

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФГБОУ ВО «БРЯНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»**

Кафедра агрономии, селекции и семеноводства

Милехина Н.В., Симонов В.Ю.

**СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ
БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Учебно-методическое пособие
для лабораторно-практических занятий
(с элементами дидактического материала)
для студентов направления подготовки
35.03.07 Технология производства и переработки
сельскохозяйственной продукции
профиль Технология производства и переработки
продукции растениеводства

Брянская область
2022

УДК 631.147 (076)

ББК 40.0

М 60

Милехина, Н. В. Сельскохозяйственная биотехнология: учебно-методическое пособие для лабораторно-практических занятий (с элементами дидактического материала) для студентов направления подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции профиль Технология производства и переработки продукции растениеводства / Н. В. Милехина, В. Ю. Симонов. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2022. – 53 с.

Целью данного учебно-методического пособия является ознакомить студентов с методами и приемами культивирования органов и тканей растений, получения безвирусного растительного материала и с основными принципами функционирования гормональной системы растений.

Пособие содержит описание лабораторных работ, основные термины, вопросы для самопроверки, рекомендуемая литература.

Для студентов очной и заочной форм обучения.

Рецензент: к. с.-х. наук, доцент кафедры агрономии, селекции и семеноводства Сычева И.В.

Рекомендовано к изданию решением учебно-методической комиссии института экономики и агробизнеса Брянского ГАУ, протокол № 3 от 19 октября 2022 года.

© Брянский ГАУ, 2022

© Н.В. Милехина, 2022

© В.Ю. Симонов, 2022

Учебно-методическое пособие разработано в соответствии с ФГОС ВО - бакалавриат по направлению подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции, утвержденным приказом Министерства образования и науки Российской Федерации от 17.07.2017 года № 669.

В результате изучения дисциплины обучающийся должен усвоить трудовые функции в соответствии с профессиональным стандартом «Агроном», утвержденным приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 20 сентября 2021 г. № 644н (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 20 октября 2021 г., регистрационный № 65482).

Пособие рекомендовано для домашней и аудиторной самостоятельной работы студентов, что позволяет экономично использовать время занятий.

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующей общепрофессиональной (ОПК) компетенции:

способен реализовывать современные технологии и обосновывать их применение в профессиональной деятельности (ОПК -4)

После изучения дисциплины студент должен:

Знать: принципы и методы генетической инженерии и возможность их применения в профессиональной деятельности; роль гормональной регуляции в биотехнологии растений; правовые аспекты внедрения новых видов производств на основе использования трансгенных форм растений и микроорганизмов.

Уметь: применять практические навыки для организации биотехнологических производств биологических активных соединений и контроля качества биотехнологических продуктов.

Владеть: технологиями стерилизации питательных сред, инструментов, материалов и рабочей зоны, правилами и порядком приготовления питательных сред для культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений; техникой клонального микроразмножения растений; приемами оздоровления растений от вирусов; методами получения каллусных и суспензионных культур.

ВВЕДЕНИЕ

Сельскохозяйственная биотехнология - это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных и микроорганизмов с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, высокой продуктивностью и качеством продукции, в целях оздоровления экологической обстановки во всех отраслях производства.

РАЗДЕЛ 1. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Тема: Биология культивируемых клеток и тканей

Работа 1. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных органов, тканей и клеток растений.

На рост и развитие растительной ткани или органа растения влияют внешние условия (освещенность, температура, влажность, кислород для дыхания, углекислота для фотосинтеза) и элементы минерального и органического питания. Растения нуждаются только в элементах минерального питания, так как органические вещества они синтезируют сами. Однако разные ткани и органы различаются по своим биосинтетическим возможностям, между ними происходит постоянный обмен метаболитами. Некоторые ткани лишены хлорофилла и являются гетеротрофными. В закрытых пробирках при культивировании растительных эксплантов фотосинтез затруднен, поэтому необходимы питательные среды сложные по составу. В состав культуральных сред входят следующие группы компонентов:

1. Неорганические макроэлементы в виде солей (N, P, K, S, Fe, Ca, Mg);
2. Неорганические микроэлементы (Co, Cu, Zn, B, Mo, Mn, J, иногда Ni);
3. Углеводы (чаще всего сахароза, глюкоза);
4. Аминокислоты (отдельные или чаще в виде смеси);
5. Витамины (тиамин B₁, пиридоксин B₆, аскорбиновая кислота C, никотиновая кислота и иногда другие);
6. Фитогормоны (обычно питокинины, ауксины и гиббереллины);
7. Желирующие вещества (наиболее часто агар-агар).

Аминокислоты, витамины и фитогормоны иногда можно заменять растительными соками или экстрактами (часто используют кокосовую воду).

Без макро- и микроэлементов и углеводов ткань перестает расти и погибает. Углеводы - основа гетеротрофного питания растений *in vitro*. Наиболее важным из углеводов является саха-

роза. Это главная транспортная форма углеводов у большинства растений. Другие сахара используются реже, обычно в виде добавок наряду с сахарозой.

Аминокислоты и витамины могут синтезироваться растительными тканями в условиях *in vitro* из сахаров и минеральных веществ. При добавлении этих веществ в среду они положительно влияют на экспланты, которые состоят из небольшого числа клеток (например, меристемы при оздоровлении картофеля от вирусов) или когда связь между клетками ослаблена (например, при индукции образования и выращивания каллуса).

При культивировании незрелых зародышей, особенно бобовых культур, в среды для лучшего роста добавляют большое количество аминокислот (глутамин и аспарагин). Витамины улучшают адаптацию тканей, улучшают рост.

Так как аскорбиновая кислота является антиокислителем и препятствует окислению фенольных соединений токсичных для растительных клеток и окрашивающих среду и ткани в темный цвет, ее концентрацию можно увеличить. Нужно помнить, что другие витамины могут проявлять фитотоксические эффекты (особенно тиамин) и превышать их концентрации не рекомендуется.

Фитогормоны не только стимулируют рост и деление клеток растений, но и направляют развитие экспланта в нужную сторону. Например, из одного и того же кусочка ткани можно получить в присутствии ауксинов корни, побеги - в присутствии цитокининов, каллус – при обоих гормонов в определенном соотношении. Кроме ауксина и цитокинина, в состав питательных сред иногда добавляют гиббереллин. Ингибиторы роста (абсцизовая кислота и этилен) применяются только в особых случаях.

В качестве желирующего вещества добавляют агар-агар - полисахарид, получаемый из морских водорослей. Он регулирует консистенцию среды, делая ее полужидкой или твердой. Это позволяет помещать растительную ткань на поверхность среды и обеспечивать тем самым одновременно хорошую аэрацию и снабжение элементами питания. Концентрация агар-агара при этом составляет всего около 0,7%. а при концентрации 0,5% среда становится полужидкой. Агар-агар не ингибирует рост растительных клеток в отличие от других желирующих агентов. Из неочищенного агар-агара выделены вещества, регулирующие

поступление воды в ткани растений, при их недостатке может наблюдаться явление витрификации - ткань поглощает избыток воды, становится прозрачной («стеклянной»), хрупкой и, в конце концов, погибает. Для предотвращения витрификации повышают концентрацию агарагара.

Существует большое количество составов питательных сред, сбалансированных по соотношению минеральных и органических компонентов. Одной из универсальной минеральной основы для питательных сред является минеральная часть среды Мурасиге - Скуга, содержащая повышенное количество азота и расширенный набор микроэлементов. Она является основой для большинства сред, применяемых в практике.

Последовательность и правила приготовления питательных сред

1. Минеральные среды готовят в повышенных концентрациях (обычно 10-20-ти кратных). Они могут храниться длительное время. Органические компоненты добавляют непосредственно перед стерилизацией, а в некоторых случаях уже в стерильную среду (например, спиртовые растворы фитогормонов и термолабильных соединений или стерилизованные фильтрованием растворы аминокислот).

2. Соли кальция при приготовлении исходных концентратов минеральных сред растворяют отдельно и добавляют к уже готовым средам. Это связано с присутствием в составе сред фосфатов и сульфатов, которые могут образовывать с кальцием малорастворимые соли и выпадать в осадок при высоких концентрациях исходных компонентов.

3. Некоторые микроэлементы используются в следовых количествах, и их навески трудно отобрать, поэтому их готовят в виде растворов с 1000 кратной или еще более высокой концентрацией. Причем желательно, чтобы соли меди и йодистый калий были разделены, так как при высокой концентрации возможна потеря микроэлементов виде осадка.

4. Чтобы железо было доступным для растительных клеток, раствор соли железа и ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) готовят в небольшом объеме воды отдельно, доводят до кипения для

завершения образования хелатного комплекса. Затем раствор прибавляют к концентрату минеральной среды.

5. pH среды доводят до величины $5,8 \pm 0,1$ с помощью раствора щелочи.

Для большинства учебных задач используются среды приготовленные на основе минеральной части среды Мурасиге-Скуга (табл. 1), которые отличаются между собой только составом органических компонентов.

Таблица 1

Состав среды Мурасиге-Скуга (среда МС) в мг/л

<i>Макроэлементы:</i>		<i>Микроэлементы:</i>	
KNO_3	1 900	H_3BO_3	6.2
NH_4NO_3	1650	$MnSO_4 \times 4H_2O$	22.3
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370	$ZnSO_4 \times 7H_2O$	8.6
KH_2PO_4	170	KJ	0.83
$CaCl_2 \times 2H_2O$	440	$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0.25
$Na_2ЭДТА$	37,3	$CuSO_4 \times 5 H_2O$	0.025
$FeSO_4 \times 7H_2O$	27,8	$CoCl_2 \times 6H_2O$	0.025
<i>Органические компоненты</i>			
Инозит 100			
Сахароза 30000			
Никотиновая кислота 0.5			
Пиридоксин 0.5			
Тиамин 0.1			
Аскорбиновая кислота 1.0			

Среда МС отличается повышенным содержанием элементов питания и полным набором микроэлементов, и обеспечивает максимальную скорость роста для культур большинства видов растений.

Вся работа с культурой тканей должна проводиться в стерильных условиях. Поэтому все среды, оборудование, материалы и части растений, помещаемые для культивирования на питательные среды, должны быть простерилизованы.

Методы стерилизации оборудования и материалов:

Посуда

- 1) Сухим жаром в сушильном шкафу при 160-170° 2 часа (кроме мерной посуды):
- 2) Автоклавирование при давлении 2 атм. 25-30 минут (в т.ч. мерную посуду).

Инструменты

- 1) Обжигание в пламени спиртовки в ходе работы:
- 2) Сухим жаром при 140° - 2 часа:
- 3) Автоклавирование
- 4) Кипячение (шприцы и сверл).

Материалы

- 1) Автоклавирование при давлении 2 атм. - 25-30 минут (вата, марля, фильтровальная бумага, ватные пробки и пр.).

Растительный материал

- 1) Ртутные препараты: 0,1% сулема (HgCl_2) и 0,1% диацид. Семена - 10-15 минут, растущие ткани - около 5 минут
- 2) 70% спирт
- 3) 13-20% H_2O_2
- 4) 3-6% хлорамин
- 5) 10% гипохлорит натрия

Рабочее место

- 1) Ламинарный стерильный шкаф
- 2) УФ облучение
- 3) 70% спирт
- 4) Работа в стерильной зоне пламени

Питательная среда

- 1) Автоклавирование при давлении 1 атм. (120°) - 15-20 мин.
- 2) Стерилизационное фильтрование через фильтры с пора-ми $\leq 0,45$ мкм:
- 3) Дробное кипячение (3 раза с интервалом в сутки).

Примечания:

1. Растительный материал стерилизуют только химическим способом. Для нежных растущих тканей, рекомендуется использовать препараты ртути, которые не проникают в растительные ткани, но необходимо промыть растительный материал 4-6 раз в стерильной воде.

2. 70% спирт (C_2H_5OH) хорошо проникает в ткани растений - время стерилизации листьев 1-2 секунды.

3. Семена можно стерилизовать разными веществами - 10-20 минут.

Контрольные вопросы

1. В чем состоят различия органов и клеток растений по потребности в элементах питания в условиях *in vitro* по сравнению с целым растением?

2. Какие группы веществ входят в состав питательных сред для растительных тканей?

3. Перечислить 5 правил приготовления питательных сред.

4. Как можно стерилизовать растительный материал перед началом его культивирования *in vitro*?

5. Какие существуют способы стерилизации питательных сред?

6. Как обеспечить стерильность на рабочем месте?

Тема: КУЛЬТУРА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

Каллус- ткань, состоящая из неорганизованно делящихся частично или полностью дедифференцированных растительных клеток. Образование каллусной ткани и ее рост происходит благодаря одновременному взаимодействию фитогормонов ауксинов и цитокининов. В качестве ауксина обычно используют 2,4-Д. Повышенная концентрация приводит к дедифференцировке клеток на стадии индукции каллусообразования, а последующее интенсивное клеточное деление происходит под влиянием цитокининов совместно с ауксинами.

Используя в качестве первичных эксплантов практически любые части растения можно получить каллусную ткань

Эксплант - любой фрагмент растительной ткани или орган, перенесенный на питательную среду для культивирования *in vitro* (т.е. в пробирке, вне растения).

Работа 2. Получение и культивирование каллусной ткани из корнеплодов моркови и клубней картофеля

Из корнеплодов моркови легко получить каллусную ткань. Каллус может расти длительное время и не терять способности к делению клеток и регенерации растений даже при большом количестве пересадок (пассажей) на новую питательную среду. Морковный каллус был одной из первых, хорошо растущих каллусных культур (Готре, 1939 год).

Из каллусной ткани моркови можно получать суспензионную культуру клеток, в которой индуцируется образование соматических эмбриоидов, то есть клеточных образований, сходных с зиготическими зародышами.

Суспензионная культура - мелкие агрегаты растительных клеток, сходных с каллусными, растущими в жидкой питательной среде при перемешивании. Каллусные и суспензионные культуры клеток используют для:

- клеточной селекции на полезные признаки;
- размножения растений путем регенерации;
- производства физиологически активных веществ, накапливающихся в каллусах или культуральной жидкости;
- генетической инженерии.

В биотехнологии картофель один из самых популярных объектов. Из различных его тканей, и даже из протопластов, можно легко получить каллус и регенерировать целые растения. Методы генетической инженерии также отработаны для картофеля. В настоящее время активно проводятся работы по получению трансгенных растений картофеля, устойчивых к колорадскому жуку, гербицидам, вирусам, обладающим новыми свойствами.

Как у моркови, так и у картофеля каллус образуется из различных частей растения, но этот процесс идет интенсивней в области первичных и вторичных меристем, камбия, примыкающей к сосудистым пучкам и меристемам паренхимы, и вообще на стыках различных тканей.

Цель работы: Индукция и получение каллусов пригодных для регенерации растений.

Материалы и оборудование: корнеплоды моркови и клубни картофеля; автоклавированные листы фильтровальной бумаги; стерильные стаканы, чашки Петри, пробирки; автоклавированная среда МС; растворы фитогормонов кинетин и 2,4-Д; спирт для стерилизации растительной ткани; скальпель, пинцеты; спиртовая горелка.

Ход работы:

1. Разогреть на плитке среду для культивирования каллусов, содержащую кинетин и 2,4-Д в концентрации 2 мг/л. разлить ее по пробиркам.

2. Отобрать здоровые корнеплоды моркови и клубни картофеля тщательно промывают водопроводной водой, затем на 5 минут погружают в 70% этанол для стерилизации.

3. Кусочки растительной ткани обсушивают между слоями стерильной фильтровальной бумаги. Поверхностные слои, обожженные спиртом, обрезают скальпелем.

4. Из внутренней части корнеплода моркови и части клубня картофеля, прилегающей к глазкам, нарезают экспланты толщиной около 1 мм и площадью 20-50 мм².

5. Экспланты помещают на питательную среду так, чтобы одна поверхность оставалась не погруженной в среду, а апикальная сторона контактировала со средой. При таком расположении каллус начинает расти быстрее. Желательно, чтобы эксплант содержал различные ткани.

6. Каллусы растут в термостате при температуре 25-50°C в течение 3-4 недель. Полученные каллусные ткани нужно рассмотреть, описать и зарисовать. Сравнить различные каллусы картофеля и моркови, возникшие из разного типа тканей.

Контрольные вопросы

1. Что такое каллус?
2. Что такое эксплант?
3. Какие условия необходимы для индукции каллусообразования?
4. Из каких клеток состоит каллус?
5. Что такое суспензионная культура?
6. Для чего применяются суспензионные и каллусные культуры?

Задания в тестовой форме

1. В состав питательной среды входят основные компоненты:
 1. Минеральные соли;
 2. Минеральные соли, витамины;
 3. Минеральные соли, витамины, гормоны;
 4. Минеральные соли, витамины, гормоны, источник углеродного питания;
 5. Минеральные соли, витамины, гормоны, источник углеродного питания, агар.
2. Для стерилизации питательных сред применяется:
 1. Кипячение;
 2. Автоклавирование;
 3. Выдерживание в термостате;
 4. Обработка УФ;
 5. Обработка γ -лучами
3. Для автоклавирования питательной среды необходимо:
 1. 10 мин;
 2. 20 мин;
 3. 30 мин;
 4. 40 мин;
 5. 50 мин

4. Для стерилизации растительного материала используют:

1. Йод;
2. Зеленку;
3. Спирт;
4. Сулему;
5. Обжигают над пламенем спиртовки

5. Молодые, активно растущие ткани выдерживают в стерилизующем растворе:

1. 10-12 мин;
2. 3-5 мин;
3. 15-18 мин;
4. 8-10 мин;
5. 18-20 мин

6. Одревесневший ткани стебля выдерживают в стерилизующем растворе:

1. 2-4 мин;
2. 4-6 мин;
3. 6-8 мин;
4. 8-10 мин;
5. 10-15 мин

7. Для ингибирования развития внутренней инфекции в тканях растений применяют:

1. Антибиотики;
2. Антитранспиранты;
3. антиоксиданты;
4. Адсорбенты;
5. ВСЕ перечисленные вещества

8. За процесс каллусогенеза отвечают:

1. Цитокинины;
2. Гиббереллины;
3. Ауксины;
4. Абсцизовая кислота;
5. Брассиностероиды

РАЗДЕЛ 2. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ И ОЗДОРОВЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ

Тема: Клональное микроразмножение и оздоровление растений

Клональное микроразмножение растений - это современный биотехнологический вариант вегетативного размножения растений, осуществляемый с помощью культивирования миниатюрных растений на питательных средах *in vitro*.

При соблюдении необходимых условий этот метод дает возможность получить генетически однородное потомство, идентичное исходному растительному материалу, как и при традиционном вегетативном размножении.

Преимущества клонального микроразмножения:

- высокий коэффициент размножения (10^6 для травянистых растений и до 10^4 - 10^5 для древесных растений в год);
- приводит к оздоровлению растений от бактериальных, грибковых, а во многих случаях и от вирусных заболеваний;
- возможность размножать растения, вегетативное размножение которых обычными методами невозможно или затруднено (например, многие пальмы, древесные лесные и декоративные породы, орхидеи и др.);
- размножение растений в течение круглого года;
- возможность содержания на ограниченной площади обширных генетических коллекций различных культур в виде пробирочных растений;
- значительная экономия места и энергии по сравнению с вегетативным размножением растений в теплицах;
- удобство транспортировки пробирочных растений, наиболее полное удовлетворение требований карантинных инспекций, особенно при зарубежных поставках.

Работа 3. Клональное микроразмножение малины, земляники и других культур

Клональное микроразмножение включает 4 основных этапа работы:

1) взятие эксплантов от исходных, предварительно отобранных элитных растений, которые требуется размножить: помещение их на питательную среду и получение из них единичных побегов, луковичек и других зачатков растений.

2) собственно размножение. Регенерировавшие из первичного экспланта морфоструктуры, чаще всего побеги, подвергаются размножению до требуемых количеств. Чаще всего при этом не наблюдается полной регенерации растения, например, побеги не имеют корней, и поэтому после размножения переходят к следующим этапам.

3) укоренение полученных побегов на питательных средах, получение целого растения.

4) перенос укоренившихся растений в твердый субстрат; адаптация их к не стерильным условиям, солнечному излучению и пониженной влажности воздуха после роста в пробирке. Только после этого растения можно переводить в открытый грунт.

Различают несколько типов клонального микроразмножения:

а) под действие цитокинина происходит увеличение количества побегов за счет снятия апикального доминирования и пробуждения пазушных почек;

б) простое черенкование путем разрезания исходных побегов на черенки (обычно по два междоузлия) - снятие апикального доминирования путем удаления верхушки и получения новых побегов за счет пробуждения пазушных почек. При этом могут использоваться невысокие концентрации цитокининов и ауксинов для ускорения процесса, или даже безгормональная среда. Коэффициенты размножения при этом, как правило, гораздо ниже, чем в предыдущем варианте, но растения могут получаться сразу с корнями и этап укоренения может быть опущен;

в) размножение путем закладки адвентивных почек и затем образования из них адвентивных побегов. Этот процесс идет вблизи места контакта экспланта с поверхностью среды и вызывается повышенными концентрациями цитокинина;

г) образование микроклубней, микролуковичек, и других зачатков растений, также стимулируемая цитокинином.

В некоторых руководствах выделяют пятый тип клонального микроразмножения - путем регенерации растений из каллуса. При этом возникают генетически и фенотипически различные

растения даже если каллус был получен из одного растения (сомаклональная вариабельность).

На этапе собственно размножения питательные среды должны содержать цитокинин, а на этапе укоренения ауксин.

Таблица 2. Состав питательной среды для этапов размножения и укоренения растений

<i>Среда для размножения малины</i>		<i>Среда для укоренения</i>	
Минеральная часть среды	МС	Минеральная часть среды	МС разбавленная вдвое, мг/л
Сахароза	30000	Сахароза	20000
Инозит	100	Инозит	-
Аскорбиновая кислота	1.0	Аскорбиновая кислота	1.0
Пиридоксин (В ₆)	0.5	Пиридоксин (В ₆)	0.5
Тиамин (В ₁)	0.1	Тиамин (В ₁)	0.1
Цитокинин (6- БАП)	1.5	Ауксин	0.75
Агар-агар	7000	Агар-агар	7000

Цель работы: Ознакомиться с современными методами клепального микроразмножения.

Материалы: пробирочные растения разных видов для демонстрации различных типов клонального микроразмножения, пробирки с исходным стерильным растительным материалом, питательные среды для клонального микроразмножения и для укоренения, автоклавированные кружки фильтровальной бумаги, спирт для горения спиртовки, спирт для стерилизации и обжигания инструментов.

Оборудование: электроплитка, ламинарный шкаф для стерильной работы, стерильные пробирки с пробками или колпачками -15-20 шт., стерильные стаканы на 100-150 мл (2 шт.) с отметками на 25, 50 и 75 мл, стаканчик на 50 мл для спирта, спиртовка, стерильная чашка Петри, глазной пинцет 2 шт., крючок и скальпель.

Ход работы:

1. Рассмотреть пробирки с культурами разных видов расте-

ний, различающихся по типу размножения (например: малина, земляника, картофель). Зарисовать схематически различные типы клонального микроразмножения.

2. Агаризованную среду для клонального микроразмножения расплавить на электроплитке и разлить по пробиркам. Если среда еще не содержит цитокининов, в расплавленную среду добавить спиртовой раствор гормона. Параллельно разлить среду для укоренения побегов, содержащую ауксин.

3. Выросший растительный материал извлечь среди стерильной зоны пламени спиртовки из пробирки пинцетом или длинным крючком, в зависимости от ее размера и поместить растения на кружок стерильной фильтровальной бумаги, вложенный в чашку Петри, которая размещается также близи пламени.

4. Конгломерат побегов и почек, извлеченный из пробирки с помощью стерильных пинцета и скальпеля, разделить на отдельные побеги и небольшие группы почек. Длинные побеги разрезать на черенки, содержащие не меньше двух междоузлий.

5. Полученные экспланты поместить с помощью крючка и пинцета на поверхность застывшей питательной среды, углубляем их концы в среду на 3-5 мм в зависимости от размера экспланта. Побеги разместить наклонно для лучшего контакта со средой, по 2 экспланта на пробирку. Перед посадкой в каждую очередную пробирку инструменты обжигать в пламени спиртовки и давать им остыть.

6. Крупные побеги поместить на среду для укоренения.

7. Спустя 3-4 недели рассмотреть и зарисовать происходящие с эксплантами изменения. Рассчитать процент пробирок с микробиологическим зарастанием.

Контрольные вопросы

1. В чем состоят сущность и преимущество клонального микроразмножения?

2. Перечислите этапы клонального микроразмножения.

3. Какие типы клонального микроразмножения можно выделить по поведению растений на этапе собственно размножения?

4. Какие фитогормоны, и на каких этапах применяются?

5. Какие эффекты вызывают цитокинины и ауксины?

6. Почему при клональном микроразмножении следует избегать образования каллуса?

7. Какие меры для этого можно принять?

Работа 4. Введение новых генотипов растений в культуру in vitro. Выделение и культивирование точек роста и меристем растений в качестве первичных эксплантов

Меристемы и апексы растений используют в качестве первичных эксплантов для клонального микроразмножения и для оздоровления растений от вирусной инфекции.

При введении в культуру in vitro для клонального микроразмножения новых видов и сортов растений используют разные экспланты:

- почки и меристемы растений,
- незрелые зародыши,
- зрелые зародыши,
- стерильные проростки,
- части цветка, листья, отрезки стеблей, корни.

Для освобождения от вирусов выделяют слишком маленькие точки роста или меристемы, в другом случае более крупные экспланты значительно легче адаптируются к условиям культуры, меньше гибнут и быстрее растут. Культивировать меристемы необходимо на богатых питательных средах с добавлением витаминов и фитогормонов, из которых наиболее важны цитокинины. Пример состава питательной среды для культивирования меристем в мг/л:

Для меристем земляники:

Минеральная часть МС, разбавленная в 2 раза

Никотиновая кислота	0.5
Аскорбиновая кислота	1.0
Глюкоза (или сахароза)	20000
Тиамин (В ₁)	0.5
Цитокинин (6-БАП)	0.5
Пиридоксин (В ₆)	0.5
Агар-агар	7000

Для культивирования меристем смородины, малины и других ягодных культур применяются аналогичные среды, но на основе неразбавленной среды МС. В результате проведенных в лаборатории биотехнологии БГАУ исследований, для культивирования меристем предложены среды содержащие вместо 6-БАП по 0,05-0,2 мг/л цитокининов ряда дифенилмочевины, например тидиазурон или пиридилфенилмочевина. Эти среды дают гораздо лучшие результаты, особенно для генотипов, меристемы которых полностью погибают на стандартных средах.

Цель работы: Ознакомиться с методикой выделения точек роста земляники, как важнейшим этапом начала клонального микроразмножения растений.

Материалы: автоклавированные среды для культивирования меристем, 0,1% раствор сулемы, стерильные кружки фильтровальной бумаги, стерильная дистиллированная вода, спирт для стерилизации инструментов и горения спиртовки, растительный материал для выделения меристем.

Оборудование: Стереомикроскоп с максимальным увеличением не менее 28 (МБС-10), стерильные пробирки, стерильный стакан на 50, 100 и 150 мл, электроплитка, спиртовка, пинцет, скальпель, препаровальная игла.

Ход работы:

1. Разлить по пробиркам предварительно расплавленную на электроплитке питательную среду для культивирования меристем.

2. Розетки земляники отмыть в воде; с них обрезать все корни и листья с частью прилистников. Побеги со спящими почками розы, смородины, вишни и других древесных культур нарезать на черенки длиной 3-5 см, а с почек удалить самые верхние чешуйки.

3. Подготовленный растительный материал стерилизовать 0,1% раствором сулемы в течение 5 мин и затем промыть 4-6 раз стерильной дистиллированной водой и обсушить стерильной фильтровальной бумагой.

4. Под стереомикроскопом последовательно удалить с розеток земляники зачатки листьев и прилистники сначала при увеличении 14, а затем 28. Препаровальной иглой, заточенной как

торцевой нож, подрезать меристематический купол и перенести на питательную среду.

На почках древесных культур сделать надрез в виде полукольца, не доходящий до срединной почки, на уровне примерно одной трети ее высоты от основания. Откинуть вверх сразу все подрезанные чешуйки и обнажить меристему и выделить с листовыми и цветочными зачатками. Изнутри почки являются стерильными, и чтобы не занести внутрь инфекцию, по мере удаления чешуй или листовых зачатков инструменты стерилизуют несколько раз, обжигая их в пламени спиртовки.

5. Культивировать меристемы до получения побегов. Пронаблюдать и зарисовать развивающиеся меристемы через 2, 4 и 6 недель.

Контрольные вопросы

1. Что такое первичный эксплант?
2. Какие типы первичных эксплантов применяются при клональном микроразмножении?
3. Какие преимущества имеет использование меристем?
4. Как добиться стерильности выделенных меристем?
5. Какие фитогормоны используются для культивирования меристем?

Работа 5. Оздоровление растительного материала от вирусной инфекции. Выделение и культивирование меристем картофеля

Для оздоровления растительного материала от вирусной инфекции используют меристемы. Выделяют пять основных этапов:

1. Отбор исходного растительного материала для оздоровления. Экспланты выделяют с растений, имеющих выраженные признаки сорта и, по возможности, в меньшей степени зараженных патогенами.

2. Термообработка (термотерапия) растений (вегетативных и генеративных органов), что способствует полному уничтоже-

нию некоторых видов вирусов или снизить концентрации оставшихся и расширить свободные от вирусов зоны вокруг меристем. Для разных культур и сортов режимы термообработки различаются. Длительность этапа от 2 недель до нескольких месяцев, при постоянной или периодически повышенной температуре, лежащей в диапазоне 36-45 °С.

3. Выделение меристем. Так как клетки меристемы способны быстро делиться, поэтому резко уменьшается количество плазмодесм (цитоплазматических мостиков) между клетками, что затрудняет движение вирусов из зараженных в соседние здоровые клетки. Размер зоны, свободной от вирусов, зависит от оздоравливаемой культуры. Например, для картофеля размер вычлняемых меристем не должен превышать 0,1-0,2 мм.

4. Химиотерапия с применением антивирусных препаратов. В питательные среды для культивирования меристем добавляют ферменты, разрушающие вирусные нуклеиновые кислоты (рибонуклеазу А и другие нуклеазы), и вещества ингибирующие размножение вируса, большинство из которых представляет собой синтетические аналоги или производные нуклеотидов. В некоторых случаях исходный материал также обрабатывается антивирусными веществами.

5. Тестирование клонов на наличие вирусов и вириодов. Эта работа проводится после регенерации из меристемы побега и первого цикла его размножения до нескольких штук. Отдельно анализируется каждый клон, полученный из единственной меристемы. Если доказано, что клон не содержит инфекции, его включают в программу дальнейшего широкомасштабного размножения элитного сортового материала.

Применяют два современных метода анализа патогенов: иммуноферментный и полимеразную цепную реакцию (ПЦР-метод). Первый из них является наиболее современным, чувствительным и точным вариантом серологического теста, основанного на специфическом взаимодействии антител с белковыми компонентами, входящими в состав патогена. Поэтому этот метод не пригоден для вириодов, которые не содержат молекулы белка. ПЦР-метод непосредственно определяет присутствие генетического материала патогена (т.е. нуклеиновой кислоты) и поэтому является полностью универсальным и очень чувствительным.

После оценки содержания вирусов и вириодов и отбора здоровых клонов пробирочных растений приступают к массовому клональному микроразмножению этих растений, получению из них исходного материала, затем супер-суперэлиты и далее по стандартной схеме производства высококачественного посадочного материала картофеля.

Культивирование меристем осуществляется на богатых питательных средах с добавлением витаминов и фитогормонов, из которых наиболее эффективны цитокинины.

Состав питательной среды для культивирования меристем картофеля в мг/л:

Минеральная часть МС			
Сахароза	20000	Фолиевая к-та	0,5
Глюкоза	20000	Рибофлавин	0,5
Гидролизат казеина	1000	Биотин	1,0
Мезоинозит	100	Пантотенат	10
Тиамин	1	Цианкобаламин	0,015
Пиридоксин	1	Аденин	40
Никотиновая к-та	2	Кинетин	0,5
Уголь активированный	10000	Гиббереллин	1,0
		Агар-агар	7000

Цель работы: Ознакомиться с методикой выделения меристем картофеля, как составной частью системы его оздоровления.

Материалы: автоклавированные среды для культивирования меристем, 0,1% раствор сулемы, стерильные кружки фильтровальной бумаги, стерильная дистиллированная вода, спирт для стерилизации инструментов и горения спиртовки, растительный материал для выделения меристем.

Оборудование: Стереомикроскоп с максимальным увеличением не менее 28 (МБС-10), стерильные пробирки, стерильный стакан на 50, 100 и 100 мл с делениями, электроплитка, спиртовка, глазной пинцет, скальпель, препаровальная игла.

Ход работы:

1. Разлить по пробиркам предварительно расплавленную на электроплитке питательную среду для культивирования меристем. На поверхность застывшей среды прилить 30 мкл раство-

ра РНКазы А, стерилизованной дробным кипячением (этот фермент является термостойким), или другого антивирусного вещества в концентрациях, указанных преподавателем.

2. Ростки картофеля отделить от клубней и укоротить до размера 3-5 см. При оздоровлении от вирусов использовать только апикальные меристемы.

3. Подготовленный растительный материал стерилизовать 0,1% раствором сулемы в течение 5 минут, затем промыть 3-4 раза стерильной дистиллированной водой и обсушить стерильной фильтровальной бумагой.

4. Под стереомикроскопом последовательно удалить с апикальной части ростков картофеля зачатки листьев сначала при увеличении 14, а затем 28, стерилизуя несколько раз инструмент в пламени спиртовки по мере приближения к меристеме. Препаровальной иглой подрезать меристематический купол, обычно с одним очень мелким начинающим развиваться листовым примордием, так чтобы ее размер не превышал 0,1-0,2 мм и перенести на питательную среду.

5. Культивировать меристемы до получения побегов. Пронаблюдать и зарисовать их развитие через 2, 4 и 6 недель.

Контрольные вопросы

1. Перечислите этапы освобождения растительного материала от вирусов.

2. Почему меристемы оказываются свободными от вирусов?

3. Какого размера должны быть выделенные меристемы?

4. Какие методы применяются для обнаружения вирусов и вироидов в растительных тканях?

5. В чем заключается разница строения этих двух типов патогенов и как это сказывается на применимости методов их анализа?

Тема: Вторичный морфогенез в культуре недифференцированных тканей растений

Недифференцированные клетки растений в каллусной и суспензионной культурах сохраняют свойство тотипотентности. Это свойство складывается из:

1) наличия полного набора генетического материала в растительных клетках (исключением являются ситовидные клетки флоэмы некоторых видов растений),

2) способности клетки растения легко переходить из дифференцированного состояния в недифференцированное и наоборот, приводящей к образованию всех типов тканей,

3) потенциально неограниченной способности растительной клетки к делению.

Получение растений из недифференцированных тканей бывает необходимо для самых разнообразных целей, например:

- при использовании культуры тканей для повышения разнообразия исходного материала при селекции за счет соматической варибельности вместо мутагенеза,

- для размножения растений,

- для получения устойчивых растений после клеточной селекции,

- для получения трансформированных растений при генетической инженерии.

Морфогенез в каллусной и суспензионной культуре может идти несколькими путями:

1) образование соматических эмбриоидов, то есть образований, морфологически схожих с обычными зиготическими зародышами, возникающими при половом процессе, но в отличие от них формирующихся из соматических клеток,

2) органогенез, который бывает:

а) стеблевой, с образованием побега,

б) флоральный, с образованием цветка,

в) корневой, с образованием корней.

Для регенерации целого растения практическое значение имеет только два пути:

- стеблевой органогенез с последующим укоренением побегов на среде с ауксином,

- образование соматических зародышей.

Получение соматических эмбриоидов так же применяется для получения искусственных семян, представляющих собой соматический эмбрионд, окруженный специальными синтетическими оболочками, содержащими питательные вещества, стимуляторы, фунгициды.

Работа 6. Регенерация растений из каллусных культур картофеля и моркови

Для индукции морфогенеза в каллусной ткани ее пересаживают на другую питательную среду при этом необходимо изменить гормональный баланс, а во многих случаях и концентрации органических питательных веществ. При изменении гормонального баланса из питательной среды исключают 2,4-Д или заменяют его на пониженную концентрацию более мягкого ауксина (ИУК), так же подбирают концентрацию цитокинина, который стимулирует морфогенез. Чтобы дальнейший рост каллуса не происходил, необходимо снизить концентрацию углеводов, а уровень азотного питания нужно усилить, поскольку синтез белка необходим для начала процесса регенерации. Для стимуляции этих процессов в среду можно добавить гидролизат белка.

Большое значение при этом имеют видовые и сортовые особенности регенерации растений. Регенерация в каллусе моркови начинается при удалении 2,4-Д, на безгормональной среде или в присутствии небольшой концентрации цитокинина, а регенерация в каллусах пшеницы и других злаков возможна только при дополнительном подавлении роста каллуса с помощью абсцизовой кислоты.

Одна из сред, рекомендована для регенерации из каллусной ткани картофеля:

Среда для регенерации побегов из каллуса картофеля
(в мг/л):

Минеральные компоненты среды МС

Гидролизат казеина	1000	Биотин	0.05
Аденин	40	Фолиевая к-та	0.5
Инозит	100	Зеатин	1.0
Пиридоксин	0.5	ИУК	0.1
Глицин	2.0	Сахароза	2.4
Никотиновая кислота	5.0	Глюкоза	10.0
Тиамин	0.5	Маннит	36.4

Цель работы: Получить растения регенеранты из каллусных тканей.

Материалы: каллусная ткань из корнеплодов моркови и клубней картофеля; стерильные листы фильтровальной бумаги; стерильные среды для регенерации побегов на основе МС.

Оборудование: стерильные стаканы; стерильная чашка Петри; стерильные пробирки; скальпель, пинцеты; спиртовая горелка.

Ход работы:

1. Разлить по пробиркам питательные среды для регенерации.

2. Извлечь каллусы из пробирки и положить на кружки стерильной фильтровальной бумаги в чашки Петри. С помощью стерильного инструмента расчленить их на фрагменты размером около 0,5 см.

3. Кусочки каллуса для регенерации нужно поместить на поверхность застывшей питательной среды.

4. Наблюдать в течение 2, 4, 6 и 8 недель, отметить и зарисовать последовательное образование уплотнений, окрашенных в зеленый цвет, меристематических очагов и побегов.

5. Образовавшиеся побеги для укоренения перенести на среду.

6. В случае образования эмбриоидов, а это возможно для каллусов моркови, рассмотреть их под микроскопом и периодически наблюдать за их развитием.

Контрольные вопросы

1. Что такое тотипотентность?

2. Почему из соматической клетки растений можно получить целый организм, а из клетки животных – нет?

3. Какие пути регенерации растений представляют практический интерес?

4. Что такое искусственные семена?

5. Какие изменения нужно внести в состав питательной среды, чтобы индуцировать морфогенез?

Задания в тестовой форме

1. Клональное микроразмножение растений это разновидность:
 1. Семенного размножения;
 2. Вегетативного размножения;
 3. Все перечисленные выше

2. В результате клонального микроразмножения получают растения:
 1. Генетически идентичные между собой;
 2. Генетически идентичные между собой и растением-донором;
 3. Генетически неоднородные между собой;
 4. Генетически неоднородные между собой и растением-донором;
 5. Все перечисленные выше

3. Клональное микроразмножение имеет этапов:
 1. 2;
 2. 3;
 3. 4;
 4. 5;
 5. не ограничено

4. Коэффициент размножения при клональном микроразмножении картофеля в течение года:
 1. 100 растений;
 2. 1000 растений;
 3. 10000 растений;
 4. 100000 растений;
 5. 1000000 растений

5. Орган, который изолируют с интактного растения с целью получения оздоровленного посадочного материала:
 1. Стебель;
 2. Почка;
 3. Меристема побега;
 4. Корень;
 5. Меристема корня

6. Для оздоровления посадочного материала от необходимо применять:

1. Хемиотерапию;
2. Термотерапию;
3. Изолирование меристем;
4. Все приемы перечисленные выше

7. Метод клонального микроразмножения, который подразумевает получение всегда генетически однородного посадочного материала:

1. Индукция образования адвентивных почек;
2. Соматический эмбриогенез;
3. Активация развития существующих меристем;
4. Дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани;
5. Все перечисленные выше

8. Этап укоренения отсутствует при использовании метода клонального микроразмножения:

1. Индукции образования адвентивных почек;
2. Соматического эмбриогенеза;
3. Активации развития существующих меристем;
4. Дифференциации адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани;
5. Все перечисленные выше

РАЗДЕЛ 3. ОСНОВЫ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Тема: Основные закономерности гормональной регуляции физиологических процессов растений. Понятие о биотестах

Работа 7. Влияние фитогормонов на рост и позеленение семядолей люпина и тыквы

Фитогормоны - физиологически активные вещества, действующие в чрезвычайно низких концентрациях, которые вырабатываются в самих растениях. Они могут воздействовать как

вблизи места синтеза, так и транспортироваться в удаленные части растения и регулировать жизнедеятельность других органов.

Фитогормоны участвуют в регуляции следующих процессов:

- фотосинтез,
- рост тканей (как за счет деления, так и растяжения клеток),
- транспорт питательных веществ (регулируют интенсивность и направление потока),
- транспирация (открывают и закрывают устьица),
- закладка новых органов (в том числе вызывают переход к цветению и определяют пол цветков, индуцируют появление корней),
- опадения органов и созревания плодов, переход к покою и пробуждению и т.д.

Эти процессы имеют важное значение для практики, поскольку непосредственно связаны с урожайностью сельскохозяйственных культур и при воздействии на гормональную систему растений, можно регулировать эти процессы в желательном для человека направлении.

Почти любые части и органы растений могут реагировать на фитогормоны. В лабораторных условиях одними из удобных систем отражающих воздействие гормонов на рост и позеленение являются изолированные части семян, в частности семядоли двудольных растений. При прорастании из осевых частей растений в семядоли поступает цитокинин, который синтезируется в корне. В семядолях он стимулирует активность гидролитических ферментов, которые вызывают переход в растворимую форму запасных веществ, что усиливает накопление хлорофилла, деление и растяжение клеток, выражающиеся в увеличении площади и массы семядолей. Таким образом, по мере роста осевой части проростка и, в строгом соответствии с этим процессом семядоли снабжают их питательными веществами из имеющихся запасов, а сами семядоли при этом превращаются в зеленые фотосинтезирующие семядольные листья. Если семядоли изолировать приток цитокинина к ним прерывается, и их рост и позеленение резко замедляется, в тоже время они проявляют высокую чувствительность к добавляемому экзогенно цитокинину.

В регуляции одного и того же процесса у растений могут участвовать фитогормоны различных групп. При этом они могут усиливать или ослаблять действие друг друга.

Принцип гормональной регуляции у растений - регуляция процесса в обе стороны – т.е. и стимуляции процесса и его затормаживание (ингибирование). Только тогда процесс можно считать полностью регулируемым.

Роль тормозящего фактора могут играть все фитогормоны, но наиболее часто в качестве ингибитора выступает абсцизовая кислота (АБК). Она может подавлять протекание самых различных физиологических процессов у растений, препятствует действию фитогормонов, стимулирующих эти процессы, - то есть является их антагонистом. В частности, АБК тормозит процессы, связанные с прорастанием, замедляет рост и позеленение семян, снимает стимулирующий эффект цитокинина.

Еще одна закономерность действия фитогормонов, которую также можно продемонстрировать в условиях лаборатории на изолированных семенах растений, это количественная зависимость эффекта от концентрации гормона. Такие концентрационные зависимости выражаются графически в виде кривых характерной формы. Наличие биологического объекта, реагирующего на фитогормон с высокой чувствительностью и избирательностью, позволяет по физиологическому эффекту судить о наличии и примерной концентрации этого гормона. Эта идея легла в основу для разработки биологических тестов на фитогормоны, одного из способов качественного и количественного анализа этих соединений по реакции биологических объектов.

Цель работы: продемонстрировать некоторые важнейшие принципы гормональной регуляции процессов у растений - во-первых, взаимодействие органов растений посредством фитогормонов; во-вторых, участие разных гормонов в регуляции одного процесса; в третьих, принцип сочетания положительной и отрицательной регуляции; в четвертых, количественную зависимость эффекта от концентрации гормона. Дать понятие о биотестах как методе определения фитогормонов.

Материалы и оборудование: набухшие семена тыквы и люпина, чашки Петри с кружочками фильтровальной бумаги, скальпель, пинцеты, торсионные весы, мерный цилиндр на 25 или 50 мл, растворы фитогормонов, автоматические дозаторы (автосамплеры) со сменными наконечниками.

Ход работы:

1. Снять кожуру с набухших семян и изолировать семядоли люпина и тыквы, тщательно удалив осевые части зародыша, из расчета 10 и 5 семядолей на вариант соответственно;

2. Пронумеровать чашки Петри согласно вариантам опыта, положить в них кружки фильтровальной бумаги и начертить сетку.

3. Взвесить семядоли люпина и тыквы, разложить их внутренней стороной вверх на фиксированные места в ячейки сетки и записать в таблице (на отдельном листе) вес каждой семядоли в порядке, соответствующем положению ячейки для каждого варианта опыта. Сохранить результаты взвешивания до следующего занятия.

4. Приготовить растворы фитогормонов из расчета 10 мл на чашку Петри согласно вариантам опыта:

Схема опыта	2,0
1. контроль	5,0
2. цитокинин (6- БАП)	-
3. -//-	7. АБК
4. -//-	8. -//-
5. -//-	9. АБК+БАП
6. X	
Концентрация мг/л	1,0+1,0
вода	2,0
0,5	1,0
1,0	

Примечание: X - неизвестная концентрация цитокинина (добавляет преподаватель), ее необходимо определить.

5. Осторожно залить растворы в чашки с соответствующими номерами так, чтобы семядоли не изменили своего положения. Оставить чашки до следующего занятия на горизонтальной поверхности при комнатной температуре и одинаковом умеренном освещении.

6. На следующем занятии рассмотреть семядоли в чашках, оценить визуально их размер и степень позеленения по сравнению с водным контролем и целыми проростками. Сделать выводы о воздействии на семядоли их изоляции, эффектах цитокинина и АБК, характера взаимодействия гормонов, основных принципах функционирования гормональной системы растений.

Контрольные вопросы

1. Какова роль гормональной системы растений?
2. Назовите основные принципы гормональной регуляции у растений.
3. Как действует цитокинин на семядоли растений?
4. Какой характер имеет взаимодействие цитокинина и АБК при развитии семядолей?
5. Почему опыт проводят на изолированных семядолях?
6. В чем состоит принцип определения фитогормонов биотестами?

Работа 8. Определение концентрации цитокинина с помощью биологического теста (биотеста) по росту и позеленению изолированных семядолей растений

Биотест - метод качественного и количественного определения физиологически активных соединений с помощью биологических объектов, специфически реагирующих на эти вещества.

Для проведения биотестов решающее значение имеет выбор биологической системы. Она должна удовлетворять целому ряду требований:

1. Проявлять реакцию на гормон в виде физиологического эффекта, хорошо заметного визуально или легко измеряемого в широком диапазоне концентраций, причем эта реакция должна развиваться достаточно быстро в течение нескольких часов или дней, но не многих недель или месяцев;
2. Обладать достаточно высокой чувствительностью, то есть проявлять значительный эффект при низких концентрациях гормонов;
3. Иметь высокую избирательность - присутствие других веществ не должно слишком сильно влиять на биологическую реакцию;
4. Достаточно хорошо воспроизводится при небольших колебаниях условий и так далее.

Реакция роста и позеленения семядолей люпина и растений семейства тыквенных хорошо отвечает этим требованиям. Важно отметить, что она является довольно высоко избирательной

по отношению к цитокинину и АБК по сравнению со многими другими биологическими системами; остальные фитогормоны - ауксин и гиббереллин - влияют на физиологический эффект незначительно и не мешают определению.

Для анализа фитогормона подобраны системы, наиболее удобные и отвечающие основным требованиям для биотестов.

Фитогормоны	Объекты, используемые для анализа
Ауксин	а) удлинения отрезков coleoptилей пшеницы; б) изгиба coleoptилей овса; в) укоренения черенков
Цитокинин	а) рост и позеленение изолированных семядолей; б) задержку старения срезанных листьев ячменя; в) стимуляцию накопления цианиновых красителей у проростков амаранта; г) стимуляция роста каллуса и др.
Гиббереллин	а) удлинение стеблей проростков карликовых форм гороха, кукурузы и других культур; б) стимуляция прорастания семян некоторых сортов салата
Этилен	а) опадения черешков листьев фасоли; б) ускорения созревания плодов томатов
АБК	а) скорость и степень закрывания устьиц при нанесении капли испытуемого раствора; б) ингибирование роста и позеленения семядолей; в) торможение удлинения отрезков coleoptилей пшеницы

Для количественной или полуколичественной оценки уровня фитогормонов определяют зависимость биологического ответа от концентрации чистого фитогормона, используемого в качестве стандарта, и строят график этой зависимости. Полученные кривые называют калибровочными и используют для определения неизвестных концентраций гормона по его эффекту. Если на осях отложить величины в обычном линейном масштабе, то кривые принимают характерную "колоколообразную" форму, а если использовать на осях логарифмы концентрации или вычисляемые через них величины, начальная часть кривой превращается в прямую и это значительно упрощает графическую обработку результатов и повышает их точность.

Контрольные вопросы

1. Что такое биотест?
2. Каким требованиям должна удовлетворять биологическая система, используемая для биотеста?
3. Как определить концентрацию фитогормона по его биологическому эффекту?
4. Какие биотесты применяются для основных классов фитогормонов?

Тема: Регуляция состояния покоя у растений фитогормонами и регуляторами роста

Фитогормоны играют важную роль в регуляции покоя у различных видов растений независимо с покоящимися органами - почками, семенами, луковицами, клубнями и корневищами. Переход в состояние покоя связан с накоплением ингибиторов (АБК, а также фенольных ингибиторов). А гормоны стимуляторы способствуют выходу из покоя. Однако конкретные детали регуляции зависят от органа и вида растения. Примером одной из самых удачных попыток обобщения наблюдающихся закономерностей может служить теория Кана о гормональной регуляции физиологического покоя семян. Основные ее положения иллюстрирует следующая таблица.

Таблица 2. Влияние фитогормонов на прорастание семян

Присутствие фитогормона в семенах			Способность прорастания
АБК	Цитокинин	Гиббереллин	
+	-	-	-
+	-	+	-
+	+	-	-
+	+	+	+
-	+	-	-
-	-	+	+
-	+	+	+

Согласно этой трехзвенной теории, АБК играет роль фактора, запрещающего прорастание; цитокинин - разрешающего фактора, а гиббереллин - непосредственного стартового фактора прорастания. Поэтому в отсутствии АБК (запрета прорастания) начало прорастания может быть индуцировано гиббереллином, а присутствие цитокинина не имеет значения. Напротив, в присутствии АБК, требуется кроме гиббереллина, дающего непосредственный сигнал прорастания, наличие цитокинина (разрешающего фактора), способного преодолеть ингибирующее действие АБК. Причем результат в последнем случае будет зависеть от соотношения концентраций АБК и цитокинина. Эта теория имеет важное теоретическое и практическое значение, несмотря на наличие исключений, применимость не ко всем покоящимся органам и неприменимость к семенам, имеющим различные типы органического покоя, например, с недоразвитым зародышем.

Работа 9. Регуляция покоя клубней картофеля с помощью регуляторов роста

Одним из объектов, для которых регуляция покоя имеет большое практическое значение, являются клубни картофеля. Преждевременное прорастание клубней - одна из главных причин потерь продукции и падения качества при хранении картофеля. Напротив, стимуляция пробуждения глазков перед высадкой клубней может дать положительный эффект - увеличить общий урожай, выход ранней продукции, и особенно выход семенной фракции. В южных районах, например в Средней Азии, климатические условия позволяют получать два урожая картофеля за вегетационный сезон. Однако глубокий покой свежесобранных клубней делает это невозможным. Даже подбор специальных сортов не решает полностью эту проблему - требуется использование стимуляторов прорастания.

Работами ученых, среди которых ведущее место занимают исследования российских ученых из института биохимии им. А.Н. Баха, была изучена регуляция покоя клубней картофеля и предложены практические приемы прерывания или углубления покоя. Доказано, что глубокий покой клубней обеспечивается

накоплением в них высокого уровня АБК перед уборкой. В процессе хранения ее концентрация падает.

Гиббереллин ускоряет прорастание глазков и может увеличить количество побегов получаемых в расчете на один клубень. АБК в настоящее время является очень дорогим препаратом, доступным только для исследовательских целей. Поэтому была предложена идея использовать вещества, под действием которых увеличивается естественное накопления АБК. Наиболее активным в этом отношении является этилен. На практике вместо самого этилена применяются вещества, разлагающиеся в клетках растений с выделением этилена - это так называемые этиленпродуценты. Этилен сам является фитогормоном и его собственные эффекты, помимо усиления накопления АБК, значительно увеличивают ценность данного приема. Во первых, этилен имитирует защитные системы растений против патогенов - поэтому в 2 - 5 раз возрастает устойчивость клубней к грибным инфекциям во время хранения. Во-вторых, поскольку этилен является гормоном старения и созревания обработку этиленпродуцентами можно проводить не только перед закладкой клубней на хранение, а за 2-3 недели до уборки по ботве. При этом ускоряется естественное старение ботвы, сопровождающееся оттоком ассимилятов в клубни - это дает прибавку урожая до 7-10% и зачастую позволяет избежать необходимости скашивания ботвы. Кроме того, ускоряется созревание клубней, образуются прочные покровные ткани и клубни меньше травмируются при уборке.

Цель работы: с помощью этиленпродуцента и гиббереллина продемонстрировать эффективность регуляции покоя клубней картофеля.

Материалы и оборудование: выровненные по размеру здоровые клубни картофеля, широкие химические стаканы или банки на 0,5 л для замачивания клубней, листы бумаги и полиэтиленовые пакеты, раствор гиббереллина, препарат этиленпродуцента (например, кампозан).

Ход работы:

1. Помыть клубни картофеля и просушить.

2. Приготовить растворы гиббереллина и этиленпродуцента. Для кратковременного смачивания концентрация препаратов должна составлять 50 - 100мг/л.

3. Смочить клубни в растворах фитогормона и этиленпродуцента (опыт) и в воде (контроль), дать им обсохнуть.

4. Сложить клубни в подписанные пакеты и хранить их в темноте при комнатной температуре или как вариант опыта в термостате при температуре 25°.

5. Через каждые 2 недели проводить наблюдения и фиксировать в тетради состояние клубней.

Контрольные вопросы

1. Какие фитогормоны играют главную роль в регуляции покоя у растений?

2. Какова роль каждого типа фитогормонов согласно теории регуляции физиологического покоя семян?

3. Какие препараты могут углубить покой клубней картофеля или прервать его?

4. Когда нужно производить обработку этиленпродуцентами?

5. Какие дополнительные эффекты вызывает обработка картофеля этиленпродуцентами?

Тема: Регуляция роста и развития растений с помощью СРР

Синтетические регуляторы роста (СРР) как и гормоны могут контролировать процессы роста и влиять на развитие растений. С их помощью можно:

- изменять высоту растений, прочность стебля, бороться с полеганием;

- регулировать скорость прохождения фенофаз, скороспелость и опадение органов;

- влиять на морфологические особенности растений, соотношение органов, вызывать сдвиг пола, перераспределение и отложение в запас ассимилятов, повышая урожай и его качество;

- повышать устойчивость к стрессам и сопротивляемость растений при поражении патогенами, при этом обеспечивая стабильность урожаев культурных растений.

Применять регуляторы роста на растениях необходимо на всех этапах, начиная с обработки семян и до уборки урожая. Это позволяет поднять уровень сельскохозяйственного производства и его экологическую чистоту. Среди регуляторов роста выделяется группа абсолютно безвредных для человека и окружающей среды препаратов. Практически все остальные вещества, обладающая небольшой токсичностью в чистом виде, применяются для регуляторного воздействия в столь малых дозах и быстро разлагаются, что также могут считаться экологически безопасными.

Быстрое расширение набора регуляторов роста и спектра их применения в последнее десятилетие, как в России, так и за рубежом ознаменовал начало нового, экологически более безопасного этапа химизации сельского хозяйства. Тем не менее, при внедрении регуляторов роста проводятся такие же испытания, как и для других средств химизации.

Работа 10. Действия ретардантов и их взаимодействие на примере проростков пшеницы

Ретарданты (регуляторы роста) - вещества замедляющие вытягивание стебля в длину. Некоторые из них применяются уже многие десятилетия, например Хлорхолинхлорид (ССС или препарат Тур); позже появились этиленпродуценты (Кампозан), а за последние 10-15 лет к ним добавились новые гораздо более эффективные препараты нового поколения (Паклобутразол и др.).

Ретарданты широко применяют для уменьшения высоты растений, как следствие, предотвращения полегания сельскохозяйственных культур. Однако спектр применения этих веществ шире, они могут использоваться, например, с целью предотвращения энзимо-микозного истекания или для ускорения начала плодоношения плодовых деревьев. Препараты на основе Хлорхолинхлорида, как правило, не вызывают серьезных побочных эффектов, их действие достаточно специфично.

Этиленпродуценты, при разложении выделяют этилен, для которого характерны соответствующие эффекты, свойственные этому гормону. Например, нельзя их использовать как ретарданты на большинстве двудольных культур, так как образуется этилен, который способствует образованию отделительного слоя,

что может вызвать массовое опадение органов - листьев, цветков или плодов.

Под влиянием ретардантов не происходит нарушение основных процессов метаболизма, не угнетается развитие и накопление биомассы растениями. Механизм действия ретардантов связан с их влиянием на функционирование гормональной системы растений, точнее с проявлением активности гиббереллина - фитогормона, стимулирующего растяжение стеблей растений вдоль продольной оси.

С точки зрения механизма действия ретарданты можно разделить на три группы:

а) блокирующие у растений биосинтез гиббереллинов на различных этапах, что приводит к падению его концентрации и замедлению вытягивания стебля;

б) не влияющие на концентрацию гиббереллина, но нарушающие способность клеток реагировать на этот гормон путем блокирования рецепторов гиббереллина или цепочки исполнительных механизмов;

в) комбинированного действия, совмещающие оба механизма.

Экспериментально установить, к какой группе относится данное вещество, довольно просто: достаточно воздействовать на растения гиббереллином одновременно с ретардантом.

Для веществ первой группы добавление экзогенного гормона уменьшит торможение роста, а при достаточно высокой концентрации гиббереллина ретардантное действие может быть полностью снято.

Если ретардант принадлежит ко второй группе, добавление даже больших количеств гиббереллина может привести только к незначительному уменьшению ингибирования роста, но никак не к снятию ретардантного эффекта.

Совместное применение веществ оказывается в некоторых случаях более эффективным, чем использование их по отдельности. Если два ретарданта блокируют биосинтез гиббереллина на одной и той же стадии, то при их совместном применении эффект окажется равен сумме эффектов каждого препарата или меньше ее. Например, если каждый из них вызывает уменьшение уровня гиббереллина в 4 раза, то при действии смеси этот

уровень упадет максимум в 8 раз. Когда два ретарданта подавляют разные стадии биосинтеза гормона, то эффект будет гораздо сильнее. Так, по аналогии с предыдущим примером, если каждый ретардант подавит биосинтез в 4 раза, то результатом совместного действия препаратов в этом случае может быть подавление биосинтеза гиббереллина максимум до 16 раз! Такой тип взаимодействия препаратов называется синергизмом. Усиление биологических эффектов еще в большей степени характерно при совместном действии веществ с разным механизмом действия, как например, ретардантов, ингибирующих биосинтез гиббереллина и блокирующих его действие. Следует отметить, что кроме синергизма встречаются другие типы взаимодействия препаратов.

При простом, полном или неполном, сложении эффектов тип взаимодействия называется аддитивным, соответственно полным или неполным.

Третий тип взаимодействия характерен для препаратов противоположного действия - они уменьшают эффекты друг друга вплоть до полного их уничтожения. Такое взаимодействие называется антагонизмом.

С точки зрения практики, часто более важным является не возможность дальнейшего синергистического усиления эффекта препаратов, а другое следствие синергизма веществ - достижение некоторого среднего оптимального уровня эффекта при использовании гораздо меньшей суммарной концентрации смеси препаратов по сравнению с каждым из них по отдельности. Это дает возможность повысить экологическую безопасность их применения, уменьшить стоимость обработки без потери ее эффективности.

Цель работы: продемонстрировать различия в механизм действия ретардантов и эффективность применения их сочетаний.

Материалы и оборудование: чашки Петри с кружками фильтровальной бумаги по числу вариантов опыта, автосамплеры, мерные цилиндры на 25 и 50 мл, термостат, измерительные линейки, пинцеты, торсионные весы; семена пшеницы, которые проращивались в течение суток при 25°C, раствор перманганата

калия, раствор гибберелловой кислоты, ретарданты различного типа, дистиллированная вода.

Ход работы:

1. Приготовить растворы ретардантов в различных концентрациях и разлить их по чашкам Петри с кружками фильтровальной бумаги согласно вариантам опыта. Оптимальный объем раствора 7-10 мл, выбранный объем должен быть одинаков во всех вариантах опыта.

2. Набухшие семена промыть раствором перманганата и ополоснуть дистиллированной водой.

3. Выбрать зерновки одинакового размера и разложить их по чашкам, по 25 - 30 штук на каждую.

4. Поместить чашки в термостат и инкубировать неделю при 25°C.

5. После инкубации определить среднюю длину и массу coleoptилей, а также корней проростков и сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Что такое ретардант?
2. На какие группы делят ретарданты по механизму действия?
3. Каким образом можно экспериментально определить к какой группе относятся ретардант?
4. В чем состоит преимущество использования смесей регуляторов роста?
5. Перечислите типы взаимодействия регуляторов роста при совместном применении.
6. Что такое синергизм?
7. Можно ли применять Кампозан на двудольных культурах? Ответ обоснуйте

Работа 11. Стимулирующее действие на семена и проростки сельскохозяйственных культур экологически чистых регуляторов роста

В последнее десятилетие появилась обширная группа новых стимуляторов роста и развития растений, не относящихся к

фитогормонам. Их можно выделить из растительного материала или получить с помощью химического синтеза. По химическому строению они относятся к различным классам, но их объединяет практическое отсутствие токсичности и высокая активность. Очень низкие дозы в несколько грамм или даже миллиграмм на тонну семян или гектар посевов значительно стимулируют рост и развитие растений, увеличивают полевую всхожесть семян, энергию роста проростков, ускоряют их развитие, усиливают биохимические процессы и способствуют повышению устойчивости к абиотическим стрессам и болезням. В результате повышается продуктивность растений и качество продукции.

Список культур, на которых эти регуляторы испытаны и разрешены к применению, постоянно растет. Вместе с тем, каждый препарат имеет какую-то специфичность действия, например, в большей степени стимулирует рост корневой или надземной части растения, активизирует специфические биохимические процессы. Для большинства этих веществ молекулярные механизмы их действия и связь с гормональной системой растений неизвестны или изучены недостаточно.

Приведем для примера характеристики некоторых препаратов:

1. Эмистим, Симбионт-1, Симбионт-2, Экост и др. - группа препаратов, полученных из культур симбиотических микоризных грибов и представляющих собой сложную смесь веществ. Их история восходит к работам по изучению микоризного симбиоза растений, выполненным в Московской сельскохозяйственной академии. Эти препараты применяются для предпосевной обработки семян и опрыскивания вегетирующих растений зерновых, овощных и плодовых культур и дозах порядка 1 мл на тонну семян или на гектар. Прибавка урожая составляет от 15 до 50%, за счет повышения энергии роста и устойчивости к различным стрессам. Абсолютно безвреден.

2. Крезацин - кремнийорганический препарат, оказывающий многообразное действие на растения, стимулируя развитие и устойчивость, в частности, усиливает засухоустойчивость за счет быстрого развития более длинного корня, проникающего в глубокие слои почвы. Увеличивает продуктивность. Безвреден. В тестах на токсичность проявляет защитные и стимулирующие свойства, например, вместо гибели дафний вызывает их раз-

множение по сравнению с контролем. Рекомендован также в качестве стимулирующей и повышающей устойчивости пищевой добавки для животных. Ведутся закупки препарата зарубежными странами.

3. Фумар - может рассматриваться как дегидропроизводное аминокислоты. Помимо ростстимулирующих свойств отличается способностью активизировать восстановление нитратов и дальнейший метаболизм азота в растениях. Может применяться для снижения уровня нитратов в продукции, особенно у овощных культур, в тех частях растений, где из-за недостатка света резко тормозится активность нитратредуктазы, связанная с использованием восстановленных никотиновых коферментов образующихся при фотосинтезе (кочаны, клубни, корнеплоды).

4. Краснодар -1, Кавказ и другие препараты, созданные на Кубани, активные стимуляторы роста и развития широкого спектра сельскохозяйственных культур, в том числе овощных в условиях высокоинтенсивного выращивания в закрытом грунте.

5. Хитозан (более простые и низкомолекулярные производные хитина, входящего в состав клеточных стенок грибков и панцирей ракообразных) Иммуноцитифит и другие производные арахидоновой кислоты - прежде всего эффективные индукторы естественной защитной реакции растений. Повышают устойчивость к грибным болезням.

6. Гумат, гидрогумат, оксигумат препараты торфяного происхождения. Стимулируют развитие растений и повышают урожай.

7. Стимуляторы различной природы (Ивин, Амбиол, Мивал, Лентихнин и другие) - иногда не уступают по активности перечисленным выше препаратам.

8. Препараты, защищающие культурные растения от угнетающего действия гербицидов (антидоты), например оксикарбам, глутатион.

Практически все эти вещества хорошо совместимы с любыми протравителями семян и препаратами, применяемыми для обработок вегетирующих растений. Включение регуляторов роста в такие смеси повышает их эффективность и позволяет снизить расход пестицидов.

Перспективным также является применение смесей регуляторов роста с различными механизмами действия. В этих

направлениях открыты большие перспективы для исследований и практического внедрения результатов.

Цель работы: Демонстрация эффективности действия стимуляторов на начальных этапах развития растений; а также сортовой и видовой специфичности ответа.

Материалы и оборудование: Чашки Петри с кружками фильтровальной бумаги по числу вариантов опыта, автосамплеры, мерные цилиндры на 25 и 50 мл, термостат, измерительные линейки, пинцеты, торсионные весы; семена различных культур и сортов, которые проращивались в течение суток при 25°, раствор перманганата калия, набор стимуляторов роста и развития различного типа, дистиллированная вода.

Ход работы:

1. Приготовить растворы регуляторов роста в наборе, указанном преподавателем, и разлить по чашкам Петри (по 7 мл), в которые вложены кружки фильтровальной бумаги.

2. Набухшие семена выбранных для занятия культур и сортов промыть розовым раствором перманганата и ополоснуть их дистиллированной водой.

3. Выбрать семена одинакового размера и разложить их по чашкам, по 15 - 50 штук на каждую, в зависимости от крупности семян.

3. Поместить чашки в термостат и инкубировать неделю при 25°C.

4. После инкубации определяется средняя длина и масса побегов, а также корней проростков. Результаты сравниваются с данными других групп, полученными на различных сортах и культурах. Делаются выводы из отмеченных закономерностей.

Контрольные вопросы

1. Какими общими свойствами характеризуется изучаемая группа регуляторов роста?

2. Приведите не менее пяти примеров препаратов и охарактеризуйте их.

3. При каком характере взаимодействия веществ, их совместное применение может быть эффективным?

4. Некоторые препараты (например хитозан, иммуноцитрфит) применяются для борьбы с болезнями растений, но не действуют отрицательно на рост паразитических грибов в культуре. Каков механизм их действия?

5. Имеет ли смысл их применение в сочетании с фунгицидами?

Работа 12. Влияние фитогормонов и синтетических регуляторов роста на устойчивость растений к стрессам на модели проростков разных культур

Одной из важнейших функций фитогормонов является участие в ответах растений на воздействие стрессовых факторов. Наиболее сильно защитные функции при абиотических стрессах выражены у абсцизовой кислоты. Именно АБК служит сигналом, вызывающим закрытие устьиц при засухе. Она также индуцирует биосинтез специальных белков, защищающих клетки от повреждений при обезвоживании, и синтез белков теплового шока (БТШ), повышающих устойчивость клеток к высокой температуре. Очень важную роль АБК играет при защите от низких температур и других стрессов. Этилен во многих случаях вызывает повышение концентрации АБК, которая уже непосредственно оказывает защитное действие, но способен и сам стимулировать защитные механизмы растений; например при гипоксии, вызванной затоплением корневой системы, этилен включает альтернативные механизмы дыхания, защитные биохимические реакции и активизирует закладку аэренхимы. Во всех случаях под действием АБК и этилена ингибируется рост растений в стрессовых условиях, что также является защитной реакцией - быстрорастущие ткани являются самыми чувствительными к повреждающему действию стрессовых факторов и, кроме того, расходуют энергию, необходимую для защитных реакций. Можно полагать, что такая защита может быть эффективна при очень сильных стрессах, но, как правило, ведет к потере продуктивности.

В средней полосе России более характерны слабые и умеренные стрессы, и с практической точки зрения перспективны препараты, защищающие растения при минимальном снижении

скорости роста. А при небольших стрессах и после окончания действия неблагоприятных факторов повышение продуктивности могут дать вещества стимулирующего действия, заставляющие растения расти, игнорируя стрессы или ускоряя восстановление и отрастание после повреждений.

Среди фитогормонов такими свойствами обладает цитокинин. Он также может индуцировать синтез защитных веществ, но одновременно поддерживает в активном состоянии белоксинтезирующую систему, сохраняет целостность клеточных мембран, продлевает жизнь листьев, вызывает их вторичное позеленение и увеличивает площадь. Однако сами цитокинины слишком дороги для использования на больших площадях. Практическое применение нашли синтетические препараты, имитирующие защитные свойства цитокининов - Картолин-1 и Картолин-2. В отсутствие засухи их использование нецелесообразно - они не дают прибавки урожая. Однако обработка ими посевов во время засухи в дозе порядка 2 кг/га может в буквальном смысле спасти урожай. Недостатком данных препаратов является заметный уровень токсичности. Многие новые экологически безопасные регуляторы роста также обладают способностью устойчивости растений к стрессам умеренной силы.

Защитное действие регуляторов роста можно изучать на проростках растений. Эффективность препаратов зависит от вида и сорта растений. Легче всего имитировать в лабораторных условиях действие температурного стресса и засухи (водного стресса). Для создания первого достаточно поместить растения в термостат, а второго - поместить проростки в среду с повышенной осмотической силой, идеальным для этого является раствор непроникающего в клетки осмотика полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой в пределах 1000-6000, в концентрации от 10 до 30% в зависимости от молекулярной массы и вида растения. Напомним, что осмотический потенциал раствора пропорционален не концентрации вещества, выраженной в %, а его молярной концентрации $P_{осм}=71M$.

Цель работы: Продемонстрировать на модели проростков различных растений защитное действие регуляторов роста при стрессах.

Материалы и оборудование: Чашки Петри с кружками фильтровальной бумаги, пинцеты, цилиндры на 25 и 50 мл, автосамплеры, технические весы, измерительные линейки, термостаты; семена различных культур, полиэтиленгликоль, регуляторы роста, калий марганцевокислый.

Ход работы:

1. Простерилизовать семена розовым раствором марганцево-кислого калия или спиртом и поместить их в чашки Петри с кружками фильтровальной бумаги с 10 мл растворов испытуемых препаратов. Контролем служит вода. Выдержать 2-4 суток при температуре 25°C.

2. Приготовить растворы ПЭГ для создания осмотического стресса и разлить их по 20 мл на чашку.

3. В каждом варианте опыта отобрать одинаковые проростки. Для термических испытаний поместить чашки Петри в термостат с заданной температурой в зависимости от культуры. Например, для пшеницы рекомендуемая температура 48-50°C в течении 4 часов. Затем проростки доращиваются при 25° С 3-5 дней.

4. Для проверки устойчивости к водному стрессу одинаковые проростки каждого варианта переносят на чашки с раствором ПЭГ и помещают в термостат при 25°C на 3-5 дней.

5. После окончания инкубации подсчитывают процент погибших проростков и длину оставшихся.

Контрольные вопросы

1. Какие фитогормоны наиболее тесно связаны с защитными реакциями растений на стрессы?

2. Какие физиолого-биохимические ответы растения вызывает повышение уровня АБК при засухе?

3. Как действует этилен при стрессах?

4. Почему торможение роста при стрессах не всегда может рассматриваться как положительное явление?

5. В чем состоят особенности защитного действия цитокининов и других регуляторов роста при стрессах?

Задания в тестовой форме

1. К фитогормонам относятся:
 1. Хлорофиллы;
 2. Каратиноиды;
 3. Ферменты;
 4. Цитокинины

2. Фитогормоны это:
 1. Органические соединения;
 2. Неорганические соединения;
 3. Соединения органической и неорганической природы;
 4. Соединения белковой природы

3. Фитогормоны с атрагирующим действием:
 1. Ауксины;
 2. Цитокинины;
 3. Гиббереллины;
 4. Этилен

4. Фитогормоны, влияющие на пол растений:
 1. Цитокинины,
 2. АБК;
 3. Этилен;
 4. Гиббереллины.

5. Гормон, синтез которого светозависим:
 1. Ауксин;
 2. Гиббереллин;
 3. Брассиностероид;
 4. Цитокинин

6. Явление «апикального доминирования» связано с :
 1. АБК;
 2. Этиленом;
 3. Ауксином;
 4. Гиббереллином

7. Длину междоузлий увеличивают:
 1. Ауксины;

2. Гиббереллины;
3. Цитокинины;
4. Брассиностероиды

8. Ауксины синтезируются в:

1. Корнях;
2. Стеблях;
3. Листьях;
4. Зародыше

Список использованных терминов

in vivo - внутри клетки, растения.

in situ - на своем месте (на растении).

in vitro - вне растения, в стекле, в пробирке.

Витрификация - вредное явление, возникающее при культивировании тканей в пробирке; ткани становятся оводненными, прозрачными, «стеклянными» и погибают.

Каллус - ткань, состоящая из неорганизованно делящихся, частично или полностью дедифференцированных (потерявших специализацию) растительных клеток.

Эксплант - любой фрагмент растительной ткани или орган, перенесенный на питательную среду для культивирования *in vitro*.

Пассаж - пересадка экспланта на новую питательную среду.

Соматические эмбриониды - клеточные образования в культурах клеток сходные с зиготическими зародышами.

Клональное микроразмножение - современный биотехнологический вариант вегетативного размножения, осуществляемый с помощью культивирования растений на питательной среде в пробирках.

Сомаклональная варибельность - явление образования генетически и фенотипически разнородных регенерантов при регенерации растений из каллуса.

Тотипотентность - способность соматических клеток из разных типов тканей дать начало целому растению.

Искусственные семена - соматические эмбриониды, окруженные синтетическими оболочками, содержащими элементы питания, стимуляторы, фунгициды.

Иммуноферментный анализ - метод определения патогенов растений, более чувствительный современный вариант серологического метода. Полимеразная цепная реакция - современный метод, применяемый для анализа патогенов растений, основанный на определении присутствия нуклеиновых кислот с определенными последовательностями нуклеотидов специфичными для каждого патогена. Имеет максимальную чувствительность и избирательность.

Биотесты - методы качественного и количественного определения физиологически активных соединений с помощью биологических объектов, специфически реагирующих на эти вещества.

Этиленпродуценты - препараты, разлагающиеся в растениях с выделением этилена, являющегося гормоном растений.

Синергизм - один из вариантов взаимодействия физиологически активных веществ, при котором эффект их смеси существенно превосходит сумму эффектов этих препаратов, применяемых по отдельности.

Аддитивное взаимодействие - наблюдается в случае полного или неполного суммирования эффектов препаратов при их совместном применении.

Антагонизм - взаимодействие препаратов, при котором наблюдается взаимное подавление ими эффектов друг друга.

Энзимо-микозное истекание - явление, сущность которого состоит в том, что при влажной погоде (особенно после засушливых условий) в недозревшем зерне происходит активация гидролитических ферментов, разрушающих запасные вещества в зерне и делающих их доступными для вымывания атмосферными осадками. Это ведет к потерям урожая и ухудшению его качества.

Список рекомендуемой литературы

1. Биотехнология: учеб. для вузов / под ред. Е.С. Воронина. СПб.: ГИОРД, 2005. 792 с.
2. Биотехнология растений: культура клеток / пер. с англ. В.И. Негрука; под ред. Р.Г. Бутенко. М.: Агропромиздат, 1989. 280 с.
3. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986.
4. Бунтукова Е.К., Пахомова В. Сельскохозяйственная биотехнология: учеб. пособие для вузов. Казань: КГСХА, 2004. 80 с.
5. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. Киев: Наукова думка, 1984.
6. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии: учеб. пособие для вузов. М.: КолосС, 2006. 144 с.
7. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983.
8. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений / Г.С. Муромцев, Д.И. Чкаников, О.Н. Кулаева, К.З. Гамбург. М.: Агропромиздат, 1987. 384 с.
9. Нецветаев В.П. Основы биотехнологии: учеб. пособие. Белгород: БелГУ, 2007. 44 с.
10. Никеля Л.Д. Регуляторы роста растений. Применение в сельском хозяйстве. М.: Колос, 1984. 191 с.
11. Основы биотехнологии переработки продукции растениеводства: учеб. пособие. Самара, 2002. 185 с.
12. Основы биотехнологии: учеб. пособие для вузов / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. М.: Академия, 2006. 208 с.
13. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев, Р.Г. Бутенко, Т.И. Тихоненко, М.И. Прокофьев. М.: Агропромиздат, 1990. 384 с.
14. Сельскохозяйственная биотехнология: учеб. для вузов / под ред. В.С. Шевелухи. М.: Высш. шк., 2008. 710 с.
15. Чхенкели В.А. Биотехнология: учеб. пособие для вузов. СПб.: Проспект Науки, 2014. 336 с.

Учебное издание

Наталья Витальевна Милехина
Виталий Юрьевич Симонов

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие
для лабораторно-практических занятий
(с элементами дидактического материала)
для студентов направления подготовки
35.03.07 Технология производства и переработки
сельскохозяйственной продукции
профиль Технология производства и переработки продукции
растениеводства

Редактор Осипова Е.Н.

Подписано к печати 21.10.2022. Формат 60x84. 1/16.
Бумага офсетная. Усл. п. л. 3,08. Тираж 25 экз. Изд. №7387.

Издательство Брянского государственного аграрного универси-
тета 243365, Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино,