимой пшеницы и ярового ячменя; эпин – повышает устойчивость к болезням и абиотическим стрессам у картофеля, ячменя, устойчивость к болезням у декоративных растений.

3. КЛЕТочНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Сущность и задачи клеточной инженерии. Использование культуры изолированных клеток, тканей и органов в биотехнологии

Клеточная инженерия – это раздел биотехнологии, занимающийся выполнением различных манипуляций с клетками и тканями в культуре *in vitro*.

Основные направления использования достижений клеточной инженерии.

1. *В области селекции.* С переходом на клеточный уровень стало возможным вести клеточную и гаметную селекцию на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, преодолевать барьеры нескрещиваемости и создавать принципиально новые образцы, несущие различные наборы ядерных и цитоплазматических генов в результате соматической гибридизации, изменять уровень пloidности, ускорять селекционный процесс путем использования гаплоидов, сохранять генофонд в виде культуры клеток посредством криосохранения в жидком азоте.

2. *В области семеноводства* создана индустрия производства оздоровленного от вирусов и других патогенов посадочного материала вегетативно размножаемых культур (картофель, плодовые, ягодные, овощные, декоративные растения).

3. *В области защиты растений* на основе достижений генетической и клеточной инженерии получены растения, устойчивые к насекомым, вирусам, болезням и другим патогенам; созданы новые средства защиты растений путем культивирования бактерий и грибов (антагонистов патогенов), биологически активных веществ, полученных при культивировании организмов, и т. д.

4. *Создание новых штаммов микроорганизмов*, повышающих усвоение азота и фосфора, подавляющих развитие вредной микрофлоры, что позволяет конструировать микробиоценоз, достигая повышения плодородия почвы и продуктивности растения.

5. *В области защиты окружающей среды.* Новые штаммы микроорганизмов позволяют решать экологически безопасным путем проблемы утилизации отходов промышленности

и сельского хозяйства, уменьшать действие поллютантов (тяжелые металлы, нефтепродукты, пестициды и др.) на экосистемы и человека.

6. *Культивирование новых микроорганизмов и растений – продуцентов биологически активных веществ* позволит более эффективно решать проблему создания и производства новых препаратов для медицины и ветеринарии. Важным направлением практического применения клеточной инженерии является микробиологический синтез белка и незаменимых аминокислот.

Все манипуляции клеточной инженерии основываются на 3-х принципах:

1) вычленение экспланта из растительного организма;

Эксплант – это часть растения, помещенная в асептические условия на искусственную питательную среду. В качестве экспланта могут выступать любые части растения (корень, лист, стебель, семена, пыльца и т. д.).

В зависимости от цели исследований выбирается объект, то есть культура и подбирается тип экспланта. Вычленение эксплантов производится из здоровых, типичных, соответствующих виду или сорту растений. Желательно растения, предназначенные для вычленения эксплантов, выращивать в культуральном помещении или предварительно за два месяца до предстоящей работы из полевых условий перенести в культуральное помещение. Экспланты от таких растений легче стерилизуются.

2) создание регулируемых условий выращивания:

а) *химические условия* или основные принципы составления искусственных питательных сред:

1) макроэлементы – азот, фосфор, калий, кальций, сера, магний, железо;

2) микроэлементы – марганец, молибден, кобальт, цинк, йод, бор, медь;

3) витамины – тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота;

4) сахароза или глюкоза как источники углеводов необходимы, так как в большинстве случаев экспланты в условиях *in vitro* не способны к автотрофному питанию;

5) регуляторы роста (ауксины, цитотоксины, ГК) при использовании следует применять правило *Скуга-Миллера*;

б) консистенция питательной среды определяется агар-агаром – полисахарид, полученный из красных морских водорослей. Присутствуя в составе питательной среды агар, выполняет удерживающую функцию, однако среда может быть и жидкой. В этом случае культивирование проводится в условиях постоянного перемешивания среды на качалках для обеспечения экспланта кислородом;

7) pH питательной среды 5,5–5,8, в зависимости от требований культуры.

б) физические условия (свет, температура, влажность);

1) температура – зависит от биологии культур, может быть постоянной (+24–26 °С) или в режиме «день–ночь»;

2) освещенность – 4–6 тыс. люкс;

3) влажность воздуха – 70–80 % (установка увлажнителей);

4) аэрация – необходимо обеспечить эксплантам постоянный приток кислорода, для этого подбираются оптимальные объемы сосудов для культивирования, причем экспланты должны быть изолированы от окружающей среды, но не лишены доступа кислорода.

3) соблюдение условий стерильности, то есть выполнение всех видов работ в абсолютно стерильных условиях или асептических условиях.

Богатая питательная среда является хорошим субстратом для развития микроорганизмов. Развиваясь очень активно на питательной среде, микроорганизмы (грибы, бактерии) способны угнетать рост экспланта и изменять состав питательной среды. Поэтому для работы с культурой *in vitro* необходимо стерилизовать растительные объекты, питательные среды, посуду, инструменты.

Культура каллусных тканей

Каллусная ткань представляет собой совокупность недифференцированных клеток и

является ответной реакцией тканей организма на повреждающее воздействие.

Впервые культура каллусной ткани из корня моркови была получена Р. Готре (*Gautheret* 1939). Основной трудностью в индуцировании и культивировании каллуса в условиях *in vitro* является создание сбалансированной оптимальной питательной среды. Успех каллусогенеза в большой мере зависит от удачного подбора регуляторов роста, которые индуцируют клеточные деления – ауксинов и цитокинов. С помощью этих веществ образование каллуса можно вызвать и у тех тканей растения, которые его не образуют в ответ на ранение. Каллусы растений легко образуются на эксплантах из самых различных органов растения: из асептически прорастающих семян, отрезков стебля и корней, из листа, органов цветка, зародышей, плодов, изолированных фрагментов паренхимы ткани клубня.

Образование каллусной ткани лучше происходит у двудольных растений, чем у однодольных, особенно у злаковых. Процесс каллусообразования зависит от возраста тканей (наиболее интенсивно он наблюдается у более молодых тканей). Каллусные культуры очень различаются по интенсивности роста, по консистенции, окраске, по морфологическим и биосинтетическим свойствам. По консистенции каллусные ткани могут быть компактными и твердыми, а также рыхлыми. Консистенция каллуса в значительной степени зависит от состава питательной среды. По цвету каллус может быть белым с желтым оттенком, зеленым, коричневым (старый каллус), фиолетовым (получен в стрессовых условиях). В 60-х гг. XX века было выявлено, что клетки каллусной ткани обладают выраженной генетической гетерогенностью (неоднородностью, то есть различной пloidностью), которая обусловлена гетерогенностью клеток исходного экспланта и условиями *in vitro*, особенно составом питательной среды и в частности входящими в нее регуляторами роста. Рост каллусной ткани выражается S-образной кривой (Кривая Сакса). В процессе субкультивирования клетки последовательно проходят следующие фазы:

- 1) лаг-фаза (латентная-скрытая);
- 2) логарифмическая фаза (напоказ);
- 3) фаза замедленного роста;
- 4) стационарная фаза;
- 5) фаза деградации.

Процесс роста каллуса протекает в течение 25–30 дней, после чего наблюдается отравление самого себя, что требует немедленной его пересадки на свежую питательную среду. Процесс деления каллусной ткани на небольшие фрагменты, удаление потемневших участков и остатков старой питательной среды и пересадка на свежую питательную среду называется *пассированием* каллусной ткани.

При длительном культивировании каллусной ткани наблюдается явление привыкания. Наиболее характерной особенностью так называемых «привыкших» тканей является внезапное, резкое повышение интенсивности роста и приобретение способности расти на питательной среде без гормональных средств, по типу опухолевого роста.

При работе с каллусной тканью следует иметь в виду, что длительное культивирование каллуса ведет к появлению в клетках различных нежелательных изменений (происходят сдвиги в структуре хромосом и генов). Из стареющего каллуса становится все труднее получать зачатки почек и зародышеподобных структур.

Основные условия получения каллусной ткани в культуре *in vitro* из различных частей растения:

- 1) высокий уровень содержания регуляторов роста в составе питательной среды, причем в большинстве случаев предпочтение следует отдать фитогормонам ауксиновой природы;
- 2) наличие на эксплантах раневой поверхности;
- 3) наиболее интенсивно каллусообразование происходит в темноте, при температуре 24–26 °С.

Каллусная ткань является легкодоступным материалом, который часто используется

для селекции устойчивых генотипов. Через культуру каллусной ткани впервые выделили линии табака, устойчивые к стрептомицину, токсичноустойчивые генотипы кукурузы. Каллусные ткани используются для решения теоретических вопросов физиологии клетки и изучения ее биосинтетических потенций, при селекции *in vitro* для отбора линий, устойчивых к различным заболеваниям. Способность каллусных тканей к органогенезу обуславливает их использование для получения новых образцов растений. Широко используется для получения ценных первичных и вторичных метаболитов (биологически активных веществ).

Суспензионные культуры, их получение, культивирование и использование

Суспензионная культура – это культуры одиночных клеток и клеточных агрегатов, растущие в аэрируемой жидкой питательной среде.

Для обеспечения аэрации в жидкой среде необходимо постоянное перемешивание или встряхивание, достигаемое следующими способами:

1) культура суспензионных клеток выращивается в колбах в жидкой питательной среде на качалках ротационного или шейкерного типа, или роллерах (*накопительное культивирование*);

2) выращивание суспензионной культуры в жидкой питательной среде в ферментерах при подаче воздуха в сочетании с механическим перемешиванием (*непрерывное культивирование*).

Основным способом получения суспензионной культуры является помещение кусочка недифференцированного каллуса в перемешиваемую жидкую питательную среду, при интенсивности встряхивания 100–120 об/мин. В более редких случаях используют экспланты тканей, стерильные проростки, которые в жидкой среде дедифференцируются и образуют каллус, распадающийся в конечном итоге на отдельные клетки.

Для выращивания клеточных суспензий применяются в основном те же питательные среды, что и для каллусных культур. Однако, создан и ряд сред, предназначенных непосредственно для выращивания суспензионных культур, например, питательная среда Болла, Ли-ау.

Применение суспензионной культуры. Клеточные суспензии являются удобной и ценной моделью для всестороннего и глубокого изучения физиологических закономерностей роста, дифференциации, регуляции клеточного метаболизма соматических клеток растений. Клеточные суспензии используются для промышленного получения ценных веществ: алкалоидов, стероидных соединений, эфирных масел, ферментов и др. Преимущество этого способа по сравнению с традиционным получением вторичных метаболитов из растительного сырья заключается в отсутствии зависимости от погодных условий, высоком выходе и качестве продукции, возможности организации промышленного производства.

Культуры одиночных клеток

Культуры одиночных клеток используются для изучения деталей клеточного строения, роста, дифференциации, дедифференциации, биохимии и генетики высших растений. Отдельная соматическая клетка является хорошей моделью для изучения взаимоотношений между клеткой и окружающей средой, клетками растения-хозяина и различными патогенами и для решения задач клеточной селекции.

Источником одиночных клеток могут служить каллус, суспензионная культура, культура протопластов.

Выращивание одиночных клеток включает в себя два этапа:

- 1) изолирование одиночных жизнеспособных клеток;
- 2) создание благоприятных условий для их деления и роста.

Изолирование одиночных клеток осуществляют следующими методами:

- а) выращивание каллусной массы и разобщение её в суспензию;
- б) использование низкоагрегированной суспензии;

в) изолирование отдельных клеток непосредственно из тканей целого растения.

Выделение отдельных клеток достигается механическим или химическим способами. При *механическом* способе полученную клеточную суспензию фильтруют через металлические или нейлоновые сита с различными размерами отверстий. При этом происходит отсеlectирование одиночных клеток от клеточных агрегатов и разрушенных клеток.

Разделение клеток *химическим* способом добиваются мацерацией (лат. размягчение, распадение) фрагментов ткани (калусной ткани или ткани целого растения) в жидкой среде с применением ферментов, разрушающих межклеточные связи, например, целлюлазы, пектиназы.

Для выращивания одиночных клеток в условиях *in vitro* имеется несколько методов:

1) *Метод культуры няньки*. Одиночную клетку помещают на квадрат стерильной фильтровальной бумаги, которая за 2–3 дня до изолирования клетки была помещена на верхушку калусной ткани – для увлажнения и адсорбции питательных веществ из материнской культуры. После помещения изолированной клетки на влажный фильтр, последний переносится с клеткой на верхушку каллуса-няньки в культуральный сосуд. Изолированная клетка на фильтре не контактирует с каллусом-нянькой, но получает от него диффузией через бумажный барьер все необходимые питательные вещества и факторы, индицирующие клеточное деление.

2) *Метод микрокапель*. Одиночная клетка культивируется в капле жидкой питательной среды, окруженной стерильным минеральным маслом, в специально сконструированных микрокамерах в подвешенном состоянии.

3) *Метод плейтинга (plating – высева клеток в агаризованные среды)*. Суспензию одиночных клеток смешивают с расплавленной агаризованной питательной средой, охлажденной до 30–40 °С и разливают тонким слоем до 1 мм в стерильные чашки Петри.

4) *Метод пластинок-реplik*. В основу метода положен принцип роста клеток через сетку. В чашку Петри с одиночными клетками, высеянными по методу плейтинга, помещают стерильную нейлоновую сетку так, чтобы она находилась в тесном контакте с поверхностью агаризованной среды. Через 20 дней контакта со средой в стерильных условиях сетку удаляют и стороной, направленной к крышке чашки Петри, плотно прикладывают к поверхности агаризованной среды новой пластинки-реплики. Клетки пластинки-хозяина, прилипающие к сетке и прорастающие через её нити, переносятся на новую пластинку и растут на ней. Сетку удаляют и пластинку реплику инкубируют 10–20 дней.

Изолированные протопласты растений, их получение и культивирование

По определению Е. Кокинга, изолированный *протопласт* – это часть клетки, остающаяся после удаления клеточной стенки ферментативным или физическим способом. Благодаря способности протопластов поглощать макромолекулы и органеллы, возможности слияния, индукции в них меристематической активности и регенерации целого растения, культура протопластов наиболее интенсивно применяется в области генетики как объект генной инженерии и модификации растительной клетки. Изолированные протопласты используются для:

1) получения соматических гибридов, далеко стоящих в систематическом отношении видов, или в случае половой несовместимости;

2) получения новых образцов растений путём введения в клетку с помощью трансгеноза чужеродного генома или части его.

Исходным материалом для выделения протопластов могут служить различные части растений – листья, корни, семядоли, лепестки цветков, пыльцевые зерна, а также каллусные культивируемые клетки.

Клеточная оболочка растений представлена главным образом целлюлозой, гемицеллюлозой и пектиновыми веществами. Поэтому для её деградации используются ферментативные смеси на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ.

Техника выделения протопластов, например, из листьев:

- 1) отбираются полностью развернувшиеся листья с черешками;
- 2) листья подвергаются стерилизации;
- 3) промываются стерильной дистиллированной водой;
- 4) удаляется нижний эпидермис и кусочки листьев переносятся в чашки Петри на поверхность среды для промывки протопластов;
- 5) из под листьев пипеткой удаляется среда для промывки протопластов и вместо неё вносится раствор фермента;
- 6) инкубируются кусочки листьев в течение 16 часов в темноте при температуре +27 °С;
- 7) удаляется раствор фермента, и кусочки листьев отжимаются в питательный раствор, чтобы высвободить протопласты;
- 8) суспензия протопластов переносится в центрифужные пробирки и центрифугируется в течение 10 минут, после чего протопласты всплывают на поверхность;
- 9) протопласты переносятся в пробирки с умеренным объёмом среды и подсчитываются. Работать удобнее с объёмом 10 мл. Подсчет протопластов необходим, чтобы контролировать при культивировании их плотность. Это важно для ведения последующих манипуляций с протопластами: слияния, трансформации, регенерации растений.

Культивирование протопластов проводится на рассеянном свете или в темноте в жидкой или агаризованной питательных средах при температуре +25–28 °С. Требования к составу питательных сред для культивирования протопластов зависят от вида растения. Наиболее часто используются питательные среды Т. Нагаты и Г. Такебе.

Регенерация и морфогенез растений в культуре *in vitro*

Регенерация – (лат. восстановление, возрождение, возобновление) – восстановление организмом утраченных или поврежденных органов и тканей, а также восстановление целого организма из его части.

Восстановление целого растительного организма из отдельной клетки связано с уникальным свойством, которым обладает любая растительная клетка, – тотипотентностью – это способность растительной клетки нести в себе генетическую информацию о целом организме, и в результате процессов регенерации образовывать взрослое растение.

Регенерант – стерильное растение с развитой системой корней и побегов, сформировавшихся в условиях *in vitro*.

В настоящее время имеются два основных положения об определяющих факторах *морфогенеза* (формообразование у растений включает в себя процессы заложения, роста и развития клеток, тканей и органов). Первое теоретическое обоснование *морфогенеза in vitro* выдвинули F. Skoog и C.O. Miller в 1957 г. Это положение гласит, что любой тип *морфогенеза in vitro* определяют различия в балансе экзогенных фитогормонов ауксинового и цитокининового типов.

F. C. Steward в 1964 г. высказал другую гипотезу, согласно которой сигналом к выполнению клеточной программы развития является ее физическое или физиологическое обособление.

Обе гипотезы подтверждены экспериментальными данными.

Существует и значительное количество точек зрения, в которых авторы дополняют ту или иную концепцию *морфогенеза*, вводя в качестве индукторов температуру, фотопериод, интенсивность и качество света, трофику. Но более поздние концепции *морфогенеза* представляют собой модификации двух основных гипотез с различными дополнениями.

Процесс регенерации в культуре *in vitro* зависит от состава питательной среды, обязательным компонентом которой являются цитокинины (правило Скуга – Миллера); от возраста экспланта (лучше всего регенерируют молодые части побегов – части стебля, почки, листья); от вида растения (у двудольных растений регенерация идет быстрее).

Физические условия регенерации: температура +24–26 °С (до +28 °С) освещенность – 6–8 тыс. люкс, 16-часовой фотопериод, 70–80 % влажность воздуха.

Существуют различные типы регенерации: культура зародышей, соматический эмбриогенез и органогенез (корневой, стеблевой, флоральный или цветочный, листовой).

Культура зародышей или *эмбриокультура* представляет собой стерильную культуру зиготических зародышей. Зародыш изолируют из семени или семянки и помещают в искусственные условия на питательную среду, которая заменяет зародышу эндосперм. Эмбриокультура используется в селекции при нескрещиваемости растений.

Соматический эмбриогенез представляет собой процесс формирования зародышеподобных структур из соматических клеток. Образование соматических зародышей может происходить прямым или непрямым путем. *Прямой соматический эмбриогенез* заключается в формировании вегетативного зародыша из одной или нескольких клеток ткани экспланта без стадии образования промежуточного каллуса. *Непрямой эмбриогенез* состоит из нескольких этапов: помещение экспланта в культуру *in vitro*, последующая стимуляция роста каллуса и формирование предзародышей (обычно на питательной среде, содержащей высокие концентрации ауксина) и перенос каллуса на питательную среду без факторов роста, для того чтобы индуцировать формирование биполярных зародышей из предзародышей.

Формирование растений путем *органогенеза* состоит в появлении и росте побегов из каллусов или в инициации и росте побегов из пазушных почек, развившихся на культивируемых верхушках побегов и образовавших впоследствии адвентивные корни. Существует три способа получения растений через органогенез: 1) путем формирования придаточных органов на каллусе, полученном из экспланта; 2) путем формирования придаточных органов прямо из экспланта без промежуточной фазы каллусообразования; 3) путем формирования растений регенерантов из побегов, образовавшихся из пазушных почек.

Органогенез и регенерация растений из различных эксплантов и эмбриогенез используются для клонирования ценного растительного материала, для получения больших популяций растений из одной генетической линии. Органогенез гаплоидных клеток пыльцы или каллусов позволяет получить гаплоидные растения. Культура изолированных клеток дает возможность применять в генетических исследованиях высших растений методы клеточной селекции и выделять клоны клеток с измененным метаболизмом, устойчивостью к неблагоприятным условиям и болезням; морфогенез таких клеток позволяет получить растения с новыми полезными признаками.

4. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ *IN VITRO* В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Преодоление прогамной и постгамной несовместимости при отдалённой гибридизации растений

При отдаленной гибридизации и создании межвидовых и межродовых гибридов затрудняется получение фертильных образцов. Выделяют *прогамную* и *постгамную* несовместимость. В первом случае механизмы несовместимости проявляются до оплодотворения, во втором – после оплодотворения.

Преодоление несовместимости в культуре *in vitro* возможно двумя методами – оплодотворение *in vitro* и эмбриокультура.

Оплодотворение in vitro (преодоление прогамной несовместимости). Проводится, когда невозможно осуществить оплодотворение между выбранными парами в естественных условиях, по следующим причинам:

- 1) физиологические – несоответствие во времени созревания пыльцы и т. д.;
- 2) морфологические – короткая пыльцевая трубка, блокирование роста пыльцевой трубки на разных этапах развития и т. д.

Способы оплодотворения *in vitro*:

– культивирование на искусственной питательной среде завязи с нанесённой на неё готовой пыльцой;

– завязь вскрывается и на питательную среду переносятся кусочки плаценты с семяпочками, вблизи которых или на ткани плаценты культивируется готовая пыльца.

Когда успешно прошло оплодотворение, можно наблюдать быстро увеличивающиеся в размерах семяпочки. Сформировавшийся зародыш прорастает, образуя растение-регенерант, и даёт начало гибриднему поколению.

Например, оплодотворение *in vitro* позволило преодолеть несовместимость в скрещивании сортов культурного табака с дикими видами и стало возможным получение межвидовых гибридов табака.

Эмбриокультура. Постгамная несовместимость при отдалённой гибридизации возникает после оплодотворения. При этом образуются щуплые, невсхожие семена. Причинами могут быть: 1) расхождение во времени развития зародыша и эндосперма; 2) слабое развитие эндосперма и зародыш при этом неспособен к нормальному прорастанию.

В таких случаях из семян изолируют зародыши и выращивают их на искусственной питательной среде в условиях *in vitro*.

Культивирование изолированных зародышей как метод преодоления постгамной несовместимости применяется при получении межвидовых, межродовых и межсемейственных гибридов плодовых, овощных, декоративных, кормовых и зерновых культур.

Метод эмбриокультуры успешно применяется для выращивания растений из щуплых семян, а также для преодоления покоя семян путем яровизации зародышей. В последнем случае удастся вывести семена из состояния покоя и сократить период их выращивания. К примеру, семена ириса не прорастают до 2–3 лет, а метод эмбриокультуры позволяет получать растения для пересадки в грунт за 3,5–4 месяца. Метод эмбриокультуры используется также для культивирования гаплоидных зародышей.

Индукция гаплоидии в культуре тканей и использование гаплоидов и дигаплоидов в селекции растений

Гаплодия – получение растений с половинным набором хромосом.

Гаплоиды – это растения, в клетках которых содержится половинный как в гаметах набор хромосом. Сами по себе эти растения мелкоклеточные, имеют небольшой рост, сближенное расположение листьев. Тем не менее – это ценный материал для селекции.

Преимущества гаплоидов как материала для селекционной работы:

1) гаплоидные растения дают возможность наблюдать мутации сразу же при их осмотре, ибо, все рецессивные генные мутации в гаплоидных организмах не маскируются доминантными аллелями. Это значительно ускоряет селекционный процесс;

2) если гаплоидные клетки подвергнуть воздействию колхицина – вещества индуцирующего полиплоидию, то возникают дигаплоидные клетки, ценные своей абсолютной гомозиготностью, т. е. имеющие совершенно идентичные гомологичные хромосомы. Скрещивание гомозиготных линий между собой даёт высокопродуктивное потомство;

3) гаплоидные растения ценны тем, что лишены летальных и сублетальных наследственных факторов, ведущих к гибели или ослаблению растений.

Гаплоиды могут возникать спонтанно, но частота их спонтанного возникновения очень мала. Поэтому существуют следующие методы получения гаплоидов:

1. Получение гаплоидов воздействием физических (облучение, экстремальные температуры) и химических (мутагены) факторов на пыльцу при межвидовых скрещиваниях. Этот метод малоэффективен. Выход гаплоидов очень низок.

2. Метод гаплопродюсера. Используется какой-то вид как опылитель, пыльца которого выступает как посредник, её присутствие вызывает элиминацию (устранение) хромосом. Применяется при селекции ячменя.

3. Способы получения гаплоидов с использованием методов *in vitro*:

Андрогенез – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор. В культуре пыльников возможны два пути образования гаплоидных растений: 1) образование растений путём эмбриогенеза из пыльцевых зёрен; 2) образование каллуса из клеток пыльника, которые в дальнейшем в результате морфогенеза регенерируют растения.

Гиногенез – получение гаплоидов из изолированных семян.

Партеногенез – получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы (развитие особи с участием только материнских генов). Образовавшиеся в результате элиминации хромосом отцовского генома гаплоидные эмбриониды культивируют на искусственной питательной среде и получают гаплоидные растения.

В настоящее время получены гаплоиды рапса, картофеля, риса, ячменя, табака, ржи, томатов и др.

Клеточная селекция растений

Клеточная селекция – проведение отбора в культуре *in vitro* на уровне клетки.

Исследования показали, что процесс культивирования растительного материала на искусственных питательных средах может сопровождаться различными аномалиями митоза, это приводит к возникновению значительного генетического разнообразия в популяциях каллусных тканей и регенерантных растений. Явление возникновения новых образцов растений в результате накопления генетической изменчивости в растительных клетках, культивируемых *in vitro*, получило название соматклональной изменчивости. Соматклональная изменчивость – это разновидность мутационной изменчивости.

Генетическая природа и механизмы соматклональной изменчивости пока мало изучены. Основными причинами ее возникновения являются:

1) генетическая гетерогенность соматических клеток исходного экспланта;

2) условия культивирования *in vitro*, особенно состав искусственной питательной среды, и в частности, регуляторы роста, такие как ауксины.

Естественная соматклональная изменчивость, возникающая в процессе культивирования клеток и протопластов, может быть усилена с помощью мутагенов. В качестве искусственных мутагенов используются нитрозометил мочевины, нитрозозетил мочевины, рентгеновские лучи, ультрафиолетовые лучи и другие физические и химические мутагены и супермутагены. Воздействие мутагенами на растительный материал в культуре *in vitro* – это дополнительный метод получения генетической изменчивости. Затем возможно проведения отбора на уровне клетки в культуре *in vitro*. При этом необходимо соблюдать одно важное условие: признак, по которому ведется отбор, должен проявляться на клеточном уровне. Чаще всего это признаки устойчивости: к патогенам, к различным температурам, к засолению и др. Питательные среды, на которых ведется отбор в культуре *in vitro*, называются селективными.

Используя методы клеточной селекции, и в частности, соматклональную изменчивость, получены образцы картофеля, томатов с повышенной устойчивостью к фитофторозу; сорта клевера, устойчивые к фузариозу; сорта томата, табака, люцерны, устойчивые к засолению.

Основные преимущества клеточной селекции:

1) большое количество генотипов, с которыми ведется работа;

2) регулируемость условий, а, следовательно, и воспроизводимость результата;

3) отсутствие сезонности в работе.

Использование гибридизации соматических клеток в селекции растений

Под *соматической гибридизацией* понимается создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов, выделенных из соматических клеток растений.

Термин «соматическая гибридизация» впервые предложен немецким исследователем Г. Мельхерсом в 1974 году. Для обозначения соматического гибрида используют вместо формулы $A \times B$, принятой для записи половой гибридизации, формулы $A+B$ или $A(\times)B$. Для обозначения гибрида, несущего гены ядра только одного из родителей наряду с цитоплазматическими (внеядерными) генами от обоих или только от другого родителя используют термин «цитоплазматический гибрид» (*цибрид*).

Первое слияние протопластов было получено Пауэром в 1970 году. Соматическая гибридизация растений включает четыре отдельных этапа:

- 1) выделение протопластов;
- 2) слияние протопластов;
- 3) отбор и регенерация растений;
- 4) анализ растений-регенерантов.

Соматическая гибридизация открывает перед исследователем возможность:

- 1) скрещивать филогенетически отдаленные виды растений, которые невозможно скрестить половым путем;
- 2) получить асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами другого;
- 3) создать систему гибридизации, включающую одновременное слияние трех и более родительских клеток;
- 4) получить растения, гетерозиготные по внеядерным генам (генам пластид и митохондрий).

Выделяют следующие методы слияние протопластов:

1) *Использование полиэтиленгликоля (ПЭГ)* в сочетании с высоким рН (9–11) среды и повышенным содержанием ионов кальция Ca^{2+} (100–300 мМ). Полиэтиленгликоль выполняет роль индуктора слияния, который обеспечивает агглютинацию (слипание). Высокое значение рН и высокая концентрация ионов кальция необходимы для нейтрализации отрицательного поверхностного заряда, который имеют протопласты.

2) *Электрослияние протопластов.* В этом случае протопласты помещают в неоднородное переменное электрическое поле. В данных условиях протопласты образуют мостик из нескольких клеток между электродами. После пропускания единичных импульсов тока происходит их слияние в результате разрыва плазмалемм.

Гибридизация соматических клеток позволяет преодолеть созданные эволюцией барьеры несовместимости и скрещивать между собой растения, принадлежащие к различным видам, родам и семействам. При этом обычно наблюдается элиминация хромосом одного из родителей. Чаще всего гибриды между отдаленными видами аномальные и не дают потомства. Однако большой практический интерес представляет создание асимметричных гибридов, несущих полный геном одного из родителей и лишь несколько хромосом или генов другого.

Получены фертильные межвидовые амфиплоиды дурмана с повышенным на 20–25 % выходом алкалоидов. Созданы фертильные амфиплоиды межвидовых гибридов табака, картофеля, баклажанов. Большой селекционный интерес представляют также гибриды, полученные у картофеля, томатов, капусты.

Криосохранение как метод создания банка клеток и тканей

Криосохранение – это сохранение изолированных культур тканей, клеток, апексов, эмбриоидов в жидком азоте при температуре $-196^{\circ}C$.

Цель метода – сохранение в культуре *in vitro* генофонда, а также в обеспечение селекционеров в любое время генотипом, имеющим искомые признаки.

Процесс криосохранения включает следующие приёмы:

1. Подготовка культуры клеток к замораживанию – культивирование на питательных средах, содержащих осмотически активные вещества, связывающие воду в клетках (маннит или сорбит, аминокислоты (пролин).

2. Добавление криопротекторов. В качестве криопротекторов используются вещества, имеющие низкий молекулярный вес, легко и равномерно проникающие через мембрану в клетку, легко отмываемые, с высокой водоудерживающей способностью, нетоксичные. Наиболее известны следующие криопротекторы: диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, сахароза, низкомолекулярные белки. Криопротекторы проникают через мембрану клетки, связывают воду и повышают вязкость вне и внутриклеточной среды.

3. Программное замораживание до супернизких температур. Важно правильно подобрать режим замораживания от 0 до -40°C . Как правило, замораживание до -40°C осуществляется постепенно, со скоростью $0,5-1^{\circ}\text{C}$ в минуту. Затем ампулы с растительным материалом погружают в жидкий азот.

4. Хранение в жидком азоте. Хранение в жидком азоте практически не лимитировано. Осуществляется в ампулах в замораживающих агрегатах.

5. Оттаивание должно быть проведено как можно быстрее. Для этого ампулы помещают на водяную баню с температурой $+40^{\circ}\text{C}$ и выдерживают до полного исчезновения кристаллов льда.

6. Удаление криопротектора отмыванием.

7. Определение жизнеспособности клеток после оттаивания. Окраска клеток витальным красителем сини Эванса, в результате которой мёртвые клетки окрашиваются, а живые нет. Окончательным критерием служит возобновление роста и деления клеток при рекультивировании на искусственных питательных средах.

Экспериментально доказано, что клетки после хранения в жидком азоте не теряют способности к делению и регенерации растений. Растительный материал может сохраняться неограниченный период времени. Хранимый материал не занимает много места, не изменяется генетически и не заражается патогенами.

Технологии *in vitro* для поддержания генколлекций весьма широко используются в генбанках. По данным ФАО, во всем мире *in vitro* сохраняются 37600 образцов, причем число генбанков и количество образцов с каждым годом увеличивается. В Риме создан Международный институт генетических ресурсов растений, который координирует работу международных и национальных генцентров по сохранению генколлекций, в том числе и методом *in vitro*.

5. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ *IN VITRO* ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Микроклональное размножение растений *in vitro* и его задачи

Микроклональное размножение – это разновидность вегетативного размножения, проводимого в культуре *in vitro*.

В настоящее время для ряда культур разработаны технологии микроклонального размножения. Такие технологии особенно актуальны для культур, размножаемых в производстве преимущественно вегетативно (картофель, плодовые, ягодные, декоративные, лесные растения). При длительном вегетативном размножении черенками, луковичками, клубнями снижается качество посадочного материала. Дочерние растения накапливают вирусную, бактериальную и грибную инфекцию, поэтому возникает необходимость в оздоровлении посадочного материала. Перед микроклональным размножением стоят следующие задачи:

1) ускоренное размножение уникальных генотипов в селекции растений;

- 2) промышленное размножение посадочного материала высоких репродукций в семеноводстве растений;
- 3) оздоровление посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции в процессе размножения;
- 4) поддержание неконстантного материала, расщепляющегося в процессе семенного размножения (гибриды плодовых, ягодных, декоративных и других культур);
- 5) размножение культур с длительным жизненным циклом (древесные растения);
- б) размножение растений, которые невозможно или трудно размножить *in vivo* (стерильные формы для гетерозисной селекции).

Преимущества микрклонального размножения в сравнении с традиционными методами заключаются в следующем:

- метод обеспечивает высокий коэффициент размножения, что даёт возможность быстро внедрить в производство новые сорта растений;
- метод не имеет альтернативы для видов, не размножаемых или трудноразмножаемых *in vivo*;
- в процессе размножения обеспечивается оздоровление посадочного материала путем применения методов апикальных меристем, термотерапии или химиотерапии;
- требуется небольшое количество стартового материала, существует возможность его сохранения в генбанках, в том числе *in vitro*;
- выполнение работ осуществляется в лабораторных условиях и не зависит от факторов внешней среды;
- метод обеспечивает экономию площадей и возможность регуляции средовых факторов;
- возможны автоматизация выращивания *in vitro* и применение промышленных технологий получения посадочного материала.

К *недостаткам* метода микрклонального размножения следует отнести: сложность и высокую цену применяемого оборудования, возможность повышения частоты мутаций в культуре *in vitro*, удорожание посадочного материала. В связи с этим микрклональное размножение целесообразно использовать для получения высоких репродукций в семеноводстве с последующим применением традиционных методов вегетативного размножения оздоровленного посадочного материала, либо размножения ценных и трудноразмножаемых образцов и видов растений.

Этапы микрклонального размножения и оптимизация процесса на каждом этапе

Т. Мурасиге в 1974 году впервые предложил подразделить микрклональное размножение на три этапа:

Этап 1. Введение в культуру *in vitro*. Цель – получить стерильный, жизнеспособный растительный материал и обеспечить успешную пролиферацию экспланта в культуре *in vitro*. Размножение на этом этапе не является важным.

Этап 2. Собственно размножение. Единственная функция этой стадии – увеличить число побегов. Для этого индуцируются меристематические центры, которые развиваются в почки или побеги.

Этап 3. Укоренение и адаптация в нестерильных условиях. На этом этапе удлиняются побеги, индуцируются и развиваются корни. Затем осуществляется перенос в тепличные условия. Большинство видов требуют адаптации в условиях *in vivo*.

Особенности микрклонального размножения на каждом из его этапов.

Этап 1. Введение в культуру in vitro.

Исходным материалом для введения в культуру обычно служат элитные растения, типичные для данного сорта, без признаков инфекции. Для подготовки таких растений желательно уменьшить их инфицированность путем выращивания в условиях теплиц, а также изменить физиологический статус. В теплицах поддерживается высокая температура (около 25

°С) и сравнительно низкая влажность (70 %). Для уменьшения инфицированности растения поливают непосредственно под корень, исключая полив листьев.

При выборе экспланта необходимо учитывать следующее:

- 1) экспланты из надземной части растения менее инфицированы, чем из подземной;
- 2) внутренние части растения менее инфицированы, чем внешние;
- 3) чем меньше эксплант, тем меньше риск инфицирования;
- 4) регенерационная способность экспланта обычно обратно пропорциональна возрасту экспланта и возрасту исходного растения;
- 5) эксплант, взятый из верхушечной почки, часто находится в более молодом возрасте и регенерационная способность его выше;
- 6) на эффективность приживаемости и успешной пролиферации влияет время взятия экспланта. Экспланты, взятые в состоянии активного роста растения (весна – начало лета), приживаются более успешно в сравнении с эксплантами, взятыми у растений, находящихся в состоянии покоя (осень – зима).

Этап 2. Собственно размножение.

Цель этапа – получение максимального количества побегов за один пассаж. Главным условием образования побегов является высокое соотношение цитокининов к ауксинам. Потребность в экзогенных гормонах зависит от концентрации цитокининов в экспланте. Среди цитокининов часто используется 6-БАП, и в отдельных случаях кинетин и 2-*ip*. Обычно 1–2 мг/л цитокинина достаточно для пролиферации побегов. Более высокие концентрации усиливают образование адвентивных почек, что не всегда желательно в связи с повышением вероятности образования мутаций. Возможно использование ауксинов для повышения активности роста побегов. Чаще используют нафтилуксусную и индолилмасляную кислоты реже – индолилуксусную кислоту из-за ее нестабильности. Ауксин 2,4-Д не применяется, поскольку может вызывать мутации.

Этап 3. Укоренение и адаптация в нестерильных условиях.

Побеги, полученные на втором этапе при высокой концентрации цитокининов, имеют небольшой размер, что затрудняет манипуляции с ними. Удлинения побегов можно достичь при их пересадке на питательную среду, не содержащую цитокинины.

Образование корней происходит при низком содержании или отсутствии цитокининов и высоком содержании в среде ауксинов. Обычно остаточного количества цитокининов в побегах после второго этапа достаточно и их добавления в питательную среду не требуется. На третьем этапе чаще всего применяют нафтилуксусную, индолилмасляную, индолилуксусную кислоты в концентрации 0,1–1 мг/л.

Высокая концентрация солей в питательной среде подавляет развитие корневой системы. В этом случае концентрацию солей уменьшают в 2–4 раза.

Возможно и укоренение в нестерильных условиях. Так, например, микропобеги голубики высокой можно укоренять в смеси верхового торфа с перлитом 1:3 после обработки нижней части микропобега ростовой пудрой. Укоренение производится в условиях повышенной влажности и притенения. Корни образуются в течение месяца.

Микрорастения, выращенные в культуре *in vitro*, имеют ряд анатомических и физиологических особенностей. Для них характерны более мелкие и тонкие листья, слабо развитая кутикула, нарушение работы устьиц. Кроме того, тип питания микрорастений миксо- или гетеротрофный, но не автотрофный. При пересадке в условия теплицы для адаптации микрорастения испытывают состояние стресса, что может привести к гибели части растений от недостатка влаги, повышенной температуры и других неблагоприятных факторов среды. В связи с этим главная задача этапа – акклиматизация микрорастений в условиях *in vivo*. Микрорастения пересаживаются в теплицы или комнаты с контролируемыми условиями. Главные требования успешной акклиматизации растений *in vivo*: высокая относительная влажность, уменьшенная интенсивность света, не слишком влажный субстрат и оптимальная температура.

Методы оздоровления посадочного материала

Оздоровление посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции выполняется на основе одного из трех методов: метод апикальных меристем, метод термотерапии, метод химиотерапии или их сочетания.

Метод апикальных меристем. Меристема – конус активно делящихся клеток, расположенных на кончике побегов или корней. Для оздоровления используют меристему побегов шириной 0,1 мм и длиной 0,2–0,4 мм. Метод основан на том, что распределение вируса в растении неравномерно и наименьшая концентрация наблюдается в зоне апикальной меристемы. Вычленение апикальной меристемы и высадка ее на питательную среду приводят к снижению концентрации или полной элиминации вируса в дочернем растении после его регенерации из апикальной меристемы.

Существует несколько теорий, объясняющих отсутствие вирусов в меристеме: медленное распределение вирусов в активно делящихся клетках апикальной меристемы, подавление размножения вирусов высокой концентрацией ауксинов, влияние компонентов питательной среды.

Авторами метода считаются Ж. Морель и С. Мартин, впервые получившие в 1952 году свободное от вирусов растение георгины от инфицированного донорного растения. В настоящее время метод получил широкое распространение и используется для оздоровления посадочного материала картофеля, плодовых, ягодных, декоративных растений. Метод апикальных меристем сам по себе не гарантирует обязательного оздоровления. Вирус может присутствовать в апикальной меристеме в скрытом состоянии. В связи с этим необходимо сочетать метод апикальных меристем с другими методами оздоровления (термо- и химиотерапия).

Термотерапия. Тепловая обработка растений в культуре *in vivo* или *in vitro* обычно предшествует вычленению апикальных меристем. Термотерапия (лечение зараженных вирусными болезнями растений длительным воздействием на них повышенных температур) способствует элиминации вирусов в инфицированных растениях. Механизм этого процесса до конца не изучен. Предполагаются следующие возможные причины элиминации вирусов в результате тепловой обработки растений: инактивация имеющихся вирусов, увеличение темпа синтеза вирусных частиц с последующей деградацией, блокирование синтеза РНК вируса, уменьшение движения вируса к быстрорастущей апикальной меристеме. Различные вирусы по-разному относятся к термотерапии. Так, например, вирусы картофеля располагаются в порядке увеличения трудности элиминации под действием термотерапии в следующем порядке: *L, A, Y, F, M, X, S*, вирион веретеновидности клубней.

Термотерапия выполняется обычно при температуре, не угнетающей развитие растений и подавляющей развитие вирусов. Наиболее часто используется температура 36–38 °С. Для выполнения термотерапии растения, черенки или клубни помещают в термокамеры, где в течение первой недели температуру изменяют от 25 °С до 37 °С путем ежедневного увеличения на 2 °С.

Продолжительность термотерапии зависит от биологии культуры, сорта и состава вирусов инфицированного растения. Если для картофеля оптимальная продолжительность составляет около 4 недель, то для хризантем – более 12 недель.

Химиотерапия. Метод предполагает использование химических соединений – ингибиторов вирусов, которые добавляются в состав питательной среды. Наиболее часто для этих целей применяют виразол. Виразол стерилизуется путем фильтрации и добавляется в охлажденную питательную среду. Концентрация препарата зависит от вида растения, длительность обработки подбирается эмпирически. По мере возрастания концентрации усиливается процесс элиминации вирусов, однако при концентрации выше 20–50 мг/л уменьшается темп роста и может наблюдаться фитотоксический эффект. Виразол показал высокую эффективность при оздоровлении картофеля, черешни, сливы, малины, декоративных растений.

В Белорусском НИИ картофелеводства успешно испытан метод оздоровления посадочного материала картофеля на основе применения 2,5-олигоаденилатов.

Методы контроля вирусной инфекции в растениях

Применение тех или иных методов оздоровления посадочного материала не гарантирует полной элиминации вирусов в растениях. В связи с этим в технологии производства оздоровленного посадочного материала обязательными являются контроль вирусной инфекции при микроклональном размножении, а также меры по защите растений от повторного инфицирования, поскольку оздоровленный материал не приобретает устойчивости к вирусу. Наиболее часто для целей диагностики наличия вирусов в растительном материале используют методы электронной микроскопии, иммуноферментного анализа (ИФА), а также растения-индикаторы, чувствительные к вирусу.

ИФА проводится с использованием полистироловых пластин с 96 лунками, т. е. одновременно можно протестировать 16 растений на 6 вирусов.

Методика выполнения анализа, следующая:

1) на первом этапе в оптически прозрачные полистироловые платы вносят антитела, полученные из крови кролика при введении в его организм препарата вируса. Антитела адсорбируются на поверхности за счет электростатических взаимодействий и остаются в виде пленки в лунках полистироловых плат; таким образом, повышается чувствительность плат к наличию вирусной инфекции;

2) на втором этапе в лунки вносят тестируемые образцы (сок листьев, ростков, клубней). Если материал зараженный, вирусы связываются с фиксированными на первом этапе антителами;

3) на третьем этапе в лунки вносят меченные ферментом антитела к определенному вирусу (их называют конъюгат), которые специфически связываются с вирусами на антителах, фиксированных на полистироле.

Если в тестируемом материале есть вирус, то в конечном итоге получается комплекс, состоящий из антитела-вируса-антитела-фермента, причем произойдет ферментная реакция, вследствие чего развивается ярко выраженное изменение окраски (коричневая).

Наличие или отсутствие вируса может быть определено визуально или спектрофотометрически, с помощью фотометра, т. е. пропуская пучок света через каждую лунку полистироловой платы.

При визуальной оценке интенсивность окраски в лунках с анализируемыми пробами сравнивают с интенсивностью окраски в лунках с контролем (в качестве контроля используют сок заведомо здоровых растений). При использовании фотометров, происходит разбивка цветовой шкалы в диапазоне цветов, от отрицательного, до положительного контроля. При этом результаты анализа можно фиксировать условными обозначениями: «-» – вирус отсутствует, «+» – материал заражен.

Метод электронной микроскопии. Разрешающая способность электронного микроскопа – 40–60 тысяч раз, что позволяет увидеть в поле зрения вирусную частицу. С помощью этого метода можно определить относительную концентрацию вирусных частиц в соке или препарате и подсчитать их количество на единице площади листа или в единице массы исследуемой ткани. Достоинство электронной микроскопии как метода диагностики вирусов состоит в возможности использования небольшого количества сока или растительной ткани. Высокая чувствительность метода позволяет обнаруживать вирусы, находящиеся в растениях в низкой концентрации. Недостаток метода – необходимость дорогостоящего и сложного оборудования.

Растения-индикаторы. Метод основан на чувствительности отдельных видов или сортов растений к определенным вирусам. Наблюдаются три типа реакций растений-индикаторов на вирусы: *локальная* – проявление некротических пятен на листьях в местах

инфицирования; *системная* – мозаика, деформации листьев, некрозы различных органов; *смешанная* реакция – проявление симптомов вируса в местах инфицирования, а затем по всему растению.

Инфекция переносится на индикатор механической инокуляцией сока с помощью насекомых-переносчиков или прививкой. Признаки заболевания проявляются при локальной реакции через 5–12 дней, при системной – через 15–30 дней. С помощью индикаторов можно определить вирусы в материале с очень низкой концентрацией инфекционного начала. Помогает метод и при отсутствии других методов диагностики. Растения-индикаторы используются при анализе инфицированности картофеля, земляники и др.

Таким образом, ни один из методов диагностики не обладает абсолютной точностью и для изучения инфицированности растений желательным сочетанием различных методов анализа.

Технология получения оздоровленного посадочного материала на примере картофеля

Производство оздоровленного посадочного материала картофеля в Беларуси налажено в НИИ картофелеводства с 1976 года. В настоящее время процесс размножения оздоровленных растений выполняется в более чем 30 лабораториях.

Для оздоровления посадочного материала картофеля используется три основных метода: термотерапия, метод апикальных меристем и химиотерапия. Для термотерапии отбирают клубни, типичные по внешним признакам для данного сорта, не имеющие поверхностных повреждений, без признаков инфекции, моют их и размещают в кюветах, заполненных стерильным песком. Кюветы устанавливают в термобокс, где поддерживается температура +37 °С и влажность 75 %. Через 7–10 дней клубни подкармливают раствором Кнопа и микроэлементов по Мурасиге-Скуга. Термотерапия клубней в течение 35–50 дней резко снижает, а по отдельным сортам полностью освобождает клубни картофеля от вируса скручивания листьев. Однако этот метод не дает положительного эффекта по освобождению от вирусов X, S, M, Y, A.

Ростки клубней, прошедших термотерапию, длиной 2 см и более стерилизуют в 0,1%-ном растворе диацета 3–5 минут, затем 3 раза промывают в стерильной воде. Стерилизовать ростки также можно в 1–6%-ном растворе гипохлорита кальция или натрия, или в 0,1%-ном растворе сулемы. Меристему размером 0,1–0,25 мм вычлняют в ламинарном боксе под микроскопом с 24-кратным увеличением с помощью медицинской иглы. Меристему высаживают на модифицированную среду Мурасиге-Скуга и культивируют при температуре +24–25 °С, освещенности 6 тысяч люкс, фотопериоде 16 часов, влажности воздуха 70 %. За 30–45 дней из меристемы вырастает растение с 5–6 листочками. При сочетании метода апикальных меристем с химиотерапией в состав питательной среды добавляют виразол или 2,5-олигоаденилаты. Полученное из меристемы растение-регенерант черенкуют и проводят контроль на наличие вирусной инфекции методами иммуноферментного анализа или электронной микроскопии.

Оздоровленные растения размножают в культуре *in vitro* или *in vivo*. При традиционном размножении *in vitro* растения черенкуют в условиях ламинарного бокса на черенки с одним листочком, которые помещают на свежую питательную среду Мурасиге-Скуга. Условия культивирования: температура +18–25 °С, относительная влажность воздуха 70 %, освещенность 6–8 тысяч люкс, фотопериод – 16 часов. За 20–30 дней вырастает растение с корневой системой, готовое к новому черенкованию. Согласно Положению о семеноводстве картофеля в Республике Беларусь, допускается не более трех циклов черенкования исходных растений, полученных из НИИ картофелеводства.

Пробирочные растения картофеля могут использоваться для получения мини- или микроклубней. Для получения микроклубней пробирочные растения высаживаются в защищенный грунт. Его использование обязательно, так как пробирочные растения имеют слабую

корневую систему, привычную к доступности питательных веществ, поэтому для высадки тщательно готовится субстрат, лучше использовать верховой торф; у растений, полученных *in vitro*, уменьшается или отсутствует полностью кутикулярный восковой налет на листьях и недостаточно эффективно работает механизм открывания – закрывания устьиц, так как в пробирке транспирация протекает наиболее интенсивно. Все это требует обязательного высаживания пробирочных растений в условия защищенного грунта для снижения стресса при переносе растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro*.

Для получения миниклубней пробирочные растения высаживают в теплицу загущено. Схема посадки 10×15; 10×10 или 10×5. При загущенной посадке к осени формируется полноценный семенной клубневой материал. Средний вес одного клубня равен обычно 25–30 г или 1,5–3 см в диаметре.

В период вегетации за растениями необходимо осуществлять тщательный уход: поливы, окучивание, прополка, первые две подкормки желательно проводить раствором Кнопа; не допускать вторичного заражения растений вирусной инфекцией для этого один раз в неделю проводится обработка смесью фунгицид + инсектицид для борьбы с тлей и возможными болезнями (фитофтороз, макроспориоз). Фрамуги в теплицах желательно заделать сеткой, чтобы не допускать в теплицу тлю, которая является основным переносчиком вирусной инфекции.

Способ получения миниклубней носит название – рассадного способа выращивания растений картофеля. Полученный клубневой материал из пробирочных растений составляет первую семенную репродукцию.

Кроме тщательного ухода, в период вегетации растений картофеля необходимо проверить их на наличие вирусной инфекции. При этом достаточно широко используется серологический анализ. Метод основан на том, что при введении вирусов в организм животных (чаще кроликов) в крови их образуются антитела, способные вступать с вирусом в реакцию. Если каплю сока растения, содержащего вирусы, смешать с сывороткой крови кролика, выпадает осадок, по наличию или отсутствию которого можно судить, есть вирус или нет. Можно использовать также ИФА.

Существует рулонный способ выращивания рассады.

В этом случае делается специальный желоб длиной 1,5 м и более, по краям прибиваются две планочки. Вырезается тонкое полотнище пленки и укладывается на дно желоба. На пленку кладется увлажненный торф толщиной 2 см и раскладываются растения (точка роста в сторону желоба). Корневая система растений укрывается также 2 см слоем увлажненного торфа. Затем пленка с торфом и растениями скручивается и образуется рулон, в котором по спирали располагаются растения. Рулоны связывают шпагатом и устанавливают в теплице. Уход за растениями тот же, что и при рассадном способе.

Получение микроклубней картофеля. Микроклубни картофеля имеют диаметр 0,5–1,5 см (крупная горошина до размена вишни). Если растение картофеля, растущее в пробирке на питательной среде, подвергнуть действию стрессового фактора, то через 1,5–2 месяца на нем образуются микроклубни. Сокращение фотопериода, снижение температуры культивирования до +10–12 °С и освещенности до 50–100 люкс или помещение пробирочных растений в условия полной темноты, увеличение в составе питательной среды концентрации углеводов 40–60 г/л, добавление в питательную среду регуляторов роста – цитокининов, абсцизовой кислоты, хлорхолинхлорида, – все это индуцирует клубнеобразование картофеля в условиях *in vitro*. Одно пробирочное растение картофеля способно сформировать 1–2 клубня.

Методика получения микроклубней. Черенок картофеля сажают на питательную среду, содержащую индукторы клубнеобразования, и помещают в обычные условия культивирования – это 16-часовой фотопериод, температура +20–24 °С, освещенность 6000 лк. В течение 15–20 дней происходит развитие растения с 5–6 листочками и уже это растение помещают в стрессовые физические условия. Весь период клубнеобразования протекает в среднем 2 ме-

сяца. Образовавшиеся в условиях *in vitro* клубни можно хранить в закрытой стеклянной таре при температуре +4–5 °С.

Микроклубни, как и любой клубневой материал картофеля, имеют период покоя. Поэтому, если их получить весной, неизбежны проблемы по выведению клубней из состояния покоя. Желательно нарабатывать клубневой материал *in vitro* осенью.

Микроклубни возможно высаживать в хорошо подготовленную почву открытого грунта с густотой посадки 70–80 тыс. клубней на гектар. Глубина заделки 3–4 см. Желательно посадку производить в гребни. Уход за растениями тот же, что и при рассадном способе, лишь нет необходимости в поливах. Однако обязательно поддерживать жесткий пестицидный фон и проводить контроль на наличие вирусной инфекции.

Клубни, полученные рассмотренными способами, размножают три года под строгим фитосанитарным контролем с постоянной выборочной проверкой растений на зараженность вирусами. Осенью третьего года клубневому семенному материалу присваивается репродукция супер-супер-элиты.

Микроклональное размножение плодовых, ягодных, овощных, декоративных и лесных культур

В соответствии с мировой практикой в Беларуси посадочный материал подразделяется на 3 класса: класс А (*virus free* – свободный от вирусов), класс Б (*virus test* – тестированный на вирусы) и класс В (*visual healthy* – визуально здоровый). Для получения посадочного материала класса А необходимы тщательный отбор, оздоровление и тестирование исходных растений на наличие вирусных и микоплазменных заболеваний. Растения класса А являются основным, а в перспективе – единственным видом посадочного материала. Необходимость оздоровления исходных растений связана с широким распространением вирусов среди плодовых и ягодных растений в республике. В НИИ пловодства методом иммуноферментного анализа изучена распространенность 8 вирусов яблони, сливы, алычи, вишни и черешни в посадках института. Установлена высокая степень инфицированности яблони вирусом хлоротической пятнистости листьев (87 % растений), меньшая инфицированность вирусом мозаики яблони (11 %) и желобчатости ствола яблони (13 %). В посадках сливы и алычи широко распространены вирус мозаики яблони и карликовости сливы (37 и 47 % соответственно), а в посадках вишни и черешни – вирус мозаики яблони (45 %). Многие исследованные образцы содержат более чем один вирус, обнаружены также растения, которые можно использовать для создания маточника безвирусных плодовых деревьев (класс Б) или оздоровления (класс А). Тестирование земляники садовой и смородины черной на наличие 6 вирусов выявило очень высокий уровень инфицированности. Только 9 % растений земляники оказались свободны от вирусов, не обнаружено ни одного здорового растения смородины черной. Высокий уровень распространения вирусов снижает продуктивность плодовых и ягодных растений, для получения качественного посадочного материала класса А необходимы термотерапия и культура *in vitro*.

Наибольшее распространение для микроразмножения плодовых и ягодных культур получил метод пролиферации придаточных побегов. Для снятия эффекта апикального доминирования в этом случае используются цитокинины. Процесс происходит по описанной ранее схеме и имеет некоторые особенности, связанные со спецификой культур.

На 1 этапе важными являются подготовка растения, правильный выбор сроков взятия эксплантов (период выхода из состояния покоя и активной вегетации). На данном этапе проводят оздоровление посадочного материала, для чего применяют метод апикальных меристем в сочетании с термотерапией. Для термотерапии плодовых культур используют однолетние саженцы, которые культивируют в термокамерах при температуре 38 °С +/-1 °С, относительной влажности воздуха 70–80 %, освещенности 5–6 тысяч люкс, длине дня 16 часов в течение 5–11 недель. После термотерапии верхушки побегов обламывают,

промывают водой 2 часа, стерилизуют, например, в 0,1%-ном растворе сулемы 6–12 минут, промывают стерильной дистиллированной водой и вычлняют под микроскопом в ламинарном боксе апикальные меристемы размером до 0,5 мм. Меристемы культивируют на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга. Для инициации роста побегов из меристем используют цитокинины (чаще всего 6-БАП в концентрации 0,1–1,0 мг/л). Физические условия культивирования – температура +22–26 °С, освещенность 2,5–5 тысяч люкс, влажность воздуха 70–75 %. Побеги вишни, сливы, яблони, груши образуются в течение 2,5 месяцев.

На 2 этапе главной задачей является размножение побегов. Для увеличения эффекта размножения побеги пересаживают на питательную среду, содержащую 1,0–3,0 мг/л 6-БАП. Под воздействием повышенных концентраций цитокининов активизируется пробуждение почек в пазухах листьев, закладка и прорастание дополнительных почек. За один пассаж на питательной среде для размножения формируется конгломерат побегов размером от 0,5 до 2,0 см (лучше больше 1 см). Число побегов в конгломерате зависит от биологических особенностей культуры и колеблется от 4 до 20 шт. Коэффициент размножения в процессе нескольких пассажей может возрастать. Оптимальное число пассажей – 5–6. Длительность пассажа – 4–6 недель. Способность к пролиферации в значительной степени зависит от сорта.

На 3 этапе побеги укореняют, для чего концентрацию питательной среды Мурасиге-Скуга уменьшают наполовину, содержание сахарозы – до 20 г/л. Для индукции ризогенеза используют индолилмасляную кислоту в концентрации 0,5–1,0 мг/л. Длительность корнеобразования может составлять 3–6 недель. Затем проводится адаптация микрорастений в нестерильных условиях. Пробирочные растения после укоренения высаживают в стерильный субстрат, состоящий из смеси торфа, песка, перлита и почвы, который стерилизуют при температуре +85–90 °С в течение двух часов. Субстрат насыпают в горшочки или ящики и устанавливают в теплице. Для адаптации растения укрывают пленкой на 10–14 дней для поддержания высокой влажности. Через 5–8 дней после посадки растения подкармливают раствором Мурасиге-Скуга, разбавленным в 4–8 раз, или раствором Кнопа. После адаптации растения высаживают для создания маточника в теплицу или открытый грунт в начале или середине вегетации.

Микроклональное размножение *декоративных растений* широко распространено в Западной Европе и США. Имеется большой опыт микроразмножения и получения безвирусного посадочного материала гвоздики, хризантемы, антуриума, розы, бегонии в ряде научных и производственных учреждений СНГ (Институт физиологии растений РАН, Центральный ботанический сад НАН Беларуси, цветоводческие хозяйства «Элита» России и др.).

Сотрудниками Никитского ботанического сада разработана технология получения безвирусного посадочного материала хризантем для закрытого грунта. Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала начинается с термотерапии. Сортовые черенки берут с маточных растений, предварительно тестированных на вирусы, высаживают в контейнеры. После 2–3 прищипок растения помещают в термокамеру. Адаптацию к повышенной температуре начинают с +25 °С и доводят до +37 °С. Термотерапия продолжается 4–10 недель в зависимости от состава выявленных вирусов при освещенности 3500–4000 люкс и фотопериоде 14,5 часов. У растений, прошедших термотерапию, берут черенки длиной 5–7 см и стерилизуют их в 1,0%-ном растворе гипохлорита натрия в течение 5 минут с последующим пятикратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Вычлняют апикальные и латеральные меристемы размером 0,3–0,4 мм в ламинарном боксе и помещают на жидкую питательную среду. Пробирки с эксплантами культивируют при температуре +22–23 °С, освещенности 2500–3000 люкс, фотопериоде 16 часов. Образовавшийся каллус через 2–3 недели в асептических условиях пассируют на агазированной питательной среде, где в течение 3 недель

происходит регенерация проростков, которые пересаживают на среду для укоренения. После укоренения растения высаживают в контейнеры с субстратом (2 части торфа и 1 часть перлита), поливают раствором Кнопа и накрывают полиэтиленовыми изоляторами на 7–10 дней. После формирования 5–6 листьев растения тестируют на вирусы. Безвирусные растения используют для закладки маточника.

Масштабы и перспективы микрклонального размножения растений в мировом сельском хозяйстве

Микроразмножение растений, начавшее распространяться в 60-е годы XX века, оформилось как мощное промышленное производство, быстро реагирующее на запросы рынка. К примеру, только за период с 1985 по 1990 годы число растений, размножаемых *in vitro*, возросло с 130 млн до 513 млн. Мировыми лидерами в этой области являются Нидерланды, США, Индия, Израиль, Италия, Польша и другие страны. В США микроразмножением занимаются около 100 лабораторий, 5 из которых имеют производительность 15–20 млн растений в год, 8–10 лабораторий – от 2–10 млн, остальные менее 1 млн растений. Из 248 коммерческих лабораторий Западной Европы с общей годовой производительностью 212 миллионов растений только 37 производят более 1 млн.

Лидером микроразмножения растений в Западной Европе являются Нидерланды (около 70 лабораторий занимается микроразмножением). Это связано с традиционной ориентацией на производство декоративных культур. Они доминируют на мировом рынке. Около половины мирового экспорта цветов на срезку и декоративных растений экспортируется из этой страны. Наиболее важными группами растений, размножаемых *in vitro*, являются горшечные растения на срезку, орхидеи и луковичные.

Во Франции 94 % всей продукции цветочных культур получают методом *in vitro*. Италия специализируется на микроразмножении подвоев яблони, сливы и персика. Широкое производство растений методом *in vitro* развернуто в Индии, где 75 лабораторий производят около 190 млн растений *in vitro*.

В Беларуси около 30 лабораторий занимаются микрклональным размножением растений. Главная культура, размножаемая *in vitro*, в республике – это картофель, что связано с традиционным его производством в личном и общественном секторе. Налаживается получение оздоровленного посадочного материала земляники, голубики высокой, декоративных растений. Научные исследования по микрклональному размножению растений проводятся в НИИ картофелеводства, НИИ плодоводства, БГСХА, Институте генетики и цитологии НАН Беларуси, Центральном Ботаническом саду НАН Беларуси.

Микрклональное размножение является эффективным приемом быстрого распространения и оздоровления от инфекции новых сортов и гибридов картофеля, плодовых, ягодных, декоративных и лесных растений. Методы микроразмножения широко используются селекционерами для ускоренной репродукции ценного материала. Размножение растений *in vitro* может стать важным инструментом поддержания существующего биоразнообразия редких и исчезающих видов, занесенных в Красную Книгу.

6. ОСНОВЫ ГЕНОМИКИ

Нуклеиновые кислоты как носители наследственной информации (ДНК и РНК).

Основные методы изучения полиморфизма ДНК (РНК).

Хранение и передача генетической информации в живых организмах осуществляется с помощью рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот. Данные соединения представляют собой сложные биополимеры, состоящие из нуклеотидов, каждый из которых состоит из азотистого основания, сахара и фосфатной группы. В состав нуклеотида дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) входят дезоксирибоза, азотистые основания (пуриновые —

гуанин (G), аденин (A), пиримидиновые — тимин (T) и цитозин (C)) и фосфорная кислота. В состав нуклеотида рибонуклеиновой кислоты (РНК) входят рибоза, азотистые основания (пуриновые — гуанин (G), аденин (A), пиримидиновые – урацил (U) и цитозин (C)). Основным отличием нуклеотидов в цепях РНК или ДНК являются азотистые основания, благодаря чему существует возможность кодирования наследственной информации.

Основным методом изучения состава первичной последовательности данных молекул в настоящее время является секвенирование. Впервые метод чтения последовательности ДНК (генетического кода) был разработан Ф. Сенгером в 1977 году, за что в 1980 году получил вторую Нобелевскую премию (первую премию он получил за разработку метода чтения аминокислотных последовательностей в белках в 1958 году). Суть метода заключается в определении азотистых оснований в нуклеотидах и установлении последовательности нуклеотидов в цепи ДНК или РНК. Для чего создается определенная реакционная смесь для протекания процесса репликации (построения комплементарной цепи на основе матрицы) в искусственных условиях, в которую входят исследуемый образец ДНК, 4 типа стандартных азотистых оснований, полимераза и праймер. *Праймер* – это синтезированная короткая нуклеотидная последовательность, служащая затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью фермента ДНК-полимеразы. Праймер определяет начало построения комплементарной цепи, присоединяясь к исследуемой последовательности (реакция гибридизации). Особенностью реакционной смеси для построения комплементарной цепи ДНК, используемой Сенгером, являлось добавление в смесь наряду с обычными нормальными четырьмя типами нуклеотидов (*dNTP*) и модифицированных – дидезоксинуклеотидов (*ddNTP*). Их отличием является пентозная углеводная основа (рибоза или дезоксирибоза). У дидезоксирибонуклеотидов (*ddATP*, *ddGTP*, *ddCTP*, или *ddTTP*) в ней отсутствует 3'-гидроксильная группа. После их включения в выстраиваемую комплементарную цепь ее дальнейший синтез обрывается. Такие нуклеотиды выполняют терминирующую функцию. В процессе секвенирующей реакции – выстраивания комплементарной цепи на ДНК анализируемого гена (матрицы) – синтезируются фрагменты различной длины за счет встраивания терминирующих нуклеотидов в различные места матрицы (выделенного ампликона) с равной вероятностью.

В классическом варианте метода Сенгера реакцию с одной и той же матрицей проводят в четырёх разных пробирках, каждая из которых содержит: праймер, четыре стандартных дезоксинуклеотида, небольшое количество (в концентрации 1 к 100) одного из дидезоксирибонуклеотидов (*ddATP*, *ddGTP*, *ddCTP* или *ddTTP*) с радиоизотопной меткой. После завершения реакции содержимое пробирок разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и проводят автордиографию гелей. Продукты четырёх реакций формируют «секвенирующую лестницу», которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК (рис.2)

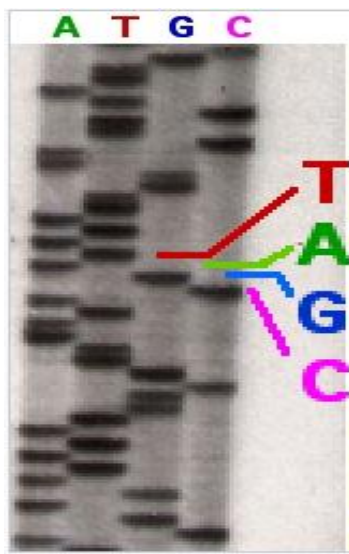


Рисунок 2 – Участок геля, содержащий продукты полимеразной цепной реакции, меченые радиоактивным изотопом.

Метод Сенгера (дидезоксинуклеотидный метод) позволяет также определять нуклеотидную последовательность РНК, но она предварительно должна быть «переписана» в форме ДНК с помощью обратной транскрипции.

Дидезоксинуклеотидный метод Сенгера, или метод «обрыва цепи», является принципиальной основой современных методов определения нуклеотидной последовательности ДНК – NGS (*next generation sequencing*). На сегодняшний день секвенирование ДНК по Сенгеру полностью автоматизировано и проводится на специальных приборах, секвенаторах. Секвенирующая реакция проводится с использованием наряду с обычными четырьмя парами нуклеотидов и дезоксинуклеотидов с флуоресцентными метками с разными длинами волн (веществами, способными переизлучать поглощенный свет с увеличением его длины волны). Кроме того, все 4 меченых *ddNTP* смешиваются в одной пробирке. Технология методов секвенирования нового поколения позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. NGS осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, выполняемого полимеразой, или многократного лигирования олигонуклеотидов. В ходе NGS могут генерироваться до сотен мегабаз и гигабаз нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл.

Реакционную смесь разделяют капиллярным электрофорезом в растворе. Фрагменты ДНК, выходящие из капиллярной колонки, регистрируются детектором флуоресценции. Результаты анализируют с помощью компьютера и представляют в виде последовательности разноцветных пиков, соответствующих четырём нуклеотидам. Секвенаторы такого типа могут «прочитывать» за один раз последовательности длиной 500—1000 нуклеотидов.

Полимеразная цепная реакция и их типы

После изобретения Сенгера мощным толчком в развитии методов молекулярного анализа стало изобретение Кэри Мюллисом в 1983 г. метода амплификации *in vitro* определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов полимеразной реакции (ПЦР - полимеразная цепная реакция, англ. *PCR - Polymerase Chain Reaction*), за которое в 1993 году ему была присвоена Нобелевская премия.

Полимеразная цепная реакция — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). В основе метода ПЦР лежит природный процесс — комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК. Метод предусматривает многократное избирательное копирование определённого участка ДНК в искусственных условиях (*in vitro*).

Процесс ПЦР можно условно разделить на два этапа – приготовление рабочей смеси для ПЦР и собственно процесса многократного копирования участка ДНК, осуществляемого на приборе амплификаторе.

Рабочая смесь (премикс) обязательно включает в себя следующие основные компоненты: праймеры, дезоксинуклеотиды, буфер, ДНК-полимеразу, ионы магния, воду.

Праймеры заменяют фермент праймазу в естественном процессе репликации, определяя начало синтеза новой цепи. В случае необходимости ограничения размеров фрагментов используют прямой и обратный праймеры. При раскручивании двух цепей ДНК прямой

праймер (*forward primer*) «садится» на транскрибируемую (матричную) цепь в начале фрагмента и обеспечивает синтез дочерней цепи в направлении от 5' к 3' концу. Обратный праймер (*reverse primer*) соединяется с нетранскрибируемой цепью ДНК в конце фрагмента и обеспечивает синтез другой дочерней цепи в направлении от конца к началу цепи. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. При подборе праймеров необходимо учитывать ряд условий для успешного протекания ПЦР. В настоящее время существует достаточно *online* ресурсов для качественного дизайна праймеров (<https://labwareguid.ru/onlain-primer-design-instruments>).

Дезоксинуклеозиды трифосфаты (dNTP) представляют собой «основной строительный материал» новых нуклеотидных звеньев в строящейся ДНК, а также являются источником энергии за счет своих макроэргических связей между остатками фосфатов. За счет этого АТФ (аденозин три фосфорная кислота) в реакционную смесь не добавляют. ПЦР-буфер обеспечивает поддержание оптимального pH для работы полимеразы. Ионы магния также необходимы для функциональной активности фермента ДНК-полимеразы. Вода является средой для протекания реакций, кроме того, регулируя ее количество, добиваются одинаковые объемы реакционной смеси и нужные концентрации всех компонентов.

ПЦР проводят на приборе – термоциклере (амплификаторе) в специальных тонкостенных полипропиленовых пробирках, совместимых по размеру с амплификатором. Суть работы прибора – контроль температурных и временных характеристик этапов ПЦР. Программа ПЦР состоит из следующих этапов: первичная длительная денатурация ДНК; быстрая денатурация ДНК; отжиг (гибридизация) праймеров; элонгация в течение 30-45 циклов; длительная элонгация; охлаждение реакционной смеси.

Каждый цикл ПЦР состоит из трех этапов: денатурация, отжиг, элонгация. Денатурация – раскручивание двухцепочечной молекулы ДНК на две одноцепочечные. Отжиг – присоединение праймеров к комплементарным участкам молекулы ДНК. Элонгация – достраивание комплементарной цепи маркируемого участка с помощью ДНК-полимеразы. В ходе каждого цикла реакции из исходного участка молекулы образуется две копии, каждая из них может служить матрицей для синтеза новых копий в следующем цикле, в результате чего возрастание количества ампликона (копируемого участка) идет в геометрической прогрессии. На рисунке 3 показана схема первого цикла амплификации.

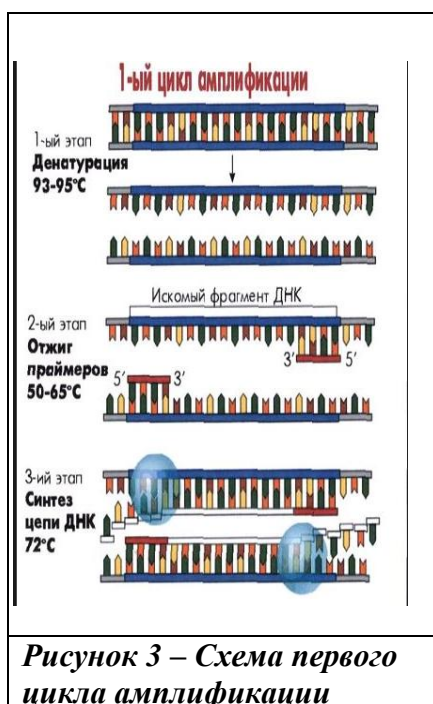


Рисунок 3 – Схема первого цикла амплификации

В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК, оптимально синтезировать до 1000 п.н.

Появление возможности секвенирования ДНК и амплификации ее фрагментов стало основой для развития метода молекулярного маркирования признаков живых организмов. *Метод молекулярного маркирования* включает в себя следующие этапы: поиск участков ДНК, которые могли бы говорить об изменчивости фенотипа по тому или иному признаку; подбор метода выявления данного полиморфизма (праймеры, рестриктаза, др.); проведение амплификации интересующих фрагментов (ПЦР) и визуализация продуктов амплификации; анализ результатов. Применение методов молекулярного маркирования в селекции растений и животных называется Маркер-Ассоциированной Селекцией (МАС) или маркер-сопутствующей селекцией. МАС позволяет вести отбор генотипов с ожидаемыми эффектами по конкретной генотипической изменчивости.

Генетический маркер — определенный полиморфизм

аллелей, локусов, и др, связанный с фенотипически узнаваемым признаком. В настоящее время при использовании понятия генетического маркера в него включают и способ выявления полиморфизма. Существует большое количество молекулярных маркеров для определения тех или иных полиморфизмов. К числу ДНК-маркеров, в основе использования которых лежит ПЦР, относятся:

SSR (*Simple Sequence Repeats*) – тип маркеров, позволяющий выявить простые повторяющиеся межлокусные последовательности (микросателлиты):

STS (*Sequence Tagged Site*) – тип маркеров, позволяющий выявить нуклеотидные последовательности, характеризующие локус;

SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) – тип маркеров, позволяющий выявить полиморфизмы на основе известной амплифицированной области, чаще всего делеции и вставки относительно больших размеров;

CAPS, dCAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, derived cleaved amplified polymorphic sequences*) тип маркеров, позволяющий выявить рестрикционные полиморфизмы известной амплифицированной области, чаще всего однонуклеотидные замены, небольшие (1-3 нуклеотида) вставки или делеции.

Маркеры для выявления участков генов могут быть доминантными и кодоминантными. Доминантные позволяют выявить один из полиморфизмов, кодоминантные позволяют увидеть два различных полиморфизма определенного участка (различия аллелей в гибриде). Наиболее удобными в маркер-ассоциированной селекции являются кодоминантные маркеры.

Важными достоинствами МАС являются:

- возможность их применения на любой стадии онтогенеза организма, что позволяет предсказать проявление признака независимо от стадии развития (не дожидаясь времени его реального фенотипического проявления);

- анализ большого количества образцов за счет возможности ДНК-маркирования на ранних этапах развития, что сокращает затраты на проведение масштабных исследований взрослых растений, животных;

- высокая эффективность отбора гомозиготных форм, что сложно сделать по фенотипической оценке;

- сокращение селекционного процесса за счет ускорения отбора интересующих форм.

7. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Сущность и задачи генетической инженерии

К началу 70-х годов XX века стали известны основные фундаментальные генетические процессы, протекающие в клетках. Удалось установить принципы репликации, рекомбинации, трансляции и репарации генетического аппарата. Было выявлено, что генетическая информация передается от ДНК к РНК и далее к белку, идентифицирована информационная РНК, расшифрован генетический код, а также выявлены ферменты, для которых нуклеиновые кислоты являются субстратом, открыты явления трансдукции, трансформации и конъюгации у бактерий, изучены некоторые вирусы и плазмиды.

По определению академика А. А. Баева, генетическая инженерия – это наука об изменении генетической программы клеток. Используя методы генетической инженерии, возможно направленное конструирование новых организмов с заданными наследственными признаками.

Генетическая инженерия наука совсем молодая. Формальной датой ее рождения считают 1972 г., когда американский ученый профессор Берг с сотрудниками создали первую гибридную молекулу ДНК.

Традиционные методы селекции растений и метод слияния протопластов так же используются для манипулирования генетическим материалом растений с целью получения

нужных комбинаций наследственных признаков. Однако обоим методам не хватает точности переноса конкретных генов.

Генетическая инженерия способна осуществлять контролируемые биологические манипуляции, связанные с отдельными генами или одним геном с целью создания новых генотипов.

Для введения индивидуальных генов в уже имеющиеся ценные генотипы или сорта необходимо, во-первых, получать определенные гены в чистом виде и в достаточном количестве и, во-вторых, научиться встраивать гены в хромосомы растений. Эти манипуляции способна выполнить генетическая инженерия.

Главная задача, которую призвана решать генетическая инженерия, – это направленное конструирование новых живых организмов с заданными наследственными признаками и свойствами.

Генетическая инженерия включает два основных раздела: геновая инженерия и генетическая трансформация.

Геновая инженерия имеет отношение только к отдельному гену или генам и выполняет следующие методические приемы или манипуляции:

- 1) синтез или выделение генов;
- 2) создание рекомбинантных ДНК или векторов;
- 3) клонирование рекомбинантных молекул;
- 4) создание банков генов.

Генетическая трансформация – это перенос ДНК неполовым путем от клеток донора клеткам реципиента, в результате чего реципиентные клетки приобретают новые наследственные свойства и признаки. При этом выполняются следующие манипуляции:

- 1) введение генов в реципиент;
- 2) отбор и анализ трансформантов;
- 3) создание трансгенных организмов, т. е. организмов, несущих чужеродные гены.

Ферменты генетической инженерии

В качестве «инструмента» для манипуляций с ДНК широко используются белковые молекулы – ферменты.

Рестрикционные эндонуклеазы, или *рестриктазы*, являются своеобразными молекулярными ножницами, без которых сейчас нельзя обойтись ни в одном генно-инженерном эксперименте. Еще в 1953 году было обнаружено, что бактерии способны разрушать чужеродную ДНК, проникающую в клетки. Как выяснилось, гидролиз чужеродной ДНК осуществляют специфические ферменты – эндонуклеазы, которые связываются с чужеродной ДНК в определенных участках – сайтах узнавания и расщепляют (рестриктируют) её на фрагменты. Эти ферменты назвали рестриктазами.

Прежде чем «разрезать» ДНК, фермент находит определенное сочетание нуклеотидов, специфическое для узнавания только данного фермента. Собственную ДНК рестриктазы, как правило, не разрушают, потому что она определенным образом защищена. Защита осуществляется с помощью другого фермента – метилазы. Сайты узнавания, содержащие метилированные основания, не узнаются соответствующими собственными рестриктазами и ДНК не разрушается, но любая чужеродная ДНК будет активно рестриктироваться.

Первая рестриктаза, обладающая высокой рестрикционной специфичностью, была выделена в 1970 году из бактерий. Сейчас системы рестрикции и модификации найдены у всех бактерий, а также дрожжей. Поскольку бактерии по-разному метят свою ДНК, то и рестриктазы способны узнавать разные последовательности. Известно более 200 различных рестрикционных эндонуклеаз. Для их обозначения предложена определенная система знаков. Название каждой рестриктазы складывается из первой буквы рода бактерий и двух первых букв вида, из которого выделен фермент. Например, рестриктаза, выделенная из

сенной палочки *Bacillus subtilis*, обозначается как *Bsu*, а кишечной палочки *Escherichia coli*, – *Eco*.

Рестриктазы разрезают ДНК в сайтах узнавания, имеющих длину 4, 6 и до 20 нуклеотидов, на фрагменты определенной длины со специфическими последовательностями нуклеотидов на концах.

Многие рестриктазы расщепляют нити ДНК в смещенных относительно друг друга местах. В результате возникают фрагменты ДНК с короткими (4–6 нуклеотидов) одноцепочечными участками на концах. Некоторые рестриктазы режут обе цепи ДНК в одном месте, образуя фрагменты одинаковой длины без выступов. В первом случае полученные хвосты называют липкими концами, а во втором – тупыми. Это важно, поскольку технология создания рекомбинантных ДНК зависит от типа образующихся при рестрикции фрагментов ДНК.

ДНК-лигазы состоят из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 68–74 тысяч дальтон. Они также осуществляют важную реакцию на ДНК – «зашивают» разрывы в нитях ДНК, которые образуются в результате многих естественных генетических процессов (репликации, рекомбинации, репарации и т.п.), происходящих в клетке. Фермент осуществляет соединение цепей ДНК путем образования фосфодиэфирных связей между соседними 3'-ОН и 5'-фосфатными концами ДНК. Для осуществления этой реакции требуются затраты энергии в виде АТФ. В генной инженерии ДНК-лигазы используются в основном для сшивания рестриктов как с липкими, так и тупыми концами.

Обратная транскриптаза, или точнее РНК зависима ДНК-полимераза, – фермент, играющий важную роль в передаче наследственной информации и сейчас широко используемый в молекулярно-генетических исследованиях. Известно, что генетическая информация реализуется в признак или свойство организма через транскрипцию ДНК в иРНК и затем через трансляцию на рибосомах – в белки (ДНК > РНК > белок). Однако в 1970 году Темин и Балтимор на РНК-содержащих вирусах показали, что генетическая информация может передаваться и в обратном направлении, т.е. от РНК к ДНК. Оказалось, что такой путь считывания информации осуществляется с помощью особых ферментов – *обратных транскриптаз*, или *ревертаз*. Фермент ревертаза выделяется из вируса миелобластома птиц. В генно-инженерных работах ревертаза используется для синтеза комплементарной ДНК (кДНК), необходимой для клонирования и получения копий генов.

Методы выделения генов

Конечной целью генной инженерии является получение нужного гена, который можно было бы ввести в клетки и таким образом предать бактерии, растению или животному новый наследственный признак или свойство.

Имеется несколько путей получения генов:

1. **Химический синтез генов** – впервые синтез гена химическим путем был осуществлен американским ученым Кораной в 1969 году. Он синтезировал ген транспортной РНК дрожжей, состоящей из 77 нуклеотидов. Метод заключается в том, что сначала химическим путем синтезировали мелкие фрагменты ДНК, а затем их соединили с помощью фермента лигазы. Этот путь создания генов довольно сложен, к тому же надо знать заранее точную нуклеотидную последовательность.

2. **Ферментативный синтез генов** – благодаря открытию явления транскрипции ДНК с РНК с помощью фермента обратной транскриптазы появилась возможность ферментативного синтеза любых индивидуальных генов при наличии матричной РНК этого гена.

3. **Непосредственное выделение генов из живых организмов** – метод заключается в том, что в начале ДНК дробят на многочисленные фрагменты используя рестриктазы и затем при помощи лигаз сшивают отдельные гены с ДНК какой либо плазмиды, предварительно разрезанной той же рестриктазой. Таким образом создается банк генов. В этом банке генов может быть представлена вся генетическая информация исходного организма.

Векторы генетической инженерии и их использование

Векторы являются основным орудием генно-инженерных работ. Это молекулы ДНК, способные переносить, размножать и хранить генетическую информацию. Вектор (от англ. «повозка») своего рода транспортное средство для перетаскивания чужеродной ДНК в реципиентные клетки.

Исходя из предназначения векторы должны иметь ряд специальных свойств:

1. Обладать способностью автономно размножаться в клетках реципиента. В этом случае обеспечивается клонирование генов.

2. Легко отличаться от ДНК реципиента, т. е. иметь селективный маркер, чтобы трансгенные организмы можно было легко выявлять.

3. Обеспечивать работу чужеродного гена. Встроенная чужеродная ДНК должна реплицироваться и клонироваться так, как будто она является обычным компонентом вектора.

4. Быть небольшого размера и иметь минимальное количество участков узнавания для ферментов рестриктаз.

5. Хорошо переноситься в тот организм, который мы желаем изменить.

В природе наиболее подходящими кандидатами на роль векторов могут быть небольшие по размерам молекулы ДНК: плазмид, вирусов, митохондрий и хлоропластов.

Непосредственно в качестве векторов их практически не используют. Для того чтобы они отвечали указанным выше требованиям, их перестраивают. При этом векторы конструируют, для каких-то конкретных целей. Есть, например, векторы, которые служат для размножения рекомбинантной ДНК, а есть векторы для переноса ДНК в хромосому хозяина.

В настоящее время существует много сконструированных векторов на основе плазмид. Они были открыты в 1952 г. американским генетиком и биохимиком Д.Ледербергом. *Плазмиды* представляют собой молекулы ДНК, насчитывающие 2250–400000 пар нуклеотидов. Они существуют в бактериальной клетке обособленно от хромосомы в количестве от одной до нескольких десятков копий. Плазмиды имеют двухнитевую кольцеобразную структуру молекул ДНК, но они значительно мельче хромосом бактериальной клетки. Количество ДНК в плаزمиде в 20–100 раз меньше, чем в бактериальной хромосоме. Плазмиды обладают способностью к удвоению, причем это удвоение осуществляется независимо от бактериальной хромосомы. Плазмиды обычно придают бактериям новые свойства. Определяют такой признак бактериальной клетки, как устойчивость к лекарственным веществам, например, антибиотикам. Важной особенностью плазмид является способность их переходить из одной бактериальной клетки в другую.

Если в плазмиду ввести тот или иной фрагмент ДНК, то он будет реплицироваться вместе с плазмидой. Благодаря этому можно размножать любой интересующий ген.

Векторы на основе агробактериальных плазмид.

В конце 70-х годов было показано, что у высших организмов, в частности у растений, генетическая трансформация может происходить в естественных условиях. Оказалось, что некоторые опухоли двудольных растений, так называемые корончатые галлы представляют собой не что иное, как результат генетической трансформации растительных клеток, которую вызывает бактерия *Agrobacterium tumefaciens*.

Установлено, что генетическая трансформация клеток растений обусловлена плазмидой *Ti* (от англ. *tumor inducing* – индуцирующая опухоль), обитающей в клетках агробактерий (рис. 4).



Рисунок 4 – Структура Ti-плазмиды

Плаزمида *Ti* – это крупная кольцевая молекула ДНК. Характерной ее особенностью является наличие участка Т-ДНК (трансформирующая ДНК), составляющего 6–10 % всего генома плазмиды (рис. 5). Эта область плазмиды и является инфекционной. Именно Т-ДНК переносится в клетки растений и встраивается в растительный геном, и гены, заключенные в ней, заставляют клетку синтезировать не свойственные ей белки.

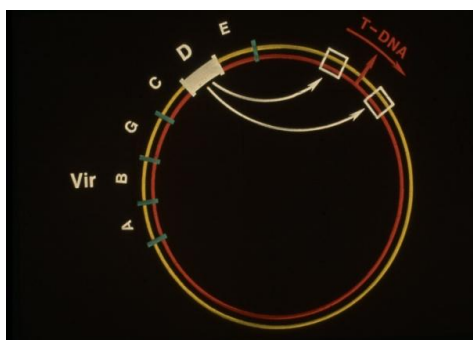


Рисунок 5 – Вырезание Т-ДНК

Кроме *A. tumefaciens* еще один вид агробактерий – *A. rhizogenes*, вызывающий у двудольных растений обильное корнеобразование, заболевание «бородатый корень». Бактерия содержит *Ri*-плазмиду, которая по аналогии с *A. tumefaciens* встраивает свою Т-ДНК в геном клетки растения, т. е. также способна осуществлять генетическую трансформацию.

Генетическая трансформация с помощью агробактерий применяется пока только для двудольных растений и может осуществляться четырьмя способами:

1. *Инфекция целых растений* – включает предварительное поранение ткани – обычно листа или стебля. Для инфекции суспензию культуры бактерии наносят на раневую поверхность. При этом методе индукцию трансформации можно выявить по образующимся наростам (корончатым галлам). Этот метод наиболее часто применяется на каланхоэ, табаке, подсолнечнике, горохе.

2. *Инокуляция тканевых эксплантов in vitro* – экспланты в стерильных условиях культивируются с суспензией агробактерий. Затем экспланты переносят на питательную среду, содержащую антибиотики, для удаления бактерий.

3. *Метод кокультивации* (поглощения) – в питательную среду, содержащую растущие протопласты, вносят суспензию клеток *A. tumefaciens* и культивируют в течение 36–48 часов (рис 6). В это время бактериальные клетки связываются с растительными клетками и происходит процесс переноса и интеграции одной или нескольких копий Т-ДНК в геном растения. Последующим отмыванием и обработкой протопластов антибиотиком они освобождаются от бактерий. Клетки выращивают до образования микроколоний, которые затем переносят на селективную питательную среду, содержащую, например, канамицин, устойчивые растения к которому хотят получить. Из антибиотикоустойчивых каллусов можно затем вырастить целые растения.

4. *Метод трансформации листовых дисков* – заключается в том, что из стерилизованных листьев вырезаются диски, которые инокулируют агробактериями, содержащими векторную плазмиду с геном, например, канамициноустойчивости. Для этого диски помещают в чашки, содержащие питательную среду, которая стимулирует регенерацию побегов из клеток листьев. Через два дня культивирования экспланты переносят на ту же питательную среду, содержащую антибиотики, чтобы освободиться от бактерий, и канамицин, чтобы отобрать трансформированные клетки. Через 2–3 недели можно наблюдать образование побегов по краю листовых дисков. Метод трансформации листовых дисков успешно применяется для таких растений, как табак, петуния, томат, картофель.

В состав векторов для трансформации растений, помимо функционального гена, входит ген селективного маркера. Это обычно ген, кодирующий устойчивость к антибиотикам (канамицину *npt II* или гигромицину *npt II*). Оценку трансгенных растений проводят на питательной среде с антибиотиком. На такой среде регенерируют растения, в геноме которых присутствует ген селективного маркера.

Для полного доказательства присутствия в геноме Т-ДНК проводят анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

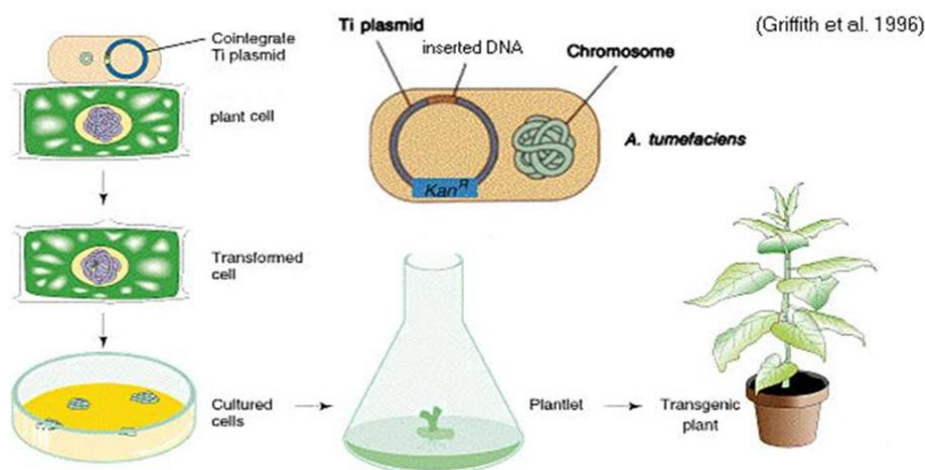


Рисунок 6 – Использование агробактерий в трансгенезе растений

Методы прямого переноса генов

Метод инъекций ДНК в клетки и растения – этот метод позволяет вводить чужеродный генетический материал непосредственно в клетки без помощи агробактерии. Метод заключается в том, что на определенной стадии развития растения шприцом в ткань вводится чужеродный генетический материал, образующиеся затем семена анализируют по селективируемому признаку. Так, например, при получении трансгенных растений ржи плазмидную ДНК (100 мкг/мл) инъецировали иглой в стебель над развивающимся колосом за 2 недели до начала мейоза в генеративных клетках. Обработанные растения выращивали до цветения, переопыляли между собой, завязавшиеся семена анализировали на селективируемый признак.

Разновидность метода инъекций в клетки и растения является метод микроинъекций клеток. Разработан для животных. Впервые применен на растениях украинским исследователем Глебой в 1985 г. для введения векторных плазмид в протопласты табака. Для микроинъекции клеток растений требуется специальное оборудование. Этот метод универсален, так как в качестве реципиента могут быть использованы как единичные культивируемые клетки, так и клетки пыльцы, эмбриоидов и соматических тканей.

Метод электропорации (электрошока) клеток впервые был разработан для клеток животных и заключается в том, что через смесь протопластов и векторной ДНК пропускают короткие импульсы тока высокого напряжения. В момент прохождения тока в мембране про-

топластов образуются отверстия (поры), через которые молекулы ДНК успевают проникнуть внутрь клеток. Для целых клеток этот метод не эффективен, поскольку оболочки растительных клеток очень толстые.

В ряде случаев с целью защиты генетического материала от разрушения нуклеазами используется **метод упаковки ДНК в липосомы**. Липосомы – это сферические образования, оболочки которых состоят из фосфолипидов. С помощью липосом в протопласты растений были введены РНК вируса табачной мозаики, ДНК *Ti*-плазмиды и даже целые метафазные хромосомы.

В настоящее время разработан совершенно новый метод генетической трансформации, получивший название **биологической баллистики** или **метод обстрела тканей микрочастицами (бомбардировки)**. Это самый эффективный метод трансформации, который может использоваться для любых тканей и различных растений, способных к регенерации. Он особенно ценен тем, что позволяет осуществлять трансформацию однодольных растений. Метод обстрела тканей микрочастицами впервые применил Сэнфорд в 1987 году. С тех пор было создано несколько вариантов прибора, различающихся в основном используемым источником энергии для ускорения микрочастиц: электричество, газ, пороховой заряд. Налажено производство прибора в форме переносного пистолета, который можно применять также и в полевых экспериментах. Однако мощность его гораздо ниже.

Принципиальная схема работы таких установок заключается в следующем. Сначала готовится ДНК для переноса и микроноситель. ДНК осаждается на микрочастицы вольфрама или золота размером от 0,6 до 1,6 мкм в зависимости от типа обстреливаемой ткани. Для лучшего осаждения ДНК на микрочастицах используют специальные добавки, например, спирмидин. Затем приготовленные частицы накапывают на целлофановые подложки, высушивают и помещают в канал пушки. Одновременно готовят материал (каллус, суспензия клеток, листовые диски и т. п.), в который будет переноситься чужеродная ДНК. Стерильные клетки или ткани помещают в чашки Петри и тоже вставляют в камеру пушки для обстрела. Из камеры отсасывают воздух, снижая давление до 0,1 атм. Затем осуществляют выстрел, в результате которого микрочастицы с нанесенной ДНК разгоняются и проникают в клетки. Во время прохождения микрочастиц через клетки ДНК отделяется и может застревать в цитоплазме и ядре. Попавшая в ядро плазмидная ДНК сохраняет биологическую активность, и взаимодействует с ДНК растительной клетки. В таких клетках и осуществляется генетическая трансформация. Обстрелянные ткани и клетки переносят на селективную среду, на которой происходят отбор и регенерация трансформантов.

Эффективность трансформации этим методом довольно высокая, а главное, она применима для любых типов тканей и видов растений. С ее помощью получены трансгенные растения пшеницы, кукурузы, ячменя и др.

Методология генетической инженерии в растениеводстве

В настоящее время благодаря хорошо разработанной методологии создания трансгенных растений может быть успешно трансформирован практически любой вид растения. Первые коммерческие сорта на основе трансгенных растений были созданы в 1994 году американской фирмой Монсанто. Это картофель, устойчивый к колорадскому жуку (*New Leaf*), хлопок, устойчивый к насекомым и вирусным болезням (*Bollgard*), кукуруза, толерантная к гербициду глифосату и кукурузной мухе (*Yield Card*), и др.

К началу 21 века в различных лабораториях мира созданы, проходят испытания или уже внедряются в производство трансгенные растения самого разнообразного назначения: для использования в сельском хозяйстве, медицине, фармакологии и парфюмерии, охране окружающей среды и др. Создание генетически модифицированных форм *сельскохозяйственных растений* можно сгруппировать в 3 основных направления:

1) улучшение признаков, связанных с устойчивостью растений к насекомым, вирусным и грибным болезням, толерантностью к гербицидам;

2) улучшение признаков, связанных с урожайностью и качеством продукции растениеводства (содержание питательных веществ, хлебопекарные качества и др.), а также с синтезом вторичных метаболитов, включая вещества для фармакологии, медицины и некоторых отраслей промышленности;

3) повышение устойчивости к засолению, тяжелым металлам, засухо- и холодостойкости, улучшение морфологических признаков растения, развития плодов, цветения, высоты растений и др.

В связи с развитием индустриальных технологий стала очень актуальной проблема разработки методов, позволяющих вести хозяйство в условиях высокого техногенного загрязнения окружающей среды. Особенно быстрыми темпами идет накопление в почве пестицидов, тяжелых металлов, радионуклидов, нефтепродуктов и других веществ, вредных для живых организмов. Генно-инженерные подходы позволяют создавать образцы сельскохозяйственных растений, более приспособленные к условиям внешней среды – засухе, засолению почвы, заморозкам и другим неблагоприятным факторам. Тем самым более эффективно используются экстремальные условия и территории для получения высоких урожаев, а сам факт выращивания растений на таких территориях способствует улучшению экологической обстановки. Создание и выращивание сортов, устойчивых к насекомым, болезням, значительно снижают объемы внесения пестицидов на поля, благодаря чему резко снижается загрязненность посевных площадей химическими веществами.

8. БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Использование микроорганизмов для получения биологически активных соединений

По сравнению с химической технологией биотехнология имеет возможность получения специфичных и уникальных природных веществ, в том числе с помощью микроорганизмов. Микроорганизмы имеют значительно более высокие скорости роста и накопления клеточной массы, чем другие организмы. Например, с помощью микроорганизмов в ферментере объемом 300 м³ за сутки можно выработать 1 т белка (365 т/год). Чтобы такое же количество белка в год выработать с помощью крупного рогатого скота, нужно иметь стадо 30 000 голов. Если же использовать для получения такой скорости производства белка бобовые растения, например, горох, то потребуется поле площадью 5400 га.

В качестве сырья для микробиологического синтеза можно использовать отходы сельского хозяйства и промышленности; эти процессы по сравнению с химическими обычно более экологичны, технология и аппаратура более просты и дешевы.

Для осуществления любого микробиологического синтеза необходимы культуры клеток, питательная среда, аппаратура для выращивания и проведения вспомогательных операций, средства контроля и управления. На стадии культивирования осуществляется накопление, как самой биомассы, так и продуктов метаболизма клеток. Необходимые полезные свойства целевых продуктов (клеток или продуктов метаболизма) создаются, главным образом, на стадии культивирования. Основная задача на последующих стадиях состоит в том, чтобы при выделении, сушке и других операциях максимально сохранить и стабилизировать эти полезные свойства.

Культивирование микроорганизмов осуществляется следующими основными способами: в стерильных или нестерильных условиях, аэробно или анаэробно, периодическим или непрерывным путем, глубинным, в том числе объемнодоливным, или поверхностным (жидкофазным и твердофазным). В основном процесс культивирования осуществляют в стерильных условиях, однако есть примеры нестерильного протекания процесса, и это экономически более выгодно.

Использование микробных почвоудобрительных препаратов

В зависимости от того, какие виды микроорганизмов преобладают в почве, она будет менее или более плодородной. Чем больше на участке будет полезных микроорганизмов, тем почва будет здоровее, плодороднее.

Давно известно, что растения в качестве азотного питания используют селитру. Ученые-микробиологи установили, что селитра в почве образуется при помощи бактерий – нитрификаторов. Где нет этих бактерий, там нет и азота для питания растений. В традиционном земледелии недостаток азота восполняют внесением селитры или других азотных удобрений. Биотехнология предлагает другой способ, при помощи которого особые микробы – азотобактеры обогащают почву азотом из воздуха. Воздух – это смесь в основном двух газов: азота и кислорода, причем азота в четыре раза больше. Есть воздух и в почве, а в нем азот, который способны усваивать бактерии. Кроме азота растениям требуются и фосфор, и калий и многие другие микро-макроэлементы. Все их без особого труда способны произвести из органических остатков агрономически полезные микроорганизмы. Чтобы заселить почву такими видами микроорганизмов и создаются микробные препараты нового поколения. Основное внимание уделяется препаратам, содержащим не один вид активно действующей микрофлоры, а комплексным микробиологическим препаратам. Это направление в науке получило название ЭМ-биотехнология т.е. технология эффективных микроорганизмов.

Комплексные микробиологические препараты выполняют следующие действия: повышают содержание агрономически полезных микроорганизмов в почве; оздоравливают почву, так как сдерживают рост фитопатогенов, увеличивая число микробов-антагонистов; улучшают структуру почвы; способствуют улучшению минерального питания растений; выделяют биологически-активные вещества и стимулируют рост растений, повышают иммунитет растений и урожайность; улучшают качество плодов.

Однако следует помнить, что все микробные препараты содержат живые организмы и необходимо очень четко соблюдать условия их применения. Внесение препаратов в почву или распыление по растениям следует проводить утром или после дождя, но ни в коем случае не в солнечную погоду, так как солнечные лучи губительно действуют на микроорганизмы и могут снизить эффективность препаратов.

На развитие микроорганизмов влияет и температура, поэтому вносить препарат в почву желательно в теплую погоду. Опрыскивание растений должно быть мелкодисперсным, так как крупные капли легко скатываются с поверхности листьев. Эффективность любых микробных препаратов увеличивается при одновременном использовании органических удобрений и соблюдении севооборотов.

Использование микробиологических препаратов при клональном микроразмножении растений

Конструирование высокопродуктивных и устойчивых агроценозов предполагает максимальное использование полезных взаимодействий растения с микроорганизмами. Наиболее целесообразно инокулировать культурные растения на ранних этапах развития, что позволит уменьшить объем инокулята и добиться максимальной пользы при небольших затратах. Наиболее частыми объектами инокуляции являются семена или молодые растения при их пересадке в грунт. Первый вариант достаточно изучен. Большой интерес представляет инокуляция полезной микрофлорой микрорастений после клонального размножения в стерильных условиях. Такая инокуляция может улучшить корневое питание растений, обеспечить их экзогенными регуляторами роста (ауксины, гиббереллины), а также защитить от вредной микрофлоры. На кафедре сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии БГСХА накоплен положительный опыт использования ряда микробиологических препаратов ВНИИ микробиологии (флавобактерин, мизорин, БАГ, экстрасол), Института микробиологии НАН Беларуси (ризобактерин), Института генетики и цитологии НАН Беларуси

(ризофил), Института почвоведения и агрохимии НАН Беларуси (азотобактерин) при клональном микроразмножении картофеля. Инокуляция производилась при пересадке микрорастений в грунт или путем добавления препаратов в субстрат при выращивании рассады кассетным способом. Наибольший эффект на приживаемость, рост и продуктивность выявлен при использовании азотобактерина.

Многие сельскохозяйственные растения обычно колонизированы везикулярно-арбускулярными микоризными грибами, за исключением растений отдельных семейств, например, *Chenopodiaceae*, *Cruciferae*. Девизами Европейского Банка по изучению микоризных грибов (*European Bank of Glomales*) являются следующие весьма красноречивые фразы: «Изучение растений без их микориз является изучением артефактов», «Большинство растений, строго говоря, не имеют корней, они имеют микоризы». Некоторые растения не развиваются без грибов (орхидеи), а у ряда древесных и травянистых растений улучшается рост и развитие в симбиозе с грибами. Роль микоризы в жизнедеятельности культурных растений весьма велика. Микориза улучшает минеральное питание растения-хозяина, в частности поступление фосфора, цинка и меди в особенности на бедных почвах. Кроме того, корни соседних растений, связанные общим мицелием, в некоторой степени обеспечивают обмен элементами минерального питания. Наличие микоризы повышает устойчивость растений к засухе, засолению, тяжелым металлам, а также корневым патогенам. Однако практическое использование симбиотических эффектов растений с микоризами затруднено в связи со сложностью их культивирования.

В настоящее время накоплена информация о микоризации ряда растений при микроклональном размножении (ананас, банан, земляника, слива, яблоня). По данным М. Вестберга и др. (1996), микоризация растений земляники грибами из рода *Glomus* обеспечила лучший рост и повысила урожайность ягод на 38-92 %. А. Трувела и др. (1996) установили, что микориза обеспечивает защиту ананаса от нематод, сопоставимую с применением фунгицидов. Инокуляция подвоев яблони грибом *Glomus intrarodices* приводила к лучшему росту растения и снижению соотношения корень/стебель. Лучшим способом инокуляции микрорастений является использование спор или микоризованных корней. В настоящее время имеются коммерческие препараты микоризных грибов для инокуляции растений, размноженных традиционным путем и в культуре *in vitro*.

Аэробная переработка отходов

При очистке сточных вод прежде всего из них удаляются макрозагрязнения: бумага, куски дерева, обрывки ткани. Механическую очистку осуществляют на решетках, в отстойниках, центрифугах, флотаторах и на фильтрах. Тяжелые частицы песка осаждаются в пескоуловителе. Лишь после этого более легкие взвешенные частицы концентрируются на дне отстойника в илоуловителе. Далее сточные воды поступают в аэротенк (аэрируемый резервуар), где поддерживаются идеальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов. В аэротенке бактерии, дрожжи и грибы образуют с веществами сточных вод большие хлопья («активный ил»), которые не распадаются благодаря слизи, выделяемой бактериями. Основная проблема этого биопроцесса связана со снабжением микроорганизмов кислородом. На расщепление 1 г сахара микроорганизмы расходуют более 1 г кислорода, а растворимость кислорода в воде при нормальной температуре составляет всего лишь 9 мг/дм³. Поэтому очень скоро после начала микробиологического процесса весь содержащийся кислород будет полностью израсходован микроорганизмами. Поэтому сточные воды в аэротенке должны постоянно перемешиваться и обогащаться кислородом. Для обеспечения аэрации сточных вод аэротенк снабжен вращающимися щетками, лопастями, а также трубой, через которую в воду нагнетается воздух. Воздух постоянно «завихряет» хлопья активного ила, благодаря чему они не достигают слишком больших размеров, остаются взвешенными и хорошо обеспечиваются кислородом. Микроорганизмы поглощают вещества сточных вод, разлагают их в процессе дыхания и при этом размножаются. Часть микробных хлопьев затем осаждаются во

вторичных отстойниках в виде ила. Меньшую часть возвращают в аэротенк для того, чтобы иметь достаточное количество микроорганизмов для окисления вновь поступающих сточных вод. Весь осадок, собранный из первичного и вторичного отстойников, разлагается в септиках или метантенках (сооружения для сбраживания с помощью микроорганизмов осадка сточных вод) метанбактериями до образования биогаза (метана). Этот газ может быть очень рационально использован путем сжигания для получения тепла. Остаточный «переброженный» ил высушивают и нередко применяют в качестве удобрения.

Резервуары очистных сооружений занимают большую площадь – это условие трудно выполнить в промышленных районах. Поэтому для очистки сточных вод были разработаны «малогабаритные» башенные биореакторы высотой около 15–20 м. При очистке сточных вод микроорганизмы проделывают особенно трудную работу. Потребляя кислород в процессе дыхания, они с его помощью разлагают содержащиеся в сточных водах сахара, жиры, белки до углекислого газа и воды и на этой основе растут и строят свои новые клетки. Очистные установки предоставляют микроорганизмам наилучшие условия для развития, размножения и для деструктивной деятельности. Это гигантские «биофабрики», и их «биопродуктом» является чистая вода.

Анаэробная переработка отходов.

Компостирование и анаэробная переработка органических отходов таких, как пищевые отходы, отходы, образующиеся в садах (дворах) и парках, отстой сточных вод, является характерной практикой. Преимущества биологической обработки включают: уменьшение объема отходного материала, стабилизацию отходов, уничтожение патогенных микроорганизмов в отходном материале и выработку биогаза для дальнейшего использования энергии. Образующиеся при биологической обработке конечные продукты могут, в зависимости от их качества, быть переработаны, либо как органическое удобрение и почвоулучшитель. Анаэробная обработка зачастую связана с рекуперацией метана (CH_4) и сжиганием с целью получения энергии.

Компостирование является анаэробным процессом, при котором большая часть способного к разложению органического углерода в отходном материале преобразована в диоксид углерода (CO_2). CH_4 образуется в анаэробных участках компоста, однако в большинстве случаев метан окисляется в тех же участках компоста. Подвергшиеся оценке попадающие в атмосферу выбросы CH_4 лежат в диапазоне от менее одного процента до нескольких процентов общего содержания углерода в материале. При компостировании также могут образовываться выбросы N_2O . Диапазон оцениваемых выбросов варьируется в пределах от менее 0,5 процентов до 5 процентов общего содержания азота в материале. В плохо разлагающемся компосте более вероятно образование, как CH_4 , так и N_2O .

Анаэробное сбраживание органических отходов ускоряет естественное разложение органического материала без участия кислорода с помощью сохранения показателей температуры, содержания влаги и уровня pH, близких к их оптимальным значениям. Образовавшийся в результате обработки отходов CH_4 может быть использован для производства тепловой и/или электрической энергии. Выбросы N_2O , образующиеся в данном процессе, являются незначительными.

Биодеградация ксенобиотиков в окружающей среде.

Биодеградация органических соединений, загрязняющих окружающую среду, оправдана только в том случае, если в результате происходит их полная минерализация, разрушение и детоксикация; если же биохимическая модификация этих соединений приводит к повышению их токсичности или увеличивает время нахождения в среде, она становится не только нецелесообразной, но даже вредной. Детоксикация загрязняющих среду веществ может быть достигнута путем всего одной модификации структуры. Судьба ксенобиотика зависит от ряда сложным образом взаимосвязанных факторов как внутреннего характера (устой-

чивость ксенобиотика к различным воздействиям, растворимость его в воде, размер и заряд молекулы, летучесть), так и внешнего (рН, фотоокисление, выветривание). Все эти факторы будут определять скорость и глубину его превращения. Скорость биodeградации ксенобиотика определенным сообществом микроорганизмов зависит от его способности проникать в клетки, а также от структурного сходства этого синтетического продукта и природного соединения, который подвергается естественной биodeградации. В удалении ксенобиотиков из окружающей среды важную роль играют различные механизмы метаболизма.

Ксенобиотики подвергаются действию смешанных популяций микроорганизмов, т. е. сообществ, для которых характерны отношения кооперации, комменсализма и взаимопомощи.

Можно выделить стабильные сообщества, в которых взаимодействия между отдельными его членами дает им ряд преимуществ, в результате чего такая ассоциация становится более эффективной, чем отдельно взятые виды.

Крайне важная роль микробных сообществ в деградации ксенобиотиков состоит в том, что они способны осуществлять совместную «метаболическую атаку» на субстрат. Отдельные члены такого сообщества в отличие от сообщества в целом не обладают метаболической активностью, необходимой для полной деградации данного соединения. Так, в лаборатории иногда не удается добиться минерализации какого-либо вещества, но происходит это потому, что деградацию тщетно пытаются осуществить с помощью одного вида микроорганизмов. Отмечалось также, что такого рода комбинированная метаболическая система может возникать в результате синтеза отдельными видами разных компонентов ферментного комплекса, с проявлением ферментативной активности только у целого сообщества.

Энергия и биотехнология.

Наряду с прямым сжиганием древесины, соломы, навоза и других отходов животноводства, биотехнология позволяет получать более удобные для использования виды энергии различными способами.

Биоэнергетика – это наука, которая изучает механизмы преобразования энергии в процессах жизнедеятельности организмов, наука о путях и механизмах трансформации энергии в биологических системах.

Переработка органических отходов в биогаз с рециклизацией богатых биогенами отходов этого производства может значительно увеличить энергоресурсы, ослабив антропогенное воздействие на окружающую среду.

Запасы энергии в растительном покрове Земли, создаваемой с помощью фотосинтеза, сопоставимы с запасами энергии природных ископаемых. Обычно сухую биомассу превращают в энергию в процессе сгорания, тогда как наиболее эффективный способ превращения сырой биомассы с помощью микроорганизмов в энергию – получение углеводов – биогаза (метана).

Метановое брожение было открыто еще в конце XVIII в. Это сложный процесс, в котором участвует несколько видов микроорганизмов (*Methanobacterium formicicum* и *M. hungati*). Биогаз, образующийся в результате такого брожения, представляет собой смесь, главные компоненты которой метан (65%), углекислый газ (30%) и сероводород (1%).

Для получения биогаза используют смеси органических веществ (навоз, солому, помет, водоросли, целлюлозную биомассу), что требует для метанообразования многокомпонентных микробных ассоциаций. Метан важен не только для производства биоэнергии. Его получение – эффективный способ утилизации отходов сельского хозяйства.

Экологически чистое топливо – этанол. В последние годы его начинают использовать в двигателях внутреннего сгорания. Наиболее пригодны для производства этанола злаки (особенно кукуруза), картофель, маниок, земляная груша, сахарная свекла, сахарный тростник. У двух последних основной запасной углеводов – сахароза, у остальных – крахмал. Сахарозу и крахмал обычно сбраживают с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В по-

следнее время спектр используемых для этого микроорганизмов значительно расширился. Обращено, например, внимание на бактерию *Zygotomonas mobilis*, способную сбраживать сок агавы. Она эффективнее перерабатывает сахара и устойчивее к этанолу (конечному продукту), чем дрожжи. В настоящее время ведутся работы по генно-инженерному изменению этой бактерии с целью расширения круга утилизируемых ею субстратов. Перспективными для биоконверсии полисахаридных субстратов в этанол считаются некоторые термофильные бактерии. Так, *Clostridium thermohydrosulfuricum* утилизирует с очень высоким выходом этанола продукты деградации целлюлозы.

Благодаря поиску микроорганизмов, содержащих углеводороды, которые можно использовать в качестве заменителей нефти, обнаружены некоторые микроводоросли (*Bolhryacoceus*, *Isochrysis* и др.), имеющие эти соединения в количестве от 15 до 80% сухой массы клеток. Наилучший состав углеводородов присущ *B. braunii*, что позволяет использовать ее в качестве источника энергии.

Химический и электрохимический способы получения водорода неэкономичны. Поэтому специалисты обратили внимание на микроорганизмы, способные выделять водород. Еще в начале 60-х годов установили, что хлоропласты шпината в присутствии бактериального экстракта, содержащего фермент гидрогеназу, продуцируют водород. Это способны делать хемотрофные бактерии, цианобактерии, некоторые водоросли и простейшие. Сейчас предложено несколько вариантов биотехнологических систем для производства водорода, однако пока ни одна из них неприемлема для практических целей.

Не одно поколение ученых бьется над проблемой повышения эффективности фотосинтеза у микроорганизмов и растений. Задача эта еще далека от решения. Однако в результате исследований в области биологии фотосинтеза (в частности, выделения и характеристики различных мутантов фотосинтезирующих микроорганизмов) работы вышли на уровень, когда они могут стать основой для решения прикладных задач. Так, некоторые фотосинтезирующие микроорганизмы способны продуцировать аммоний за счет биоконверсии солнечной энергии. Предполагается, что фотосинтезирующие бактерии будут участвовать в очистке промышленных газов, биodeградации токсических веществ и отходов производства.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

2.1. ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

№	Темы лабораторных занятий
	Введение
	Устройство биотехнологической лаборатории
1.	Регуляторы роста и развития растений в биотехнологии и растениеводстве
	Определение различий в способе действия регуляторов роста растений на прорастание семян
2.	Клеточная инженерия
	Методы стерилизации при работе с культурой изолированных клеток и тканей
	Приготовление искусственных питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений
	Культура каллусной ткани
	Получение и культивирование каллусной ткани из различных эксплантов картофеля
	Пассирование каллусной ткани на свежую питательную среду
3.	Применение методов <i>in vitro</i> в селекции растений
	Культура изолированных зародышей (эмбриокультура)
4.	Применение методов <i>in vitro</i> для размножения растений
	Вычленение и культивирование апикальных меристем картофеля
	Микроклональное размножение картофеля черенкованием побегов
	Микроклональное размножение плодовых, ягодных и декоративных растений
5.	Основы генетического анализа
	Изучение методики проведения ДНК-анализа растительного материала
6.	Генетическая инженерия
7.	Биотехнология микроорганизмов
	Получение и культивирование зернового мицелия вешенки обыкновенной

2.2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

Работа 1. УСТРОЙСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

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

Объяснение. Под методом культуры *in vitro* принято понимать выращивание изолированных клеток, отдельных клеточных структур, различных тканей, частей и органов растения в стерильных условиях на искусственной питательной среде. Область применения метода культуры *in vitro* разнообразна, число направлений и проблем, решаемых с его помощью, с каждым годом увеличивается. В связи с этим помещение и особенно оборудование определяются в значительной мере характером исследований и спецификой объектов.

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

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

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

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



Рис. 1. Автоклав



Рис. 2. Сушильный шкаф

Стерильное помещение с ламинарными боксами (ламинарная комната) используется для изоляции и пересадки культур. Его следует располагать как можно дальше от источников заражения, сквозняков, нагревательных устройств и мест с усиленным движением людей. Асептическое помещение должно, по возможности, не иметь наружных стен здания, быть большим (около 15 м²), не иметь окон. В зависимости от объема выполняемых работ в помещении устанавливается несколько ламинарных боксов (рис. 3). Двери, которые ведут в асептическую комнату, должны закрываться герметично. В стерильном боксе не должно быть лишних предметов во избежание заражения изолируемых тканей. Желательно использовать рабочие столы, покрытые гладким, легко стерилизуемым материалом. Пол, потолок, стены и другие поверхности должны быть покрыты материалами, на которые мало садится пыль, и их можно легко мыть и дезинфицировать. В бокс должен поступать стерильный кондиционированный воздух. Для этой цели используют специальные многослойные фильтры. Стерильность воздуха достигается также с помощью бактерицидных ламп.



Рис. 3. Ламинарбокс

В термостатированном помещении (культуральная) с кондиционированным воздухом, строго регулируемой температурой (для большинства культур 25 – 27° С) и относительной влажностью воздуха (70%) на стеллажах и полках размещают изолированные культуры (рис. 4). В этой же комнате можно поместить различные установки для накопительного культиви-

рования клеточных суспензий. Отдельные культуральные помещения необходимы для выращивания культур при искусственном освещении с регулируемой интенсивностью и спектральным составом света. Недопустимо поступление в операционную и культуральную комнаты различных летучих веществ (фенол, формалин).



Рис. 4. Культуральная комната

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

Работа 2. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПРИ РАБОТЕ С КУЛЬТУРОЙ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

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

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

Стерилизация ламинарного бокса. Ламинарные боксы предназначены для выполнения различных работ с культурой изолированных клеток и тканей, требующих стерильности. Стерильность обеспечивается с помощью бактериальных фильтров, установленных в ламинарном боксе, через которые нагнетается воздух. За 2 часа до начала работы ламинарный бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре

размещают спиртовую или газовую горелки, спички, фарфоровый стакан с 96%-ным спиртом, а при вычленении меристем – и бинокулярную лупу. Внутреннюю поверхность ламинара, спиртовку, лупу, пробирки с питательной средой протирают 70%-ным спиртом.

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

Стерилизация посуды. Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов, а также раствора двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпик). Вымытую посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, перед стерилизацией их заворачивают в оберточную бумагу (у стаканов и колб достаточно обернуть только горлышко).

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

Стерилизация инструментов. Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т.д.) заключается в нагревании сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 часов при температуре 140°C. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. Металлические предметы нельзя автоклавировать: под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели, микробиологические петли) еще раз стерилизуют в ламинаре, помещая их в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом и обжигая в пламени горелки. Стерильный инструмент используют только для одной манипуляции. Очень тонкие инструменты (иглы, кусочки лезвий) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

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

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

Диацид готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолртутихлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (около 300 мл), затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента “Твин-80”, хранят в плотно закрытой колбе в темноте. Перед стерилизацией ткань растения предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена – на 1 – 2 мин.) в 70%-ный этиловый спирт. Обработка тканей этанолом повышает эффект основного стерилизующего раствора. Затем растительные объекты многократно ополаскивают стерильной дистиллированной водой.

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

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

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

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

Ход работы. Простерилизовать инструменты, посуду и растворы регуляторов роста, необходимые для проведения работ по введению в культуру *in vitro* зерновок пшеницы или ржи.

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

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

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

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

Приготовить стерилизующий (10%-ный) раствор хлорамина путем добавления к 90 мл дистиллированной воды 10 г хлорамина, после чего на магнитной мешалке тщательно перемешать.

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

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

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

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

Материалы и оборудование: чашки Петри с асептически проросшими семенами, линейки, плотная бумага.

Объяснение. Целью работы является изучение действия регуляторов роста на прорастание семян. В качестве регуляторов роста использовались: абсцизовая кислота (АБК), гибберелловая кислота (ГК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), хлорхолинхлорид (ССС или ТУР).

Природные фитогормоны и синтетические регуляторы роста и развития растений, или фиторегуляторы, являются мощным химическим средством управления онтогенезом растений. Поэтому они широко применяются в биотехнологии и практическом растениеводстве. Фиторегуляторы – важное средство регулирования дифференцировки клеток, клеточных де-

лений, образования новых тканей и органов, темпов роста и развития растений, их продуктивности и качества урожая.

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

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

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

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

Цитокинины открыты в 1955 г. как факторы, стимулирующие деление клеток. Цитокинины синтезируются главным образом в апикальных меристемах корня. Особенно много их обнаруживается в активных меристемах и семенах. Основной физиологический эффект цитокининов заключается в активации клеточных делений, они активируют следующие стадии: работу РНК-полимераз, образование РНК и синтез белков. Цитокинины обладают аттрагирующим действием, которое обуславливает стимулирование роста клеток листьев и семядолей, снятие апикального доминирования, задержку старения листьев и регуляцию передвижения веществ в растении.

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

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

Гиббереллины были открыты (1926) и выделены (1938) в Японии как продуценты патогенного гриба *Gibberella fujicuroi*, вызывающие чрезмерный вегетативный рост риса. В настоящее время известно около 70 представителей гиббереллинов, в том числе 45 выделены из растений.

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

Brassinosterоиды – это гормоны растений стероидной природы. Известно, что малые количества этих фитогормонов содержат ткани цветка, листья и молодые стебли растений.

Максимальная концентрация brassinosterоидов отмечена в пыльце. Brassinosterоиды стимулируют растяжение клеток. Микроколичества brassinosterоидов, попадая с пыльцой в семяпочку, стимулируют ее развитие и образование семян. Большой интерес вызывает обнаруженный эффект стимулирования brassinosterоидами устойчивости растений к стрессам и грибным заболеваниям.

Первый представитель группы brassinosterоидов – brassinolid – был выделен американскими учеными в 1979 году в виде кристаллического вещества в количестве 4 мг из 40 кг собранной пчелами пыльцы рапса (*Brassica napus*). К настоящему времени известно более шестидесяти brassinosterоидов: из каштана (*Castanea sativa*) был выделен кастастерон, из рогоза (*Typha*) – тифастерол, из чая (*Thea*) – теастерон, из катарантуса (*Catharanthus*) – катастерон и т.д. Первым brassinosterоидом, полученным синтетическим путем, стал эпибрасинолид, абсолютно идентичный природному растительному гормону. Высокой биологической активностью из известных в настоящее время brassinosterоидов обладают три представителя этой группы соединений – brassinolid, эпибрасинолид, гомобрасинолид. Характерной особенностью указанных соединений является широкий спектр их действия в малых концентрациях.

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

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

Среди недавно открытых фитогормонов следует назвать *жасминовую и салициловую кислоты*, которые также оказывают влияние на биосинтез гормонов в растениях. Под действием жасминовой кислоты резко увеличивается уровень другого гормона – абсцизовой кислоты. Она также регулирует уровень этилена, стимулируя его биосинтез в молодых растущих тканях и снижая – в старых.

Первое сообщение о гормональном действии салициловой кислоты появилось в 1988 г. когда был установлен эффект повышения температуры пробивающего снег крокуса, контролируемый салициловой кислотой. Известен и ряд других ее эффектов: блокирование биосинтеза этилена на уровне его образования из 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, прерывание восстановления нитратов на уровне NO, индуцирование зацветания короткодневных растений, находящихся в условиях длинного дня.

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

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

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

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

Вариант	X ₁	X ₂	%	Дп	Дк	Ср. Дп	Ср.Дк
Контроль							
ГК							
АБК							
2,4-Д							
ТУР							

Примечание. Здесь X₁ – количество проросших семян, X₂ – общее количество семян, % – всхожесть, Дп – общая длина проростков, Дк – общая длина корней, Ср.Дп – средняя длина проростков, Ср.Дк – средняя длина корней.

Р а б о т а 4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Материалы и оборудование: стаканы химические на 250 мл, мерные пипетки, цилиндры, весы аналитические и ВЛКТ-500, электроплитка, колбы с приготовленными маточными растворами, сахара, агар-агар.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для культивирования клеток, тканей и органов тех или иных растений используют питательные среды различного гормонального состава. Наиболее широко применяются среды Мурасиге-Скуга (табл.2), Уайта (табл.3), Гамборга и Эвелеге (В₅) (табл.4).

Ход работы. Приготовить 100 мл питательной среды Мурасиге-Скуга (МС). Состав питательной среды приведен в таблицах 2 и 5.

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

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

Прежде всего, необходимо приготовить маточные растворы макроэлементов, микроэлементов, хелата железа (раствор FeSO₄ и Na₂ ЭДТА, необходимый для образования хелата железа следует нагреть до кипения). Полученные маточные растворы сливают в емкости с

притертой пробкой (хелат железа – в темной посуде), снабжают этикеткой и хранят в холодильнике при температуре 4°С не больше месяца.

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

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

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

Т а б л и ц а 4 – Среда Гамборга и Эвелеге В₅ (*Gamborg, Eveleigh, 1968*)

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

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

На основе маточных растворов готовят питательную среду МС.

В химический стакан емкостью 250 мл помещают 3 г сахарозы, доливают дистиллированную воду примерно до 30 мл и после растворения сахарозы добавляют 10 мл маточного раствора макроэлементов, 1мл микроэлементов, 1 мл витаминов, 0,5 хелата железа. Доводят в мерном цилиндре объем раствора до 100 мл. Необходимо обязательно измерить pH раствора, который устанавливают на уровне 5,6 – 5,8, используя 0,1н. KOH или 0,1%-ный раствор HCl. В предварительно нагретую питательную среду (60 – 70°С) добавляют 0,7 грамма агар-агара и доводят до кипения, периодически помешивая.

Т а б л и ц а 5 – Состав питательной среды Мурасиге-Скуга

Компоненты среды	Маточный раствор, г/л	Количество маточного раствора для приготовления 1л среды, мл
Макроэлементы, г/л:		100
KNO ₃	19,0	
NH ₄ NO ₃	16,5	
KH ₂ PO ₄	1,7	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7	
CaCl ₂ ·H ₂ O	4,4	
Fe-хелат, г/л:		5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,57	
Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	7,45	
Микроэлементы, мг на 200 мл:		10
H ₃ BO ₃	124,0	
MnSO ₄ ·H ₂ O	312,0	
ZnSO ₄	172,0	
KI	16,6	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	5,0	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,5	
Витамины, мг на 200 мл:		10
Пиридоксин HCl (B ₆)	10,0	
Тиамин - HCl (B ₁)	2,0	
Никотиновая кислота (PP)	10,0	

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

Р а б о т а 5. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

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

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

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

В каждой из четырех колб Эрленмейера приготовить по 50 мл питательной среды Мурасиге-Скуга. В колбу прилить небольшое количество дистиллированной воды и следующие

маточные растворы: 5 мл макроэлементов; 0,5 мл микроэлементов; 0,25 мл хелата железа; 1,0 мл витаминов; 5,0 мл мезо-инозита. Затем в каждую колбу добавить 3 г сахарозы. После этого в три колбы добавляют по одному из следующих фитогормонов: 2,4-Д (1мл/л), 6-БАП (1мл/л), 2,4-Д + 6-БАП (по 1мл/л). В четвертую колбу фитогормоны не добавляют (контроль). Полученные растворы переливают в мерные цилиндры и доводят объем до 50 мл, рН устанавливают на уровне 5,6 – 5,8, используя 0,1н. КОН. Затем добавляют агар-агар (по 0,4 г на каждый вариант питательной среды). Колбы с питательной средой автоклавируют.

Работа 6. ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ КАРТОФЕЛЯ

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

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

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

Эксплант – это любой объект, культивируемый на искусственной питательной среде в условиях *in vitro*.

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

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

Пробирки с растениями протереть спиртом, горлышко обжечь над пламенем спиртовки. Пинцетом вынуть стерильное растение из пробирки и выложить его на стерильную бумагу. Придерживая растение пинцетом, вырезать скальпелем участки стебля длиной 5 – 10 мм, листочки, участки корня. Надсечь экспланты острым скальпелем в нескольких местах, в которых в дальнейшем начнется каллусогенез.

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

Работа 7. ПАССИРОВАНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ НА СВЕЖУЮ ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ

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

Объяснение. Клетки каллусной ткани имеют свой цикл развития и повторяют развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает

старение и отмирание. Кривая роста каллусной ткани имеет S-образную форму и включает шесть фаз (рис. 5).

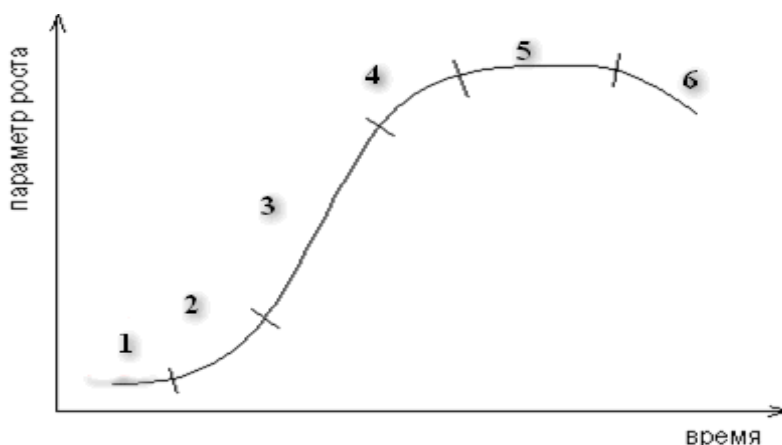


Рис. 5. S-образная кривая роста каллусной ткани

1 – латентная фаза (видимый рост не наблюдается); 2 – экспоненциальная фаза (рост с ускорением); 3 – линейная фаза (скорость роста постоянна); 4 - фаза замедленного роста; 5 - стационарная фаза; 6 - фаза деградации клеток

Во время 1-й латентной или лаг-фазы увеличения числа или массы клеток не происходит. Клетки в этот период подготавливаются к делениям. Следующая, 2-я фаза логарифмическая или экспоненциального роста – характеризуется наибольшей митотической активностью и увеличением массы каллусной культуры, кроме того, рост происходит с ускорением. 3-я фаза – линейная, в которой скорость роста клеток постоянна. Далее наступает 4-я фаза – замедленного роста, когда митотическая активность клеток резко снижается. В 5-й – стационарной фазе – начинается деградация клеток, однако она еще уравновешивается возрастанием числа клеток за счет их деления. В целом же скорость нарастания клеточной массы равна нулю. После стационарной фазы наступает отмирание (фаза деградация) клеток, во время которой число и масса живых клеток уменьшается. Обычно этот процесс сопровождается потемнением тканей каллуса. Старение клеток каллуса обусловлено не только естественной цикличностью в развитии клеток и тканей, но и изменениями, происходящими в составе питательной среды (расходование питательных веществ, выделение каллусом метаболитов, в том числе токсичных). Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания каллусных клеток, первичный каллус, возникающий на эксплантах, через 4-6 недель переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют **пассированием**. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет. Однако при многократном его повторении возможно "привыкание", которое выражается в приобретении автономности по отношению к экзогенным гормонам и утрате или значительному ослаблению способности каллусных клеток к регенерации целого растения.

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

Работа 8. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ (ЭМБРИОКУЛЬТУРА)

Материалы и оборудование: набухшие зерновки озимой ржи (замачиваются в воде в течение 24 ч. до проведения работ), проавтоклавированные пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга, стерильные листы бумаги, хлорамин, дистиллированная вода, стерильный стаканчик, скальпель, пинцеты.

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

1) получение клонов растений-перекрестноопылителей с эффективной системой самонесовместимости. В дальнейшем часть растений клона можно хранить при низкой температуре ($0+2^{\circ}\text{C}$), а часть испытывать на общую комбинационную способность с перспективой создания синтетических популяций;

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

3) устранение влияния эндосперма на проявление генетического потенциала зародыша.

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

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

На стерильном листе бумаги, придерживая зерновку, вычлениют зародыш, надавливая скальпелем в зоне щитка. После этого зародыш необходимо поместить в пробирку с питательной средой. Пробирки с эксплантами поместить в культуральную комнату.

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

Работа 9. ВЫЧЛЕНЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ КАРТОФЕЛЯ

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

Объяснение. Культура изолированных апикальных меристем используется для получения свободного от вирусов посадочного материала. Метод основан на том, что апикальная меристема, представляющая собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм (100 мкм) и шириной 0,25 мм, обычно свободна от вирусов (рис. 6). Поскольку меристеме бывает трудно вычленивать без повреждения, часто ее отделяют с 1 – 2 листовыми примордиями (апексы размером 100 – 250 мкм). Для повышения эффективности оздоровления картофеля применяют сочетание метода верхушечной меристемы с термо- и химиотерапией. Тепловая обработка вызывает инактивацию вирусов, химические вещества ингибируют их развитие. Выращенные из апикальных меристем безвирусные растения могут быть размножены и высажены в теплицы для получения безвирусных клубней. Для ускоренного размножения оздоровленного материала используются также микроклубни, образующиеся на безвирусных растениях *in vitro*.

Ход работы. Клубни картофеля хранят при температуре $4 - 6^{\circ}\text{C}$, затем проращивают в темноте в течение 30 – 45 дней при $20 - 22^{\circ}\text{C}$. Работы по вычлениванию проводят в простерилизованном с помощью бактерицидных ламп ламинарном боксе. Рабочее место (стол, бинокулярная лупа) и штативы с пробирками протирают спиртом. Инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) стерилизуют перед каждым вычлениванием, погружая в спирт, с последующим обжиганием.

Ростки картофеля опустить в химический стакан и залить на 3 – 5 мин. 5%-ным раствором гипохлорита кальция или натрия. Затем не менее 3 раз промыть их стерильной водой, поместить в стерильную чашку Петри и добавить несколько капель автоклавированной воды для предупреждения подсыхания. Перед вычленением с помощью препаровальной иглы под бинокулярным микроскопом с верхушки ростка удалить покровные листочки, последовательно обнажая меристему с примордиальными листочками. Меристему размером 100 – 250 мкм отделить тонкой иглой, зажатой в цанговый держатель. Вычленив можно как верхушечную, так и боковые меристемы. Каждую операцию проводят отдельным простерилизованным инструментом. Меристему на острие иглы перенести на поверхность питательной среды в пробирку. Пробирку закрыть пробкой над пламенем горелки и поставить в штатив. Штатив с пробирками поместить в культуральную комнату.



Рис. 6. Расположение апикальных меристем в растении

В качестве питательной среды используют модифицированную питательную среду МС (табл. 6), заранее приготовленную и простерилизованную в автоклаве при давлении 1 атм. в течение 20 мин.

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

Т а б л и ц а 6 – **Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга (МС) для культивирования апикальных меристем картофеля**

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

*- по прописи Мурасиге-Скуга

Работа 10. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ ЧЕРЕНКОВАНИЕМ ПОБЕГОВ

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

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

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

Работа 11. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ПЛОДОВЫХ, ЯГОДНЫХ И ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ

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

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

- для поддержания и размножения небольшого числа ценных генотипов;
- для ускоренного размножения новых ценных сортов плодовых и декоративных растений;
- для получения большого количества оздоровленного посадочного материала;
- для быстрого размножения некоторых гетерозиготных садовых форм, обычно размножаемых семенами;
- для получения из клонированных родительских форм семян гибридов F₁.

Клональное микроразмножение включает в себя следующие основные этапы:

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

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

В 200 – 250 мл стерилизующего раствора помещаются экспланты и перемешиваются на магнитной мешалке в течение 20 – 30 минут. В условиях ламинарного бокса экспланты от-

мываются в стерильной воде 3 – 4 раза для удаления остатков антисептика. С помощью пинцета экспланты по 2 – 5 шт. помещаются на стерильный лист бумаги, после чего с помощью скальпеля удаляются 0,5 – 1,0 см поврежденной ткани. Побеги разрезаются на экспланты длиной 2 – 4 см и помещаются на питательную среду (табл. 7). Для культивирования на первом этапе микроразмножения используются только пробирки, поскольку в этом случае удается избежать перезаражения эксплантов. Культивирование эксплантов осуществляется в культуральной комнате при длине дня 16 часов, освещенности 1000 – 6000 люкс, температуре 25 – 27°C в течение 3 – 4 недель. После окончания культивирования инфицированные экспланты удаляются, оставшиеся используются для переноса на второй этап. Как правило, после прохождения первого этапа из пазушных почек и непосредственно из каллуса, который часто образуется в нижней части экспланта, формируются пазушные и придаточные (адвентивные) побеги, которые используются как экспланты для переноса на второй этап. Культивирование на втором этапе осуществляется в банках или колбах объемом 300 – 500 мл. В течение культивирования на втором этапе (6 – 8 недель) экспланты формируют новые побеги, которые, в свою очередь, могут быть использованы для размножения (пересадка на второй или последующие пассажи) или для укоренения.

Укоренение микропобегов осуществляется на питательной среде с ауксинами. Для укоренения используются микропобеги длиной 2 см и более, которые помещаются вертикально на агаризованную питательную среду. В течение 3 – 4 недель в нижней части микропобегов формируется каллус, из которого образуются первичные корешки. Акклиматизация микро-растений осуществляется в смеси торфа (рН 5.5 – 6.0) с песком или перлитом в соотношении 3:1 с использованием туманообразующей установки или в теплице. В случае появления очагов инфекции на растениях или субстрате следует произвести обработку раствором фунгицида. После прохождения периода акклиматизации и укоренения *in vivo* (3 – 4 недели) микрорастения пикируются в горшки с субстратом и доращиваются в пленочной теплице до реализации или высадки в открытый грунт.

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

Таблица 7 – Составы искусственных питательных сред.

№ п/п	Компаненты	Объемы смеси, мл			
		1000	500	200	100
1	2	3	4	5	6
Для микроразмножения герберы					
1	Макросоли МС	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
2	Микросоли МС	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
3	Fe-хелат	5 мл	2,5 мл	1 мл	0,5 мл
4	Витамины	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
5	Мезо-инозит	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
6	Аденин	20 мл	10 мл	4 мл	2 мл
7	Кинетин	3 мл	1,5 мл	0,6 мл	0,3 мл
8	ИУК	0,1 мл	0,05 мл	0,02 мл	0,01 мл

Окончание табл. 7.

1	2	3	4	5	6
9	Сахароза	30 г	15 г	6 г	3 г
10	pH	5,8	5,8	5,8	5,8
11	Агар	7 г	3,5 г	1,4 г	0,7 г
Для микроразмножения фикуса Бенджамина					
1	Макросоли МС	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
2	Микросоли МС	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
3	Fe-хелат	5 мл	2,5 мл	1 мл.	0,5 мл
4	Витамины	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
5	Мезо-инозит	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
6	2 ip	5 мл	2,5 мл	1 мл	0,5 мл
7	Сахароза	30 г	15 г	6 г	3 г
8	pH	5,6	5,6	5,6	5,6
9	Агар	7 г	3,5 г	1,4 г	0,7 г
Для микроразмножения лилий					
1	Макросоли МС	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл.
2	Микросоли МС	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
3	Fe-хелат	5 мл	2,5 мл	1 мл	0,5 мл
4	Витамины	10 мл	5 мл	2 мл	1 мл
5	Мезоинозит	100 мл	50 мл	20 мл	10 мл
6	НУК	0,5 мл	0,25 мл	0,1 мл	0,05мл
7	Сахароза	60 г	30 г	12 г	6 г
8	pH	5,8	5,8	5,8	5,8
9	Агар	7 г	3,5 г	1,4 г	0,7 г

Работа 12. ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЗЕРНОВОГО МИЦЕЛИЯ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

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

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

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

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

Маточный мицелий получается путем инокуляции стерильного зернового субстрата споровым мицелием.

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

Ход работы. Зерно хлебных злаков (0,5 литра) отваривается в небольшом количестве воды в течение 15 – 30 мин, после чего вода сливается. Горячее зерно высыпается на поверхность стола, разравнивается тонким слоем для просыхания. Затем зерно засыпается в колбы на 0,5 л на 2/3 от полного объема, туда же добавляется мел в количестве 0,7 г (для оптимизации кислотности зернового субстрата). Колбы закрываются и слегка встряхиваются для перемешивания зерна и мела. Стерилизация осуществляется в автоклаве при температуре 125°C в течение 30 мин. После охлаждения, колбы переносятся в ламинарный бокс, где производится инокуляция зернового субстрата маточным мицелием. Расход маточного мицелия 1: (15 – 20). После инокуляции и в процессе культивирования колбы периодически встряхиваются для равномерного распределения инокулята по всему объему зерна и ставятся на заращение (культивирование) в термостат. Культивирование осуществляется в течение 10 – 15 дней при температуре 25°C до полного заращения зернового субстрата. После заращения коммерческий мицелий используется для инокуляции солоmistых субстратов с целью получения товарных грибов.

Работа 13. ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ДНК - АНАЛИЗА РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Материалы и оборудование: центрифуга для микропробирок, вортекс, автоматические микропипетки-дозаторы со сменными наконечниками на 200 и 1000 мкл, пластиковые пробирки объемом 1.5 мл (количество образцов x 2), штативы для пробирок, бумажные салфетки или полотенце, ступки и пестики для растирания растительного материала, зеленые части растений.

Растворы

- Буфер для экстракции:

На 100 мл буфера (10.0 мл 1М трис-НСl ($C_4H_{12}ClNO_3$) рН 8,0, 10 мл 0.5 М ЭДТА ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), 12.5 10 % SDS (лаурилсульфат натрия $Na C_{12}H_{25}SO_4$), доводим до 100 мл дистиллированной водой, рН 7,5-8,0, в конце добавляем 0.38 г Sodiumbisulfite (Na_2HSO_3).

- Хлороформ ($CHCl_3$)

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

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

Объяснение. Разработка и применение методов анализа ДНК позволило отбирать материал с точной наследственной детерминацией интересующих признаков, т.е. проводить **ДНК-типирование** образцов на наличие селекционно-ценных генов с помощью ДНК-маркеров. Это стало возможным благодаря определению молекулярной основы таких генов. Геном ряда основных сельскохозяйственных культур полностью расшифрован (секвенирован). Данные достижения позволили значительно повысить эффективность селекционного процесса посредством **маркер-сопутствующего отбора**, позволяющего осуществить отбор по признаку на основании генотипа ассоциированного маркера, а не фенотипа признака непосредственно. **Генетический маркер** – это короткая последовательность ДНК, тесно связанная с локусом-мишенью (интересуемым участком ДНК). Генетический маркер может быть представлен 1-2 праймерами – короткими последовательностями ДНК (затравками) для синтеза более длинного участка молекулы ДНК. К его 3'-ОН концу ДНК полимеразы добавляет нуклеотиды по принципу комплементарности. Преимуществами ДНК маркеров при отборе являются: оценка большого объема материала на ранних этапах развития; возможность отбора по признакам, которые проявляются фенотипически только в определенных условиях (например, на искусственных инфекционных фонах); подбор пар для гибридизации с точно установленным наличием аллелей ценных генов, что существенно сокращает селекционный процесс и повышает его эффективность.

Мощным толчком для создания различных типов ДНК-маркеров стало изобретение Кэри Мюллисом в 1983 г. метода амплификации *in vitro* определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов полимеразной реакции (ПЦР - полимеразная цепная реакция, англ. PCR - *Polymerase Chain Reaction*), за которое в 1993 году Кэри Мюллису была присвоена Нобелевская премия. **Полимеразная цепная реакция** — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи маркеров в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет до 1000 пар оснований в зависимости от типа маркера.

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

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

В случае использования для идентификации генов CAPS-маркеров добавляется пятый этап, включающий обработку продуктов амплификации соответствующими рестриктазами, после которой повторно проводится этап 4.

Для проведения работ желательно создание в лаборатории трех рабочих зон:

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

Возможно размещение нескольких зон в одной комнате, например: подготовка проб, выделение ДНК, амплификация и рестрикция ДНК, могут проводиться в одном помещении. Для этапа выделения и очистки ДНК в помещении необходимы вытяжной шкаф, холодильник с хранящимися реактивами, электронные весы, термобокс или термостат (их может заменить водяная баня), центрифуга, вортекс (вихревой смеситель). Если требуемые растворы готовятся здесь же, то необходимо оборудование для их приготовления: дистиллятор, магнитные мешалки с функцией подогрева, pH-метр. Для амплификации необходим термоциклер (амплификатор), желательно наличие специального ПЦР-бокса для подготовки амплифицируемых проб ДНК (рис. 7-9).



Рис. 7. Зона для выделения ДНК и амплификации



Рис. 8. Амплификаторы для проведения полимеразной цепной реакции



Рис. 9. Вытяжной шкаф с центрифугами

Для выделения ДНК лучше использовать ткани свежих листьев или проростки, сформировавшие необходимую массу (световые или темновые). Возможно хранить раститель-

ный материал в холодильнике при температуре + 4°C в течение 2-3 дней. Можно также использовать замороженный и хранившийся в течении нескольких месяцев при температуре минус 20°C материал. При использовании пробирочных растений для выделения ДНК лучше брать только листочки и верхушечную почку, поэтому требуется 3-5 пробирочных растений. На одну пробу берут 70-100 мг тщательно промытого растительного материала.

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

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

При отсутствии готовых наборов можно использовать методику, описанную *Plaschke* и др. [1] с модификациями.

Ход работы:

1. Разрушение тканей и лизис клеток.

Для выделения ДНК берут листья индивидуальных образцов, например, томата массой 70-80 мг (рис. 10, 11).



Рис. 10. Индивидуальные образцы растений томата



Рис. 11. Навеска растительного материала

Для выделения и очистки ДНК требуется два набора пробирок для центрифугирования типа «*Eppendorf*». Перед работой необходимое количество пробирок для каждого из наборов расставляют в штативах и подписывают в соответствии с принятой для материала маркировкой перманентными маркерами сбоку пробирок и на крышечках. Растительный материал измельчают в присутствии жидкого азота, суспензируют в экстракционном буфере (рис. 12, 13). При отсутствии жидкого азота небольшое количество проб можно измельчить механически в специальных ступках при помощи пестиков с добавлением 500 мкл экстракционного буфера. Материал переносят в пробирки (аккуратно пестиком или стеклянной палочкой) объемом 1,5 мл и инкубируют 45 мин при + 65°C в термостате (*Thermo block heating thermostat TDB-120*) (рис. 14).



Рис. 12. Измельчение материала при помощи жидкого азота



Рис. 13. Измельченный материал с экстракционным буфером



Рис. 14. Подготовленный для инкубирования материал в пробирках

2. Отделение раствора ДНК от примесей.

После инкубирования в пробирки при помощи пипетмана и сменного наконечника на 1000 мкл добавляют по 600 мкл хлороформа (приблизительно 1v содержимого пробирки: 1v хлороформа) не касаясь стенок пробирок и тщательно перемешивают в течение 5-10 минут на специальном встряхивателе или вручную в закрытой подставке, переворачивая вверх и вниз.

Пробирки помещают равномерно в центрифугу (рис. 15) и центрифугируют при оборотах 10 000 в течение 15 минут. Осторожно вынимают пробирки в штатив и переносят из них верхнюю прозрачную фракцию в новые пробирки (рис. 16). Перенос осуществляется пипетманами с наконечниками 200 мкл (приблизительно 2 раза по 150 мкл), меняя наконечник для каждого образца.



Рис. 15. Равномерное размещение пробирок в центрифуге



Рис. 16. Перенос фазы с растворенной ДНК в новые пробирки

3. Собственно выделение и очистка препаратов ДНК.

Для осаждения ДНК из раствора добавляют в выделенную фазу 800 мкл ледяного 96% этилового спирта (хранящегося в морозильнике при -20°C). Дают постоять. Не трясать. Через 5-7 минут медленно аккуратно поворачивают пробирку, не разбивая связавшийся комплекс (для лучшего осаждения можно поставить пробирки в холодильник на 10-15 минут). После связывания ДНК пробирки центрифугируют 10 минут при 3000 оборотах в минуту. Аккуратно сливают остатки раствора и переворачивают пробирку на чистую салфетку для удаления капель (рис. 17). ДНК при этом остается на дне или стенке пробирки.

Затем ДНК промывают в 70%-ном этиловом спирте, добавляя по 400 мкл в каждую пробирку. После добавления содержимое пробирки хорошо перемешивают на вортексе (рис. 18) до образования однородной суспензии, после чего центрифугируют 2-3 минуты при 3000 оборотах в минуту и отмывочный раствор аккуратно сливают. Процедуру можно повторить

дважды. ДНК в пробирках подсушивают в открытых пробирках (для испарения остатков спирта) и добавляют по 100 мкл бидистиллированной воды.

4. *Определение чистоты и концентрации ДНК.*

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



Рис. 17. Удаление остаточного количества промывочного раствора



Рис. 18. Перемешивание раствора на вортексе

Полимеразная цепная реакция.

Для проведения ПЦР готовят реакцию смесь, которая включает: препараты ДНК, праймеры, нуклеотидтрифосфаты, полимеразу, реакционный буфер. В зависимости от типа полимеразы, праймеров реакционный буфер может быть различным. Основными его компонентами являются Трис-HCL, KCL, MgCl_2 . Каждый из компонентов влияет на ход ПЦР и имеет свою оптимальную концентрацию. Современные компании по производству реагентов и материалов для молекулярной биологии предлагают широкий выбор указанных компонентов. Оптимальные количества компонентов реакционной смеси могут быть рассчитаны с помощью компьютерной программы «ПЦР-калькулятор». Смесь компонентов за исключением ДНК называется премиксом. Премикс готовят непосредственно перед амплификацией, смешивая компоненты в определенном порядке: бидистиллированная вода, реакционный буфер, нуклеотидфосфаты, праймер (праймеры), полимеразы.

Для подготовки исследуемого материала в каждую пробирку разносят ДНК и добавляют премикс (рис. 19). После завершения амплификации полученные продукты хранят в холодильнике или морозильнике.

ПЦР проводят на приборе – термоциклере (амплификаторе) в специальных тонкостенных полипропиленовых пробирках, совместимых по размеру с амплификатором. Суть работы прибора – контроль температурных и временных характеристик этапов ПЦР. Общий вид программы ПЦР на амплификаторе показан на рисунке 20, состоит из следующих этапов: 1. Первичная длительная денатурация ДНК; 2-4. Быстрая денатурация ДНК. Отжиг праймеров. Элонгация в течение 30-45 циклов. 5-6. Длительная элонгация. Охлаждение реакционной смеси.



Рис. 19. – Внесение ДНК в ПЦР пробирки

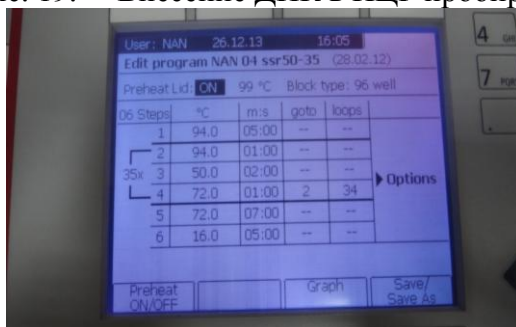


Рис. 20. Общий вид программы ПЦР на амплификаторе



Рис. 21. Постановка пробирок в амплификатор

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

Анализ амплифицируемых фрагментов ДНК

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

Горизонтальный электрофорез (анализ в агарозном геле)

Для анализа используют специальные камеры, в которых гелевая пластинка помещается в раствор горизонтально. Силы электрического поля, создаваемые в камере, заставляют внесенные в гель фрагменты ДНК мигрировать через него. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрица-

тельно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

Заливочный раствор – Трис-ЭДТА-Боратный (ТВЕ) или Трис-ЭДТА-Ацетатный буфер (ТАЕ). Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля. На выбранном растворе готовят гель с использованием агарозы (0,8-2%) и добавлением этидиум бромид. Для получения гелевой пластинки используют специальные заливочные столики (рис. 22), где при помощи гребенок создаются отверстия для амплифицированной ДНК. Застывшие гели помещают в раствор в электрофоретической камере (рис. 23). На специальных пластиковых плашках готовят смесь ампликонов и красителя (рис. 24, 25). Краситель необходим для визуализации разделяемых продуктов в процессе электрофореза, а также для удобства внесения ДНК в гель (рис. 26, 27). Для определения размера фрагментов в отдельные лунки геля добавляют маркер молекулярного веса – стандартные смеси фрагментов ДНК с точно установленными размерами.



Рис. 22. Заливочный столик с гребенками для агарозного геля



Рис. 23. Камеры для горизонтального электрофореза



Рис. 24. Подготовка продуктов амплификации для внесения в гель



Рис. 25. Добавление красителя к амплифицированной ДНК

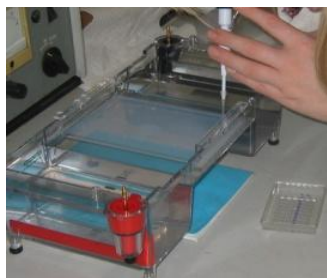


Рис. 26. Внесение подготовленного ампликона в гель

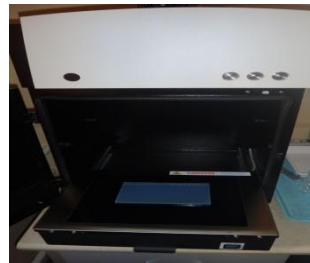


Рис. 27. Перенос геля в трансиллюминатор *Gel Doc 2000*

Агарозные гели фотодокументируют с помощью трансиллюминатора и системы геледокументирования (рис. 28). Трансиллюминаторы предназначены для просмотра гелей в видимом и УФ диапазоне. Особым образом обработанные УФ-фильтры и специальные рефлекторные мембраны внутри трансиллюминатора позволяют создать в области просмотрочного экрана равномерное интенсивное излучение с заданной длиной волны. При экспозиции в ультрафиолетовом свете комплекс «ДНК-этидиум бромид» флуоресцирует, образуя яркие полосы для определенных фрагментов ДНК в геле. Полученные изображения документируются и анализируются (рис. 29).



Рис. 28. Трансиллюминатор *Gel Doc 2000* и система геле-документирования



Рис. 29. Изображение флуоресцирующих полос в геле

Электрофорез в агарозном геле не позволяет увидеть разницу между амплифицируемыми фрагментами в 1-10 пар нуклеотидов, для этого используют полиакриламидный гель. Различия между фрагментами даже в 1-2 пары нуклеотидов четко выявляют современные генетические анализаторы (рис. 30, 31).



Рис. 30. Автоматический секвенатор *Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500*

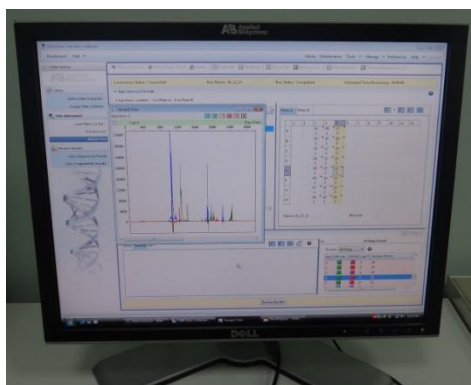


Рис. 31. Программа для генетического анализа

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

При амплификации с данной парой праймеров у линий с нормальным аллелем Мо 948 и линия 19/1 получены продукты амплификации размером 161 п.н., у образца Мо 950 фрагмент длиной 159 п.н. (рис. 32).

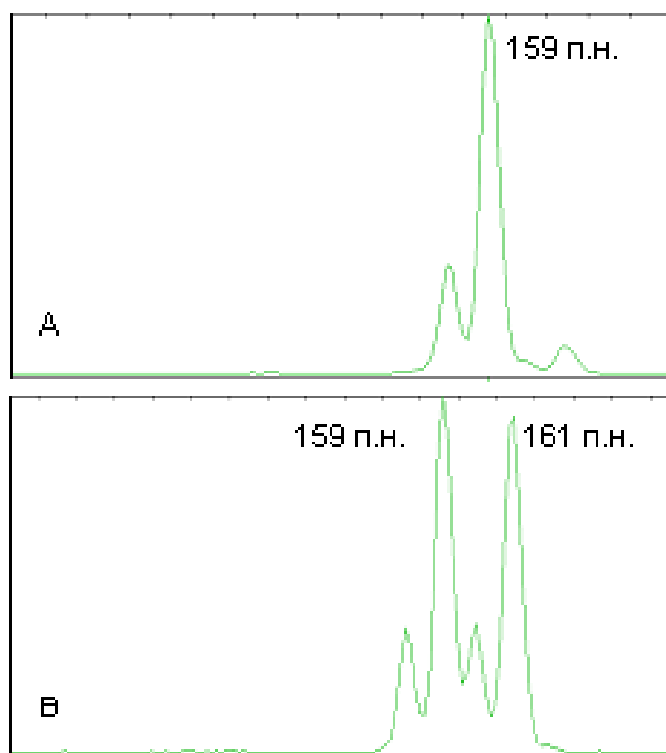


Рис. 32. Результаты фрагментного анализа растений Бония x Мо 948: А- двойная гомозигота по *nor/nor*; Б –гетерозигота по *nor⁺/nor*.

3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

3.1. ВОПРОСЫ ТЕКУЩЕЙ АТТЕСТАЦИИ

1. Биотехнология как наука.
2. Применение методов биотехнологии для получения лекарственных средств.
3. Получение биотехнологическими методами новых генотипов растений.
4. Решение проблем селекции методами *in vitro*.
5. Проблема азотфиксации и возможные пути ее решения биотехнологическими методами.
6. Получение биогаза.
7. Возможности решения экологических проблем биотехнологическими методами.
8. Использование регуляторов роста для корнеобразования *in vitro*.
9. Использование регуляторов роста для побегообразования *in vitro*.
10. Использование регуляторов роста для каллусообразования *in vitro*.
11. Использование регуляторов роста для эмбриогенеза *in vitro*.
12. Правило Скуга-Миллера.
13. Формы взаимодействия фитогормонов.
14. Состав искусственной питательной среды.
15. Физические условия культивирования объектов *in vitro*.
16. Объяснить необходимость создания условий строгой стерильности при работе с культурой *in vitro*.
17. Методы стерилизации растительного материала.
18. Стерилизация ламинарного бокса, инструментов, посуды, материалов.
19. Применение холодной стерилизации.
20. Определение каллуса.
21. Условия получения каллусной ткани.
22. Использование каллусной ткани.
23. Пассирование каллусной ткани.
24. Регенерация растений в культуре *in vitro*.
25. Соматический эмбриогенез.
26. Соматический органогенез.
27. Суспензионные культуры и их получение.
28. Методы культивирования клеточных суспензий.
29. Использование суспензионные культуры.
30. Методы культивирования одиночных клеток.
31. Получение и использование одиночных клеток.
32. Протопласты и методы их получения.
33. Культивирование и использование протопластов.
34. Методы слияния протопластов.
35. Получение цибридной клетки.
36. Соматическая гибридизация.
37. Оплодотворение *in vitro*.
38. Эмбриокультура.
39. Получение гаплоидов методами *in vitro*.
40. Андрогенез.
41. Гиногенез.
42. Партеногенез.
43. Клеточная селекция.
44. Соматическая изменчивость.
45. Преимущества клеточной селекции.
46. Техника криосохранения.

47. Определение микроклонального размножения.
48. Преимущества и недостатки микроклонального размножения.
49. Этапы микроклонального размножения.
50. Методы оздоровления растений от вирусной инфекции.
51. Методы контроля вирусной инфекции в растениях.
52. Микроклубни картофеля, их получение и использование.
53. Мини клубни картофеля, их получение и использование.
54. Микро размножение плодовых, ягодных и декоративных.
55. Генетическая инженерия как раздел биотехнологии.
56. Ферменты генетической инженерии.
57. Методы выделения генов.
58. Векторы для генетической инженерии.
59. *Ti*-плазмиды и их применение в генетической инженерии.
60. *Ri*-плазмиды и их применение в генетической инженерии.
61. Метод микроинъекций.
62. Метод упаковки в липосомы.
63. Метод биобаллистики.
64. Методы прямого переноса генов.
65. Трансгенный организм.
66. Генетическая трансформация растительной клетки.
67. Использование методов генетической инженерии.

3.2 ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЕ ВОПРОСЫ

1. Биотехнология как наука. Основные направления и задачи биотехнологии.
2. Использование достижений биотехнологии в медицине.
3. Использование достижений биотехнологии в сельском хозяйстве.
4. Использование достижений биотехнологии в промышленности.
5. Использование достижений биотехнологии в защите окружающей среды.
6. Применение методов биотехнологии в энергетике.
7. Применение методов биотехнологии для решения проблемы азотфиксации.
8. Решение проблем селекции биотехнологическими методами.
9. Фитогормоны как основная регуляторная система растений.
10. Классификация фитогормонов.
11. Функции ауксинов.
12. Функции цитокининов.
13. Функции гиббереллинов.
14. Функции brassinosteroidов.
15. Функции ингибиторов роста.
16. Действие фитогормонов на геном.
17. Взаимодействие фитогормонов.
18. Фитогормоны в онтогенезе растений.
19. Применение фитогормонов в культуре *in vitro*.
20. Правило Скуга-Миллера.
21. Условия культивирования клеток и тканей на искусственных питательных средах.
22. Физические условия культивирования клеток и тканей *in vitro*.
23. Химические условия культивирования клеток и тканей *in vitro*.
24. Методы стерилизации при работе с культурой *in vitro*.
25. Особенности введения в культуру *in vitro* растительного материала.
26. Основные принципы составления искусственных питательных сред.
27. Культура каллусных тканей.
28. Условия каллусообразования *in vitro*.
29. Регенерация растений в культуре *in vitro*.
30. Основные методы регенерации *in vitro*.
31. Понятие тотипотентности и условия ее реализации *in vitro*.
32. Суспензионные культуры. Их получение, культивирование и использование.
33. Культура протопластов. Получение, культивирование и использование.
34. Культура одиночных клеток. Получение, культивирование и использование.
35. Методы культивирования одиночных клеток.
36. Соматическая гибридизация.
37. Методы слияния протопластов.
38. Преодоление постгамной несовместимости в культуре *in vitro*.
39. Преодоление прогамной несовместимости в культуре *in vitro*.
40. Преодоление несовместимости в культуре *in vitro*.
41. Гаплоидия в селекции растений.
42. Методы получения гаплоидов в условиях *in vitro*.

43. Клеточная селекция.
44. Соматоклональная изменчивость в культуре *in vitro*.
45. Криосохранение и банк клеток и тканей.
46. Основные приемы криосохранения.
47. Основные цели криосохранения.
48. Микроклональное размножение растений методом *in vitro*.
49. Применение микроклонального размножения.
50. Этапы микроклонального размножения.
51. Преимущества микроклонального размножения.
52. Недостатки микроклонального размножения.
53. Методы оздоровления посадочного материала.
54. Методы контроля вирусной инфекции в растениях.
55. Иммуноферментный анализ.
56. Технология выращивания безвирусного посадочного материала на примере картофеля.
57. Получение микроклубней картофеля *in vitro* и их использование в безвирусном семеноводстве.
58. Получение миниклубней картофеля и их использование в безвирусном семеноводстве.
59. Технология выращивания безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур.
60. Особенности микроклонального размножения декоративных культур.
61. Сущность и задачи генетической инженерии.
62. Ферменты генетической инженерии.
63. Методы выделения генов.
64. Векторы для генетической инженерии.
65. Плазмиды и их особенности.
66. Методы прямого переноса генов.
67. Роль генетической инженерии в селекции растений.
68. Получение биотехнологическими методами новых генотипов растений.
69. Роль генетической инженерии в селекции растений.
70. Генетическая трансформация растительной клетки.
71. Методы получения трансгенных организмов.
72. Использование методов генетической инженерии.
73. Генная инженерия как раздел генетической инженерии.
74. Методы генетической трансформации.
75. Особенности применения ДНК технологий для селекции растений.

3.3 КРИТЕРИИ ОЦЕНОК РЕЗУЛЬТАТОВ УЧЕБНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Учебная деятельность оценивается по десятибалльной шкале с использованием следующих критериев:

- 1 балл – попытка дать ответ, из которого следует, что отвечающий знает, что он отвечает на вопросы по дисциплине Биотехнология в растениеводстве;
- 2 балла – неполные и неточные ответы по биотехнологии в растениеводстве без пояснений и с существенными ошибками;
- 3 балла – неполные и неточные ответы по биотехнологии в растениеводстве, включая основные разделы без пояснений и с ошибками в пояснениях;
- 4 балла – несистематизированные, неполные ответы по всем поставленным вопросам дисциплины, пояснения отсутствуют или даны с ошибками;
- 5 баллов – несистематизированные, неполные или содержащие ошибки ответы на вопросы по биотехнологии в растениеводстве, пояснения неполные;
- 6 баллов – систематизированные, но неполные ответы на вопросы по основным разделам биотехнологии в растениеводстве, изложение ответов неглубокое, имеются незначительные ошибки;
- 7 баллов – систематизированные, принципиально правильные, но недостаточно полные ответы на вопросы, пояснения ответов правильное, но неглубокое, имеются незначительные ошибки, отсутствуют конкретные примеры;
- 8 баллов – систематизированные правильные и полные ответы на вопросы по основным разделам биотехнологии в растениеводстве, могут присутствовать несущественные неточности, даются правильные, но недостаточно полные и точные пояснения, приводятся примеры;
- 9 баллов – систематизированные, глубокие, правильные и полные ответы по вопросам дисциплины, логически верное изложение ответов, даются исчерпывающие пояснения;
- 10 баллов – систематизированные, глубокие, правильные и полные ответы на вопросы по разделам биотехнологии в растениеводстве, логически верное изложение ответов, даются исчерпывающие пояснения с примерами, приводятся дополнительные сведения или делаются оригинальные обобщения.

**4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ
4.1. УЧЕБНАЯ ПРОГРАММА**

**УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОРДЕНОВ
ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ
И ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

i

УТВЕРЖДАЮ
Ректор академии
В. В. Великанов
2024 г.
Регистрационный № А-189-24/ уч.



БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ
Учебная программа по учебной дисциплине
для специальности
1-33 01 06 Экология сельского хозяйства

2024

Учебная программа составлена в соответствии с образовательным стандартом высшего образования ОСВО 1-33 01 06-2013 и учебным планом БЗ-33-01-21-20у от 27.02.2020 г.

СОСТАВИТЕЛИ:

А. В. Кильчевский, заместитель Председателя Президиума Национальной академии наук Беларуси, академик Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор;

Т. В. Никонович, доцент кафедры сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия», кандидат биологических наук, доцент;

О. Г. Бабак, ведущий научный сотрудник Государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», кандидат биологических наук, доцент;

А. Н. Иванистов, доцент кафедры сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия», кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Л. Г. Коготько, заведующий кафедрой защиты растений учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия», кандидат сельскохозяйственных наук, доцент;

Г. И. Витко, заведующий кафедрой селекции и генетики учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия», кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

РЕКОМЕНДОВАНА К УТВЕРЖДЕНИЮ В КАЧЕСТВЕ УЧЕБНОЙ:

кафедрой сельскохозяйственной биотехнологии, экологии и радиологии учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия» (протокол № 11 от « 22 » 05 2024 г.);

методической комиссией агротехнологического факультета учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия» (протокол № 10 от «25» 06 2024 г.);

научно-методическим советом учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия» (протокол № 10 от «26» 06 2024 г.).

Ответственный за выпуск: Т. В. Никонович

1. ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Биотехнология является новой областью биологической науки. Она использует методы генетики, молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, селекции, экологии.

Биотехнология – это наука о клеточных и генно-инженерных методах и технологиях для создания и использования биологических объектов с целью интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Современная биотехнология изучает возможности использования организмов, биологических процессов и систем в производстве, включая превращение различных видов сырья в высококачественные продукты. В связи с этим современные специалисты-экологи должны в совершенстве владеть методами биотехнологии, уметь использовать их для создания условий, повышающих производство сельскохозяйственной продукции, улучшающих её качество, обеспечивающих защиту окружающей среды от загрязнения и повышение устойчивости всего агропромышленного производства. Поэтому важно, чтобы в процессе обучения студент освоил современные и перспективные биотехнологические методы и приобрел практические навыки их использования.

Цель преподавания учебной дисциплины – формирование знаний, умений и профессиональных компетенций по биотехнологии в растениеводстве, применение на практике научно обоснованного комплекса технологий, предусматривающих использование биологических систем разного уровня организации.

Основными задачами учебной дисциплины являются: изучение принципов и методов клеточной и генетической инженерии для использования в селекции и семеноводстве; разработка интенсивных биотехнологий в растениеводстве, животноводстве, защите растений, утилизации сельскохозяйственных отходов, защите окружающей среды.

Содержание учебной дисциплины представлено в виде тем, которые характеризуются относительно самостоятельными укрупненными дидактическими единицами содержания обучения. Содержание тем опирается на компетенции, ранее приобретенные студентами при изучении таких учебных дисциплин, как «Химия», «Ботаника, физиология и биохимия растений». Знания, полученные при изучении дисциплины «Биотехнология в растениеводстве», используются при изучении учебных дисциплин «Методы и средства защиты растений», «Сельскохозяйственная экотоксикология».

В результате изучения учебной дисциплины специалист должен закрепить и развить академические компетенции:

АК-1 – уметь применять базовые научно-теоретические знания для решения теоретических и практических задач,

АК-4 – уметь работать самостоятельно;
социально-личностные компетенции:

СЛК-2 – быть способным к социальному взаимодействию,

СЛК-6 – уметь работать в команде;

профессиональные компетенции:

ПК-1 – успешно осуществлять активную профессиональную деятельность,

ПК-2 – участвовать в разработке производственных и технологических процессов

ПК-6. – применять эффективную организацию производственных процессов, включая, рациональное построение производственных систем,

ПК-14. – производить отбор проб различных объектов внешней среды, их маркировку, оформление сопроводительной документации, регистрацию, хранение, обработку и оформление результатов исследований,

ПК-21 – управлять качеством труда и продукции,

ПК-25 – осуществлять планирование мероприятий в области охраны окружающей среды от загрязнения поллютантами,

ПК-35 – осуществлять выбор оптимального варианта проведения научно-исследовательских работ,

ПК-36 – работать с научной, нормативно-справочной и специальной литературой,

ПК-41 – разрабатывать детальный план мероприятий, включая методологию, основные действия, кадровое обеспечение, график, бюджет, и соизмеримые цели.

В результате изучения учебной дисциплины студент должен *знать*:

– основные направления, задачи и достижения современной биотехнологии;

– технологии культивирования клеток и тканей на искусственных питательных средах;

– применение методов культуры *in vitro* в селекции и для размножения растений;

– применение молекулярных маркеров в генетике и селекции сельскохозяйственных растений;

– сущность, задачи и роль генетической инженерии в создании принципиально новых генотипов сельскохозяйственных растений, методы генетической трансформации;

– основные группы фитогормонов, их роль в экспрессии генов, регуляции физиологических процессов растений, возможности использования фитогормонов в биотехнологии и растениеводстве;

– использование методов биотехнологии для получения новых источников энергии, переработки отходов и биодеградации ксенобиотиков, повышения плодородия почв и др.;

уметь:

- составлять искусственные среды для культивирования растений *in vitro*;

- использовать методы культуры *in vitro* в селекции растений;

- использовать методы микрклонального размножения для выращивания оздоровленного посадочного материала растений;

- применять фиторегуляторы для оптимизации процессов роста и развития растений в культуре *in vitro* и *in vivo*;

- использовать методы биотехнологии для получения новых источников энергии, переработки отходов и биодegradации ксенобиотиков, повышения плодородия почв и др.;

иметь навык:

- работы в биотехнологической лаборатории;

- стерилизации и составления искусственных питательных сред для культивирования объектов *in vitro*;

- выделения ДНК и проведения полимеразной цепной реакции;

- выполнения манипуляций клеточной и генетической инженерии.

В рамках образовательного процесса по данной учебной дисциплине студент должен не только приобрести практические знания, умения и навыки по специальности, но и развить свой ценностно-личностный, духовный потенциал, сформировать качества патриота и гражданина, готового к активному участию в экономической, производственной и социально-культурной жизни страны.

Учебным планом на изучение учебной дисциплины «Биотехнология в растениеводстве» для специальности 1-33 01 06 «Экология сельского хозяйства» заочной формы обучения отводится 176 часов, из них 16 часов составляют аудиторные занятия. Примерное распределение аудиторных часов по видам занятий: лекции – 8 часов, лабораторные занятия – 8 часов. На самостоятельную работу отводится 160 часов. Учебная дисциплина изучается на 4 курсе. Рекомендуемая форма промежуточной аттестации – экзамен.

2. СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология как наука. Основные направления и задачи современной биотехнологии. Связь биотехнологии с другими биологическими и сельскохозяйственными науками. Применение методов биотехнологии в селекции, семеноводстве, защите растений, повышении плодородия почв и продуктивности растений. Использование биотехнологии в животноводстве. Биотехнология получения кормового белка, аминокислот, ферментов и биологически активных веществ. Биотехнология и медицина. Использование биотехнологии в энергетике. Биотехнология и защита окружающей среды от загрязнения. Биотехнологическая переработка промышленных, сельскохозяйственных и бытовых отходов. Аэробное и анаэробное разложение отходов. Производство биогаза как способ утилизации органических отходов.

Биодеградация ксенобиотиков в окружающей среде. Микробная деградация органических соединений, нефтяных загрязнений, пестицидов, поверхностно-активных веществ. Роль биотехнологии в защите и оздоровлении биосферы. Создание трансгенных растений, очищающих почву от загрязнения тяжелыми металлами, нефтепродуктами.

Биотехнология в решении продовольственной проблемы. Мировой уровень биотехнологии как науки и отрасли производства. Развитие биотехнологии в Беларуси.

1. РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ И РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Понятие о фитогормонах. Классификация, структура и функции фитогормонов (ауксины, цитокинины, гиббереллины, этилен, абсцизовая кислота, brassinosteroids и другие природные регуляторные соединения). Фитогормональная регуляция экспрессии генов и активности ферментов. Взаимодействие фитогормонов в растениях. Фитогормоны в онтогенезе растений.

Синтетические регуляторы роста и развития растений. Фитогормоны и синтетические регуляторы в биотехнологии растений.

Фитогормоны и регуляторы роста в растениеводстве. Регуляция корнеобразования и размножения растений, покоя и прорастания, роста органов, цветения, опыления, оплодотворения, опадения органов, завязывания, развития и созревания плодов, габитуса растений, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам.

Фиторегуляторы, разрешённые для применения в интенсивном растениеводстве и хранении продукции в Беларуси.

2. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Сущность и задачи клеточной инженерии. Использование культуры изолированных клеток, тканей и органов в биотехнологии.

Условия культивирования протопластов, клеток, тканей и органов на искусственных питательных средах. Методы стерилизации. Основные принципы составления искусственных питательных сред. Источники получения эксплантов.

Специфика каллусных тканей. Дедифференцировка как обязательное условие перехода специализированной клетки к делению и образованию каллусной ткани. Фазы ростового цикла каллусных клеток. Генетическая неоднородность клеток, культивируемых *in vitro*. Способы культивирования каллусных тканей. Пересадка каллусной ткани на свежую питательную среду (пассирование). Явление «привыкания», наблюдаемое при многократной пересадке клеток и тканей.

Суспензионные культуры, их получение и культивирование. Использование суспензионных культур для получения веществ вторичного синтеза.

Культуры одиночных клеток. Способы, облегчающие получение колоний из клеток: метод плейтинга, кондиционированные среды, кормящий слой, культуры-няньки.

Изолированные протопласты растений, их получение и культивирование. Применение осмотических стабилизаторов в культуре изолированных протопластов. Индукция деления и образования колоний каллусных клеток из протопластов.

Тотипотентность растительных клеток, её природа и значение в селекции. Вторичная дифференцировка и морфогенез в культуре клеток и тканей. Типы морфогенеза: органогенез (корневой, стеблевой, флоральный, листовый) и соматический эмбриогенез. Индукция морфогенеза с помощью фитогормонов и физических факторов среды. Генетические основы морфогенеза. Морфогенез и получение растений-регенерантов как основа клеточных технологий. Применение культуры клеток и тканей в генетической инженерии, селекции и семеноводстве растений.

3. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ *IN VITRO* В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Преодоление прогамной и постгамной несовместимости при отдалённой гибридизации растений. Оплодотворение в культуре *in vitro*. Культура изолированных семян и зародышей (эмбриокультура).

Индукция гаплоидии в культуре тканей и использование гаплоидов и дигаплоидов в селекции растений. Методы получения гаплоидов (андрогенез, гиногенез, партеногенез). Культивирование изолированных пыльников и пыльцы. Способы получения и результаты использования гаплоидных и дигаплоидных линий в селекции ячменя, риса, пшеницы и других видов растений.

Цели и задачи клеточной селекции растений. Причины, особенности и характер проявления соматической генетической изменчивости в культуре *in vitro*. Индуцирование мутаций на клеточном уровне. Создание селективных условий для клеточной селекции. Отбор устойчивых к селективному фактору клонов. Индукция органогенеза и получение изменённых растений. Достижения и перспективы клеточной селекции в создании принципиально новых генотипов, обладающих устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессам.

Гаметная и зиготная селекция растений. Методы отбора гамет и зигот, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам. Результаты и перспективы использования гаметной и зиготной селекции томата, кукурузы, рапса и других культур.

Способы слияния изолированных протопластов. Генетические изменения клеток в процессе соматической гибридизации и их практическое значение в селекции. Цибридизация как способ переноса цитоплазматических генов. Использование гибридизации соматических клеток в селекции растений.

Криосохранение как метод создания банка клеток и тканей. Значение и задачи криосохранения растительного генофонда. Объекты, сохраняющиеся в жидком азоте. Подбор криопротекторов для уменьшения повреждений. Подготовка растительного материала к замораживанию. Технология замораживания, криосохранения, оттаивания и реактивации роста клеток и тканей. Масштабы и перспективы применения криосохранения для сохранения генетических ресурсов в генбанках.

Состояние и перспективы применения методов *in vitro* в селекции растений.

4. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ *IN VITRO* ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Применение методов *in vitro* для микроклонального размножения растений и оздоровления посадочного материала. Преимущество метода микроклонального размножения растений в сравнении с традиционными методами вегетативного размножения. Цели микроклонального размножения. Классификация методов микроклонального размножения. Активация развития меристем. Образование адвентивных побегов. Индукция соматического эмбриогенеза. Дифференциация адвентивных почек в каллусной ткани. Микрочеренкование побегов, сохраняющих апикальное доминирование. Этапы клонального микроразмножения и оптимизация процесса на каждом этапе. Влияние генетических, физиологических и средовых факторов на микроразмножение растений.

Методы оздоровления посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции (метод термотерапии, химиотерапии, апикальных меристем). Методы контроля вирусной инфекции (метод электронной микроскопии, иммуноферментный анализ, использование растений-индикаторов). Технология получения оздоровленного посадочного материала картофеля.

Технология получения первой клубневой репродукции в теплицах. Метод миниклубней. Метод микроклубней. Микроклональное размножение плодовых, ягодных, овощных, декоративных и лесных культур. Масштабы и перспективы микроклонального размножения растений в мировом сельском хозяйстве.

5. ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Нуклеиновые кислоты как носители наследственной информации (ДНК и РНК). Молекулярные механизмы генетических процессов: репликация, транскрипция, трансляция. Структура генов, их полиморфизм и регуляция экспрессии. Основные методы изучения полиморфизма ДНК (РНК): секвенирование, гибридизация, амплификация, рестрикционный анализ. Полимеразная цепная реакция, типы ПЦР (ПЦР в реальном времени).

Молекулярные маркеры и их классификация. Направления применения молекулярных маркеров в генетике и селекции сельскохозяйственных растений. Филогенетическое изучение растений. Идентификация и паспортизация растений. ДНК-типирование аллелей хозяйственно ценных признаков: биохимический состав, устойчивость к биотическим и абиотическим факторам и др. ДНК-технологии для диагностики инфицированности патогенами.

6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Сущность и задачи генетической инженерии. Клонирование фрагментов ДНК – основа генетической инженерии. Ферменты генетической инженерии. Рестриктазы и их классификация. ДНК-полимеразы. Основные виды ДНК-лигаз и их использование для сшивания фрагментов ДНК. Построение рестрикционных карт. Секвенирование и проблемы синтеза генов.

Конструирование рекомбинантных ДНК. Выделение генов. Синтез и клонирование комплементарной ДНК (к-ДНК). Идентификация рекомбинантных клонов.

Способы переноса индивидуальных генов или групп генов в реципиентные клетки. Принципы конструирования векторов. Наиболее распространенные виды векторов. Плазмиды и фаговые векторы. Специальные методы получения банков (библиотек) генов. Трансформация клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК.

Проблемы экспрессии генов при трансгенезе. Способы оптимизации экспрессии генов. Основные направления генноинженерной биотехнологии. Получение новых генотипов (трансгенез) микроорганизмов, растений, животных. Основные проблемы получения трансгенных организмов и пути их преодоления. Современные достижения генетической инженерии.

Методология генетической инженерии в растениеводстве. Принципиальная схема переноса новых генов в растения. Векторный и прямой перенос генов. Создание гибридных молекул, обеспечивающих экспрессию генов в растительной клетке. Выделение растительных генов для целей генетической

инженерии растений. Проблема регенерации растений из трансформированных клеток. Агробактерии как переносчики информации в геном двудольных растений. Создание векторов на основе *Ti* и *Ri*-плазмид.

Вирусы и вироиды растений как потенциальные векторы. Разработка векторов на основе митохондриальной и хлоропластной ДНК. Мобильные генетические элементы как векторы.

Методы прямого переноса генов. Трансформация растительных протопластов. Метод кокультивации. Микроинъекции ДНК. Электропорация. Упаковка в липосомы. Метод биологической баллистики.

Маркеры генетической инженерии растений. Гены запасных белков, осмотолерантности, толерантности к гербицидам и патогенам. Экспрессия трансгенов в растениях.

Направления генетической инженерии растений. Роль генетической инженерии в создании принципиально новых форм сельскохозяйственных растений. Генноинженерные подходы к повышению эффективности фотосинтеза. Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава запасных белков растений. Получение трансгенных растений, устойчивых к гербицидам. Повышение устойчивости растений к низким температурам, засолению почв. Генноинженерные подходы к созданию штаммов микроорганизмов с повышенной эффективностью азотфиксации и генотипов растений, обладающих усиленной способностью к симбиогенезу, способных очищать почву от загрязнения тяжелыми металлами и нефтепродуктами

Применение методов генетической инженерии в защите растений. Задача получения трансгенных растений, устойчивых к вирусной, грибной и бактериальной инфекции. Применение генноинженерной технологии в создании микробиологических пестицидов и растений, устойчивых к насекомым, грибным и бактериальным заболеваниям.

Масштабы и перспективы использования трансгенных растений в сельском хозяйстве. Трансгенные растения и биобезопасность.

7. БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Использование микроорганизмов как биологических агентов для получения биомассы, органических кислот, спиртов, аминокислот, ферментов, гормонов и других соединений. Производство микробиологического кормового и пищевого белка. Микробиологический синтез незаменимых аминокислот, витаминов, ферментных препаратов, средств защиты растений. Использование микробных почвоудобрительных препаратов. Применение микробиологических препаратов при микроклональном размножении растений. Аэробная переработка отходов. Анаэробная переработка отходов. Биодegradация ксенобиотиков в окружающей среде. Энергия и биотехнология.

3. Учебно-методическая карта учебной дисциплины

Форма получения образования: заочная полная

№ тем	Название разделов	Всего аудиторных	В том числе		Количество часов СР	Форма контроля
			лекции	лабораторные занятия		
	Введение	2	1	1	20	Индивидуальные задания, текущий опрос
1	Регуляторы роста и развития растений в биотехнологии и растениеводстве	2	1	1	20	Индивидуальные задания
2	Клеточная инженерия	2	1	1	20	Индивидуальные задания, текущий опрос
3	Применение методов <i>in vitro</i> в селекции растений	2	1	1	20	Индивидуальные задания
4	Применение методов <i>in vitro</i> для размножения растений	2	1	1	20	Индивидуальные задания
5	Основы генетического анализа	2	1	1	20	Индивидуальные задания, текущий опрос
6	Генетическая инженерия	2	1	1	20	Индивидуальные задания, текущий опрос
7	Биотехнология микроорганизмов	2	1	1	20	Индивидуальные задания
	Итого:	16	8	8	160	экзамен

4. ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

4.1. Литература

Основная

1. Никонович, Т. В. Биотехнология. Лабораторный практикум / Т. В. Никонович [и др.]. – Горки: БГСХА, 2022, – 174 с.
2. Биотехнология: учебно-методическое пособие / Т. В. Никонович [и др.]. – Горки: БГСХА, 2021, – 58 с.
3. Картель, Н. А. Биотехнология в растениеводстве / Н. А. Картель, А. В. Кильчевский. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 309 с.
4. Никонович, Т. В. Биотехнология в растениеводстве / Т. В. Никонович, А. Н. Иванистов, В. В. Французенок. – Горки: БГСХА, 2017. – 84 с.
5. Лутова, Л. А. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений / Л. А. Лутова, Т. А. Матвеева. – СПб.: Эко-Вектор, 2016. – 168 с.
6. Картель, Н. А. Биоинженерия: методы и возможности / Н. А. Картель. – Минск: Ураджай, 1989, – 143 с.
7. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с.

Дополнительная

1. Харченко, П. Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии. / П. Н. Харченко, В. И. Глазко. – М.: Воскресенье, 2006. – 480 с.
2. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высш. шк., 1998, – 416 с.
3. Биотехнология – сельскому хозяйству / А.Г. Лобанок [и др.]. – Минск: Ураджай, 1988, – 200 с.
4. Биотехнология. Кн.3: Клеточная инженерия / Р. Г. Бутенко [и др.]. – М.: Высш. шк., 1987, – 128 с.
5. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1990, – 383 с.
6. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений / Г. С. Муромцев [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1987 – 383 с.
7. Пирузян, Э. С. Основы генетической инженерии растений / Э. С. Пирузян. – М.: Наука, 1988, – 302 с.
8. Артамонов, В. И. Биотехнология – агропромышленному комплексу / В.И. Артамонов. – М.: Наука, 1989, – 160 с.
8. Бекер, М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис. – М.: Агропромиздат, 1990, – 231 с.
9. Биотехнология растений: культура клеток / Г. П. Болвелл [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1989, – 280 с.
10. Биотехнология. Принципы и применение / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988, – 480 с.
11. Биотехнология сельскохозяйственных растений. – М.: Агропромиздат, 1987, – 301 с.

12. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991, – 408 с.
13. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин [и др.]. – Киев: Наукова думка, 1980, – 488 с.
14. Катаева, Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983, – 96 с.
15. Полевой, В. В. Физиология растений / В. В. Полевой. – М.: Высшая школа, 1989, – 464 с.
16. Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии / В. Н. Рыбчин. – Минск: Выш. шк., 1986, – 186 с.
17. Сидоров, В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – Киев: Наукова думка, 1990, с. 36-37.
18. Картель, Н. А. Генетика: Энциклопедический словарь / Н. А. Картель, Е. Н. Макеева, А. М. Мезенко. – Минск: Тэхналогія, 1999, – 68 с.
19. ДНК-типирование генов качества плодов и устойчивости к болезням томата: методические рекомендации / А. В. Кильчевский [и др.]; Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2016. – 41 с.
20. Генетические основы селекции растений. Т4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия. / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск: Белорусская наука, 2014. – 653 с.

4.2. Методические рекомендации по организации и выполнению самостоятельной работы

При изучении учебной дисциплины рекомендуется использовать следующие формы самостоятельной работы:

- самостоятельная работа, в том числе в виде выполнения индивидуальных заданий;
- подготовка рефератов по индивидуальным темам научно-исследовательской работы.

4.3. Рекомендуемые формы и методы обучения

В процессе освоения учебной дисциплины используется модульно-рейтинговая технология.

Основными рекомендуемыми методами (технологиями) обучения, отвечающими целям изучения учебной дисциплины, являются:

- элементы проблемного обучения, реализуемые в лекционном курсе;
- элементы учебно-исследовательской деятельности и творческого подхода, реализуемые на лабораторных занятиях, а также при самостоятельной работе.

4.4. Перечень рекомендуемых средств диагностики компетенций

Для оценки учебных достижений обучающихся используется следующий диагностический инструментарий:

- проведение текущих опросов или компьютерного тестирования по отдельным темам;
- защита выполненных работ на лабораторных занятиях;
- сдача теоретических блоков по разделам дисциплины;
- сдача экзамена по дисциплине.

ПРОТОКОЛ СОГЛАСОВАНИЯ УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЫ УВО

Название учебной дисциплины, с которой требуется согласование	Название кафедры	Предложения об изменениях в со- держании учебной программы учреж- дения высшего об- разования по учеб- ной дисциплине	Решение, приня- тое кафедрой, разработавшей учебную про- грамму (с указанием даты и номера прото- кола)
Методы и средства за- щиты растений	Защита растений		
Сельскохозяйственная экотоксикология	Сельскохозяйственной биотехнологии, эколо- гии и радиологии		

4.2 УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Никонович, Т. В. Биотехнология. Лабораторный практикум / Т. В. Никонович [и др.]. – Горки: БГСХА, 2022, – 174 с.
2. Биотехнология: учебно-методическое пособие / Т. В. Никонович [и др.]. – Горки: БГСХА, 2021, – 58 с.
3. Картель, Н. А. Биотехнология в растениеводстве / Н. А. Картель, А. В. Кильчевский. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 309 с.
4. Никонович, Т. В. Биотехнология в растениеводстве / Т. В. Никонович, А. Н. Иванов, В. В. Французенок. – Горки: БГСХА, 2017. – 84 с.
5. Лутова, Л. А. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений / Л. А. Лутова, Т. А. Матвеева. – СПб.: Эко-Вектор, 2016. – 168 с.
6. Картель, Н. А. Биоинженерия: методы и возможности / Н. А. Картель. – Минск: Ураджай, 1989, – 143 с.
7. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с.

Дополнительная

1. Харченко, П. Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии. / П. Н. Харченко, В. И. Глазко. – М.: Воскресенье, 2006. – 480 с.
2. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]. – М.: Высш. шк., 1998, – 416 с.
3. Биотехнология – сельскому хозяйству / А.Г. Лобанок [и др.]. – Минск: Ураджай, 1988, – 200 с.
4. Биотехнология. Кн.3: Клеточная инженерия / Р. Г. Бутенко [и др.]. – М.: Высш. шк., 1987, – 128 с.
5. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1990, – 383 с.
6. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений / Г. С. Муромцев [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1987 – 383 с.
7. Пирузян, Э. С. Основы генетической инженерии растений / Э. С. Пирузян. – М.: Наука, 1988, – 302 с.
8. Артамонов, В. И. Биотехнология – агропромышленному комплексу / В.И. Артамонов. – М.: Наука, 1989, – 160 с.
9. Бекер, М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис. – М.: Агропромиздат, 1990, – 231 с.
10. Биотехнология растений: культура клеток / Г. П. Болвелл [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1989, – 280 с.
11. Биотехнология. Принципы и применение / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988, – 480 с.
12. Биотехнология сельскохозяйственных растений. – М.: Агропромиздат, 1987, – 301 с.
13. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991, – 408 с.
14. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин [и др.]. – Киев: Наукова думка, 1980, – 488 с.
14. Катаева, Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983, – 96 с.
16. Полевой, В. В. Физиология растений / В. В. Полевой. – М.: Высшая школа, 1989, – 464 с.

17. Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии / В. Н. Рыбчин. – Минск: Выш. шк., 1986, – 186 с.
18. Сидоров, В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – Киев: Наукова думка, 1990, с. 36-37.
19. Картель, Н. А. Генетика: Энциклопедический словарь / Н. А. Картель, Е. Н. Мажеева, А. М. Мезенко. – Минск: Тэхналогія, 1999, – 68 с.
20. ДНК-типирование генов качества плодов и устойчивости к болезням томата: методические рекомендации / А. В. Кильчевский [и др.]; Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2016. – 41 с.
21. Генетические основы селекции растений. Т4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия. / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск: Белорусская наука, 2014. – 653 с.