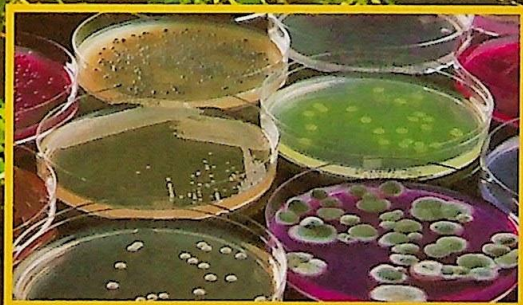
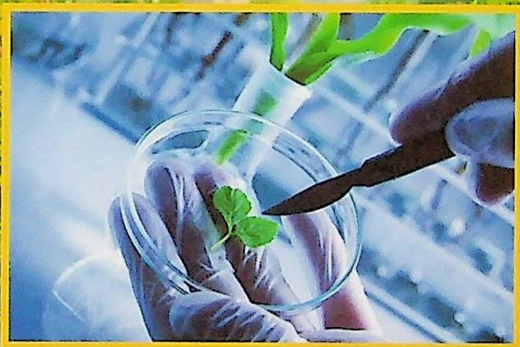


М. С. МАМИЕВ

АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯ



УДК: 616-053.2:578.28НIV

ББК: 57.33

С 14

Автор

М.С.Мамиев

Рецензенты:

Н.А.Лазутин – Старший научный сотрудник Института микробиологии АН РУз, к.б.н.

Ш.Г.Камилов – Доцент кафедры Сельскохозяйственная фитопатологии и агробиотехнологии ТашГАУ

М.С.Мамиев. Агробиотехнология. (лабораторные работы по агробиотехнологии). – Т.: «Fan zargari» 2024 – 132 с.

ISBN: 978-9910-9324-4-1

Предлагаемая работа по основным разделам курса "Агробиотехнология" будет способствовать лучшему и более глубокому усвоению студентами учебного материала, а также развитию у них творческих навыков для самостоятельной экспериментальной деятельности.

Автор сочли необходимым сохранить работы, ставшие классическими. Однако данное пособие также включает оригинальные работы, апробированные в течение многих лет на кафедре Сельскохозяйственная фитопатологии и агробиотехнологии.

Учебное пособие предназначено для студентов нижеперечисленных направлений образования сельскохозяйственных вузов.

Учебно-методическое пособие одобрено и рекомендовано заседанием кафедры Сельскохозяйственная фитопатологии и агробиотехнологии (протокол № 7 от «21» февраля 2022 г) и учебно-методическим советом факультета Защиты растений, агрохимии и почвоведения (протокол № 6 от «25» февраля 2022 г), а также учебно-методическим советом Ташкентского государственного аграрного университета (протокол № 5 от «16» марта 2022 г).

Область знания:	400000	- Сельское и водное хозяйство
Область образования:	410000	- Сельское, лесное и рыбное хозяйство
Направление образования:	5410300	- Защита растений (по видам продукции)

УДК: 616-053.2:578.28НIV

ББК: 57.33

ISBN: 978-9910-9324-4-1

© "Fan zargari", 2024.

Annotatsiya

Agrobiotexnologiya fani bo'yicha mazkur o'quv qo'llanma 5410300-O'simliklarni himoya qilish (ekin turlari bo'yicha) ta'lim yo'nalishi bakalavr talabalariga mo'ljallangan. O'quv qo'llanma Davlat ta'lim standartlari hamda o'quv dasturlariga mos keladi. Ushbu o'quv qo'llanma talabalarga mazkur fandan nazariy bilimlarni va amaliy ko'nikmalarni shakllantirishga imkoniyat yaratadi.

Agrobiotexnologiya fanidan laboratoriya mashg'ulotlari uchun o'quv qo'llanmasida nazariy ma'lumotlar va laboratoriya ishlarini bajarish usullari keltirilgan.

O'quv qo'llanmada quyidagi mavzular: Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi laboratoriyasining tuzilishi, asbob-uskunalar va laboratoriyada ishlash qoidalari bilan tanishish, O'simlik xujayrasidan DNK ajratish, Bakteriya hujayrasidan plazmid DNK sini ajratish, Agarozali gelda DNK elektroforezi, O'simlik hujayra va to'qimalarini o'stirish uchun oziqa muhitlarini tayyorlash, Biotexnologiyada streillash usullari, *In vitro* sharoitida o'simliklarni klonli mikroko'paytirish, Steril o'simtalar o'stirish, Kartoshkaning apikal meristemasini ajratish va o'stirish, Kartoshkadan mikrotuganaklar olish, Fitoregulyatorlar yordamida kartoshka tuganaklarini tinim holatiga o'tishi va uyg'onishini boshqarish, Tuganak bakteriyalarni sof kulturasini olish va ular asosida preparatlar tayyorlash, Nitragin, azotobakterin va fosforobakterin preparatlarini olish texnologiyasi, Nitragin preparatini olish texnologiyasi, Azotobakterin olish texnologiyasi, Fosfobakterin olish texnologiyasi, Entomopatogen mikroorganizmlarni ajratish va ular asosida preparatlar olish texnologiyasi, Bakteriyalar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar, Zamburug'lar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar, Viruslar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar, Antagonist mikroorganizmlarni ajratish va ko'paytirish, Tuproq namunalarini olish va ulardan antagonist mikroorganizmlarni ajratish, Antagonist mikroorganizmlar kulturasidan undirma olish uchun ekish materialli tayyorlash, Antagonist mikroorganizmlarni g'alla donlarida ko'paytirish, Zamburug'ning ekish materialini tayyorlash, Hujayralarning biopreparatdagi va suspenziyadagi zichligini Goryaev kamerasida hisobini olish bo'yicha topshiriqlar berilgan.

Har bir topshiriq yoki umumiy mavzuga tegishli topshiriqlar bo'yicha qisqa nazariy ma'lumotlar keltirilgan, laboratoriya mashg'ulotlarini bajarishda ishlatiladigan usullarni amalga oshirish yo'llari ko'rsatilgan va mashg'ulotlarni o'tkazish rejaları, ularni bajarishda qilinadigan ishlarning

ketma-ketligi hamda talabalarni bilimini tekshirish bo'yicha savollar berilgan.

Bitta laboratoriya mashg'ulotida (ikki akademik soatda) bitta topshiriq yoki umumiy mazuga tegishli bo'lgan birgina topshiriq bajarishga mo'ljallangan. Shuningdek o'quv qo'llanmada foydalangan adabiyotlar ro'yxati keltirilgan.

Аннотация

Это учебное пособие по агробиотехнологии разработан для обучения студентов бакалавриата направлений: 5410300- Защита растений и карантин (по видам продукции). Учебник соответствует государственным образовательным стандартам и учебным программам. Учебник позволяет студентам развить теоретические знания и практические навыки по предмету.

Учебник для лабораторных занятий по предмету агробиотехнология дает теоретические сведения и методы лабораторных работ.

Учебник включает следующие темы: структура лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии, оборудование и правила работ в лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии, выделение ДНК из клеток растений, выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий, электрофорез ДНК в агарозном геле, приготовление питательных сред для растений, культура клеток и тканей, Методы биотехнологии, Клонирование микроразмножения растений *in vitro*, методы стерилизации, Разделение и рост апикальной меристемы картофеля, Получение микроклубней картофеля, Контроль покоя и пробуждения клубней картофеля с помощью фиторегуляторов, получение чистых культур клубеньковых бактерий, Технология производства препаратов фосфоробактерин, Технология производства Нитрагина, Технология производства азотобактерин, Технология выделения энтомопатогенных микроорганизмов и производство препаратов на их основе, энтомопатогенные препараты на основе бактерий, энтомопатогенные препараты на основе грибов, энтомопатогенные препараты на основе вирусов, изоляция и размножение антагонистических микроорганизмов, отбор проб почвы и выделение микроорганизмов-антагонистов, культура микроорганизмов-антагонистов, подготовка посадочного материала для грибов, расчет плотность клеток в биопрепарате и суспензии в камере Горяева.

Предоставляется краткая теоретическая информация по каждому заданию или заданию по общей теме, показаны способы и методы работы, а также задаются планы уроков, последовательность выполняемых работ и вопросы для проверки знаний студентов.

Одно лабораторное занятие (два академических часа) предназначено для выполнения одного задания или задания, относящегося к общей теме. Также имеется список использованной в учебнике литературы.

Annotation

This textbook on Agrobiotechnology is designed to teach undergraduate students of the following program: 5410300-Plant Protection and Quarantine (by types of products). The textbook corresponds to the state educational standards and curricula. It allows students to develop theoretical knowledge and practical skills in the subject.

The textbook for laboratory studies on the subject of Agrobiotechnology provides theoretical information and methods of laboratory work.

The textbook includes the following topics: the structure of the laboratory of agricultural biotechnology, equipment and rules of work in the laboratory of agricultural biotechnology, isolation of DNA from plant cells, isolation of plasmid DNA from bacterial cells, DNA electrophoresis in agarose gel, preparation of nutrient media for plants, culture of cells and tissues, Methods of biotechnology, Cloning of plant micro-reproduction in vitro, sterilization methods, Separation and growth of potato apical meristem, Production of potato microtubers, Control of dormancy and awakening of potato tubers using phytohormones, production of pure cultures of nodule bacteria, Production technology of phosphorobacterin preparations, Nitragin production technology, azotobacterin production technology, technology of isolation of entomopathogenic microorganisms and production of preparations based on them, entomopathogenic preparations based on bacteria, entomopathogenic preparations based on fungi, entomopathogenic preparations based on viruses, isolation and reproduction of antagonistic microorganisms, soil sampling and isolation of antagonistic microorganisms, culture of antagonistic microorganisms, preparation of planting material for fungi, calculation of the cell density in the biological product and suspension in the Goryaev chamber.

Brief theoretical information is provided on each task or task on a common topic, methods and methods of work are shown, as well as lesson plans, the sequence of work performed and questions for testing students' knowledge are set.

One laboratory lesson (two academic hours) is designed to complete one assignment or assignment related to a general topic. There is also a list of literature used in the textbook.

ВВЕДЕНИЕ

Хотя практической наукой биотехнология стала в XX веке, корни биотехнологии уходят в далёкое прошлое, и в основном связаны с удовлетворением каждодневных потребностей человека. В настоящее время она возникла из-за необходимости решения главных и актуальных проблем человечества - продовольственного, энергетического кризиса и предотвращения загрязнения окружающей среды.

Биотехнологические процессы основываются на использовании биосинтетического потенциала микроорганизмов, растительных и животных клеток, тканей и органов, выращиваемых на искусственных питательных средах. В настоящее время во многих странах мира основное внимание уделяется развитию биотехнологии, так как биотехнологические процессы имеют ряд преимуществ по сравнению с другими технологиями с точки зрения экологичности, низкого уровня потребления энергии и, незначительных отходов. Кроме того, данная технология требует применение конкретного оборудования, технического оснащения и препаратов, а также отличается тем, что несмотря на климатические условия возможно проведение исследований на относительно небольших площадях.

В нашей стране изучение биотехнологии было начато в 70-80 гг. На сегодняшний день многие работы и научные исследования в области сельскохозяйственной биотехнологии продолжаются благодаря плодотворной работе и проводимым исследованиям ряда отечественных ученых и специалистов.

Работа 1. Оснащение и оборудование сельскохозяйственной биотехнологической лаборатории. Правила работы в ней

Организация биотехнологической лаборатории: для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные изолированные помещения освещением не ниже 110 лк. Для удобства проведения дезинфекции полы и стены в помещениях должны иметь кафельное покрытие, а потолок должен быть побелен. Комната должна быть оснащена лабораторными столами, полками и шкафами для посуды и реактивов. Столы должны быть подключены к электричеству и газу.

Помимо основной комнаты биотехнологическая лаборатория должна иметь комнату для стерилизации, моечную комнату, комнату для приготовления питательных сред, комнату для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды, а также культуральную комнату.

Оборудование моечной комнаты: мойки с горячей и холодной водой; дистилляторы и бидистилляторы; сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды - до 100-130°C, для инструментов - до 170°C; шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, ёмкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы с эксикаторами для хромпика (H_2SO_4 98% + $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

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

Оборудование помещения для стерилизации: автоклавы с режимом работы - давление 1-2 атмосферы и температура 120°C; стеллажи для штативов с питательными средами; шкафы для хранения стерильных материалов. Данное помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и

иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава.

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

Оборудование культуральных комнат: световое отделение - источники освещения со спектром близким к спектру дневного света (от 3 до 10 kLx), кондиционер для регуляции температуры (+25; -2°C) и влажности воздуха (70%), стеллажи для штативов с культивируемым материалом; темновое отделение - с тем же оборудованием, исключая источники освещения. Для культивирования эксплантов на питательной среде желательно использовать термостаты или хлад термостаты, способные с высокой точностью поддерживать задаваемые режимы температуры и влажности воздуха.

Материалы и оборудование: Основное оборудование, используемое в биотехнологической лаборатории: ламинар-бокс, автоклав, термостат, сушильный шкаф, холодильник, центрифуга, автоматические микропипетки, аппарат для электрофореза, чашки Петри, колбы, пробирки и другая посуда.

Ход работы: В сельскохозяйственных ВУЗах с направлением агрономии биотехнологические исследования ведутся в основном с растениями и микроорганизмами. Многие микроорганизмы могут быть болезнетворными, чтобы предотвратить заражение ими, нужно строго соблюдать следующие инструкции:

а) работать только в отведенном для этого месте и пользоваться оборудованием и реактивами, выделенными для конкретной работы.

б) зажигать спиртовые лампы только спичками.

в) не трогать розетки металлическими или другими предметами.

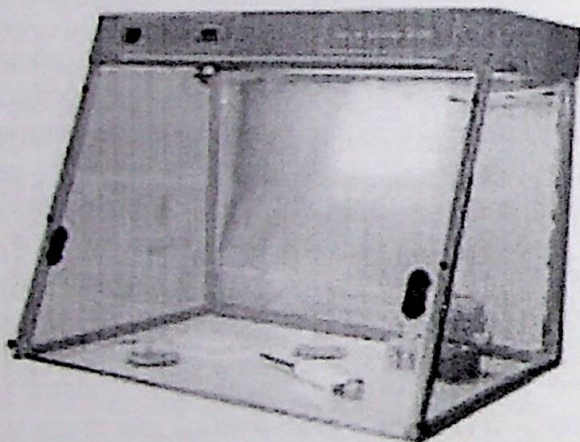
г) без разрешения преподавателя не включать электрическое и другое оборудование.

д) при работе с химическими реактивами быть предельно осторожными.

Под руководством преподавателя освоить принципы работы ламинар-бокса, автоклава, сушильных шкафов, дистиллятора и других устройств.

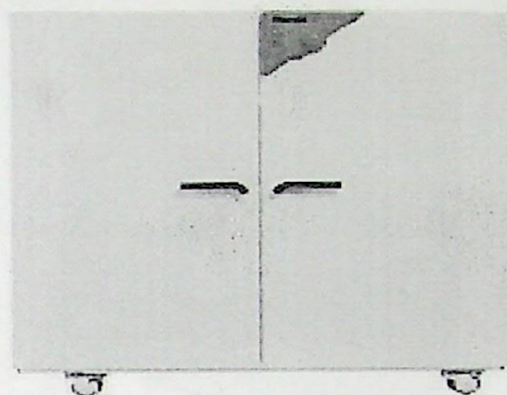
Оборудование, используемое в биотехнологической лаборатории:

Ламинар-бокс -лабораторный прибор для работы с биологическими объектами в стерильных условиях. Представляет собой шкаф, оборудованный осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха. Используется при микробиологических работах и работе с культурой клеток, тканей и органов. Стерильный воздух подаётся в бокс ламинарным потоком (равномерное движение воздуха без завихрений).



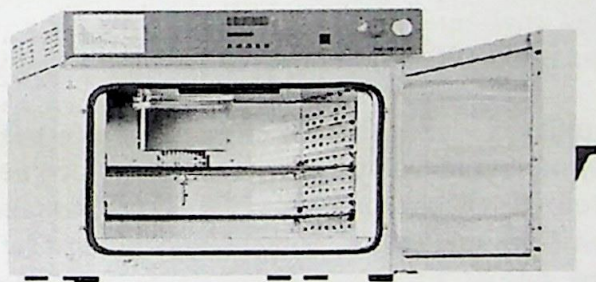
1-рис. Ламинар бокс

Термостат -прибор для поддержания постоянной температуры. Для уменьшения потерь тепла или холода термостаты, как правило, теплоизолируют.



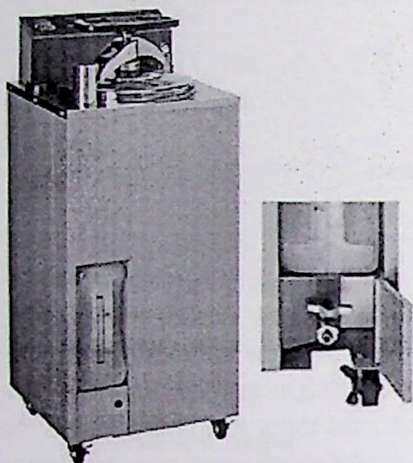
2-рис. Термостат

Сушильный шкаф (печь Пастера) - используется для стерилизации посуды из стекла, фарфора или металла.



3-рис. Сушильный шкаф

Автоклав - аппарат для проведения различных процессов при нагреве под давлением выше атмосферного. Автоклавы бывают: вращающиеся, качающиеся, горизонтальные, вертикальные и колонные. В биотехнологических лабораториях автоклав используют для стерилизации питательных сред и посуды при высоком давлении и температуре.



4-рис. Автоклав

Холодильники - используются для хранения питательных сред, плазмы, биологически активных веществ при температуре 4°C . Для хранения биологически активных веществ при температурах ниже 0°C используются холодильники низких температур.

Центрифуга - устройство, служащее для разделения сыпучих тел или жидкостей различного удельного веса и отделения жидкостей от твёрдых тел путём использования центробежной силы. При вращении в центрифуге частицы с наибольшим удельным весом располагаются на периферии, а частицы с меньшим удельным весом - ближе к оси вращения. Для разделения частиц размером менее 100 нм (коллоидов, субклеточных частиц, макромолекул белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов, синтетических полимеров и пр.), взвешенных или растворенных в жидкости, в биотехнологических лабораториях используется ультрацентрифуга. Ультрацентрифугу изобрел Т.Сведберг в 1923 г.



5-рис. Центрифуга

Автоматические микропипетки - наиболее точные и качественные инструменты для измерения малых объёмов жидкости [1-1000 мкл (μl)]. Они широко применяются в биологии, химии и биотехнологии. При работе с концентрированными кислотами и щелочью их следует хорошо промывать дистиллированной водой и высушивать.

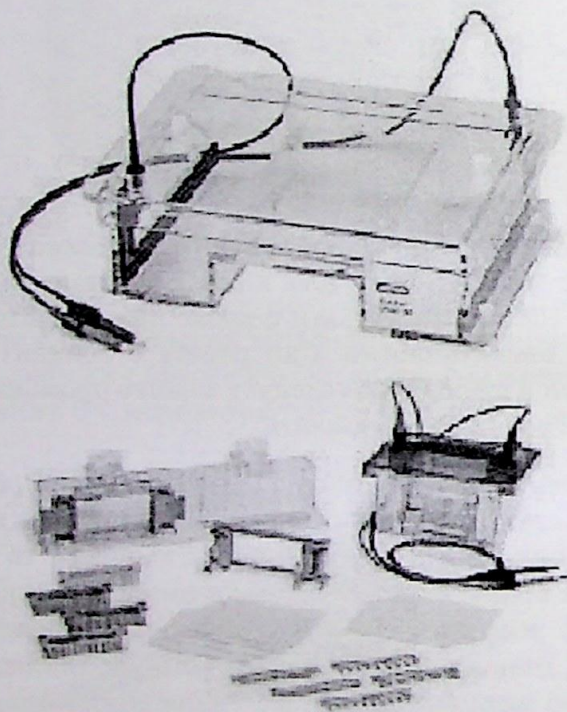


6-рис. Автоматическая микропипетка

Электрофорез (от электро- и др. -греч. φορέω - «переносу») -это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электри-

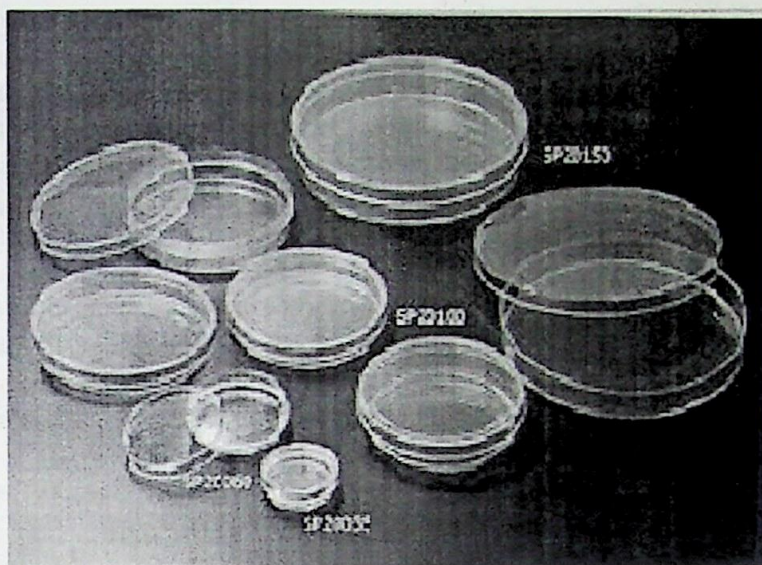
ческого поля. Впервые было открыто профессорами Московского университета П.И.Страховым и Ф.Ф.Рейсом в 1809 году.

Электрофорез применяют в физиотерапии, в химической промышленности для осаждения дымов и туманов, для изучения состава растворов и др. Электрофорез является одним из наиболее важных методов разделения и анализа компонентов веществ в химии, биохимии и молекулярной биологии.



7-рис. Электрофорез

Чашка Петри -прозрачный лабораторный сосуд в форме невысокого плоского цилиндра, закрываемого прозрачной крышкой подобной формы, но несколько большего диаметра. Применяется в микробиологии, биотехнологии и химии.



8-рис. Чашка Петри



9-рис. Основное оборудование биотехнологической лаборатории

Чашка Петри обычно изготавливается из прозрачного стекла или пластмассы (прозрачный полистирол) и может иметь самые различные размеры. Наиболее часто используемые варианты имеют диаметр порядка 50 - 100 мм и высоту около 15 мм. Чашка Петри изобретена в 1877 году. Названа в честь изобретателя - немецкого бактериолога Юлиуса Рихарда Петри, ассистента Роберта Коха.

Контрольные вопросы:

1. Каким требованиям должна отвечать сельскохозяйственная биотехнологическая лаборатория?
2. На что следует обращать внимание при работе с оборудованием?
3. Охарактеризуйте оборудования, предназначенные для стерилизации?

Работа 2. Выделение ДНК из растительной клетки

Материал и оборудование: 4г 14-дневных листьев хлопчатника, ступка, центрифуга, стаканы для центрифуги, 2 колбы, 2 стакана, стеклянная палочка, рефрактометр, бумага для диализа, спектрофотометр и холодильник.

Объяснение темы: «Получение трансгенные форм растений из одной клетки растений, животных и микроорганизмов в лабораторных условиях».

В 1973 году, после того как было открыто клонирование генов данная отрасль биотехнологии стала стремительно развиваться (1-таблица).

1-таблица

Основные этапы развития современной биотехнологии

Время изобретения (год)	Выполненные работы
1973	Первый клонированный ген.
1974	Клонирование первых бактериальных генов.
1975	Создана первая гибридома.
1976	Применение технологии рекомбинантной ДНК в производстве.
1980	Патентирование штаммов микроорганизмов, полученных при помощи методов генной инженерии.
1981	Разрешено использование моноклональных антител. Выпущен в продажу автоматический синтезатор генов.
1982	Разрешено использование в медицине рекомбинантного инсулина и разрешено использовать рекомбинантный ДНК на животных.
1983	Доказана возможность использования генной экспрессии с одного вида растения на другом.

В нашей Республике в Центре Геномики и Биоинформатики разработана и запатентована в 140 странах мира, в том числе в США, уникальная биотехнология «Ген-нокаут», обеспечивающая резкое повышение внутреннего биологического потенциала растений путем усиления или уменьшения активности ряда собственных хозяйственно-ценных генов растений. Кроме того, впервые из генома хлопчатника клонировано и аннотировано большое количество уникальных малых РНК, играющих важную роль в инициации процессов цветения и развития волокна хлопчатника, а также при патогенезе фузариозного вилта и галловой нематоды хлопчатника.

Репликация (от лат. *replicatio* - возобновление) - процесс синтеза дочерней молекулы ДНК на матрице родительской молекулы ДНК. В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки. Этот процесс обеспечивает точную передачу генетической информации из поколения в поколение.

Процесс репликации происходит при помощи ферментов ДНК-полимераза I, II, III, ДНК-лигаза и ревертаза. Механизм репликации **был** предложен Дж.Уотсоном и Ф.Криком - авторами теории двойной спирали ДНК.

Ферменты (хеликаза, топоизомераза) и ДНК-связывающие белки расплетают ДНК, удерживают матрицу в разведённом состоянии и вращают молекулу ДНК. Правильность репликации обеспечивается точным соответствием комплементарных пар оснований и активностью ДНК-полимеразы, способной распознать и исправить ошибку. Репликация у эукариот осуществляется несколькими разными ДНК-полимеразами. ДНК-полимераза I действует на запаздывающей цепи для удаления РНК-праймеров и дорепликации очищенных мест ДНК. ДНК полимераза III - основной фермент репликации ДНК, осуществляющий синтез ведущей цепи ДНК и фрагментов Оказаки при синтезе запаздывающей цепи. Далее происходит закручивание синтезированных молекул по принципу суперспирализации и дальнейшей компактизации ДНК. Синтез энергозатратный.

Цепи молекулы ДНК расходятся, образуют репликационную вилку, и каждая из них становится матрицей, на которой синтезируется новая комплементарная цепь. В результате образуются две новые двуспиральные молекулы ДНК, идентичные родительской молекуле.

Процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, называется транскрипцией. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК.



10-рис. Основной закон биологии

Транскрипция катализируется ферментом ДНК-зависимой РНК - полимеразой. Процесс синтеза РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, то есть по матричной цепи ДНК. РНК-полимераза движется в направлении 3'->5'

Транскрипция состоит из стадий инициации, элонгации и терминации. Единицей транскрипции является транскриптон, фрагмент молекулы ДНК, состоящий из промотора, транскрибируемой части и терминатора.

Трансляция - (от лат. translatio - перевод) - процесс синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной) РНК (иРНК, мРНК), осуществляемый рибосомой.

Синтез белка является основой жизнедеятельности клетки. Для осуществления этого процесса в клетках всех без исключения организмов имеются специальные не мембранные органеллы - рибосомы. Свойственный всем живым организмами способ кодирования последовательности аминокислотных остатков в составе белков при помощи последовательности нуклеотидов в составе нуклеиновой кислоты называется генетическим кодом.

Белки практически всех живых организмов построены из аминокислот всего 20 видов. Эти аминокислоты называют

Каждый белок представляет собой цепочку аминокислот, соединённых в строго определённой последовательности. Эта последовательность определяет строение белка, а следовательно, все его биологические свойства.

2-таблица

Получение первичных метаболитов L-аминокислот при помощи аукотрофных мутантов

Аминокислота	Продукт	Недостающее вещество	Субстрат	Содержание аминокислот в культуральной жидкости г/л
Л-треонин	<i>Brevibacterium flavum</i>	Треонин, метионин или гомосерин	Глюкоза сахараза	60-100
Л-лизин	<i>Escherichia coli</i>	Лизин, метионин, изолейцин	Глюкоза	20
Л-аргинин	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Аргинин	Глюкоза	26
Л-тирозин	<i>Arthrobacter paraffinicus</i>	Тирозин	н-алканы	15
Л-фенилаланин	<i>Corynebacterium</i> sp.	Фенилаланин	н-алканы	19
Л-изолейцин	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Изолейцин	Глюкоза	11

Передача генетической информации в живых клетках (то есть синтез белка, кодируемого геном) осуществляется при помощи двух основных процессов: транскрипции (то есть синтеза РНК на матрице ДНК) и трансляции генетического кода в белковую последовательность (синтез полипептидной цепи на РНК). Для кодирования 20 аминокислот, а также сигнала окончания, сигнализирующего конец белковой последовательности, требуется 64 последовательных нуклеотидов. Набор из трёх нуклеотидов называется триплетом. К последовательности

триплетов (кодонов) в нуклеиновой кислоте, а, следовательно, и к последовательности аминокислотных остатков в белковой молекуле понятие «генетический код» не имеет отношения. Генетический код - это способ записи, а не содержание записи.

Изменение структуры ДНК под воздействием внешних или внутренних факторов называется мутацией. В мутированной молекуле ДНК меняется генетическая информация и обычно влияет на нормальный рост и жизнь организма. Но в сельском хозяйстве, в медицине и в других отраслях используют мутированные организмы (таблица-2).

Мутационные процессы в человеческом организме нередко приводят к его гибели (лейкемия).

Особая функция клеток, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, повреждённой при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физических или химических агентов называется репарацией.

Процесс репарации происходит под воздействием ферментов ДНКазы, ДНК-полимераза II и ДНК-лигазы.

Ход работы:

1. Ткань растереть в ступке с жидким азотом до светло-зелёной (а не темно-зелёной) пудры;
2. Перенести пудру шпателем в колбу, очень хорошо и быстро перемешать в течение 20 мин с 50 мл буфером В;
3. Добавить 30 мл фенола и перемешивать (30 мин);
4. Центрифугировать в центрифуге К-23 при 10°C, при скорости 5000 обор/мин. 1 час;
5. Затем снять верхний слой, перелить в чистую колбу и добавить в равных пропорциях р-р фенол-хлороформа, затем перемешивать 10 мин.
6. Центрифугировать при скорости 5000 обор/мин. 30 мин при 100°C.
7. Затем снять верхний слой еще раз, добавить хлороформ, перемешать 10 мин, затем поделить на фракции путем центрифугирования.

8. Жидкую часть слить в стакан с этиловым спиртом, перемешать и ставить в холодильник. После образования "Медузы" намотать на стеклянную палочку и добавить 10 мл буфера растворителя ДНК (ТЕ).

9. В р-р ДНК добавить этидий бромид 0,2 мг/мл и 1,55 г/мл цезий хлор.

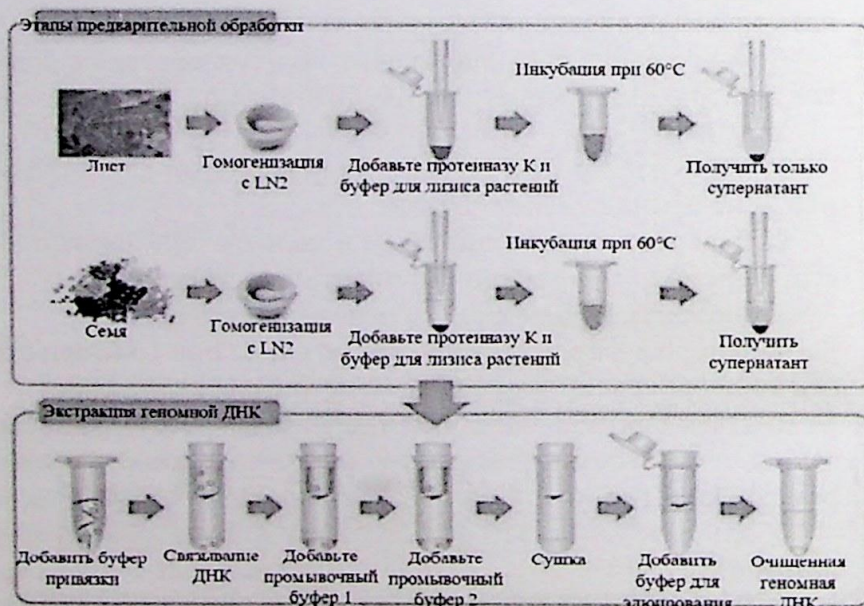
10. Раствор перелить в пробирки, центрифугировать в течение 20 часов при 150°С, при скорости 5000 обор/мин.

11. ДНК под УФ лампой выделяется шприцом.

12. ДНК очищается от этидия бромида путем 5-ти разовой экстракции изоамиловым спиртом.

13. ДНК очищается от хлористого цезия в ТЕ буфере при 40°С путем диализа 24 часа.

14. Количество ДНК можно увидеть в спектрофотометре при длине волны 260 нм.



11-рис. Выделение ДНК из растительной клетки

Буфер В:

0,2 М NaCl

0,05 М HCl pH 8,0

0,01 М ЭДТА

0,01 М ДДТ

0,2% SDS

Фенол, 0,1 М NaCl; 0,1 М трис-HCl; pH 8,0; 0,01 М насыщенный

ЭДТА

Хлороформ: изоамиловый спирт (24:1)

ТЕ буфер 10 мМ трис HCl, pH 8,0.

1 мМ ЭДТА

4,5мл раствор хлористого цезия в ТЕ буфер

Раствор Этидия бромид 10 мг/мл

Буфер для диализа: 10 мМ трис pH 8,0; 1 мМ ЭДТА

Контрольные вопросы:

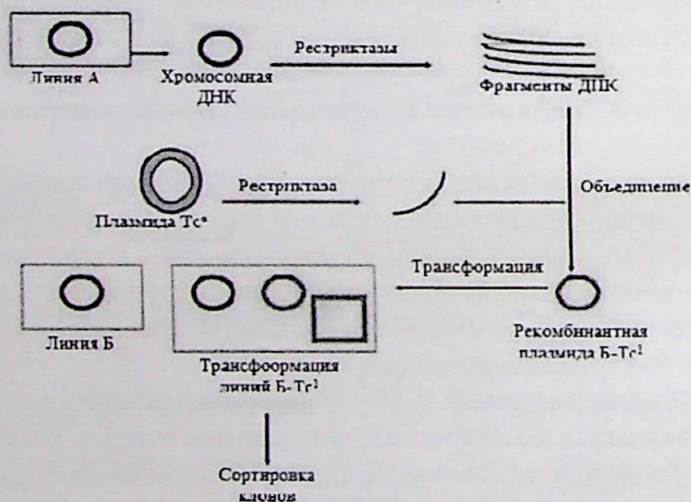
1. Как называется снятие копии с молекулы ДНК?
2. Как называется процесс возврата подверженной мутацией молекулы ДНК обратно в исходное состояние?
3. Перечислите этапы очистки ДНК?

Работа 3. Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий

Материалы и оборудование: Лизирующий буфер, лизоцим, раствор для денатурации, 3 М р-р ацетата натрия, (pH 4,8), изопронол, этанол, ТЕ буфер, РНКаза, фенол, хлороформ, 5 М раствор хлорида натрия, пробирки, автоматические микропипетки, центрифуга, ночная культура клеток *Escherichia coli*, ледяная баня, бактериальные петли.

Объяснение темы: В 70-годах прошлого века в биотехнологии появился новый метод - генная инженерия. В основе этого метода лежит образование рекомбинантной ДНК вне клетки. При помощи этого метода можно выделить гены в чистом виде, соединять их друг с другом, модифицировать и в итоге синтезировать белки с абсолютно новыми качествами.

Основная масса клеточной ДНК бактерий содержится в хромосоме (в хромосоме *Escherichia coli*, например, 4 млн. пар нуклеотидов). Однако, кроме хромосом бактерии содержат большое число очень маленьких кольцевых молекул ДНК длиной несколько тысяч пар оснований. Такие минихромосомы называют плазмидами. Как правило, плазмиды имеют в своем составе гены устойчивости к антибиотикам. Эти гены находятся в плазмидах, а не в главной хромосоме, поскольку в этом случае, они представлены гораздо большим числом копий. Высокая копияность плазмид обеспечивает клетке синтез большого количества ферментов, химически нейтрализующих антибиотики, что и обеспечивает устойчивость к последним. Попадание плазмиды в клетку может осуществляться двумя путями: либо при непосредственном контакте клетки-хозяина с другой клеткой в процессе конъюгации, либо путём трансформации, то есть искусственного введения в клетку плазмиды, которому предшествует изменение экспрессии определённого гена клетки-хозяина (приобретение клеткой компетентности).



12-рис. Клонирование гена при помощи плазмидной ДНК и клетки бактерии

Искусственные плазмиды используются как векторы в клонировании ДНК, причём благодаря их способности к репликации обеспечивается возможность репликации рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине. Векторами называют молекулы, которые помогают чужеродной ДНК проникнуть в клетку и обеспечивают его интеграцию в клетку реципиента. В качестве вектора впервые плазида была использована в 1973 г. Эксперименты проводились с маленькой плазмидой *E.coli* pSC 101, поскольку она содержит только один сайт расщепления *EcoR*I. Под действием фермента плазида превращалась в линейную молекулу с липкими концами. Такую плазмидную ДНК смешивали в оптимальных концентрациях и отношениях с фрагментами чужеродной ДНК, также обработанной *EcoR*I и имеющей такие же липкие концы. Фрагменты сшивали ферментом ДНК-лигазой из фага T4. В результате получились новые гибридные плазмиды, содержащие в своем составе фрагменты чужеродной ДНК. Затем бактериальные клетки трансформировали гибридными плазмидами и по способности расти в присутствии антибиотика отбирали клоны, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК. Стало ясно, что возможно проводить дальнейшие эксперименты, в которых эти плазмиды будут встраиваться в самые разнообразные чужеродные ДНК, происходящие как из микробов, так и из тканей высших растений и животных.

Ход работы:

1. 1,5 мл ночной культуры *E.coli* перенести в пробирку, охладить в ледяной бане, центрифугировать 3 мин, при 8000 обр, тщательно освободится от супернатанта (надосадочная жидкость). Остальную ночную культуру хранить при 4 °С.

2. К осадку добавить 200 мкл холодного лизирующего буфера, содержащего глюкозу 50 мм, трис-HCl - 25 мм, (pH 8,0) ЭДТА-10 мм, лизоцим 4 мг/л. Лизоцим в виде порошка добавить в последнюю очередь.

3. Осадок тщательно суспендировать и инкубировать на ледяной бане 20 мин.

4. Добавит 400 мкл свежеприготовленного охлажденного во льду

раствора, содержащего 0,2% NaOH, 1% SDS. Закрывать пробирку крышкой и перемешать содержимое, быстро переворачивая 3-4 раза (без встряхивания). Оставить пробирку на льду на 5 мин. Суспензия должна просветлеть и стать более вязкой.

5. Добавить 300 мкл холодного р-ра ацетат калия (рН 4,8), резко встряхнуть и инкубировать на льду 15 мин.

6. Центрифугировать 5 мин, перелить супернатант в чистую пробирку.

7. Добавить 500 мкл изопропанола, и инкубировать 15 мин при комнатной температуре.

8. Центрифугировать 5 мин, освободить от супернатанта, тщательно высушить осадок (можно при помощи полосок фильтровальной бумаги).

9. Осадок растворить в 100 мкл ТЕ буфера, содержащего 10 мм трис-HCl (рН 8,0), 1 мм ЭДТА (рН 8,0), и добавить р-р РНКазы 10 мг/л до конечной концентрации 100 мкг/л. Исходный раствор РНКазы в ТЕ буфере предварительно инкубировать 15 мин в кипящей бане.

10. Добавить равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1).

11. Встряхивать 2-3 мин и затем центрифугировать 5 мин.

12. Отобрать водную фазу. Операцию повторять до полного исчезновения интерфазы.

13. К водной фазе добавить 5 М раствор хлорида натрия, до конечной концентрации 0,3 М, а затем 2 объема этанола.

14. Вымораживать при 20°C 30-40 мин, разделить осадок центрифугированием.

15. Высушить пробирку и растворить ДНК в 50-100 мкл ТЕ буфера.

Полученная этим методом плазмидная ДНК пригодна для рестрикционного анализа, гибридизации, определения последовательности нуклеотидов, а также для экспериментов по трансформации.

Контрольные вопросы:

1. Какое строение имеет плазмидная ДНК?
2. Сколько генов содержит плазмидная ДНК?
3. Из скольких этапов состоит очистка плазмиды?

Работа 4. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Материалы и оборудование: Аппарат для электрофореза, гребенка, источник питания, автоматические микропипетки, парафин, 120 мл 0,8% агарозы, 0,5 л электрофорезный буфер, краситель, 300 мл бромистый этидий, (1/4 - 1/5 мг/мл) антиконвекционный раствор, ультрафиолетовая лампа, водяная баня, резиновые перчатки.

Объяснение темы: Электрофорез ДНК в агарозном геле (инертный гель, приготовленный на основе агарозы) - это аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру (длине). Для разделения фрагментов ДНК разной длины используют гель с различной концентрацией агарозы. Чем меньше длина разделяемых фрагментов ДНК, тем больше должна быть концентрация агарозы, поэтому при разделении ДНК на фрагменты очень важно выбрать правильную концентрацию агарозы (3-таблица):

3 таблица

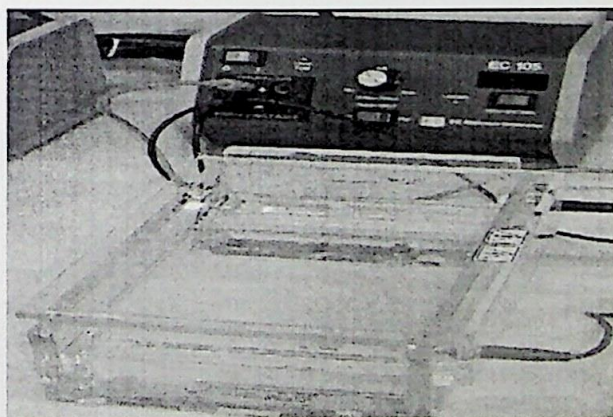
Концентрация агарозы, %	Длина разделяемых фрагментов ДНК в п.о.
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Молекулы ДНК одного и того же размера, но разного конформационного состояния (спиралевидный, кольцевидный и линейные формы) агарозном геле движутся разной скоростью. Их сравнительное электрофоретическое движение зависит от условий электрофореза, ионной силы буфера и в определенной степени зависит от количества электроэнергии и концентрации агарозы. С помощью специальных методов можно определить

соответствие между конформационным состоянием молекул ДНК и их расположением в геле. При проведении электрофореза фрагменты ДНК мигрируют в геле под воздействием сил электрического поля. Дело в том, что сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

Сбор аппарата для электрофореза.

Ход работы: Электрофорез в агарозном геле можно проводить при помощи вертикальных или горизонтальных устройств. Горизонтальные устройства более просты и удобны в использовании. Устройство изготовлено из органического стекла, имеет форму прямоугольного контейнера (кювета), по края расположены два платиновых электрода соединенных к источнику постоянного тока. На дно кюветы ставят органическое стекло для удобства работы и увеличения объема буфера.



13-рис. Электрофорезный аппарат

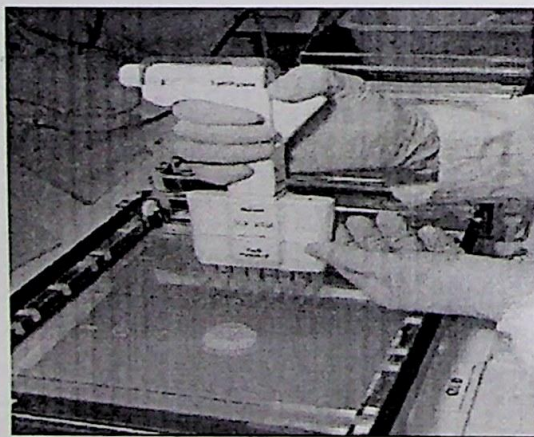
Приготовление агарозного геля: Соответствующее количество агарозы и буферного раствора вскипятить в водяной бане

до полного растворения агарозы. После полного растворения агарозы охлаждаем до 50-55°C. Ставим гребенку. После застывания геля (30-40 мин при комнатной температуре), вынимаем гребенку, и заливаем буферным раствором с покрытием 2-3 мм.

Введение образцов ДНК в гель. Образцы ДНК перемешиваются с антиконвекционным раствором, при помощи автоматических пипеток (20-200 мКл) с осторожностью вводится в гель. При помощи красителя (бром феноловый синий 0,0025%) в составе антиконвекционного раствора, можно наблюдать за ходом процесса. Кроме того, добавляем сахарозу (40%), которая обеспечит не смешение электрофорезного буфера и образцов ДНК.

После этого закрываем крышку аппарата, включаем источник постоянного тока и даем нужное напряжение (до проникновения образцов ДНК в гель 20 Вт, после 100-120 Вт). Процесс длится 2 часа.

Окрашивание геля: затем окрашиваем гель, бромистым этидием в течение 40-60 мин и после того, как смываем краску можем наблюдать трансиллюминаторе. При необходимости гель фотографируют. Для этого при открытой диафрагме используют желтый или оранжевые фильтры.



14-рис. Окрашивание геля

[Figure 1]

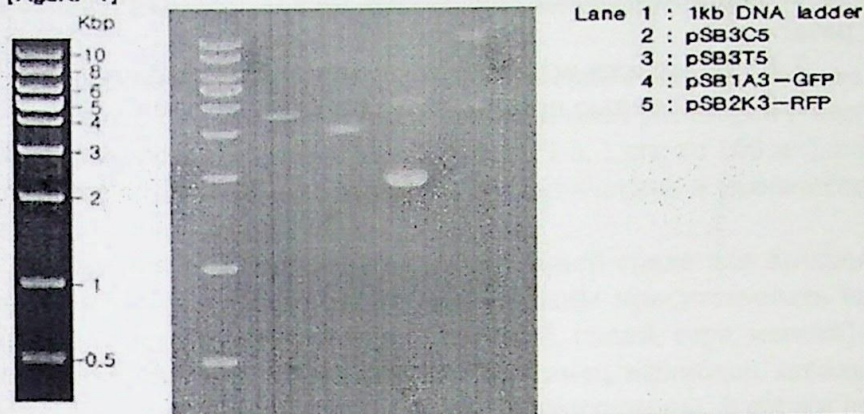
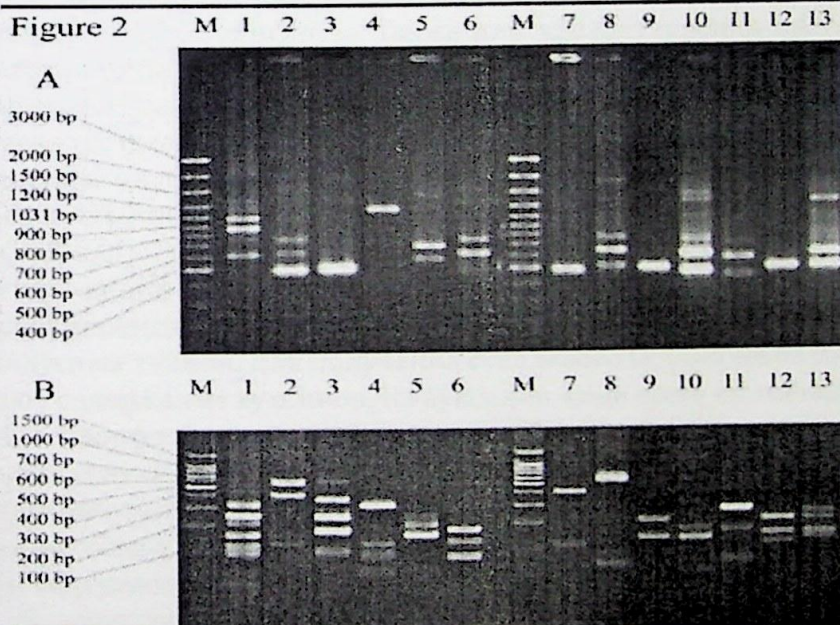


Figure 2



15-рис. Фотография геля

Контрольные вопросы:

1. Перечислите методы сборки электрофоретического аппарата?
2. Какие краски используются при окрашивании геля?
3. С какой целью проводится электрофорез?

Работа 5. Приготовление питательных сред для выращивания клеток и тканей растений

Материалы и оборудование: Химические стаканы объемом в 1 л, (4 шт.), посуда для хранения первичных растворов с плотно закрывающейся крышкой (3 шт. по 1 л, 1 шт. по 100 мл), стеклянные сосуды 10 шт., пипетки, аналитические и технические весы, химические реактивы.

Объяснение материала: В питательной среде для выращивания клеток и тканей растений должны присутствовать все макроэлементы (азот, фосфор, кальций, калий, сера, магний) и микроэлементы (бор, цинк, медь, марганец, молибден, кобальт, йод), витамины, углеводы, а также фитогормоны. В состав некоторых питательных сред также входят гидролизат казеина и некоторые аминокислоты. Также для удовлетворения клеток железом добавляют ЭДТА (этилдiamинтетрауксусная кислота) или его натриевую соль. Основу питательной среды составляют углеводы, потому что выделенные клетки и ткани не способны питаться автотрофно. Источником углеводов в питательных средах обычно используют растворы сахарозы или глюкозы (20-40 г/л). Регуляторы роста (фитогормоны) вызывают клеточную дедифференцировку, цитокинины индуцируют деление дедифференцированных клеток и необходимы для получения каллусных тканей. Для получения стеблевого морфогенеза снижают содержание ауксинов. Из ауксинов чаще всего применяют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) - 0,1-10 мг/л, нафтилуксусную кислоту (НУК) - 0,1-2 мг/л, ИУК - 1-30 мг/л. Для индукции каллусогенеза используют более высокие концентрации ауксинов, в дальнейшем ткань может расти при более низком содержании ауксинов.

В качестве цитокининов используют кинетин, 6-бензиламинопури́н (БАП), зеатин (0,001-10 мг/л); из них кинетин наименее активен. В состав некоторых сред входит аденин. Иногда используют гибберелловую кислоту (ГК). В качестве ростактиваторов применяют также кокосовое молоко, дрожжевой экс-

тракт, гидролизат казеина и др. При приготовлении твердых питательных сред пользуются агар-агаром, получаемым из водорослей. В бактериальном агаре под названием "*Bacto agar*" содержание примесей мало, поэтому его можно использовать без очищения. Обычно, для приготовления твердой питательной среды используется 5-7% агар. Для эффективного использования времени, можно приготовить концентрированный исходный раствор с макро и микроэлементами, витаминами и использовать его в последующем методом разведений. Эти растворы хранятся в холодильнике, витаминные растворы хранятся при минусовых температурах. Состав питательных сред зависит от вида растения и типа питания. Разработано много питательных сред, но большинство из них представляют модификации основных: Мурасиге-Скуга (МС) (4-таблица), Уайта, Шенка-Хильдебрандта, Гамборга (В5), Линсмайера-Скуга, Хеллера, Чапека и др. Для микрклонального размножения тканей растений, для выращивания апикальных меристем используется питательная среда Мурасиге-Скуга.

4-таблица

Составы питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений

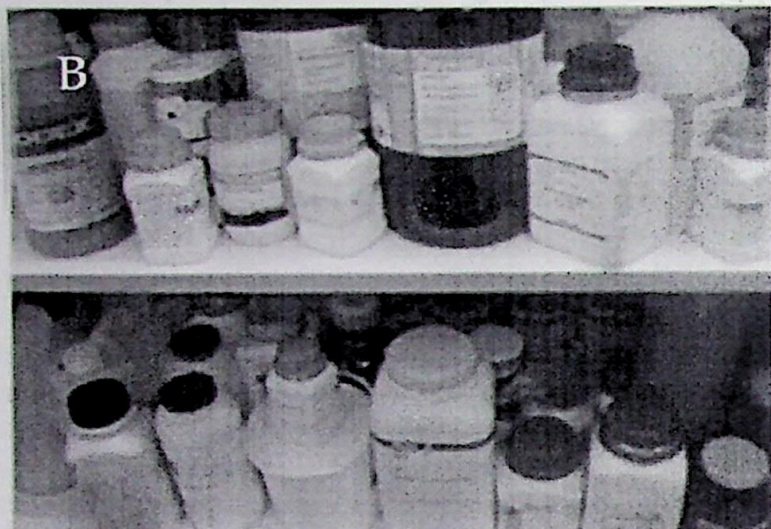
Компоненты питательных сред	Концентрация мг/л			
	Мурасиге-Скуга	Гамборга	Шенка-хильдебрандт	Грессхофф-доу
NH_4NO_3	1650	2500	2500	—
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	—	300	—
KNO_3	1900	2500	—	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	134	—	—
KH_2PO_4	170	—	—	—
$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	28,0	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	150	—	90,0
H_3BO_3	6,2	3,0	5,0	3,0

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	1,0	3,0
KI	0,83	0,75	1,0	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,1	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,2	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	–	–	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотиновая кислота	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин –HCl	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин–HCl	0,1	10,0	5,0	–
2,4-дихлорфенок-уксусная кислота (2,4-Д)	–	2,0	–	–
Кинетин	–	–	0,1	–
Глутамин	–	–	–	2,0
Сахароза	30 000	20 000	30 000	20 000

Ход работы: Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для выращивания апикальных меристем картофеля и клубники. Состав питательной среды приведена в 4 и 5 таблицах. Прежде всего готовим исходный раствор с макро, микроэлементами и с витаминами.

Питательная среда Мурасиге-Скуга готовится из следующих компонентов:

1. NH_4NO_3 , KNO_3 , KN_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MgSO_4 добавляется в конце, для предотвращения осаждения);
2. Раствор CaCl_2 ;
3. Раствор хелата железа (Хелат железа получается при нагревании: FeSO_4 и раствора Na_2 ЭДТА);
4. Раствор микроэлементов.



16-рис. Соли для приготовления питательных сред

Приготовленные растворы нужно хранить в холодильнике в стеклянных банках с плотно закрывающейся крышкой. Хелат железа хранится в темной стеклянной банке в холодильнике. Насыщенные растворы витаминов готовятся отдельно и хранятся в пенициллиновых флаконах в холодильнике.

1 мл витаминного раствора добавляют в питательную среду Мурасиге-Скуга для выращивания апикальных меристем клубники и картофеля.

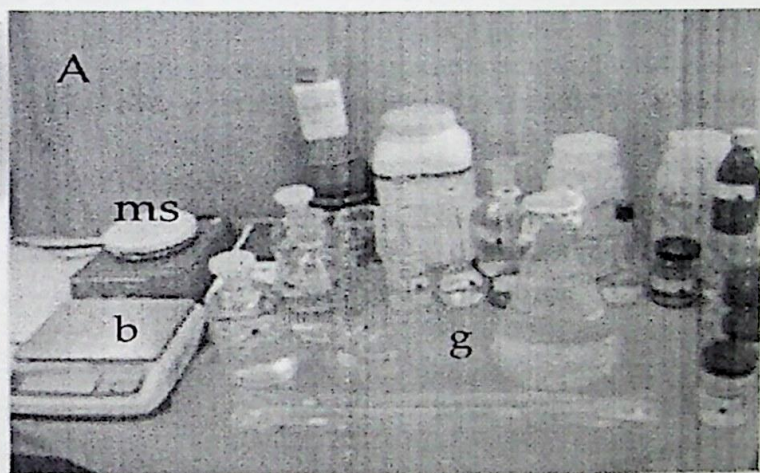
В сосуд объемом 1 л до половины добавляем сахарозу, затем согласно таблицы-4 добавляем нужное количество растворов солей и витаминов. Для выращивания апикальной меристемы картофеля добавляем активированный уголь, регуляторы: гибберелловая кислота (ГК), кинетин, аденин. Гибберелловая кислота растворяется в небольшом количестве спирта и затем добавляется в питательную среду.

Цитокинины не растворяются в воде, их растворяем в этиловом спирте или этиловом эфире либо в щелочи. Чтобы приготовить раствор цитокинина берем 3-5 мл дистиллированной

воды, 0,5-1 мл 0,1 Н КОН и подогреваем до растворения. Затем обязательно измеряем рН, оно должно быть в пределах 5,5 - 5,6.

В это же время в другом стакане растворяем агар-агар. Для этого берем 7 г замоченного в воде агар-агара, держим над электрообогревателем до полного растворения, затем, после остывания до 50°C, добавляем в питательную среду.

И доводим объем нашего раствора до 1 л, добавление воды. Разливаем в пробирки и стерилизуем автоклавированием.



17-рис. Посуда и оборудование для приготовления питательных сред

Контрольные вопросы:

1. Какие питательные среды используются при культивировании растительных клеточных тканей?
2. Какие микро- и макроэлементы используются при культивирования растительных клеток и тканей?
3. Основные требования, предъявляемые к питательным средам?

Работа 6. Методы стерилизации в биотехнологии

Материалы и оборудование: Чашки Петри (3 шт.), 300-500 мл химические стаканы (2 шт.), 1 л колба с дистиллированной водой, среда Мурасиге-Скуга с гормонами (2,4-Д-2 мг/л, кинетин-0,2 мг/л) и без гормонов, пинцеты, скальпели (2 шт.), крафт-бумага, целлофан, ножницы и фильтровальная бумага.

Объяснение материала: В работе с изолированными тканями и клетками растений, очень важно соблюдать стерильные условия. Питательные среды являются источником питания для всех микроорганизмов. Экспланты, выделенные из растений очень чувствительны к микробам, поэтому необходимо проводить стерилизацию и экспланта и питательной среды. Все работы с изолированными клетками и тканями проводятся в ламинар боксе с использованием стерильного оборудования. В процессе роста тканей необходимо соблюдать стерильные условия, так как изменения влажности и температуры в ватных пробках, дает возможность росту микроорганизмов.

Стерилизация эксплантов. Семена держать в стерильном растворе, затем промыть дистиллированной водой. Время стерилизации зависит от типа экспланта, обычно семена стерилизуют 10-20 минут, растительные экспланты 5-10 минут. Растворы для стерилизации указаны в 5- таблице.

Растительный орган, выделенный для дальнейшей работы, сначала моется в мыльном растворе при помощи щетки, затем погружается на несколько секунд в 70% этанол и хорошо вымывается дистиллированной водой. Семена держат 1-2 минут в спирте. Если экспланты имеют внутренние инфекции, воздействуют антибиотиками. К внутренним инфекциям особо подвержены тропические и субтропические растения с крупными сосудами. Загрязнение культуры грибами и бактериями станет заметно через 1-14 дней после посева, такие культуры уничтожают немедленно, чтобы предотвратить загрязнения воздуха в лаборатории.

Стерилизация питательных сред. Питательные среды стерилизуют автоклавированием при 120°C, 1,0 - 2,0 атм. 20 минут.

Если в составе питательной среды имеются компоненты чувствительные к высоким температурам, проводится холодная стерилизация. Среду пропускают через бактериальные фильтры, имеющие диаметр 0,22-0,45 мкм.

Посуда стерилизуется в сушильных шкафах, предварительно обернутая в бумагу, при 160°C 2-3 часа.

5-таблица

**Стерилизация растительных материалов
(Р.Г.Бутенко, 1990 год)**

Источник	Время стерилизации, минут			
	0,1% диацид	0,1% хло- рид серебра (AgCl ₂)	5-9% гипохло- риты (Na, Ca)	10-12% пере- кись водорода (H ₂ O ₂)
Семена				
сухие	15-2	10-15	15-20	12-15
влажные	6-10	6-8	10-15	6-8
Ткани				
корнеплод	20-3	15-25	15-20	-
побеги	20-4	20-25	20-25	-
листья	1-3	1-3	3-6	3-5
апексы	1-10	1-7	3-15	2-7

Стерилизация ламинар бокса. Ламинар бокс - лабораторный прибор для работы с биологическими объектами в стерильных условиях. Воздух, поступающий в бокс, проходит через бактериальные фильтры, за 2 часа до начала работ включается бактерицидная лампа. Предварительно нужно в бокс положить спиртовую лампу, спички, 96% спирт, стерильную воду и биноккулярную лупу. Также проводится обработка всех поверхностей бокса и биноккулярной лупы 70 % спиртом.

Люди, допущенные к работе, должны надевать стерильный халат и шапку, мыть руки в мыльном растворе.

Стерилизация посуды. Посуда моется в мыльной воде, ополаскивается в дистиллированной воде, затем ставится в сушильный шкаф. Предварительно вся посуда заворачивается в бумагу, во избежание попадания микробов. Стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 160°C 2-3 часа. Температура не должна превышать 175°C, так как при такой температуре бумага становится ломкой, ватные пробки меняют цвет.

Также, при стерилизации посуды можно воспользоваться автоклавом. При автоклавировании погибают все известные микробы и их споры. Время автоклавирования 25-30 минут при 2 атм.

Стерилизация инструментов. Инструменты (скальпели, иглы, пинцеты) стерилизуют в сушильных шкафах при 140°C 2 часа. Шприцы и ножницы кипятят. Перед началом работ каждый инструмент повторно стерилизуется прокаливанием, затем помещаются заранее простерилизованные бумажные пакеты. Очень тонкие иглы стерилизуют 96% спиртом.

Стерилизация материалов. Ватные пробки, халаты, платки, фильтровальная бумага стерилизуется автоклавированием 25-30 минут при 2 атм.

Стерилизация растительных объектов. Для стерилизации растительных объектов используется 0,1% р-р сулемы, 0,1% р-р диацита, 13-20% пергидроль, 3-6 % хлорамин, 10% натрий или кальций гипохлорид. Перед стерилизацией выделенные органы растений вымывают в проточной воде, затем моют мыльным раствором и промывают тщательно в дистиллированной воде.

Контрольные вопросы:

1. Перечислите методы стерилизации образцов растений?
2. При каких температурах стерилизуются питательные среды?
3. Как осуществляется холодная стерилизация?

Работа 7. Микроразмножение растений *in vitro*

В природе существует два способа размножения растений: половой (семенной) и вегетативный. Оба эти способа имеют как свои преимущества, так и недостатки.

К недостаткам семенного размножения относятся генетическая пестрота семенного материала и длительность ювенильного периода.

При вегетативном размножении генотип материнского растения сохраняется, а также сокращается длительность ювенильного периода. Однако большинство видов плохо размножается вегетативным способом, к ним относятся многие древесные породы. Например, эффективность размножения, даже на ювенильной стадии, дуба, сосны, ели, орехоплодных не очень высока. Кроме того, с помощью черенкования невозможно размножать многие виды древесных растений в возрасте старше 10-15 лет. Трудно получить стандартный посадочный материал, так как существует возможность накопления и передачи инфекции. Операции по размножению с помощью прививок сложны и трудоемки.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения - клонального микроразмножения. Клональное микроразмножение - получение *in vitro*, неполовым путем, генетически идентичных исходному экземпляру растений. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность. Термин «клон» был предложен в 1903 году Уэбстером (от греческого *klon* - черенок или побег, пригодный для размножения растений). В соответствии с научной терминологией клонирование подразумевает получение идентичных организмов из единичных клеток. Этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;

- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- высокий коэффициент размножения (10^5 - 10^6 для травянистых, цветочных растений, 10^4 - 10^5 для кустарниковых древесных растений и 10^4 для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение всего года;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

Пионером клонального микроразмножения считается французский ученый Жан Морель, который в 50-х годах двадцатого века получил первые растения - регенеранты орхидей. В это время техника культивирования апикальных меристем *in vitro* была уже хорошо разработана. Как правило, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы и т.д. В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 30-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза ИФРа. Под руководством Р.Г.Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы и др. растений и предложены промышленные технологии. В дальнейшем исследования по клональному микроразмножению охватили и древесные растения.

Так же, в нашей стране, именно в Ташкентском аграрном университете ученые-преподаватели ведут работы по микроразмножению картофеля, который устойчив к засухе, к болезням и к другим неблагоприятным факторам.

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на 4 этапа:

1. выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры.

2. собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов.

3. укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°C, +10°C).

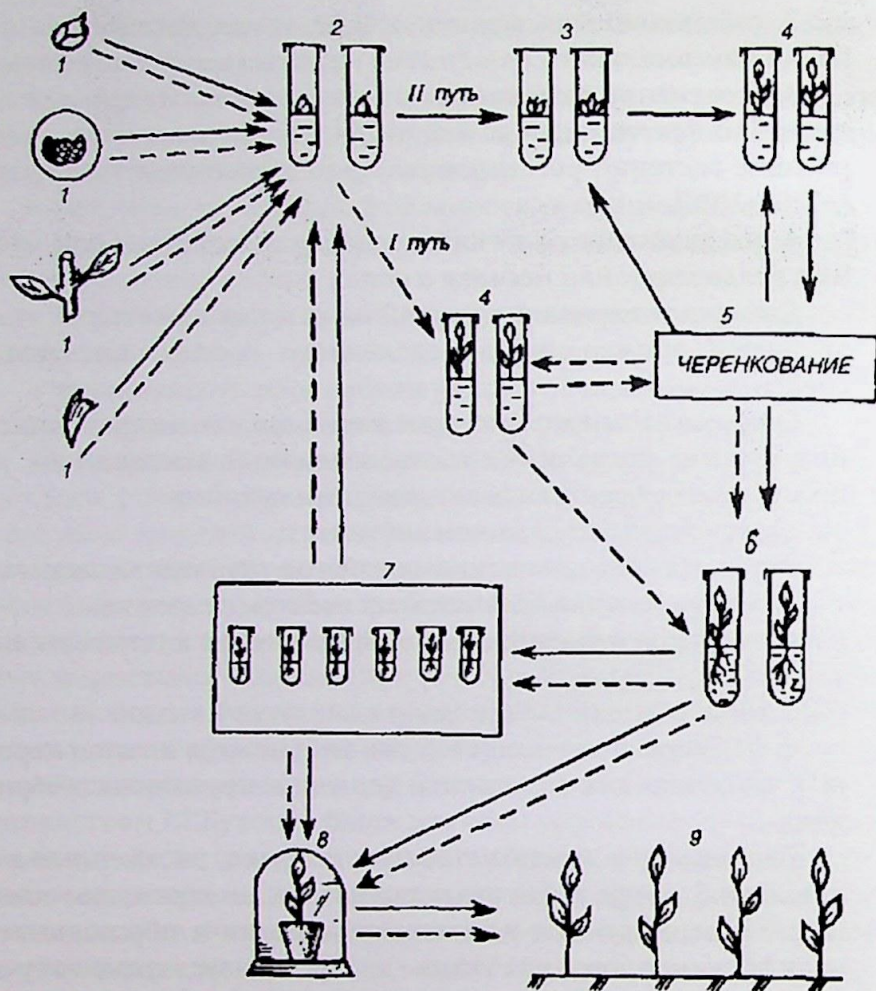
4. выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Для культивирования тканей на каждом из четырех этапов требуется применение определенного состава питательной среды.

Существует много методов клонального микроразмножения, а также различных их классификаций. Согласно им, процесс можно осуществлять следующими путями:

1. активация пазушных меристем.
2. образование адвентивных побегов тканями экспланта.
3. возникновение адвентивных побегов в каллусе.
4. индукция соматического эмбриогенеза в клетках экспланта.
5. соматический эмбриогенез в каллусной ткани.
6. формирование придаточных эмбриоидов в ткани первичных соматических зародышей (деление первичных эмбриоидов).

Паренхимные клетки стебля картофеля, посаженные в питательную среду с фитогормонами, после заражения клетки дедифференцируются и начинают деление и образовывается недифференцированная ткань - каллус. Каллус можно получить из различных частей растения: листьев, клубней, стебля, корня.



18- рис. Схема клонального микроразмножения растений методом активации развития существующих меристем (I путь), индукция возникновения адвентивных почек на экспланте (II путь).

1-выбор исходного экспланта, 2-получение стерильной культуры, 3-образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте, 4-рост почек и формирование микропобегов, 5-размножение микропобегов (черенкование), 6-укоренение микропобегов, 7-депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре, 8-перевод растений в тепличные условия, 9-высадка растений-регенерантов в поле.

Контрольные вопросы:

1. Что означает *in vitro*?
2. Перечислите методы микроразмножения растений?
3. Сколько этапов включает метод клонального микроразмножения?

Работа 7.1. Выращивание стерильных проростков

Материалы и оборудование. Выращенные в пробирке ростки картофеля, пробирки с модифицированной средой Мурасиге-Скуга, стерильные скальпели, чашки Петри.

Объяснение материала. Для культивирования клеток и тканей извлеченного из растений необходимо соблюдение некоторых условий. Многие каллусные культуры не нуждаются в солнечном свете, потому что они не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно, кроме некоторых каллусных тканей зеленого цвета. В некоторых случаях каллусные ткани не способны питаться автотрофно, их выращивают в условиях постоянного света. Это и есть условие для успешного морфогенеза.

Ткани, выделенные для морфогенеза, переводятся в световую комнату и выращиваются при освещении 1000-4000 лк. Выращивание и микроразмножение выделенных меристем так же проводятся при свете. Свет должен быть 1000-10000 лк, интенсивность света зависит от особенностей растений. При этом необходима фотопериодичность выбранного растения.

В комнате для культивирования влажность должна составлять 60-70%. Более сухая среда, если пробирки закрыты ватными тампонами, приведет к изменению состава питательной среды и к его осушению.

Для выращивания многих тканей оптимальной считается 25-26°C. Для тканей тропических растений 29-30°C. Для индуцирования морфогенеза снижают температуру до 18-20°C, для этого обычно используют климатические камеры.

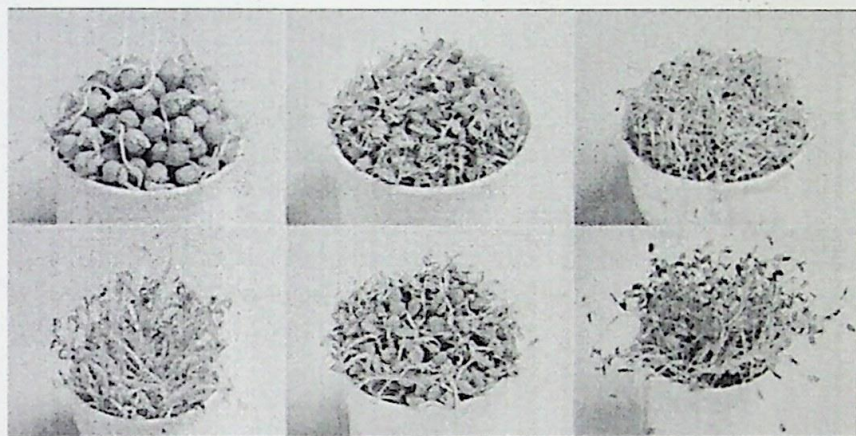
Самый распространённый метод выращивания стерильных проростков - это выращивание в пробирке путем черенкования. Для этого растение делится на части, черенки сажают в пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга.

Основной метод, использующийся при клональном микро-размножении растений - активация развития уже существующих в растении меристем. Он основан на снятии апикального доминирования. Из черенков, посаженных в питательную среду, развиваются стебли. Черенкование проводится каждые 14-21 день. Из одного растения можно получить 5-8 черенков, за 2-3 месяца можно увеличить их количество до 5000, за 7 месяцев до 30-40 тыс.

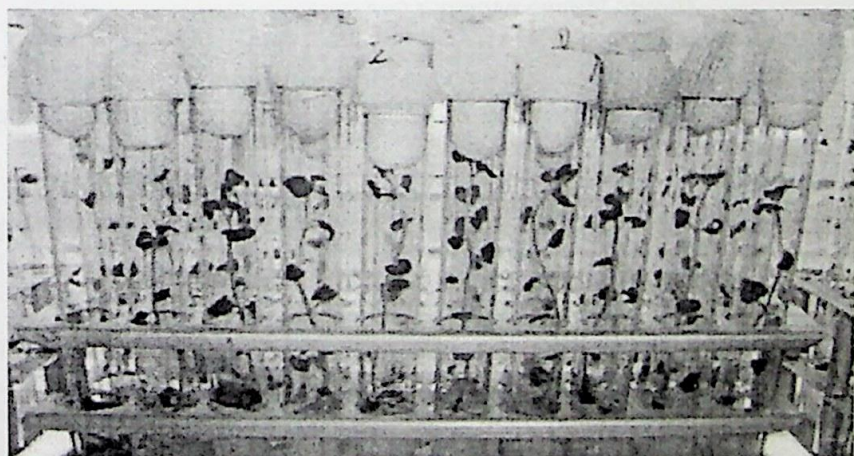
После этого переходят к следующему этапу выращивания оздоровленного посевного материала. Этот процесс проходит в теплице. Растение с пробирки, вместе с агаровой питательной средой высаживается в горшочки с почвой. Через 3-7 дней после перепосадки, поливают раствором Кнопа, приготовленного на основе питательного раствора Мурасиге-Скуга (на 1 л воды 5 мл раствора в концентрации 1x100). Через 7-10 дней растение пересаживают на постоянное место. Таким образом, получают безвирусные растения для посадки в открытые участки.

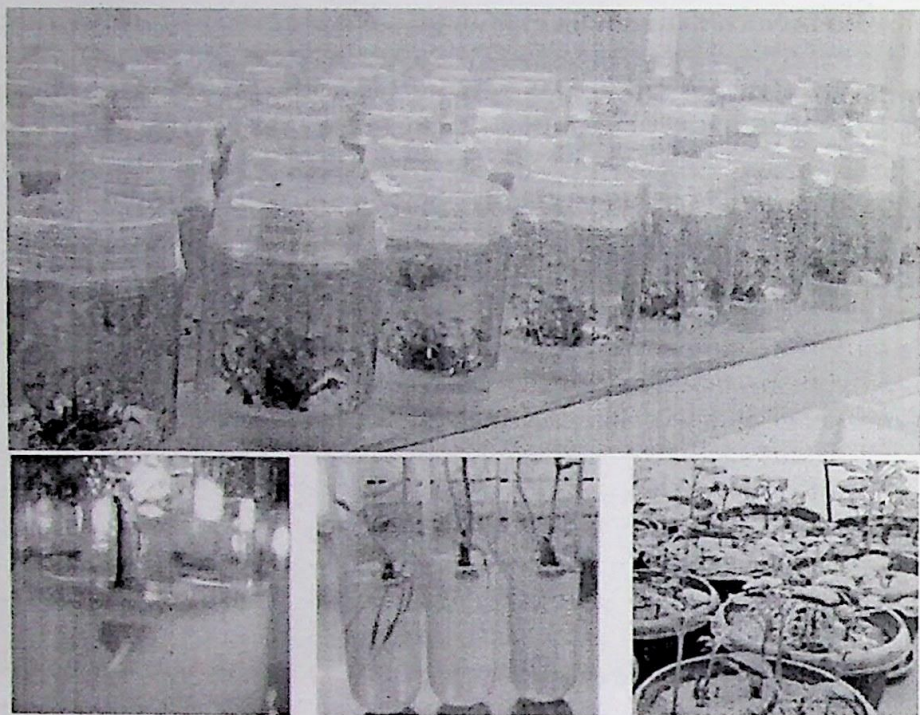
Ход работы. В ламинар боксе из пробирки вынимают растение, выкладывают в чашки Петри и делят на фрагменты. Каждый фрагмент должен содержать лист и пазушную почку, часть стебля над листом при этом должна быть в 2-3 раза меньше, чем часть ниже листа. Обязательно соблюдать стерильность.

Черенки сажают в пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга. Чтобы предотвратить проникновение микроорганизмов в пробирки ватный тампон держат над пламенем горелки. После зарисовки пробирки с черенком, ставят в световую камеру и наблюдают за развитием в течение 7-10 дней. Этапы развития черенка зарисовывают.



19-рис. Стерильные проростки полученные из растений





20-рис. Микро черенки полученные путем *in vitro*

Контрольные вопросы:

1. Через какой интервал времени осуществляется черенкование?
2. Сколько черенков можно получить с 1 растения?
3. В каких питательных средах культивируется каллусные ткани *in vitro*?

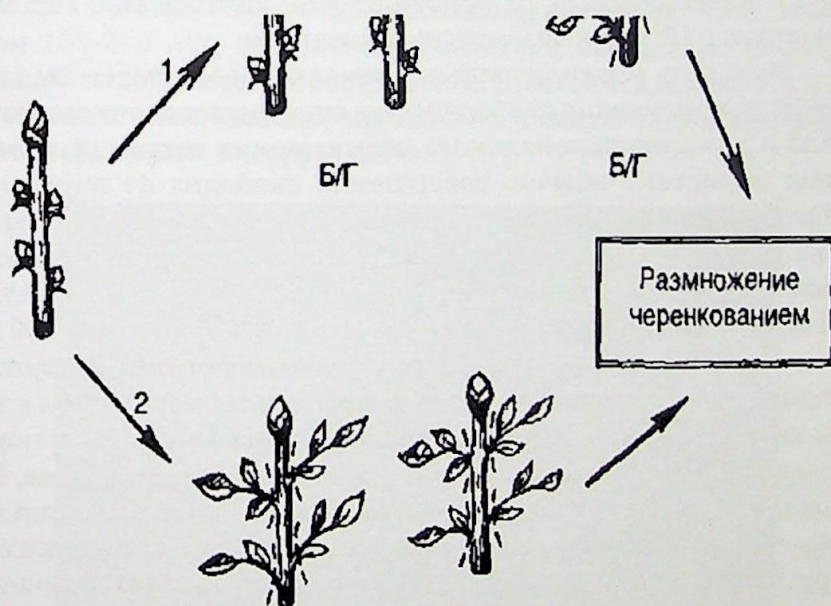
Работа 7.2. Выделение и выращивание апикальной меристемы картофеля

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, бинокулярная лупа, скальпели, препаровальные иглы, лезвия, зажатые в держателе и пробирки со стерильной питательной средой.

Объяснение материала. Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений - активация развития уже существующих в растении меристем и снятия апикального доминирования (21- рис).

Этого можно добиться 2 путями:

- удаление верхушечной меристемы и микроразмножение *in vitro* в безгормональной среде;
- добавление в питательную среду цитокининов.



21-рис. Схема размножения растений методом активации развития существующих меристем

1 - путем удаления верхушечной меристемы; 2- добавлением в питательную среду цитокининов (Б/Г - безгормональная среда, Ц - цитокинины, А - ауксины)

Обычно, в качестве цитокининов используется 6-бензиламинопурин (БАП), 6-фурфуриламинопурин (кинетин), 2-изопентениладенин (2ip) и зеатин.

В настоящее время этот метод широко применяется в сельском хозяйстве при получении без вирусного посадочного материала. При помощи этого метода выращиваются оздоровленные саженцы сахарной свеклы, картофеля, помидоров, табака, топинамбура, огурцов, земляники и других растений.

Технология клонального микроразмножения картофеля приобрела производственные масштабы.

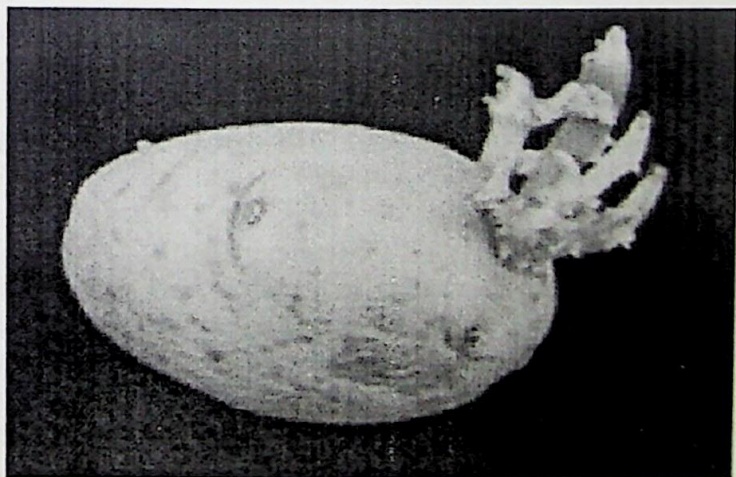
Преимущество метода перед обычными способами вегетативного размножения - это большие коэффициенты получаемого материала, так из одного клубня картофеля в год можно получить 10^5 штук безвирусных саженцев.

Культура изолированных апикальных меристем используется для получения свободного от вирусов посадочного материала и для микроклонального размножения растений. Апикальная меристема обычно совершенно свободна от вирусов, она представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм (100 мкм) и шириной 0,25 мм. Поскольку меристему бывает трудно вычленить без повреждения, часто ее отделяют с 1-2 листовыми примордиями (апексы размерами 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 клубни, образовавшиеся на безвирусных растениях *in vitro*.

Ход работы. Клубни картофеля хранят при 4-8°C, затем проращивают в темноте при 20-22°C. Работы по вычленению меристем проводят в простерилизованном с помощью бактерицидных ламп ламинар боксе. Рабочее место (стол, бинокулярная лупа) и штативы с пробирками протирают спиртом. Инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) стерилизуют перед каждым вычленением, погружая в спирт и затем обжигая.

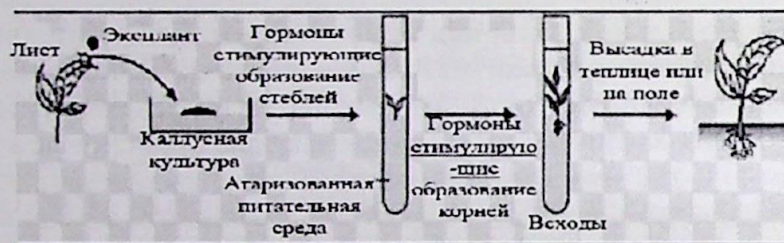
Ростки опускают в химический стакан и заливают 0,1%-ным раствором диацита на 3-5 минут. Затем не менее 3 раз промывают их стерильной водой, затем помещают в чашки Петри и добавляют несколько капель автоклавированной воды для предупреждения подсыхания. Перед вычленением с помощью препаровальной иглы под бинокулярным микроскопом с верхушки ростка удаляют покровные листочки, последовательно обнажая боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками. Меристему, включающую кусочек ткани размером 100-250 мкм без листовых зачатков, вычленивают обычной тонкой иглой, зажатой в держатель. Вычленивать можно как верхушечные, так и боковые меристемы. Каждую операцию проводят стерильным инструментом.



22-рис. Проросший клубень картофеля

Меристему на острие иглы переносят на поверхность питательной среды в пробирку, закрывают ее пробкой над пламенем горелки и поставят в штатив. Штатив с пробирками закрывают целлофановым колпаком для предупреждения подсыхания сред и поставят в световую камеру.

В качестве питательной среды используют модифицированную среду Мурасиге-Скуга, приготовленную заранее и простерилизованную в автоклаве при давлении 1 атм. в течение 20 минут. Через 2, 3, 4 недели последовательно пронаблюдают за развитием из меристем побега и зарисовывают этапы этого процесса.



23-рис. Действие гормонов на развитие ростков

Контрольные вопросы:

1. Что такое апикальная меристема?
2. Что такое каллусные ткани?
3. В чем выражаются признаки старения каллусных тканей?

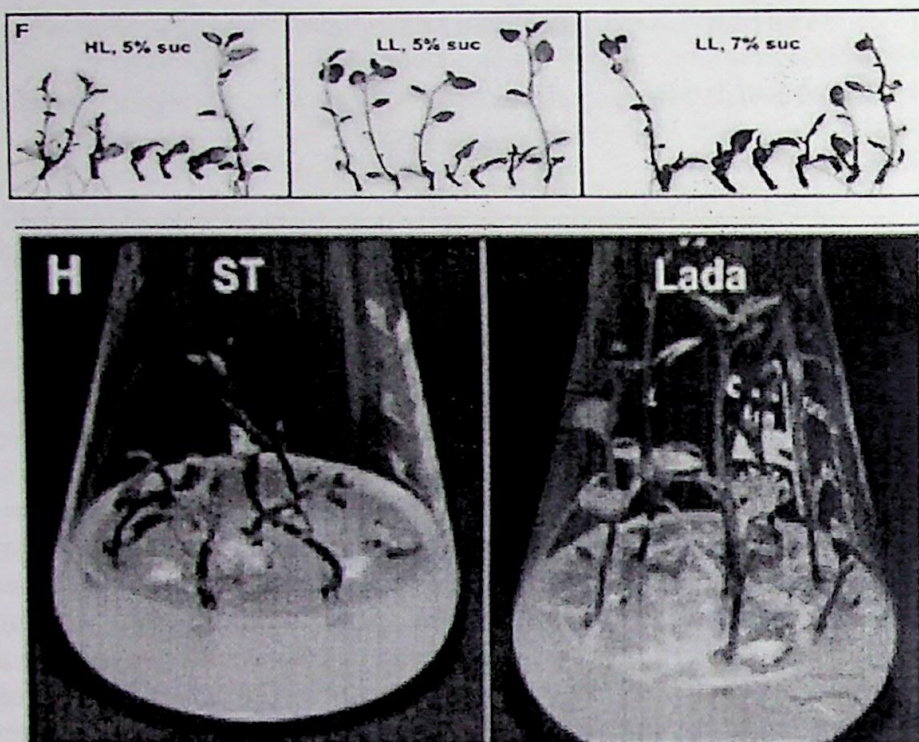
Работа 8. Получение микроклубней картофеля *in vitro*

Работа- 8.1. Микроразмножение картофеля черенкованием побегов

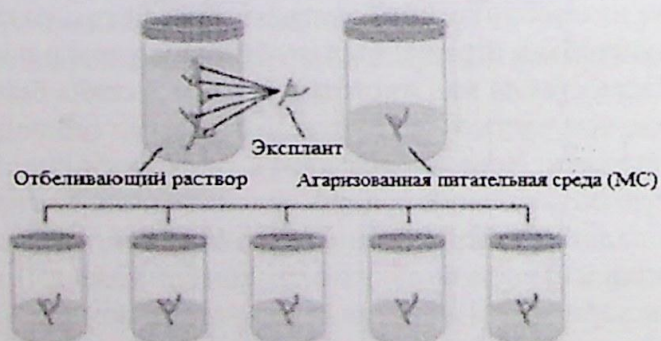
Материалы и оборудование: Пробирочные растения картофеля, пробирки с модифицированной стерильной питательной средой Мурасиге-Скуга, стерильные скальпели, пинцеты и чашки Петри.

Объяснение материала. Растения картофеля, выращенные из апикальных меристем, должны выращиваться в искусственных питательных средах. 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 в питательную среду развивается побег. Черенкование проводят с интервалом 14-21 день. Из 1 растения получают 5-8 черенков, за 2-3 месяца это 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 так чтобы в отрезке был стебель 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 модифицированную стерильную питательную среду Мурасиге-Скуга. Для предотвращения попадания микроорганизмов в пробирку обжечь горлышко пробирки и ватную пробку в пламени спиртовки. Пробирку с черенком зарисовать и поставить в световую камеру. Наблюдать за развитием побега через 7 и 14 дней. Зарисовать этапы развития черенка.



24-рис. Ростки полученные микроразмножением



25-рис. Получение ростков из растительного экспланта

Контрольные вопросы?

1. Из какой части картофеля выделяется апикальная меристема?
2. Что означает регенеративное растение?
3. Какие фитогормоны используются для образования корневой системы растений?

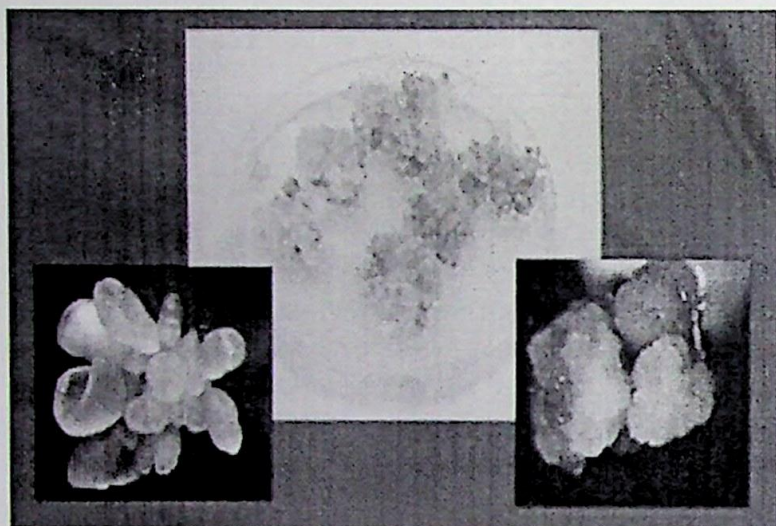
Работа 8.2. Получение микроклубней из картофеля

Материалы и оборудование: Пробирочные растения картофеля, стерильные скальпели, пинцеты, матрасики, чашки Петри, спиртовка, пробирка или колба для выделения и выращивания каллуса картофеля с питательной средой, бумага парафильм, ножницы, спички.

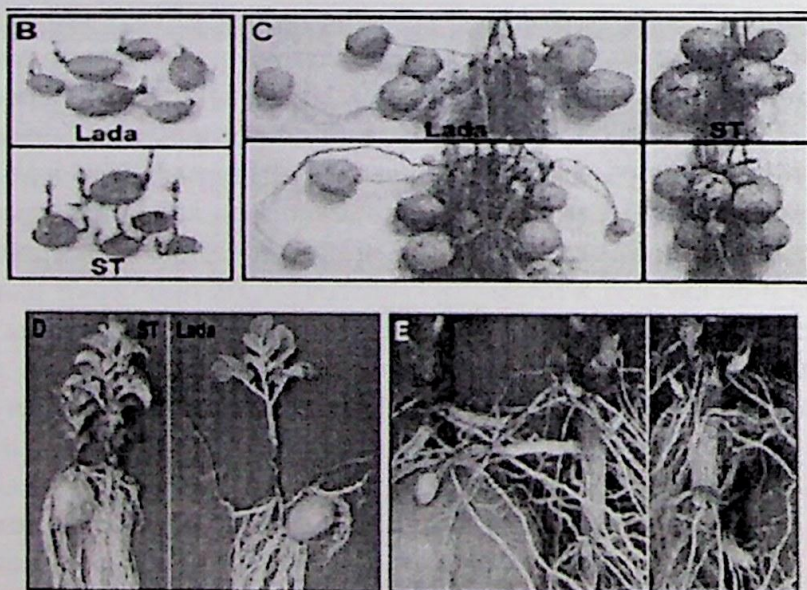
Объяснение материала. Следующий этап размножения оздоровленного посадочного материала проводят в условиях теплицы. Растения из пробирок вместе с агаровой питательной средой переносят в горшки с почвой. Отверстие в увлажненной почве проделывают пробиркой незадолго до пересадки. На 3-7 день растения подкармливают растворами Кнопа и микроэлементов по Мурасиге-Скуга: 5 мл маточного раствора в концентрации 1х100 на 1 л воды. Через 7-10 дней растения пересаживают на постоянное место в теплице для получения безвирусных клубней, которые можно в дальнейшем пересадить в поля.

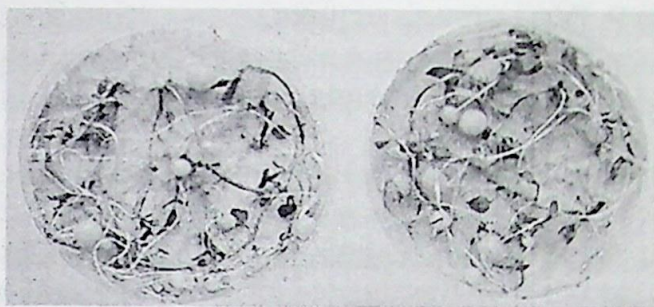
Ход работы. Внутреннюю поверхность ламинара протирают спиртом. Пробирку со стерильным растением протирают спиртом и обжигают в пламени спиртовки. Из пробирки вынимают растение пинцетом на матрасик таким образом, чтобы пинцет находился в левой руке, а в правой - скальпель. При помощи скальпеля разрезают растение на части по 5-10 мм. Для образования каллуса в нескольких местах на стебле делают надрезы. Разливают питательную среду с колбы в чашки Петри по 15-30 мл и остуживают 10-15 минут. В одну чашку Петри помещают от 10 до 20 эксплантов растения. Закрывают крышку чашки Петри, заворачивают в бумагу парафильм и помещают в климати-

ческую камеру без света при температуре 20-22°C и 70% влажности. Через 3 недели наблюдать за эксплантом и зарисовать образовавшийся каллус.



26-рис. Каллусные ткани





27-рис. Получение микроклубней картофеля

Контрольные вопросы:

1. В каких питательных средах культивируется апикальная меристема картофеля?
2. В каких целях выделяются клубни картофеля?
3. Перечислите преимущественные стороны черенкования?

Работа 9. Управление переходом клубеньков картофеля в состояние покоя и выход из него при помощи фиторегуляторов

Материалы и оборудование: Клубни картофеля, гиббереллин, 2-хлорэтилфосфоновая кислота или препарат на его основе, этиловый спирт, посуда для растворов и для погружения клубней, термостат, бумажные пакеты, мерная посуда для растворов, линейка и миллиметровая бумага.

Объяснение материала. Фитогормоны могут менять проницаемость клеточной мембраны, в частности, проницаемость плазмолеммы мембраны, отделяющей клетку от клеточной стенки. Плазмолемма содержит белки, осуществляющие перенос различных ионов через мембрану. Клеточная стенка состоит из целлюлозных пучков, скрепляемых между собой гемицеллюлозой и пектиновыми веществами. Она выполняет функцию жесткого каркаса растительной клетки, ограничивая клеточные растяжения. В то же время фитогормоны, стимулируя активность транспортного белка, осуществляющего перенос протонов (H^+) из клетки в область клеточной стенки, способны управлять ее эластичностью. Под действием фитогормонов - ауксина и гиббереллина - перенос протонов усиливается, а под действием абсцизовой кислоты и этилена замедляется выброс ионов H^+ из клетки и соответственно изменяется рН в зоне клеточной стенки. При усилении выброса протонов клеточная стенка активно подкисляется, что приводит к ослаблению связей между целлюлозными фибриллами из-за частичного кислотного гидролиза пектиновых веществ. Клеточная стенка при этом становится менее прочной, и за счет тургорного давления вакуоли клетка приобретает способность к растяжению.

В условиях нашей республики возможно выращивание двух урожаев картофеля в год, однако на практике часто не реализуется. Основной причиной является недостаток посадочного материала, так как клубни, полученные в прошлом году трудно сохранять до второго срока посадки, а клубни первого урожая

не способны к прорастанию из-за того, что находятся в состоянии глубокого покоя. Для прерывания покоя используют гиббереллин, который резко повышает содержание фитогормонов - стимуляторов прорастания.

При хранении потери картофеля во многом обусловлены преждевременным выходом клубней из стадии покоя, т.е. разрушением ингибитора прорастания - фитогормона абсцизовой кислоты. Обработка клубней этиленом перед закладкой на хранение способствует увеличению биосинтеза абсцизовой кислоты и, следовательно, лучшей сохранности клубней.

Ход работы. Приготовить растворы гиббереллина и 2-хлорэтилфосфоновой кислоты. Замочить клубни в этих растворах на 10-20 мин, после чего обсушить фильтровальной бумагой и запаковать в пакеты, вложив в каждый этикетку с указанием варианта обработки. Поместить в термостат при температуре 26-29°C. Через 14 суток провести учет проросших глазков. По этим данным определить оптимальные концентрации препаратов для стимулирования состояния покоя и прорастания клубней.

Контрольные вопросы:

1. Какие фитогормоны используют для ускорения стадии покоя картофеля?
2. Перечислите фитогормоны использующихся в сельскохозяйственной практике?
3. В каких целях используются фитогормоны?

Работа 10. Выделение чистой культуры клубеньковых бактерий и приготовление препаратов на их основе

Материалы и оборудование: 10 г фасоли или нута, стерильные колбы, 2 г агар-агар, чашки Петри, клубни бобовых, термостат, микроскоп и фуксиновая краска.

Объяснение материала. Фиксация молекулярного азота, который содержится в воздухе, имеет большое значение для сельского хозяйства. Основная масса азота на Земле находится в атмосферном воздухе; 78% воздуха - чистый молекулярный азот. Растения не могут усваивать свободный азот, содержащийся в воздухе. Для этого есть микроорганизмы, которые усваивают атмосферный азот и переводят их в растворимую форму доступную для усвоения растениями. Эти микроорганизмы называют азотификсаторами. Азотификсаторы делят на 2 группы.

1. *Симбиотические азотификсаторы*

2. *Свободноживущие азотификсаторы*

Наиболее известен симбиоз клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. Обычно происходит корневое заражение, но известны растения, образующие клубеньки на стеблях и листьях.

В 1897 году Ф.Ноббе и Л.Гильтнер выпустили бактериальный препарат нитрагин, представляющий собой культуру клубеньковых бактерий на желатине. Разведенным в воде препаратом обрабатывали семена бобовых. Впоследствии препараты нитрагина были предложены многими исследователями. В мировой практике сельского хозяйства используется несколько десятков разновидностей бактериальных удобрений, которые выпускаются в самых разнообразных формах. Наиболее удачна сухая отличающаяся простотой применения и хорошей транспортабельностью.

Препараты из клубеньковых бактерий начали производить в США (1886 г), в Венгрии (1898 г), в Англии (1906 г). В России по производству бактериальных препаратов впервые вели работы Л.М.Будинов (1907 г) и далее И.А.Макринов (1915 г).

Для приготовления препаратов клубеньковые бактерии выращивают на отваре бобовых (фасоль, горох и др.) растений с добавлением углеводов (глюкоза, сахароза и маннит). В некоторых странах (Болгария, Румыния) используется агаровая среда. При использовании агар-агара экономическая эффективность падает и исходный материал дорожает. Использование почвы, как субстрата, дает относительно хороший эффект.

Стерилизованная почва помещается в стеклянные емкости и добавляется жидкая культура клубеньковых бактерий. Но в почвенном нитрогене трудно добиться высокого титра бактерий, поэтому для этих целей начали использовать торф. В странах, где нет запасов торфа, для субстрата стали использовать другие материалы. В виде субстрата также может использоваться высушенная смесь болотных водорослей и навоза.

Микробиологические подходы в сельском хозяйстве являются экологически оправданными, и потому должны привлекать внимание как ученых, так и фермеров.

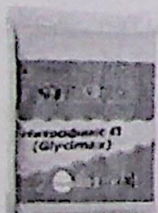
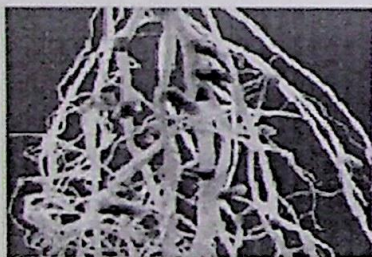
Так, в нашей Республике, в Институте микробиологии, успешно используются активные штаммы клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* для предпосевной обработки семян сои, а также бактерии рода *Rhizobium* для обработки семян бобовых растений. Бактерии симбиотически взаимодействуя с растением, помогают усваивать атмосферный азот, что приводит обогащению почвы азотом, что влечёт за собой повышение урожайности. Кроме этого, в нашей республике учеными ведётся научно-исследовательская работа по поиску эффективных, экономически выгодных азотных субстратов.

Технология приготовления бактериального удобрения проходит в несколько этапов:

- выращивание и хранение культуры клубеньковых бактерий;
- получения жидкой культуры (инокулята);
- приготовления субстрата-носителя;
- стерилизация;
- инокулирование и хранение готового препарата;

- контроль производства;
- статистический анализ эффективности в практике.

Ход работы. Чтобы выделить чистую культуру клубеньковых бактерий используется бульон из бобов (можно использовать горох или фасоль). Для бульона нужно 100 мл воды 10 г фасоли или гороха, кипятить 30-40 минут. Вылить в стерильную колбу через фильтр и довести объем раствора до 100 мл стерильной водой. Довести до нейтрального значения pH. Растворить в гороховом бульоне сахар и 2 г агар-агара. Готовую питательную среду разлить по чашкам Петри, дать полностью остыть. Простерилизовать под UV в течение 15-20 мин в ламинре. Затем сделать посев из сока, выделенного из клубней бобовых растений. Чашки ставят в термостат на несколько дней при 25-30°C. Через 3-4 дней на чашках вырастут мелкие слизистые колонии молочно-белого цвета. Из выросших колоний готовят препарат и окрашивают по методу Грамма метиленовым синим или фуксином. Под микроскопом можно увидеть мелкие тоненькие палочки, не образующие спор.



28-рис. Клубеньковые бактерии и препараты на их основе

Контрольные вопросы?

1. Какие препараты имеются на основе клубеньковых бактерий?
2. Как осуществляется приготовление бактериального препарата?
3. На какие группы разделяются азотфиксаторы?

Работа 11. Технология получения препаратов Нитрагин, Азотобактерин и Фосфобактерин

Работа 11.1. Технология получения препарата Нитрагин

Оборудование и материалы. Корни клубеньковых растений, питательная среда, микроскоп, иммерсионное масло, фильтровальная бумага, предметные и покровные стекла, микробиологическая петля, скальпель, пинцеты, красители (метиленовый синий, фуксин), почва, весы, колбы.

Объяснение материала. Микрофлора почвы оказывает непосредственное влияние на её плодородие и, как следствие, на урожайность растений. Почвенные микроорганизмы в процессе роста и развития улучшают структуру почвы, накапливают в ней питательные вещества, минерализуют различные органические соединения, превращая их в легкоусвояемые растением компоненты питания. Для стимуляции этих процессов применяют различные бактериальные удобрения, обогащающие ризосферу растений полезными микроорганизмами. Микроорганизмы, используемые для производства бактериальных препаратов, способствуют снабжению растений не только элементами минерального питания, но и физиологически активными веществами (фитогормонами, витаминами и др.).

По данным проф. Мишустина Е.В. азотофиксаторы за год собирают в 7 раз больше азота, чем производители азотных удобрений. Другими словами, азотофиксаторы в год производят 1-1,5 млн тонн азота.

Симбиотические азотофиксаторы. Азотфиксирующие микроорганизмы, которые живут в симбиозе с корнями бобовых растений и образуют на их корнях клубеньки, называют клубеньковыми бактериями. Растение обеспечивает бактерии необходимыми питательными веществами и создает для них оптимальные условия существования. Бактерии же, находясь в клубеньках, снабжают растение азотистым питанием. Ни растение, ни бактерии сами по себе не могут фиксировать азот. В настоящее время учеными обнаружено 16 видов клубеньковых

бактерий. Они отличаются друг от друга морфологическими и физиологическими особенностями.

Клубеньковые бактерии относятся к роду *Rhizobium*. Форма и величина клубеньковых бактерий изменяется в зависимости от стадии их развития. В молодой культуре они представлены короткими подвижными палочками, которые со временем утрачивают подвижность и переходят в стадию так называемых опоясанных палочек. Клетки клубеньковых бактерий имеют размер от 1 мкн до 4-5 мкн. Оптимальная температура для жизни 25-28°C и при 50-60°C они погибают. При 15-19°C тепла они также могут развиваться. Если кислотность среды нейтральная, они развиваются лучше. Фиксация атмосферного азота возможна только в образующихся в корневой системе растения клубеньках. Их возникновение связано с инфицированием корневой системы бобового растения бактериями из рода *Rhizobium*. Заражение корневой системы происходит только через молодые корневые волоски: после внедрения бактерии прорастают внутри них до самого основания в виде инфекционной нити. Выросшие нити проникают сквозь стенки эпидермиса в кору корня, разветвляются и распределяются по клеткам коры.

Бактерии рода *Rhizobium* могут образовывать клубни у 1300 видов бобовых.

Чтобы получить чистую культуру клубеньковых бактерий, берут корни бобовых (маш, фасоль, горох и др.), тщательно промывают под водопроводной водой, выделяют 3-4 крупных клубня и вырезают их. Вырезанные клубни промывают в стерильной воде, затем замачивают 0,1% растворе сулемы на 5 мин. Затем промывают водой в течение 5 мин, после замачивают в спирте на 1 мин. Остатки спирта с клубней удаляют при помощи спиртовой лампы. Стерильные клубни помещают в стерильную чашку Петри и разделяют на части. Бактериологической петлей берут небольшое количество содержимого клубенька, переносят в каплю стерильной воды на поверхность агаровой питательной среды в чашку Петри и растирают шпателем. Этим же шпателем делают посев последовательно еще на 2-3 других

чашках со стерильной средой для получения отдельных колоний.

В таблицах 6, 7, 8, 9, 10 указаны питательные среды, которые используются в получении чистой культуры клубеньковых бактерий.

Для приготовления бобового отвара 50 г бобов (белой фасоли или гороха) заливают 1 л водопроводной воды и варят до набухания и растрескивания кожуры (бобы не должны развариваться). Отвар фильтруют через вату (марлю) и доводят водопроводной водой до 1 л.

6-таблица

Среда Фреда

Маннит (сахароза или глюкоза)	10 г
KH_2PO_4	0,5 г
MgSO_4	0,2 г
NaCl	0,1 г
CaCO_3	3 г
Дрожжевая вода (рН 6,8)	100 мл
Агар-агар	15 г
Дистиллированная вода	0,9 л

7-таблица

Бобовый агар

Бобовый отвар	1000 мл
KH_2PO_4	1 г
MgSO_4	0,3 г
Агар-агар	15 г

рН среда вышеприведенных сред доводится до значения 7 при помощи соды. Среды стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм, 120°C, 30 минут.

На этих средах клубеньковые бактерии образуют бесцветные или молочно-белые, часто слизистые, колонии, за исключением розово-красных колоний клубеньковых бактерий из клубеньков *Lotononis bainesii*. Из этих колоний выделяют чистую культуру микроорганизмов.

Кроме этого, можно использовать среды, приведенные таблицах 8, 9, 10.

8-таблица

Среда Лазарева

KH ₂ PO ₄	0,5 г
MgSO ₄	0,2 г
NaCl	0,2 г
MnSO ₄	0,005 г
NH ₄ MoO ₄	0,002 г
Маннит или сахароза	10 г
Дрожжевая вода	100 л
Агар-агар	1,5 %
Вода	0,9 л

9-таблица

Среда Норриса

K ₂ HPO ₄	0,5 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,8 г
NaCl	0,2 г
FeCl ₃	0,01 г
Маннит	10 г
Экстракт свежих дрожжей	100 мл
вода	0,9 л
pH	7,2

10-таблица

Питательная среда для медленнорастущих клубеньковых бактерий (соя, люпин)

Маннит или сахароза	10 г
K ₂ HPO ₄	0,5 г
MgSO ₄	0,2 г
NaCl	0,1 г
Глюконат кальция	1,5 г
FeCl ₃	0,01 г
Экстракт дрожжей	2 г
Вода	1 л
Агар-агар	20 г

Нитрагин-препарат, содержащий чистую культуру бактерий рода *Rhizobium*.

Бактерии рода *Rhizobium* - строгие аэробы. Среди них различают активные, малоактивные и неактивные культуры. Критерием активности клубеньковых бактерий служит их способность в симбиозе с бобовым растением фиксировать атмосферный азот и использовать его в виде соединений для корневого питания растений. Клубеньковые бактерии обладают избирательной способностью вступать в симбиотические взаимоотношения с различными бобовыми растениями.

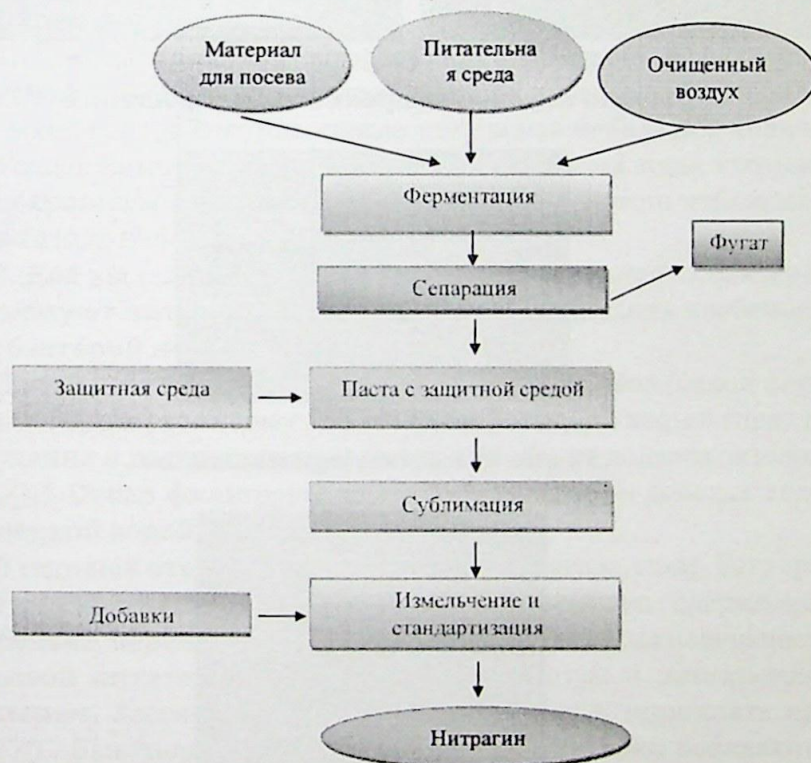
В России выпускается 2 вида нитрагина: почвенный и сухой. Впервые культура клубеньковых бактерий на почвенном субстрате была приготовлена в 1911 году на бактериально-агрономической станции в Москве. В настоящее время его производство имеет ограниченное значение, так как технология довольно сложна и трудоёмка при выполнении отдельных операций.

Сухой нитрагин - порошок светло-серого цвета, содержащий в 1 г не менее 9 млрд. жизнеспособных бактерий в смеси с наполнителем. Влажность не превышает 5-7%. Сухой нитрагин состоит из смеси клубеньковых бактерий и добавок, как торф или бентонит. Более перспективна технология производства сухого нитрагина. Промышленное производство имеет типичную схему.

Для каждого вида бобового растения изготавливается свой нитрагиновый препарат.

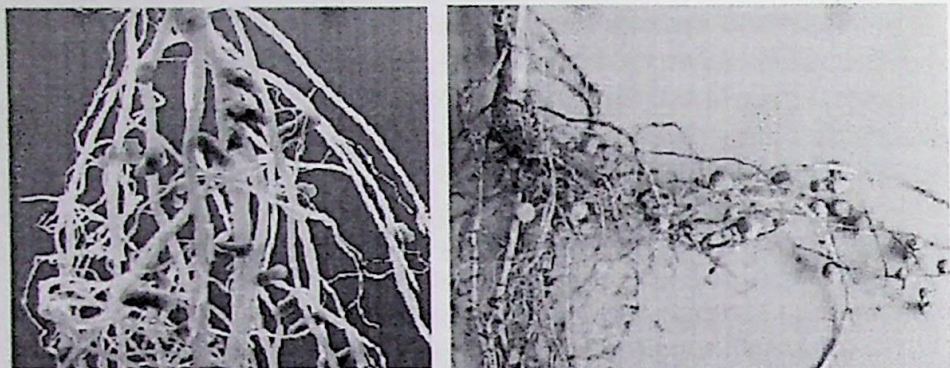
Для производства посевного материала исходную культуру клубеньковых бактерий выращивают на агаризованной среде, содержащей отвар бобовых семян, 2% агара и 1% сахарозы, затем культуру размножают в колбах на жидкой питательной среде в течение 1-2 суток при 28-30°C и рН 6,5-7,5. На всех этапах промышленного культивирования применяют питательную среду, включающую такие компоненты, как меласса, кукурузный экстракт, минеральные соли в виде сульфатов аммония и магния, мел, хлорид натрия и двузамещенный фосфат калия. Ос-

новая ферментация идет при тех же условиях в течение 2-3 суток. Готовую культуральную жидкость сепарируют, получается биомасса в виде пасты с влажностью 70-80%. Пасту смешивают с защитной средой, содержащей тиомочевину и мелассу (1:20) и направляют на высушивание. Сушат путем сублимации (в вакуум-сушильных шкафах). Высушенную биомассу размалывают. Производительнее высушивание в распылительных сушках, но при этом 75% клеток теряют жизнеспособность. Препараты сухого нитрагина фасуют и герметизируют в полиэтиленовые пакеты по 0,2 - 1 кг, хранят при температуре 15°C не более 6 месяцев.

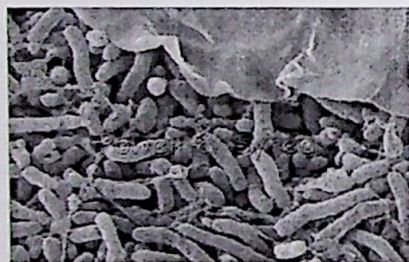


29-рис. Технологическая схема производства нитрагина

Семена «опудривают» перед посевом. Внесение нитрагина повышает урожайность в среднем на 15-25%.



30-рис. Клубни на корнях бобовых растений



31-рис. *Rhizobium leguminosarum*



32-рис. Колонии *Rhizobium*



33-рис. Препарат Нитрагин на основе клубеньковых бактерий

Ход работы. Существует несколько методов определения клубеньковых бактерий.

1. Для определения морфологии клубеньковых бактерий, берут клубни бобовых растений, хорошо промывают в стерильной воде. На предметное стекло помещают небольшое количество содержимого клубенька, каплю стерильной воды, закрывают покровным стеклом и под микроскопом можно наблюдают подвижные небольшие палочки.

2. Для выделения чистой культуры клубеньковых бактерий используют питательные среды. Для выращивания клубеньковых бактерий используется бобовый отвар.

Для приготовления бобового отвара 10 г бобов (белой фасоли или гороха) заливают 100 мл водопроводной воды и варят до набухания и растрескивания кожуры (бобы не должны развариваться). Отвар фильтруют через вату (марлю) и доводят водопроводной водой до 100 мл.

В готовый отвар добавляется 2 гр. агар-агара, сахар. Бактериологической петлей берут небольшое количество содержимого клубенька, переносят в каплю стерильной воды на поверхность агаровой питательной среды в чашке Петри и размазывают шпателем. Засеянные чашки выдерживают в термостате при 25-27°C. Быстрорастущие клубеньковые бактерии появляются на 3-4-е сутки, медленнорастущие - на 7-9-е. Появление колоний на 1-2-е сутки свидетельствует о загрязнении культуры. На

этих средах клубеньковые бактерии образуют бесцветные или молочно-белые, часто слизистые колонии. Затем готовят фиксировано-окрашенный препарат по методу Грамма и микроскопируют под иммерсией.

Контрольные вопросы:

1. Перечислите методы получения препарата Нитрогин?
2. Какое значение имеют симбиотические азотфиксаторы для растений?
3. Какими методами используются при определении клубеньковых бактерий?

Работа 11.2. Технология получения Азотобактерина

Оборудование и материалы. Образцы почвы, чашки Петри, питательные среды (меласса, кукурузный экстракт, минеральные соли), термостат, микроскоп, иммерсионное масло, микробиологическая петля, предметные и покровные стекла.

Объяснение материала. К свободноживущим азотфиксаторам относится *Azotobacter chroococcum* и анаэробный азотфиксатор *Clostridium pasteurianum*.

Азотобактерин - бактериальное удобрение, содержащее свободноживущий почвенный микроорганизм *Azotobacter chroococcum*, способный фиксировать до 20 мг атмосферного азота на 1 г использованного сахара. Внесенные в качестве удобрения в почву бактерии также выделяют биологически активные вещества (никотиновую и пантотеновую кислоты, пиридоксин, биотин, гетероауксин, гиббереллин и др.). Эти вещества стимулируют рост растений. Кроме того, продуцируемые *Azotobacter* фунгицидные вещества из группы анисомидина угнетают развитие некоторых нежелательных микроскопических грибов в ризосфере растения.

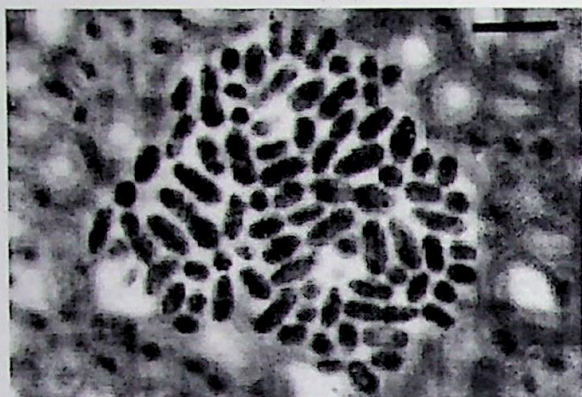
Все виды *Azotobacter* строгие аэробы. Процесс азотификации достаточно энергоёмкий, для ассимиляции 1 молекулы азота требуется не менее 12 молекул АТФ, то есть для использова-

ния 1 мг азота анаэробным микроорганизмам требуется около 500 мг сахарозы. *Azotobacter chroococcum* при азотофиксации окисляет часть органического вещества, не запасая выделившейся энергии, а только лишь удаляя этим кислород.

Clostridium pasteurianum - подвижная спорообразующая анаэробная палочка. Бактерии рода *Clostridium* обычно развиваются в верхних слоях почвы, богатых органическим веществом в широком диапазоне pH - 4,5-9 и способны фиксировать 5-10 мг азота на 1 г источника углерода. В качестве последнего они используют моносахариды, полисахариды, органические кислоты. Хорошо переносят высокую влажность, так как по природе своей анаэробны, усваивают не только молекулярный азот, но и другие минеральные и органические азотсодержащие соединения. По отношению к температуре среди них встречаются мезофиллы и термофилы. Споры клостридий могут выдерживать нагревание до 80°C. Накопление азота в почве благодаря деятельности этих организмов незначительно - несколько килограммов на 1 га за период вегетации.

Для получения селективной культуры *Azotobacter* в почву добавляют 2% маннит, вымешивают до состояния густого теста. Полученное тесто размазывают по поверхности питательной среды в чашке Петри, и ставят в термостат. Маннит в данном случае служит источником энергии, и питаясь им азотобактер образует блестящие, прозрачные колонии.

Для получения селективной культуры *Cl.pasteurianum* в почву добавляют 1% глюкозу и воду, доводя до консистенции кашицы. Таким же образом размазывают по поверхности питательной среды в чашке Петри, и ставят в термостат. Для *Cl.pasteurianum* добавляют немного больше воды, потому что чем больше воды в почве, тем меньше воздуха. Таким образом, образуется анаэробная среда. В этой среде клостридии, окисляя сахар образуют газ. Пузырьки газа поднимают почву и появляются шишки, что свидетельствует о развитии клостридий.



34-рис. *Azotobacter chroococcum*



35-рис. Препарат Азотобактерин полученный из свободноживущих азотификсаторов

В микробиологической промышленности производят несколько видов азотобактериновых препаратов: сухой, почвенный, торфяной.

Технология производства сухого Азотобактерина

Технология получения сухого азотобактерина имеет много общего с технологией производства сухого Нитрагина. Сухой азотобактерин - активная культура высушенных клеток азотобактера с наполнителем. В 1 г препарата содержится не менее 0,5 млрд. жизнеспособных клеток. Культуру микроорганизма выращивают методом глубинного культивирования на среде, содержащей те же компоненты, что и при культивировании клеток *Rhizobium*. Дополнительно вводят только сульфаты железа и марганца, а также сложную соль молибденовой кислоты, рН 5,7-6,5.

Процесс ферментации проводят до стационарной фазы развития культуры, так как в этой фазе биологически активные вещества выделяются из клетки и остаются в культуральной жидкости. Биологически активные вещества могут также полностью или частично теряться при высушивании, однако жизнеспособные клетки быстро восстанавливают способность их продуцировать. Высушенную культуру стандартизируют, фасуют в полиэтиленовые пакеты по 0,4-2 кг и хранят при температуре 15°C не более 3 месяцев.

Технология производства почвенного и торфяного азотобактерина

Почвенный и торфяной азотобактерин представляют собой активную культуру азотобактера, размноженную на твердой питательной среде, и содержат в 1 г не менее 50 млн. жизнеспособных клеток. Для приготовления берут плодородную почву или разлагающийся торф с нейтральной реакцией среды. К просеянному субстрату добавляют 2% извести и 0,1% суперфосфата. По 500 г полученной смеси помещают в бутылки емкостью по 0,5 л и увлажняют на 40-60% по объему водой, закрывают ватными пробками и стерилизуют. Посевной материал готовят на агаровых средах, содержащих 2% сахарозы и минеральные

соли. Когда агар полностью покрывается слизистой массой коричневого цвета, полученный материал стерильно смывается дистиллированной водой и переносится на приготовленный субстрат. Содержимое бутылок тщательно перемешивают и инкубируют при 25-27°C. Культивирование продолжают до тех пор, пока бактерии не размножатся до необходимого титра. Полученный препарат сохраняет свою активность в течение 2-3 месяцев.

Использовать Азотобактерин рекомендуется только на почвах, содержащих фосфор и микроэлементы. Азотобактерин применяют для бактеризации семян, рассады и компостов. При этом урожайность увеличивается на 10-15%. Семена зерновых «опудривают» сухим азотобактерином из расчета 100 млрд. клеток на 1 гектарную порцию семян. Картофель и корневую систему рассады равномерно смачивают водной суспензией бактерий. Для получения суспензии 1 гектарную норму (300 млрд. клеток) разводят в 15 литрах воды. При обработке почвенным или торфяным азотобактерином семена перемешивают с увлажненным препаратом и для равномерного посева подсушивают. Корневую систему рассады смачивают приготовленной суспензией.

Ход работы. Проверка под микроскопом элективной культуры почвенных свободноживущих азотофиксаторов. В маннитных почвенных пластинах видны окруженные слизистой прозрачной оболочкой тетро и диплококки азотобактер.

Почвенные пластины с глюкозой имеют неровную поверхность с шишками, если поднять микробиологической петлей под ними обнаруживают пустоты. Эти пустоты образуют газы, выделяемые при окислении глюкозы. Если из образца этой почвы приготовить мазок, и окрасить его эритрозином, то можно увидеть крупноспоровые, лимонобразные клетки клостридия Пастера.

Контрольные вопросы:

1. В чем заключается преимущества препарата Азотобактерин?
2. Какие бактерии используются для приготовления препарата Азотобактерин?
3. Какое значение имеют симбиотические азотфиксаторы?

Работа 11.3 Технология получения Фосфобактерина

Оборудование и материалы. Образцы почвы, чашки Петри, питательные среды (меласса, кукурузный экстракт, минеральные соли), термостат, микроскоп, иммерсионное масло, микробиологическая петля, предметные и покровные стекла.

Объяснение материала. Фосфобактерин - бактериальное удобрение, содержащее споры микроорганизма *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*. Представляет собой порошок светло-серого или желтоватого цвета. Бактерии обладают способностью превращать сложные фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды и т.д.) и трудноусвояемые минеральные фосфаты в доступную для растений форму. Кроме этого, бактерии вырабатывают биологически активные вещества (тиамин, пиридоксин, биотин, пантотеновую и никотиновую кислоты и др.), стимулирующие рост растения. Фосфобактерин относится к числу препаратов со стимулирующим эффектом.

Bacillus megaterium var. *phosphaticum* представляют собой мелкие, грамположительные аэробные спорообразующие палочки размером 2-6 мкм. Клетки содержат значительное количество соединений фосфора. В ранней стадии развития это подвижные одиночные палочки, при старении образуют эндоспоры, локализующиеся в одном из концов клетки. В силу вышеизложенного технология выращивания сводится к получению спор.

Известно, что основой получения любого бактериального препарата является классическая схема асептического биотех-

нологического производства. Однако при этом культивирование каждого конкретного штамма предполагает выполнение специфических условий, необходимых для максимального проявления штаммом его промышленно значимых свойств. Особенно важно сохранить свойства исходной матричной культуры после допустимого периода хранения препарата. В современном промышленном биотехнологическом производстве многие биопрепараты изготавливаются на основе различных штаммов бактерий рода *Bacillus* sp. Одним из существенных негативных эффектов подобного производства является фаголизис бактериальной культуры, особенно *Bacillus megaterium*. Фаголизис - эффект разрушения (лизирования) бактериальных клеток под действием вирусов бактерий - бактериофагов, которые могут попасть в клетку снаружи, либо могут активироваться в определенных условиях в виде провируса, встроенного в бактериальный геном. Основными способами борьбы с лизогенными вирусами бактерий являются поддержание строжайшей стерильности исходной матричной культуры для производства препарата и селекция устойчивых к бактериофагам штаммов.

При обработке семян препаратом используется механический метод, при этом соотношение фосфобактерина и добавок 1:40. Для обработки клубней картофеля 15г препарата растворяется в 15 л воды. Этого объема достаточно для посева клубней на 1 гектар. Применение фосфобактерина повышает урожайность на 10% и более.

В последние годы разработаны множество биопрепаратов на основе микроорганизмов, обитающих в ризосфере и в ризоплане. Особенный интерес представляют препараты для защиты растений на основе ризосферных микроорганизмов. Для выращивания экологически чистых продуктов эти препараты очень ценны. Один из них препарат - экстрасол, разработанный российскими учеными. Основу этого препарата составляет бактерия *Bacillus subtilis*. Препарат имеет антагонистическое воздействие на патогены, такие как *Fusarium*, *Verticillium* и *Rhizoctonium*, и тем самым защищает от заболеваний.

В Узбекистане, сотрудниками Института микробиологии выпускается биопрепарат "Ер малҳами". Основу данного биоудобрения составляет штамм *Azotobacter chroococum* А-2. Кроме азотификации штамм бактерий синтезирует ценные для растения фитогормоны, поэтому препарат является высокоэффективным на засаленных почвах.

Ход работы. Культивирование *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ведется глубинным методом в строго асептических условиях при постоянном перемешивании и принудительной аэрации до стадии образования спор. Основные параметры проведения процесса: 28-30°C, pH 6,5-7,5, длительность культивирования 1,5-2 суток (11- таблица).

11-таблица

**Состав питательной среды для первичной
лиофилизированной культуры (%)**

Состав питательной среды №1	Состав питательной среды №2
Экстракт кукурузы - 1,8	Кукурузная мука - 2
Меласса - 1,5	Меласса - 1,5
Сульфат аммония - 0,1	В-комплекс остатки производства
мел - 1,0	Витамина D - 2
вода	Фосфат калия - 0,01
	Кальций карбоксид - 0,3
	Вода

При культивировании в питательной среде №1 в готовой культуральной жидкости титр клеток составляет в 2,7-3 млрд. спор/мл, в среде №2 - среде 4,3 млрд. спор/мл.

Полученную в ходе культивирования биомассу клеток отделяют центрифугированием и высушивают в распылительной сушилке при температуре 65-75°C до остаточной влажности 2-3%. Высушенные споры смешивают с наполнителем. Готовый препарат должен содержать не менее 8 млрд. клеток в 1 г. Расфасовывают препарат в полиэтиленовые пакеты по 50-500 г. В отличие от нитрагина и азотобактерина фосфобактерин обладает большей устойчивостью при хранении.

Контрольные вопросы:

1. На основе каких групп микроорганизмов готовят препарат Фосфобактерин?
2. Какое действие оказывает Фосфобактерин на растения?
3. Назвать российские и отечественные препараты на основе фосфорномобилизующих бактерий?

Работа 12. Выделение энтомопатогенных микроорганизмов и приготовление препаратов на их основе

Работа 12.1 Энтомопатогенные препараты на основе бактерий

Оборудование и материалы. Пептонная питательная среда для выращивания бактерий, вегетативная культура бактерии *Bacillus thuringiensis*, световой микроскоп, качалка для выращивания культур, камера Горяева для определения численности живых клеток, термостат, рН метр.

Объяснение материала. Наибольшее распространение среди промышленно-выпускаемых микробных патогенов получили бактериальные препараты. Их отличительными особенностями являются высокая вирулентность по отношению к насекомым-вредителям, безопасность для окружающей флоры и фауны, достаточно высокая скорость воздействия на вредителей и др. В настоящее время производятся препараты против более 160 видов насекомых.

Выращивание микробных патогенов в жидкой питательной среде основано на получении высокой концентрации клеток и токсинов энтомопатогенных бактерий.

Производство бактериальных препаратов на примере энтобактерина

Технология производства энтобактерина предусматривает все последовательные стадии, характерные для любого микробиологического производства, основанного на глубинном культивировании микроорганизмов:

- получение материала для посева;
- приготовление и стерилизация питательной среды;
- стерилизация воздуха;
- ферментация;
- сгущение культуральной жидкости;

- сушка и фасовка препарата.

Получение материала для посева. Энтобактерин готовят на основе споровой энтомопатогенной культуры *Bac. thuringiensis* var. *gallerie*. В лаборатории завода производственный штамм *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* рассеивают на твердую среду (мясопептонный агар -МПА). Культура контролируется на чистоту, отсутствие фага, продуктивность и вирулентность культуральной жидкости.

В начальной стадии приготовления посевного материала культуру выращивают в конических колбах на 3000 мл. После выращивания посевной материал должен содержать 1,7 млрд. спор/мл.

На всех стадиях производства для выращивания бактерий используют дрожжеполисахаридную среду (ДПС) следующего состава (в %):

- кормовые дрожжи 2-3;
- кукурузная мука 1-1,5;
- кашалотовый жир до 1.

При выращивании культуры в посевном аппарате засев стерильной среды осуществляют посевным материалом, полученным в лаборатории в количестве 0,05 % от объема засеваемой среды (титр посевного материала не менее $1,7 \times 10^9$ спор/мл). Рост культуры длится 35-40 ч при непрерывном перемешивании и аэрации, температуре 28-30°C и избыточном давлении в аппарате 40-50 кПа. При использовании полученного посевного материала для засева питательной среды в ферментаторе среду проверяют на наличие посторонней микрофлоры и фага.

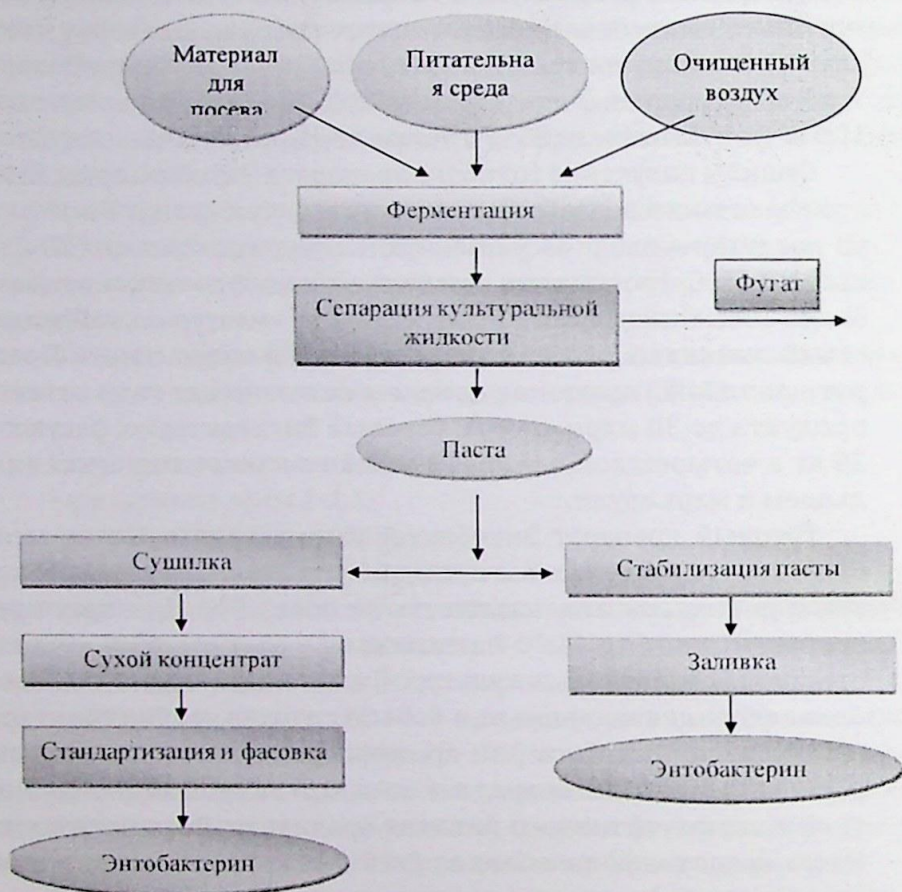
Ферментация. Выращивание культуры в ферментёре ведется в течение 35-40 ч при тех же технологических параметрах процесса, что и в посевном аппарате. Процесс заканчивается тогда, когда в культуральной жидкости содержится не менее 5-10% свободных спор и кристаллов от их общего количества, при этом титр культуры должен составлять не менее 1 млрд. спор/мл.

Сгущение культуральной жидкости. Готовую культуральную жидкость передают в предварительно простерилизованные сборники. Собранную в сборнике пасту перемешивают в течение 30 мин, после чего отбирают пробу на проверку титра, влажности, вирулентности и наличия фага. При сепарировании 1 м³ культуральной жидкости выход пасты составляет около 100 кг при влажности 85% и титре порядка 20 млрд. спор/г.

Сушка и получение готового препарата Энтобактерин. После проверки паста подается на распылительную сушку. Температура воздуха на входе в сушильную камеру составляет 120°C, на выходе 50°C. Из сушилки продукт выходит со влажностью не более 10%. Выход сухого продукта с 1 м³ культуральной жидкости составляет 12-13 кг с титром 100-150 млрд. спор/г. Препарат наполняют каолином, доводя в наполнителе титр готового продукта до 30 млрд. спор/г. Готовый Энтобактерин фасуют по 20 кг в четырехслойные крафт-мешки с полиэтиленовым вкладышем и маркируют.

Готовый препарат Энтобактерин содержит в 1 г не менее 30 млрд. спор бактерий и примерно столько же белковых кристаллов эндотоксина, влажность не более 5%. Препарат предназначен для борьбы с насекомыми - вредителями садовых, огородных и парковых культур. В настоящее время выявлено более 60 видов насекомых, в борьбе с которыми Энтобактерин эффективен. Энтобактерин применяется путем опрыскивания растений, зараженных вредителями, 0,5-1%-ной водной суспензией в период активного питания вредителя. Обычно основная масса вредителей погибает за 2-10 суток. Энтобактерин выпускается в виде пасты, что намного дешевле сухого препарата. При производстве стабилизированной пасты после сепарации стабилизация проводится путем внесения в пасту карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Имея высокую сорбционную способность, молекулы КМЦ в период смешивания со споро-кристаллическим комплексом сорбируют белковые кристаллы и споры и заряжают их отрицательно. В результате нативные частицы препарата располагаются на равном расстоянии одна от другой,

образуя так называемую трехмерную сетчатую структуру в пасте.



36-рис. Технологическая схема производства энтобактерина

Такое расположение частиц позволяет консервантам в равной степени проникать между ними, обеспечивая препаратам длительную сохранность.

Борьба с фаголизисом. Одним из «уязвимых мест» в технологии производства Энтобактерина, остается борьба с фаголизисом культур *Bacillus thuringiensis*. Фаг - это вирус, разрушающий бактерию. Фаг, поражающий бактериальную клетку, называется бактериофагом. Механизм действия фага, как принято считать, связан с прекращением синтеза ДНК в бактерии-хозяине. Экспериментально показана возможность блокирования развития фага путем добавления к культуре различных соединений (антифаговых факторов). Все перечисленные соединения, ввиду сложности получения и высокой стоимости, не находят в настоящее время широкого применения. По-видимому, кроме селекционных приемов для повышения устойчивости к фагам необходимо регулярно производить смену штаммов и препаратов, что даст возможность избежать фаголизиса в производстве.

Ход работы. Из организма насекомых культура выделяется методом Скринга. При этом, внешняя поверхность тела стерилизуется, а микроорганизмы с желудочно - кишечного тракта высевают на твердую питательную среду. Выросшие колонии пересеивают и идентифицируют биохимическими тестами. Энтомопатогенная бактерия *B.thuringiensis* выращивается на пептонном агаре (ПА) в течение 72 часов. В колбы объемом 750 мл помещают 100 мл питательной среды и выделенную культуру, ставят на качалку на 48-72 часа со скоростью 180 об/мин при 27-28°C. Количество живых клеток вычисляют по количеству колоний на твердой агаровой среде. Соотношение спор/кристаллов изучается в окрашенном мазке. Количество клеток вычисляют при помощи камеры Горяева. В процессе развития бактериальной культуры, рН питательной среды в культуральной жидкости измеряется каждые 24, 36, 60 и 72 часа.

Изучение энтомопатогенного действия *B.thuringiensis* проводят с использованием **личинок тест-насекомого (*Galleria mellonella* L.)** 2-го и 3-го возрастов. Корм готовят по следующему рецепту: сахар - 1 часть, молоко - 1 часть, кукурузная мука - 3 части, маргарин - 0,5 части, воды - 0,5 части; автоклавируют при 2 атм. в течение 40 мин. В чашку Петри помещают 4г корма,

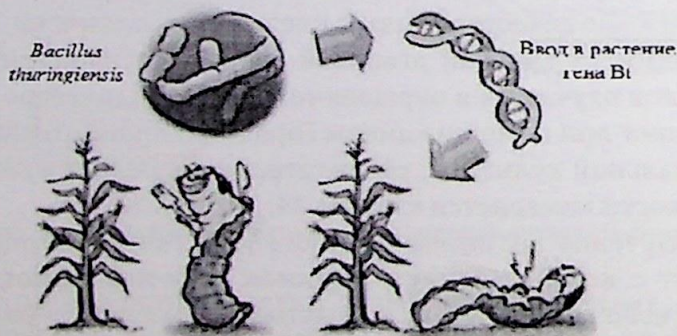
тщательно перемешивали с 0,8 мл бактериальной суспензии с титром 2×10^6 спор/мл, и подсаживали по 10 гусениц тест-насекомого, которые предварительно голодают в течение 16-20 часов. Инсектицидную активность бактерий *Bt* рассчитывают по формуле Аббота:

$$\text{Инсектицидная активность штамма} = \frac{Г_k - Г_0}{Г_k} \times 100,$$

где $Г_k$ и $Г_0$ - количество погибших гусениц соответственно в контроле и опыте;

Одновременно ставят контроль, где к корму добавляют стерильную воду. Наблюдения ведут в течение 10 дней.

Для изучения морфо-культуральных, физиологических и биохимических особенностей и *B.thuringiensis*, для определения размера клеток и спор используется окулярный микрометр. Кроме этого, подвижность бактерий изучается путем посева в полужидкую питательную среду (NaCl -0,5 г, K_2HPO_4 - 0,5 г, MgSO_4 - 0,5 г, пептон-10 г, сахароза-2 г, агар-агар 2,5 г, вода - 1000 мл). В этой питательной среде изучают следующие особенности культуры: характер образования пленки, изменение цвета питательной среды, характер роста, цвет и консистенция, форма, рельеф и образование ацетил-метил карбонола.



37-рис. Получение трансгенных растений при помощи введения гена энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis*

Контрольные вопросы:

1. Какие основные проблемы имеются в технологии производства Энтобактерина?
2. Какие методы существуют для приготовления препаратов на основе *Bacillus thuringiensis*?
3. В чем заключается преимущество препаратов на основе *Bacillus thuringiensis*?

Работа 12.2. Получение энтомопатогенных препаратов на основе грибов

Материалы и оборудование. Жидкие и твердые питательные среды для выращивания грибов, чистая культура грибов, световой микроскоп, качалка для выращивания культур, камера Горяева для определения численности живых культур, термостат, рН метр.

Объяснение материала. Энтомопатогенные препараты на основе микроскопических грибов вызывают у насекомых микозы.

Грибы обладают рядом особенностей:

- поражение происходит через кутикулу;
- насекомые поражаются в фазе развития куколки и имаго;
- большая скорость роста и огромная репродуктивная способность. Споры длительное время могут находиться в природе без снижения энтомопатогенной активности;
- высокая специфичность, вирулентность сильно зависит от штамма гриба.

Действие грибного препарата на насекомое начинается с проникновения споры в полость тела через кожные покровы. Попав в тело, споры прорастают в гифу, затем разрастается мицелий, от которого отчленяются конидии. Промежуток веремени после взрастания конидий и до смерти насекомого, в зависимости от размеров, составляет от 2 до 8 суток.

Получение препаратов и производство на основе гриба рода *Beauveria*, и его видов *B.bassiana vuill* (уничтожает более 60 ви-

спороносной пленки, которую впоследствии снимают, высушивают, измельчают и при необходимости стандартизуют соответствующим количеством наполнителя.

Среди возможных приемов, используемых в производстве боверина поверхностным культивированием, различают:

а) культивирование гриба на жидких средах без стерилизации, перемешивания и аэрации;

б) культивирование на твердых автоклавированных средах без перемешивания и аэрации.

в) культивирование смешанным методом.

Первые 2 метода основаны на том, что гриб хорошо растет на различных растительных субстратах - отходах сельскохозяйственной продукции. Оптимальная температура для развития гриба является 18-28°C. И в южных районах проводится в соответствии с температурными условиями.

Культивирование гриба на жидких средах без стерилизации, перемешивания и аэрации проводят без предварительной стерилизации среды, её просто нагревают до кипения, разливают в деревянные каркасы, покрытые изнутри полиэтиленовой пленкой. Среду, охлажденную до 35-40°C, засевают сухими спорами. Сверху каркасы накрывают полиэтиленовой пленкой, которую после образования спороносной пленки гриба снимают. В качестве сред используют всевозможные отвары, например: из сахарной свеклы, картофеля, тыквы, зерна и муки.

Культивирование на твердых автоклавированных средах без перемешивания и аэрации. Выращивание предусматривается на размещенных по отдельным емкостям питательных средах (сусло-агар, картофель, морковь, кукуруза, корки арбуза) в течение 40 минут при 110°C.

В стерильный субстрат вносят сухие споры, емкости с субстратом встряхивают до однородного распределения посевного материала и оставляют стоять при температуре окружающего воздуха 18-23°C.

Образование конидиоспор завершается к концу 12-15 суток. Культуру гриба с остатками субстрата извлекают из емкостей

и высушивают на стеллажах при 25-28°C. Получение готового препарата завершают размолотом материала до мелкодисперсного порошка и перемешивают с торфом или тальком.

Оба метода можно локализовать. При этом в производственном цеху за 1 месяц можно получить 750-800 кг препарата содержащего $1,5 \cdot 10^9$ спор.

Удобным для производства считается комбинированный метод. Он состоит из следующих этапов:

- *получение матричной культуры пшеницы;*
- *культивирование инокулята в жидкой питательной среде 12-17 часов;*
- *получение вегетативной культуры в ферментёре в условиях принудительной аэрации 22-28 часов;*
- *разливание культуральной жидкости по кюветам и выращивание спороносных пленок методом поверхностного культивирования 4-5 суток;*
- *сушка спорового слоя и стандартизация;*
- *стандартизация каолином.*

Для культивирования гриба используют следующую среду (%): меласса-6; кукурузный экстракт-1%; $MgSO_4$ -0,05%; K_3PO_4 -0,2.

Культивирование проводят при 24-26°C. Титр конидий при этапе инокулята составляет 0,5-2 млн/мл посевного материала. Объем инокулята составляет 2-4% от массы питательной среды. В готовой культуральной жидкости титр клеток составляет в 50-100 млн/мл.

Для выращивания в слоях кюветы находятся в вертикальном положении (каждый по 35-70 штук). Культивация проводится при 25-26°C, после 16-18 часов можно наблюдать появление тонкой пленки. Через 3-4 суток появляются споры и еще через 4-5 суток появляются конидии.

В этом этапе разделяют слой, помещают в сухие кюветы и оставляют на 2-3 дня для суммирования, затем высушивают при 28°C.

Высушенные споры хранят в полиэтиленовых пакетах при 18-20°C в сухом месте.

При комбинированном способе производственный цикл составляет 11-12 суток. Применяют Боверин против листогрызущих вредителей сада и леса (ложногусениц пилильщиков, личинок колорадского жука и других листоедов) с нормой расхода 1- кг/га и сублетальными дозами инсектицидов.

Контрольные вопросы:

1. Какими свойствами обладают энтомопатогенные грибы?
2. Какие группы грибов используются при приготовлении энтомопатогенных препаратов?
3. В чем заключается отличие энтомопатогенных препаратов от химических препаратов?

Работа 12.3. Энтомопатогенные препараты на основе вирусов

Материалы и оборудование. Вредители зараженные вирусами, питательная среда для приготовления препаратов из вирусов, центрифуга, флаконы, дистиллированная вода, глицерин, ацетон.

Объяснение материала. Из всех энтомопатогенных препаратов вирусные обладают наибольшей специфичностью по отношению к насекомому-хозяину. Они поражают не более одного вида.

Их ярко выраженная специфичность обуславливает практическую безвредность вирусных препаратов для человека, флоры и фауны.

Вирусы отличаются высокая устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды, они способны сохранять активность в течение 10-15 лет, находясь вне насекомого. Заражение вирусом происходит при питании вредителя. Попавшие в кишечник тельца-включения при щелочных значениях pH разрушаются. Освобожденные вирионы проникают через стенку ки-

шечника в клетки, где в ядрах происходит репликация вирусов. Высвободившиеся вирусы заражают другие клетки, что в итоге приводит к гибели насекомого.

Отличительной особенностью вирусов является то, что они могут размножаться только в живой ткани. Это создает определенные трудности в организации промышленного производства, так как технология размножения вирусов должна быть связана с использованием живых насекомых-хозяев.

В наши дни осуществляется выпуск трех вирусных энтомопатогенных препаратов: вирин-ЭКС (против капустной совки), ЭНШ (против непарного шелкопряда) и АББ (против американской белой бабочки).

Производство любого из вирусных препаратов начинают с разведения насекомого-хозяина на искусственных питательных средах, обеспечивающих их физиологически здоровое состояние. На определенной стадии развития (обычно на стадии гусеницы) насекомых заражают, добавляя вирусную суспензию к корму. При этом инокулят предварительно получают от нескольких больных личинок. После заражения насекомых выдерживают в строго определенных условиях, обеспечивающих максимальное накопление вируса в тканях.

Ход работы. Через 7-9 суток собирают больные и погибшие личинки, подсушивают при температуре 33-35°C, измельчают механическим способом для вывода телец-включений из тканей. К полученной массе добавляют физиологический раствор или дистиллированную воду из расчета 1 мл на гусеницу, взвесь полученных тканей фильтруют.

При производстве вирин-ЭКС полиэдры осаждают из фильтрата центрифугированием. Осадок суспендируют в минимальном количестве дистиллированной воды и добавляют простерилизованный глицерин до титра 1 млрд. полиэдров в 1 мл. Готовый препарат разливают во флаконы.

При производстве вирин-ЭНШ в фильтрат добавляют лактозу, а после перемешивания ацетон в соотношении 4:1 к объему суспензии. После отстаивания надосадочную жидкость сли-

вают, осадок подсушивают до полного удаления ацетона. Если препарат планируется выпускать в виде порошка, то сухой осадок смешивают с мелкодисперсным наполнителем (каолином, например) до получения титра 1 млрд. полиэдров в 1 г.

Масляную форму препарата получают путем диспергирования осадка в стерильном 50% растворе глицерина до титра 2 млрд. полиэдров в 1 мл, а затем добавляют равный объем солярового масла, перемешивают и разливают по флаконам. Вирусные энтомопатогенные препараты применяют путем внесения полиэдров в плотные популяции насекомых-вредителей с целью возникновения в них эпизоотий. Данный способ обработки предполагает внесение небольших количеств препарата. В другом случае опрыскивание или опыление производят на зараженных участках в период рождения личинок или на ранних стадиях их развития.

Контрольные вопросы:

1. Рассказать о технологии получения вирусных энтомопатогенных препаратов?
2. Перечислить методы получения вирусных энтомопатогенных препаратов?
3. Как действуют вирусные энтомопатогенные препараты на насекомых?

Работа 13. Выделение и размножение микроорганизмов с антагонистическими свойствами

Объяснение материала: При антагонизме один вид микробов угнетает развитие других видов, а иногда и полностью уничтожает их. Явление антагонизма у микроорганизмов очень распространено. Различные виды микробов на протяжении длительной истории эволюции в борьбе за существование вырабатывали те или иные средства борьбы со своими конкурентами. Одни виды вытесняют другие своим обильным и очень быстрым размножением. Другие виды вырабатывают неспецифические и специфические вещества, которые подавляют рост многих микробов. К неспецифическим веществам относятся органические кислоты, спирты, перекиси, сероводород, аммиак и т.д. Так, молочнокислые бактерии подавляют развитие гнилостных бактерий, образуя молочную кислоту. Дрожжи образуют спирт, который подавляет развитие других микробов. Эти вещества являются отходами в процессе обмена веществ.

Изменения pH среды, окислительно-восстановительный потенциал, поверхностное натяжение и другие физические факторы также могут вызвать задержку развития и гибель тех или иных микробных сообществ.

Контрольные вопросы:

1. Как выделяют микроорганизмы антагонистов?
2. В каких группах микроорганизмов преобладают антагонисты против фитопатогенов?
3. В чем отличие микроорганизмов антагонистов от других микроорганизмов?

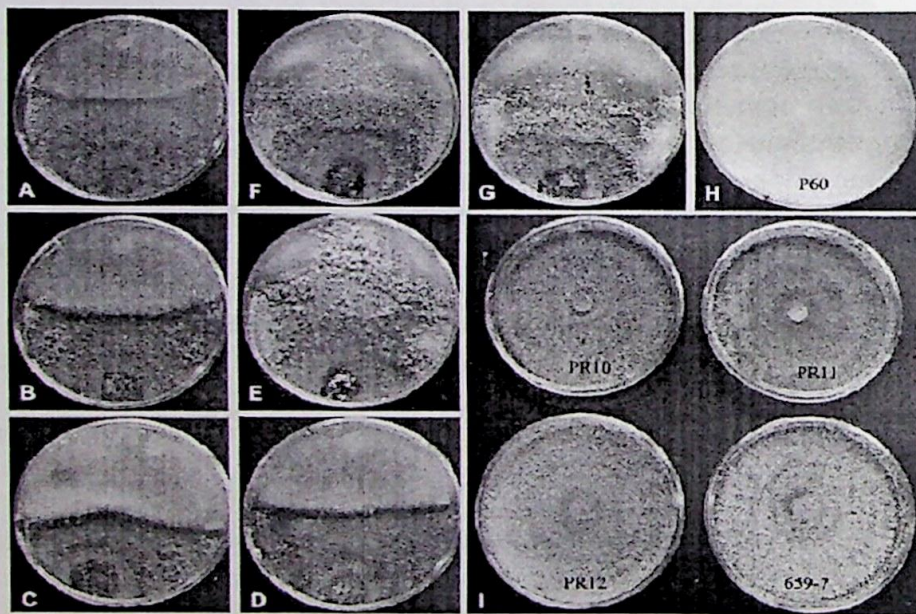
Работа 13.1. Получение образцов почвы и выделение из нее микроорганизмов с антагонистическими свойствами

Материалы и оборудование: Стерильные бумажные пакеты с образцами почвы, чашки Петри, фильтровальная бумага, пин-

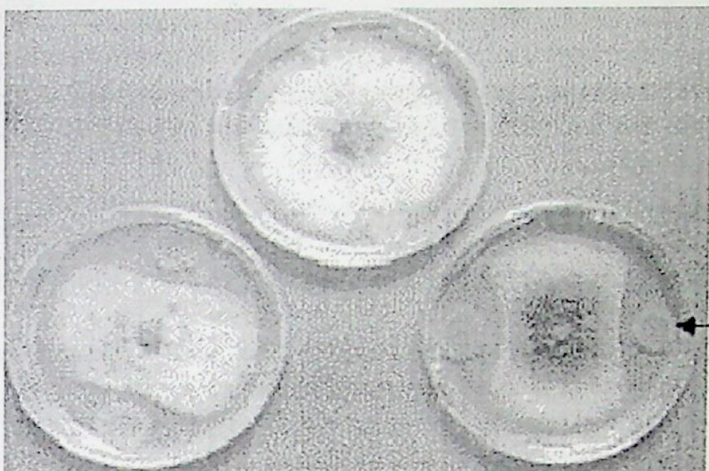
цет, автоклав, термостат, холодильник, стерильные пробирки с питательной средой.

Ход работы: Для работы берут образцы почвы с посевных полей с глубины от 0-30 см. Помещают в заранее приготовленные стерильные бумажные пакеты и хранят в холодильнике до их использования.

Для выделения микроорганизмов с использованием влажной камеры, используются чашки Петри. Фильтровальную бумагу увлажняют стерильной водой в непосредственной близости спиртовой лампы. Затем небольшие образцы почвы помещают в чашку Петри и помещают в термостат с установленной температурой 25-27°C. С 3-го дня можно наблюдать за ростом антагонистических микроорганизмов. Затем выделяют чистую культуру выросших микроорганизмов. Для культивирования используется среда Чапека или сусло-агар.



38-расм. Проявление антагонистической активности грибов



39-рasm. Проявление антагонистической активности бактерий

Контрольные вопросы:

1. Какой слой почвы содержит наибольшее количество микроорганизмов?
2. Перечислите методы изоляции и выделения микроорганизмов из образцов почвы?
3. Какие микроорганизмы живут в симбиозе с растениями?

Работа 13.2. Приготовление посадочного материала из культуры микроорганизмов с антагонистическими свойствами

Материалы и оборудование. Колбы по 250 мл, термостат, автоклав, измельченная кукуруза, пшеничные отруби, H_2SO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 , CuSO_4 .

Ход работы. В качестве антагониста выбираем гриб *Trichoderma lignorum*. В колбу объемом 250 мл добавляем 100 г среды следующего содержания: 10 г измельченной кукурузы, 100 г пшеничных отрубей, 60 мл 0,2% H_2SO_4 и 0,62% ZnSO_4 х $7\text{H}_2\text{O}$, 0,63% FeSO_4 х $7\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 х $5\text{H}_2\text{O}$. После стерилизации и ох-

лажде-ния среды вносят *Trichoderma lignorum*. Колбы помещают в термостат при 25-27°C. В это время спорообразование достигает максимума, затем культура подсушивается и хранится до использования. Подсушенная споровая культура должна иметь зеленый цвет.

Контрольные вопросы:

1. В чем заключается преимущества микроорганизмов-антагонистов?
2. В каких синтетических питательных средах культивируются микроорганизмы-антагонисты?
3. Влияние микроорганизмов-антагонистов на растения?

Работа 13.3. Культивирование антагонистических микроорганизмов в злаках

Материалы и оборудование. Пробирки, автоклав, термостат, зерно проса, сусло-агаровая питательная среда. Приготовление на зерне проса грибного посевного материала.

Ход работы. В пробирку в 20x2 см засыпают 8-10 г чистого сухого зерна проса. Закрывают ватным тампоном и стерилизуют 20 мин при 2 атм. (134°C), 2 раза каждые 20-24 часа. После стерилизации заливают стерильной водопроводной водой, при этом масса проса должна составлять 60-80% общей массы пробирки. Затем повторно стерилизуют. После просо в пробирке хорошо встряхивают и охлаждают. Затем сеют конидии, выросшие в среде, Билая. При достижении концентрации среды $2 \cdot 10^6$ конидий на 1 мл, разливают в пробирки по 1 мл. В течение 8-10 дней грибок выращивается при температуре 24-25°C. Полученный посевной материал хранят при комнатной температуре, в сухом месте до следующего посева. Срок хранения культуры 1 год.

Контрольные вопросы:

1. В каких зерновых культурах выращиваются микроорганизмы-антагонисты?

2. В чем отличие микроорганизмов-антагонистов от метабиоза?

3. В чем заключается антагонистические свойства микроорганизмов?

Работа 13.4. Приготовление грибного посевного материала

Материалы и оборудование. Флаконы, автоклав, термостат, вакуумная сушка, среда Чапека, сусло-агар, среда Хоттингер или МПА, МПБ.

Ход работы. Для получения посадочного материала используют овес высшего или первого сорта. В кипящую воду добавляют овес в пропорциях 1:1 и кипятят в течение 15-20 минут, затем еще 15-20 минут держат в кипяченой воде, после подсушивают на фильтровальной бумаге. Обсушенную овсяную массу помещают в специальные 250 мл флаконы по 10-15 г. Флаконы закрывают ватными пробками и стерилизуют при 100°C 30 мин в автоклаве, затем еще 30 мин при 1 атм. После стерилизации охлаждают.

Суспензию культуры, выращенную в агаровом сусле, используют для посева на приготовленный овсяной субстрат. Суспензия конидий должна содержать в 1 мл 10^5 конидий. В флаконы с питательной средой для посева вносят 0,5-1 мл суспензии.

После посева конидий во флаконы, флаконы взбалтывают для равномерного распределения. Затем помещают в термостат 24-25°C на 7-10 дней. В процессе роста культур флаконы рекомендуют взбалтывать.

До набора постоянной массы культуру держат в вакуумной сушке при 28°C 48-72 часа. Затем флаконы закрывают пергамент-ными клипсами. Каждый флакон подписывают, где указывается название штамма, срок изготовления, срок годности. Таким образом, готовый посевной материал может храниться при нормальной комнатной температуре и влажности в течение 1 года со дня изготовления.

Контрольные вопросы:

1. В каких питательных средах грибы дают хороший рост?
2. Способы выделения грибов из природных субстратов?
3. Отличие грибов от бактерий?

Работа 13.5. Учет количество плотности клеток на биопрепарате и суспензии на камере Горяева

Материалы и оборудования. Световой микроскоп, предметное стекло, покровное стекло, камера Горяева, исследуемая культура микроорганизмов.

Ход работы. Счетная камера Горяева - имеет вид толстого предметного стекла разделенная бороздками, в центре которого находится стеклянная пластинка с выгравированной на ней сеткой с глубиной 0,1мм. Глубина камеры (0,1мм) и площадь больших и малых квадратов сетки соответственно $1/25$ и $1/400\text{мм}^2$ указаны на предметном стекле. Углубленные сетки покрываются специальным шлифованным покровным стеклом и двигают его до появления картины интерференции. Предварительно камеру заполняют 1 каплей исследуемой суспензией микроорганизмов. Обычно просчитывают клетки в 10 больших квадратах, учитывается все клетки лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. Число клеток в большом квадрате не должно превышать 20 (16), а в малом 10. Эти углубления разделены на большие квадраты и часть из них разделены на 16 маленьких квадратов. Объем маленьких квадратов $1/4000=0,00025\text{мм}^3$, а большой камеры равен на $16/4000=1/250=0,004\text{мм}^3$.

Для достоверности показания следует просчитать количество клеток, находящихся в 10 больших квадратах, как минимум из пяти капель и вывести среднее значение. Твердые суспензии разбавляются перед исследованием. При этом объем 50 больших квадрат (5x10 большой квадрат) равен к 0,2 мм. Например, в суспензиях 50-ти больших квадратов существует 530 клеток. Если 1мм^3 равен к 0,001мл, то в маленьком квадрате.

$$1 \text{ мм}^3 - 0,001 \text{ мл}$$

$$0,00025 \text{ мм}^3 - x \text{ мл}$$

$$X = \frac{0,00025 \text{ мм}^3 \cdot 0,001 \text{ мл}}{1 \text{ мм}^3} = 0,00000025 \text{ мл}$$

число клеток суспензии в одном квадрате:

$$1 \text{ мм}^3 - 0,001 \text{ мл}$$

$$0,004 \text{ мм}^3 - X \text{ мл}$$

$$X = \frac{0,004 \text{ мм}^3 \cdot 0,001 \text{ мл}}{1 \text{ мм}^3} = 0,000004 \text{ мл}$$

0,000004 мл число клеток суспензии.

Значит, если в 50 больших квадратах 0.0002 мл (0.000004 мл х 50) клеточной суспензии, существует 530 клеток, то в 1мл суспензии:

$$0,0002 \text{ мл} - 530$$

$$1 \text{ мл} - x$$

$$X = \frac{1 \text{ мл} \cdot 530}{0,0002 \text{ мл}} =$$

2650000 число клеток суспензии

При опеределении количества клеток в порошкообразных биопрепаратах, считается также уровень ее разбавленности. Например, если биопрепарат разбавлен в 1:100 раз, тогда количество клеток определяемой в суспензии умножается на 100:

$$2650000 \times 100 = 265000000$$

Значит в 1 г порошкообразного биопрепарата находится 265000000 ($2,65 \cdot 10^7$) клеток.

Контрольные вопросы:

1. Какое строение имеет камера Горяева?
2. Основные принципы работы с камерой Горяева?
3. Как осуществляется подсчет количества клеток микроорганизмов в камере Горяева?

ГЛОССАРИЙ

Агар-агар	Продукт (смесь полисахаридов агарозы и агаропектина), получаемый путём экстрагирования из красных (<i>Phyllophora</i> , <i>Gracilaria</i> , <i>Gelidium</i> , <i>Ceramium</i> и др.) и бурых водорослей, произрастающих в Чёрном море, Белом море и Тихом океане, и образующий в водных растворах плотный студень. Агар является растительным заменителем желатина. Агар-агар не растворим в холодной воде. Он полностью растворяется только при температуре 95 -100°C. Горячий раствор является прозрачным и вязким. При охлаждении до температуры 35-40°C он становится чистым и крепким гелем, который является термообратимым. При нагревании до 85-95°C он опять становится жидким раствором и снова превращающимся в гель при 35-40 °C градусах.
Агароза	Полисахарид, получаемый из морских водорослей, используется для электрофореза и хроматографии.
Агрегация	Слипание клеток в многоклеточное образование.
Агробиоценоз	Совокупность организмов, обитающих на землях сельскохозяйственного пользования.
Адаптация	Процесс приспособления к изменяющимся внешним условиям.
Адвентивные почки	Почки, возникшие у растений из клеток и тканей, обычно их не образующих.

Аденилирование	Один из видов изменения активности ферментов путем ковалентной модификации.
Аденин	азотистое основание, аминопроизводное пурина (6-аминопурин). Образует две водородные связи с урацилом и тиминном (комплементарность).
Азотобактер	Род бактерий, живущих в почве и способных в результате процесса азотфиксации переводить газообразный азот в растворимую форму, доступную для усваивания растениями.
Азотобактерин	Азотобактерин - бактериальное удобрение, содержащее свободноживущий почвенный микроорганизм <i>Azotobacter chroococcum</i> .
Акропетальный транспорт	Перенос (транспорт) веществ в растениях по направлению к апикальным меристемам стебля.
Активирование (активация)	1) Запускание и усиление активизации; 2) Усиление химических реакций путем запускание молекул.
Амплификация	Процесс образования дополнительных копий участков хромосомной ДНК.
Анаэробы	Микробы, способные расти и размножаться без доступа свободного кислорода.
Андрогенез	Развитие яйцеклетки с мужским ядром, внесённым в неё спермием в процессе оплодотворения.
Антагонист	Вещество, которое ослабляет действие другого вещества или проявляет противоположные эффекты.

Антибиотики	Вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток, чаще всего прокариотических или простейших.
Антигены	Вещества, чужеродные для данного организма, вызывающие образование антител.
Антитела	Белковые соединения плазмы крови, образующиеся в ответ на введение в организм человека или теплокровных животных бактерий, вирусов, белковых токсинов и других антигенов.
Апикальное доминирование	Преимущественное развитие верхушечной почки, которая растёт быстрее и замедляет рост боковых почек. Развивающийся из верхушечной почки побег имеет преимущественное развитие.
Аттрагирующий эффект	Клетки меристемы «привлекают» к себе питательные вещества: сахарозу, аминокислоты, нуклеотиды, неорганические ионы, воду и др. Аттрагирующий эффект проявляется в зоне активных делений клеток.
Ауксотрофные мутанты	Набор неполовых хромосом.
Базальные тельца	Протоплазматические зерна в клетках, снабженные ресничками или жгутиками, лежащие в основании этих ресничек и жгутиков. У растений базальные тельца описаны в зооспорах водорослей и в сперматозоидах мхов.
Базипетальный транспорт	Транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам корня.
Бактериофаги	Вирусы, поражающие бактерии.

Белки теплового шока	Это класс функционально сходных белков, экспрессия которых усиливается при повышении температуры или при других стрессирующих клетку условиях. Повышение экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока, регулируется на этапе транскрипции.
Бинарный	Состоящий из двух частей, компонентов.
Биогенез	Образование органических соединений живыми организмами.
Биомасса	Общая масса живых особей одного вида, группы видов или сообщества в целом (растений, животных, микроорганизмов) на единицу поверхности или объёма местобитания.
Биореактор	Прибор, осуществляющий перемешивание культуральной среды в процессе микробиологического синтеза. Применяется в биотехнологической промышленности при производстве лекарственных и ветеринарных препаратов, вакцин, продуктов пищевой промышленности (ферменты, пищевые добавки, глюкозные сиропы), а также при биоконверсии крахмала и производстве полисахаридов и нефтедеструкторов.
Биосинтез	Промышленное получение чего-либо (антибиотиков, гормонов, витаминов, аминокислот и других необходимых людям веществ) с помощью микроорганизмов.

Биотехнология	Дисциплина, изучающая возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методом генной инженерии.
Блоттинг ДНК по Саузерну	Процедура переноса денатурированной ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для гибридизации с комплементарными нуклеотидными последовательностями.
Блоттинг РНК	Перенос РНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для последующей гибридизации с комплементарной ДНК.
Брешь в ДНК	Отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в одной из цепей двухцепочечной молекулы ДНК.
Вектор	Это биологические структуры, способные вносить чужеродный генетический материал в клетку: плазмиды, бактериофаги, вирусы.
Вирусы	Неклеточный инфекционный агент, который может воспроизводиться только внутри живых клеток. Вирусы поражают все типы организмов, от растений и животных до бактерий и архей. Обнаружены также вирусы, поражающие другие вирусы.
Гаплоидные клетки	Живые клетки, в отличие от диплоидных клеток, содержащие одинарный набор хромосом.
Ген	Материальный носитель наследственности в животных или растительных организмах

Ген маркер	Ген, для которого известна точная хромосомная локализация и, как правило, имеется четкое фенотипическое выражение (мутантный фенотип, ферментативная активность и др.); Используются в основном при проведении картирования.
Генетический код (ГК)	Свойственный всем живым организмам способ кодирования последовательности аминокислотных остатков в составе белков при помощи последовательности нуклеотидов в составе нуклеиновой кислоты.
Генная инженерия	Совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.
Генно модифицированные организмы (ГМО)	Организм, генотип которого был искусственно изменён при помощи методов генной инженерии. Это определение может применяться для растений, животных и микроорганизмов
Геном	Совокупность генов, содержащихся в одинарном наборе хромосом данного организма.
Геномная библиотека	Представляет собой набор ДНК всего генома одного организма. Эта ДНК хранится в популяции идентичных векторов, каждый из которых содержит различные вставки ДНК.

Генотерапия	Совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний.
Генотип	Наследственная основа организма, совокупность всех его генов, всех наследственных факторов организма.
Генофонд	Совокупность генов, которые имеются у особей, составляющих данную популяцию.
Гетерозис	Увеличение жизнеспособности гибридов вследствие унаследования определённого набора аллелей различных генов от своих разнородных родителей.
Гибрид	Животное или растение, полученное от скрещивания представителей разных пород, сортов, видов и т. п.
Гиногенез	Частный случай партеногенеза, особая форма полового размножения, при которой после проникновения спермия в яйцеклетку их ядра не сливаются, и в последующем развитии участвует только ядро яйцеклетки, либо не происходит оплодотворения. При этом нет объединения наследственного материала родителей посредством слияния ядер их половых клеток.
Гифа	Нитевидное образование у грибов, состоящее из многих клеток или содержащее множество ядер.
Гормон рецепторный комплекс	Комплекс, образующийся при взаимодействии гормона и белкового рецептора, первый необходимый шаг в реализации действия гормона на организм.

Гормональный статус	Общее состояние гормональной системы организма.
Дедифференциация	Упрощение структуры клеток, связанное с временной потерей признаков их специализации, когда дифференцированная клетка вновь становится эмбриональной. Возникает под действием механических, термических, химических и лучевых агентов, при культивировании тканей.
Деструкция	Разрушение клеток и тканей в ходе жизнедеятельности организма или после его смерти.
Диплоидия	Наличие двух наборов хромосом (гаплоидных геномов) в клетке или у особи.
Диплоидные клетки	Клетки, содержащие полный набор хромосом - по одной паре каждого типа.
Дифференциация	Процесс образования из одной клетки (обычно зиготы) различных типов клеток. В основе ее лежит явление дифференциальной активности генов.
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота - макро-молекула (одна из трёх основных, две другие - РНК и белки), обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов. ДНК содержит информацию о структуре различных видов РНК и белков.
ДНК лигазы	Ферменты, катализирующие соединение двух молекул с образованием новой химической связи.

ДНК репликация	Процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты на матрице родительской молекулы ДНК.
Закрытая система	Термодинамическая система, которая может обмениваться с окружающей средой теплом и энергией.
Затравка	Короткий фрагмент РНК, необходимый для инициации синтеза дочерней цепи ДНК, комплементарно соединяющийся с материнской цепочкой. Он предназначен для создания свободного 3'-конца, используя который, фермент ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеиновой цепи. После присоединения к затравке небольшого количества нуклеотидов она вырезается экзонуклеазой.
Идентификация	Установление тождественности неизвестного объекта известному на основании совпадения признаков; опознание.
Иммобилизация	Физический и химический процесс, используемый для мобилизации в мембранах клеточных ферментов.
Ингибитор	Общее название веществ, подавляющих или задерживающих течение физиологических и физико-химических (главным образом ферментативных) процессов.
Индуктор	В молекулярной биологии индуктор представляет собой молекулу, которая регулирует экспрессию генов. Индуктор может связываться с репрессором или активатором.

Индуктор	Представляет собой молекулу, которая регулирует экспрессию генов. Индуктор может связываться с репрессором или активатором. Индукторы функционируют при отключённых репрессорах.
Индукция	Индукция ферментов метаболизма - абсолютное увеличение количества и активности ферментов метаболизма вследствие воздействия на них определенного химического соединения.
Инициация	Серия молекулярных событий, происходящих с рибосомой, которая приводит к взаимодействию рибосомы с началом кодирующей нуклеотидной последовательности мРНК и последующему считыванию (трансляции) этой последовательности.
Инкубация	(от лат. incubate - высиживать, выдерживать что-то в чём-то.
Инокулят	Суспензия клеток, являющаяся исходной для наращивания клеточной культуры и используемая для первоначального посева на питательную среду.
Интрон	Участки ДНК, копии которых удаляются из первичного транскрипта и отсутствуют в зрелой РНК.
Клетки мишени	Это клетки, которые специфически взаимодействуют с гормонами с помощью специальных белков-рецепторов. Эти белки-рецепторы располагаются на наружной мембране клетки в цитоплазме или на ядерной мембране и на других органеллах клетки.

Клон	Группа генетически идентичных клеток или организмов.
Клонирование	Появление естественным путем или получение нескольких генетически идентичных организмов путем бесполого размножения.
Кодон	Единица генетического кода, тройка нуклеотидных остатков (триплет) в ДНК или РНК.
Компетенция	Способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.
Комплементарная цепь	Цепь ДНК, синтезируемая на матрице вирусной (+) цепи вирусной ДНК, что приводит к образованию двухцепочечной репликативной формы ДНК.
Лигирование	Формирование фосфодиэфирных связей между близлежащими (соседними) нуклеотидами в одной и той же или двух различных молекулах ДНК через 5'-фосфатные и 3'-гидроксильные группы. Впервые этим способом гибридная ДНК была получена С. Коэном с сотр. в 1973 г
Лизис	Растворение клеток и их систем, в том числе микроорганизмов, под влиянием различных агентов, например ферментов.
Маркер (ДНК)	Полиморфный признак, выявляемый методами молекулярной биологии на уровне нуклеотидной последовательности ДНК, для определенного гена или для любого другого участка хромосомы при сравнении различных генотипов, особей, пород, сортов, линий.

Матрица	Нуклеотидная последовательность РНК или одно-цепочечной ДНК, являющаяся основой («шаблоном») для ферментативного синтеза комплементарной ей полинуклеотидной последовательности.
Мейоз	Редукционное деление клетки - деление ядра эукариотической клетки с уменьшением числа хромосом в два раза.
Меристемы	Обобщающее название для тканей растений, состоящих из интенсивно делящихся и сохраняющих физиологическую активность на протяжении всей жизни клеток, обеспечивающих непрерывное нарастание массы растения и предоставляющих материал для образования различных специализированных тканей.
Метаболизм	Набор химических реакций, которые возникают в живом организме для поддержания жизни. Эти процессы позволяют организмам расти и размножаться, сохранять свои структуры и отвечать на воздействия окружающей среды.
Метаболиты	Вещества, синтезируемые в процессе метаболизма.
Микориза	Симбиотическая ассоциация мицелия гриба с корнями высших растений.
Микроклональное размножение	Один из способов вегетативного размножения в условиях «in vitro».
Микрофлора	Совокупность микроорганизмов, обитающих в какой-либо естественной среде.

Митоз	Непрямое деление клетки, наиболее распространённый способ репродукции эукариотических клеток.
Мицелий	Вегетативное тело грибов и актиномицетов.
Модификация	Ненаследственные изменения признаков организма, возникающие под влиянием изменившихся условий внешней среды (температуры, влажности и др.).
Морфогенез	Возникновение и развитие органов, систем и частей тела организмов как в индивидуальном (онтогенез), так и в историческом или эволюционном, развитии (филогенез).
Мутагенез	Внесение изменений в нуклеотидную последовательность ДНК (мутаций). Различают естественный (спонтанный) и искусственный индуцированный) мутагенез.
Мутагены	Химические и физические факторы, вызывающие наследственные изменения - мутации.
Мутация	Изменение наследственных свойств организма.
Нозерн-блот-РНК	Метод исследования экспрессии генов путём тестирования молекул РНК (мРНК) и их фрагментов в образцах.
Нуклеиновые кислоты	Биополимеры, функция которых заключается в хранении, реализации и передаче генетической (наследственной) информации в живых организмах.

Оперон	Функциональная единица генома у прокариот (у эукариот-транскриптон), в состав которой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие совместно или последовательно работающие белки и объединенные под одним (или несколькими) промоторами.
Органогенез	Это формирование органов в процессе эмбрионального развития организма.
Открытая система	Организмы, устойчивые лишь при условии непрерывного поступления в них энергии и вещества из окружающей среды.
Партеногенез	Возникновение, зарождение, у растений (апомиксис) - так называемое «девственное размножение», одна из форм полового размножения организмов, при которой женские половые клетки (яйцеклетки) развиваются во взрослом организме без оплодотворения.
Плазмида	Небольшие молекулы ДНК, физически отдельные от геномных хромосом и способные реплицироваться автономно.
Повторяющиеся последовательности ДНК	Участки ДНК, включённые в геном, последовательность которых состоит из повторяющихся фрагментов. Выделяют 2 типа таких повторяющихся последовательностей.

Полиаденилирование	Это процесс присоединения большого количества остатков аденозинмонофосфата (поли (А) -хвоста) к 3'-концу первичной мРНК (пре-мРНК). Иными словами, поли (А) -хвост - это фрагмент молекулы мРНК, азотистые основания которого представлены только аденином.
Половой процесс	Процесс слияния гаплоидных половых клеток, или гамет, приводящий к образованию диплоидной клетки зиготы.
Половые хромосомы	Хромосомы, определяющие различие кариотипов особей разных полов у раздельнополых организмов.
Производительность процесса	Образование веществ и метаболизм растений, происходящее одновременно в совокупности физиологических биохимических, биофизических и др. процессов, донор-акцепторные отношения и формирование производственно ценных органов растений на основе генетического контроля, обеспечение вторичного обмена.
Пролиферация	Новообразование клеток и тканей путем размножения.
Промотор	Участок гена, ответственный за начало его транскрипции.
Пронуклеус	Ядро (мужское, женское) оплодотворенной яйцеклетки.
Протонная помпа	Белки-переносчики протонов, переносящие их через клеточные мембраны.
Протопласт	Растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Профаг	Фаговый геном, интегрированный в бактериальную хромосому.
Процессинг	Процессинг РНК (посттранскрипционные модификации РНК) - совокупность процессов в клетках эукариот, которые приводят к превращению первичного транскрипта в зрелую РНК.
Разрыв в дуплексе ДНК	Отсутствие фосфодиэфирной связи между двумя соседними нуклеотидами в одной из цепей двухцепочечной ДНК.
Растительный гормон	Природное или синтетическое органическое вещество, отличающееся от питательного вещества тем, что изменяет или контролирует один или несколько специфических физиологических процессов у растений.
Расхождение путей биосинтеза фитогормонов	Сотрезка определяемый условиями окружающей среды для одних или других фитогормонов пути ферментативного биосинтеза фитогормонов для нескольких фитогормонов.
Регенерация	Рост новых тканей или органов для замены тех, которые были утрачены или повреждены.
Рекомбинантная ДНК	Результат объединения фрагментов ДНК из различных источников.
Рекомбинантный ген	Ген, состоящий из компонентов различных генов.
Рекомбинация	Изменение положения генов в хромосомах.

Репарация ДНК	Различные механизмы, которые исправляют ошибки, появившиеся в молекуле ДНК (например, встраивание некомплементарного нуклеотида), многие из которых возникают в процессе репликации ДНК.
Репрессия	Ингибирование транскрипции путем блокировки связывания РНК-полимеразы с иницирующим сайтом транскрипции.
Репрессор	Белок, который связывается со специфической последовательностью ДНК, расположенной "вверх по течению" (слева, апстрим) от сайта инициации транскрипции, и не дает РНК-полимеразе начать синтеза иРНК.
Рестриктазы	Ферменты, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям (сайтам рестрикции). Открыты в конце 60-х гг XX в. как агенты, элиминирующие чужеродные нуклеиновые кислоты (вирусов) в клетках бактерий. В дальнейшем было показано, что Р. кодируются не только геномом бактерий, но также бактериофагами, плазмидами. Главные инструменты генетической инженерии.
Ризосфера	Слой почвы (2-3 мм), непосредственно прилегающий к корню растения и характеризующийся повышенным содержанием микроорганизмов.
РНК	Полимер органической кислоты, состоящий из аденозинового, гуанозинового, цитидинового и уридинового рибонуклеотидов.
Сайт	Участок молекулы ДНК, белка и т. п.

Секвенирование белка	Процесс определения аминокислотной последовательности белка. Обычно проводится после частичного ферментативного гидролиза белка на более мелкие пептиды.
Селекция	Наука о методах создания новых и улучшения существующих пород животных, сортов растений, штаммов микроорганизмов
Селекция клеток	С помощью селективных условий получение генетически модифицированных мутантных клеток и соматоклональных вариантов.
Синергизм	Эффект взаимоусиления факторов.
Скрининг	Предварительная характеристика коллекции образцов на основе набора простых критериев (биохимических, анатомических, физиологических и т.д.).
Соматоклональная вариабельность	Растения, регенерировавшие из культивируемых клеток и несущие какие-либо отклонения от исходных форм.
Соматоклоны	Растения, полученные из любых форм культивируемых клеток.
Соматическая гибридизация	Система, вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.
Соматический гибрид	Растение, полученное путем гибридизации соматических клеток.
Соматический эмбриогенез	Процесс образования зародыше-подобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток.

Сообщество микроорганизмов	Совокупность совместно обитающих организмов разных видов, представляющая собой определённое экологическое единство.
Стимуляторы	Факторы, усиливающие рост растений - биологически активные вещества, регуляторы роста растений, вещества, ускоряющие деление клеток. Они могут быть синтетического и природного происхождения. К природным стимуляторам относятся - ауксины, гиббереллины и цитокинины.
Стрессовые белки	специальные белки, синтезируемые организмом в неблагоприятных условиях и позволяющие снизить вредоносное воздействие этих условий существования.
Субкультивирование	Перенос транспланта (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.
Субстрат	источник питания для растущих клеток и микроорганизмов.
Субъединица	Белковая субъединица в структурной биологии - полипептид, который вместе с другими компонентами собирается в мультимерный или олигомерный белковый комплекс.
Термодинамическая система	Совокупность макроскопических тел, которые могут взаимодействовать между собой и с другими телами (внешней средой) - обмениваться с ними энергией и веществом.
Тотипотентность	Свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития при определенных условиях выращивания.

Трансгеноз (трансгенез)	Искусственный перенос чужеродных фрагментов ДНК (генов) в зародышевые клетки животных или в недифференцированные клетки растений (протопласты), микроорганизмов с последующим получением из них нового организма (трансгенный организм), у которого эти экзогенные фрагменты ДНК присутствуют в составе генома всех типов клеток как менделирующие гены, которые экспрессируются и передаются по наследству.
Трансдукция	Перенос генетического материала (часть молекулы ДНК с содержащимися в ней генами) из одной клетки в др. с помощью вируса, что приводит к изменению наследственных свойств клеток-реципиентов.
Транскрипция	Образование РНК копии ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.
Трансляция	Синтез белка на рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.
Трансплант (инокулюм)	Часть каллусной (суспензионной) культуры, используемой для пересадки в свежую среду.
Транспозон	Участок ДНК, способный перемещаться по геному из одного положения в другое.
Трансформация	Ввод в интеграция в клетку чужеродной ДНК, предназначенной для направленного изменения фенотипа у реципиентного организма.
Урацил	Одно из оснований, обнаруженных в РНК.

Фаги	Вирусы, поражающие бактерии (бактериофаги) или водоросли (альгофаги).
Фенотип	Совокупность всех признаков и свойств особи, формирующихся в процессе взаимодействия ее генетической структуры (генотипа) и внешней по отношению к ней среды.
Ферментер	Резервуар для проведения биологических реакции с помощью живых клеток, клеточных экстрактов или ферментов. Часто применяется к ферментационной ёмкости для культивирования клеток или микроорганизмов.
Ферменты	Биологические ускорители (энзимы) - обычно белковые молекулы или молекулы РНК или их комплексы, ускоряющие химические реакции в живых системах. Реагенты в реакции, катализируемой ферментами, называются субстратами, а получающиеся вещества - продуктами. Ферменты специфичны к субстратам.
Фитоалексины	Компоненты системы устойчивости растений к болезням, замедляющие развитие патогенов.
Фиторегуляторы	Природные и синтетические препараты, вызывающие ростовые или формативные эффекты и не обладающие действием удобрений и гербицидов.
Фосфобактерин	Фирменное название отечественного препарата для повышения плодородия почвы, содержащего бактерии <i>Bacillus megaterium</i> , способных разрушать фосфоорганические соединения и переводить их в доступную для растений форму.

Фотосинтез	Образование клетками высших растений, водорослей и некоторыми бактериями органического вещества при участии энергии света.
Фрагмент	Часть какой-либо структуры.
Хемосинтез	Тип метаболизма бактерий, основанный на усвоении организмами CO_2 за счет энергии, получаемой при окислении неорганических соединений (в отличие от фотосинтеза).
Хромосомы	Структуры, несущие генетическую информацию об организме, содержащие ДНК и белки. Являются главными материальными носителями наследственной информации организмов.
Центрифуга	аппарат для механического разделения смеси на составные части под действием центробежной силы.
Цитозин	одно из оснований, входящих в состав и ДНК, и РНК.
Эксплант	Фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.
Экспрессия генов	Это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт - РНК или белок.
Электропора-ция	метод переноса генов в клетки с помощью электрического разряда, вызывающего образование пор в клеточной мембране.

Электрофорез	Перемещение заряженных коллоидных частиц, вызываемое действием внешнего электрического поля. В белковой химии метод электрофореза широко используется для разделения белков с использованием полиакриламида в качестве носителя.
Эндонуклеаза	Фермент, расщепляющий внутренние фосфодиэфирные связи в молекуле ДНК, что приводит к образованию двух более коротких нитей ДНК.
Ювенильная фаза развития	Период заложения, роста и развития вегетативных органов от проростания семени или вегетативной почки до появления способности к образованию репродуктивных органов.
In vitro	Выращивание живого материала «в стекле» (пробирке, чашке), на искусственных питательных средах, в стерильных условиях.
In vivo	Выращивание живого материала в естественных условиях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артамонова Г.М., Герасимова С.И. и др. Лабораторно-практические занятия по сельскохозяйственной биотехнологии (Методические указания). Издательство МСХА, Москва. 1991.-134 с.
2. Артикова Р., Муродова С.С. Қишлоқ хўжалик биотехнологияси.Ўқув қўлланма. Тошкент, "Фан ва технология" нашриёти, 2010 й. -252 б.
3. **Давранов Қ.Д.** Биотехнология: илмий, амалий ва услубий асослари. -Т.: 2008. -214 б.
4. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций:/ А.Н.Евтушенков, Ю.К.Фомичев. -М.: БГУ, 2002. - 105 с.
5. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии 2-е изд., перераб. И доп.: Учебник для ВУЗов СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. -522 с.
6. Тимощенко Л.В., Чубик М. В. Т417 Основы микробиологии и биотехнологии: учебное пособие/-Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2009. -194 с.
7. **Цыренов В.Ж.** Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: Учебно-методическое пособие. -Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. -231с.
8. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник/ Под ред. В.С. Шевелухи. - 3-е изд., перераб. и доп. -М.: Высш. шк., 2008.-710 с.

Интернет сайты

1. <http://www.referat.ru>
2. <http://www.mycophyto.com>
3. <http://www.zin.ru>
4. www.biotech.com
5. <http://rt-biotechprom.ru>
6. <http://agribiotech.info/>

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
Работа 1. Оснащение и оборудование сельскохозяйственной биотехнологической лаборатории. Правила работы в ней	8
Работа 2. Выделение ДНК из растительной клетки.....	17
Работа 3. Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий.....	23
Работа 4. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	28
Работа 5. Приготовление питательных сред для выращивания клеток и тканей растений.....	33
Работа 6. Методы стерилизации в биотехнологии.....	38
Работа 7. Микроклонирование растений in vitro.....	41
Работа 7.1. Выращивание стерильных проростков.....	46
Работа 7.2. Выделение и выращивание апикальной меристемы картофеля.....	50
Работа 8. Получение микроклубней картофеля in vitro.....	54
Работа- 8.1. Микроразмножение картофеля черенкованием побегов	54
Работа 8.2. Получение микроклубней из картофеля.....	56
Работа 9. Управление переходом клубеньков картофеля в состояние покоя и выход из него при помощи фиторегуляторов.....	59
Работа 10. Выделение чистой культуры клубеньковых бактерий и приготовление препаратов на их основе.....	61
Работа 11. Технология получения препаратов	65
Нитрагин, Азотобактерин и Фосфобактерин	65
Работа 11.2. Технология получения Азотобактерина	73
Работа 11.3. Технология получения Фосфобактерина.....	78
Работа 12. Выделение энтомопатогенных микроорганизмов и приготовление препаратов на их основе.....	82
Работа 12.1. Энтомопатогенные препараты на основе бактерий.....	82
Работа 12.2. Получение энтомопатогенных препаратов на основе грибов	88
Работа 12.3. Энтомопатогенные препараты на основе вирусов	93
Работа 13. Выделение и размножение микроорганизмов	96
с антагонистическими свойствами	96
Работа 13.1. Получение образцов почвы и выделение из нее микроорганизмов с антагонистическими свойствами	96
Работа 13.2. Приготовление посадочного материала из культуры микроорганизмов с антагонистическими свойствами.....	98
Работа 13.3. Культивирование антагонистических микроорганизмов в злаках.....	99
Работа 13.4. Приготовление грибного посевного материала.....	100
Работа 13.5. Учет количество плотности клеток на биопрепарате и суспензии на камере Горяева.....	101
ГЛОССАРИЙ.....	104
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	127

М.С.Мамиев

АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯ

(лабораторные работы по агробиотехнологии)

Ташкент

«Fan zargari»

2024

Редактор:	И.Хасанов
Тех. редактор:	М.Муҳаммад
Корректор:	П.Валижон
Компьютерная вёрстка:	Ш.Сирожиддинов

Издательская лицензия АИ № 060006

Разрешено в печать 06.05.2024.

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Гарнитура «Cambria».

Офсетная печать. Усл. печ.л. 5.34. Изд. печ.л. 8.64.

Тираж 50. Заказ № 20. Цена договорная.

100047, Богмайидон МФЮ, дом 82, район Ялангоч.

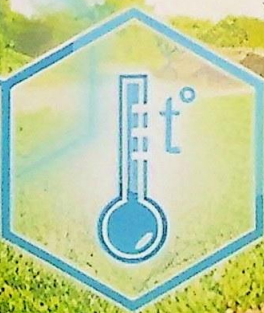
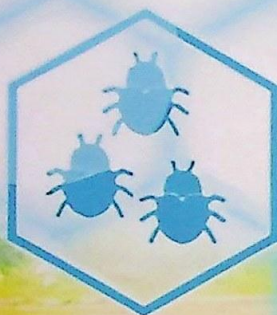
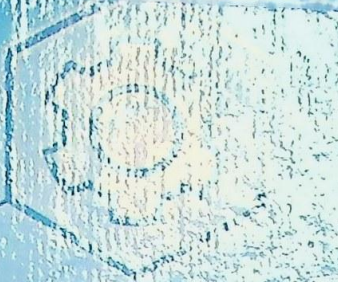
E-mail: Shahjahonyuldashboev@gmail.com

Тел.: +998 97 146 72 27

Он издан в типографии ООО «Азмир Нашр Принт».

100200, г.Ташкент, А. улица Рахмата, дом 10.





ISBN 978-9910-0000-4-1



9 789910 000041