



Министерство сельского хозяйства
Российской Федерации
федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Самарский государственный
аграрный университет»

Кафедра «Садоводство и селекция»

Сельскохозяйственная биотехнология

Методические указания
для практических работ

Кинель
2024

Методические указания по выполнению практических работ «Сельскохозяйственная биотехнология» составлены в соответствии программой дисциплины и предназначены для учащихся СОШ 10 классов естественнонаучного направления. Методические указания по выполнению практических работ содержат краткое описание лабораторных методов, позволяющих продемонстрировать применение биологических технологий в области сельского хозяйства. Направлены на формирование у школьников навыка проведения биотехнологических исследований.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биотехнология приобретает все более важную роль в повышении доходности сельского хозяйства. Биотехнологические приёмы используются для выведения сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды; разработки биологических средств борьбы с сорняками, фитопатогенными грибами, бактериями и вирусами; получения бактериальных удобрений; разработки микробиологических методов рекультивации почв; получения трансгенных растений; переработки отходов и побочных продуктов растениеводства.

Методические указания направлены на закрепление основных разделов теоретического курса по дисциплине «Сельскохозяйственная биотехнология». По каждой теме предусмотрены: минимум теоретического материала, ход выполнения работы, перечень необходимого оборудования, вопросы для обсуждения и список литературы.

Тема 1. Организация биотехнологической лаборатории (виртуальная или реальная экскурсия) (2ч.)

Цель работы - ознакомиться с организацией биотехнологической лаборатории, современным оборудованием, реактивами, а также способами стерилизации, применяемые в биотехнологии.

Для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные изолированные помещения, а также современное оборудование и высококачественные реактивы.

Главным условием функционирования лаборатории является соблюдение строгой стерильности во всех помещениях.

Лаборатория клеточной или генной инженерии включает в себя несколько помещений:

- лаборантскую комнату;
- моечную комнату;
- автоклавную комнату;
- комнату для проведения стерильной работы;
- световую комнату;
- комнату для обработки и хранения информации по исследованиям;
- адаптационную комнату;
- складская комната;
- раздевалку.

Лаборантская комната предназначена для приготовления питательных сред. В ней должны быть: холодная и горячая вода, лабораторные столы, шкафы для хранения чистой посуды и необходимых химических реактивов надлежащей степени чистоты (ХЧ, Ч, ЧДА), холодильники для хранения химических реактивов, аналитические весы, электроплитки, дистиллятор, посуда химическая и биологическая для приготовления, хранения и стерилизации питательных сред, пипетки и микропипетки, инструменты (шпатели, металлические пинцеты, скальпели, препаровальные иглы).

Моечная комната используется для мытья химической и биологической посуды. Оборудование моечной комнаты: мойки с горячей и холодной водой; дистиллированная вода; дистиллятор; сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды – до 100 – 130 С, для инструментов – до 170 С; шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, емкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы с эксикаторами. Моечную комнату желательно располагать изолированно, без контактирования со стерильными материалами, посудой, растениями.

Автоклавная комната предназначена для стерилизации питательных сред, инструментов и вспомогательных материалов. Оборудование помещения для стерилизации: автоклавы с режимом работы – давление 1-2 атмосферы и температура 120⁰С; сушильные шкафы для стерилизации посуды и инструментов сухим жаром, 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.

Комната для проведения стерильной работы предназначена для введения растительного материала в культуру *in vitro* и пересадки микрокультуры. Оборудование комнаты для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды: ламинар – боксы, лабораторные столы, стеллажи, бактерицидные лампы, шкафы для материалов и оборудования.

Световая (культуральная комната) используется для выращивания растительных тканей в условиях *in vitro*. Оборудование культуральных комнат: световое отделение - источники освещения со спектром близким к спектру дневного света (от 3 до 10 kLx), кондиционер для регуляции температуры (25 ± 20 С) 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 хладотермостаты, способные с высокой точностью поддерживать задаваемые режимы температуры и влажности воздуха, а также качалки.

Комната для обработки и хранения информации по исследованиям необходима для планирования, обработки и хранения данных экспериментов.

Адаптационная комната предназначена для адаптации микрорастений к почвенным или гидропонным условиям выращивания. Ее оборудуют стеллажами для ящиков (горшочков) с грунтом или гидропонными установками, а также дополнительным освещением.

Необходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории: мерные колбы, колбы Эрленмейера (конические), химические стаканы на 50, 100, 200, 250, 500 и 1 л, мерные цилиндры, чашки Петри, пробирки, бутылки, пипетки, стеклянные палочки, стеклянные и мерные фильтры, ланцеты (в том числе глазные, хирургические, анатомические), ножницы, пинцеты, ножи, бритвенные лезвия, препаровальные иглы, шпатели, бумага (оберточная, пергаментная, фильтровальная), фольга алюминиевая, вата.

Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* проводят в стерильных (асептических) условиях в стерильном боксе или ламинар – боксе, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах. В случае нарушения стерильности на средах хорошо развиваются микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Методика выполнения работы

1. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории.
2. Под руководством преподавателя освоить принципы работы автоклава, сушильных шкафов, дистиллятора.

3. Посуду тщательно отмыть в растворах детергентов (стиральный порошок), промыть 8 – 10 раз проточной водой, затем дважды дистиллированной.

4. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 2 часа при температуре 100 – 130⁰С.

5. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.

Контрольные вопросы:

1. Как устроена биотехнологическая лаборатория?
2. Как простерилизовать посуду, дистиллированную воду, инструменты, помещение лаборатории?
3. Организация лаборатории культуры ткани.

Тема 2. Молекулярная основа жизни (4ч.)

Цель работы – закрепить теоретические знания по молекулярной основе жизни.

Задание 1. Обнаружение и локализация нуклеиновых кислот в клетке

Для обнаружения нуклеиновых кислот широко используют смесь двух красителей – пиронина и метилового зеленого. Пиронин взаимодействует с РНК, а метиловый зеленый связывается с ДНК. Это дает возможность одновременно выявить локализацию (расположение) в клетке РНК и ДНК.

Методика выполнения работы

С вогнутой стороны мясистой чешуи лука снять кусочек эпидермиса и поместить его в каплю красителя на предметное стекло на 5-20 мин. Убрать краску фильтровальной бумагой с одной стороны препарата, добавляя с противоположной стороны воду. Препарат покрыть покровным стеклом и рассмотреть под микроскопом сначала при малом, а затем при среднем увеличении. Под действием красителя РНК окрашивается в малиновый цвет, ДНК – в синий. На хорошо приготовленных препаратах в ядре можно рассмотреть ядрышко, имеющее иную, чем ядро, окраску.

Оформление результатов опыта

1) Зарисовать несколько клеток после окраски их смесью пиронина и метилового зеленого.

2) Сделать выводы о локализации ДНК и РНК в клетке.

Контрольные вопросы

1. Почему молекулы нуклеиновых кислот называют полимерными?
2. Охарактеризуйте мономеры ДНК и РНК.
3. Опишите строение молекулы ДНК.
4. Опишите строение молекулы РНК.
5. Почему ДНК называют «самой главной молекулой» в клетке?

Тема 3. Объекты биотехнологии (прокариоты, эукариоты) (4ч.)

Цель работы - ознакомиться с особенностями клеток прокариот на примере бактериальных клеток, их окраской и микроскопированием. Изучить основные формы бактерий. Изучить особенности клеток эукариот на примере особенностей строения растительных клеток.

Методика выполнения работы

1. Простерилизовать в пламени спиртовки бактериологическую петлю (до покраснения), держа ее в правой руке (как ручку при письме).

2. Стерильную петлю ввести в пробирку с чистой культурой бактерий, которая должна находиться в левой руке, и захватить небольшой участок бактериальной колонии.

3. Захваченный из пробирки материал размешать в капле воды на предметном стекле, а затем мутную капельку размазать по стеклу тонким слоем.

4. Полученный мазок зафиксировать. Для этого предметное стекло пронести над пламенем спиртовки 3-4 раза. При фиксации мазок прикрепляется к стеклу и легче окрашивается, так как мертвый белок более восприимчив к окраске, чем живой.

5. Фиксированный мазок окрасить фуксином. Для этого поместить стекло с мазком на специальную подставку и налить на него несколько капель фуксина. Через 1-2 мин краску смыть водой. Мазок подсушить фильтровальной бумагой.

6. Готовый окрашенный мазок просмотреть в микроскоп с помощью капельки кедрового иммерсионного масла и иммерсионного объектива МИ-90. Пользуясь методикой и различными культурами бактерий, познакомиться с основными формами бактериальных клеток:

- а) шаровидные;
- б) палочковидные;
- в) извитые;
- г) нитевидные.

Оформление результатов

Задание 1. Ознакомиться с основными формами бактерий, зарисовать и обозначить их.

1. Шаровидная

2. Палочковидная

3. Извитая

4. Нитевидная

Задание 2. Нарисовать схему строения бактериальной клетки и обозначить ее основные структурные элементы.

Задание 3. Нарисовать схему строения растительной клетки, отметить её особенности

Тема 4. Биотехнологические процессы (4ч.)

Цель работы - познакомиться с основными видами брожений, их возбудителями и практическим значением.

Задание 1. Дать краткое определение процессов, называемых брожениями и уяснить, какую роль играют брожения в жизни микроорганизмов, ведущих эти процессы.

Задание 2. Приготовить препарат из кислого молока для знакомства с возбудителями молочнокислого брожения, зарисовать и охарактеризовать основные виды.

Методика выполнения работы

Приготовить препарат из кислого молока. С этой целью в капельку воды на предметном стекле внести небольшое количество кислого молока. Сделать на стекле тонкий мазок, зафиксировать на пламене спиртовки, и, не давая мазку остыть, промокнуть его фильтровальной бумагой для удаления жира. Затем в течение 30 с окрасить мазок метиленовой синькой, промыть водой и просушить в фильтровальной книжке. Просмотреть препарат в микроскоп в капле кедрового масла с иммерсионным объективом МИ-90.

Оформление результатов

1. Выполнить рисунок возбудителей молочнокислого брожения

Задание 3. Приготовить препарат, познакомиться с возбудителями спиртового брожения, зарисовать их.

Методика выполнения работы

Приготовить препарат. Для этого нанести на стекло капельку бродящих дрожжей и окрасить небольшой капелькой Люголя (KI+I). Накрыть препарат покровным стеклом и рассмотреть в микроскоп, пользуясь обычной системой объективов.

Задание 4. Приготовить препарат, познакомиться с возбудителями маслянокислого брожения, зарисовать их.

Методика выполнения работы

Приготовить препарат для знакомства с *Clostridium butyricum*. Для этого взять пробирку с накопительной культурой маслянокислых бактерий и погрузить в нее пипетку, закрыв ее пальцем. В нижнем слое пипетку открыть и набрать несколько капель, затем пипетку снова зажать пальцем и вынуть из пробирки, перенести пробу на предметное стекло и окрасить несколькими каплями раствора Люголя (KI + I). Накрыть препарат покровным стеклом и посмотреть в микроскоп, пользуясь обычной системой объективов.

Приготовить препарат для знакомства с *Clostridium rectinovorum*. Вынуть из эксикатора замоченный льняной снопик и разорвать его. Из одной или нескольких соломинок выдавить скальпелем каплю жидкости на предметное стекло, окрасить ее раствором Люголя (KI + I). Накрыть покровным стеклом и посмотреть в микроскоп с обычной системой объективов.

Тема 5. Состав и приготовление питательных сред (2ч.)

Цель работы – ознакомиться с наиболее распространёнными типами питательных сред для культивирования микроорганизмов.

Задание 1. Изучить способы приготовления питательных сред для выращивания микробов.

По исходным компонентам различают натуральные, полусинтетические, синтетические среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения (мяса, рыбы, молока, овощей, фруктов и др.), поэтому точный состав этих сред неизвестен. Их используют в том случае, когда хотят вырастить различные виды микроорганизмов.

Чаще всего обычно используют полусинтетические среды, в которых ценные пищевые продукты (мясо и др.) заменены непищевыми: костной и рыбной мукой, кормовыми дрожжами, и др. Примером таких сред могут быть мясопептонные среды, в которые, кроме мясного экстракта и пептона, входят: поваренная соль, фосфат калия. Полусинтетические среды хороши для выращивания определенных групп микроорганизмов, а также для выделения из среды продуктов их жизнедеятельности: антибиотиков, витаминов.

Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в бидистиллированной воде. Важное преимущество этих сред в том, что состав их постоянен (известно, сколько и какие вещества в них входят), поэтому эти среды легко воспроизводимы.

Методика выполнения работы

МПБ – мясо-пептонный бульон.

К 10 мл мясного бульона прибавить 100 мг пептона. После растворения пептона бульон нейтрализовать содой до легкого посинения лакмусовой бумаги, прокипятить и отфильтровать.

МПА - мясо-пептонный агар.

Сухой питательный агар 3 г всыпать в 40 мл холодной дистиллированной воды, тщательно размешать, нагреть при помешивании до полного растворения агара, не допуская его пригорания. Расплавленную питательную среду разлить по пробиркам.

Картофельный агар.

200 г очищенного и промытого водой картофеля нарезают ломтиками, заливают 1 л водопроводной воды, варят 30 мин. Отвар фильтруют через вату и доводят до первоначального объема. К полученной жидкости прибавляют 2% агара, кипятят до его растворения и устанавливают

нейтральную реакцию среды (рН 7,0). Среду стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин.

ГРМ-агар.

38,5г порошка размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить 2 мин до полного расплавления агара, фильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить по флаконам и стерилизовать автоклавированием при 121 °С 15 мин. Остудить до 45-50 °С, разлить в стерильные чашки Петри слоем 4-6 мм. После застывания среды чашки подсушить при температуре 37 °С 40-60 мин.

Среда Чапека.

Развести 45,4 грамма среды в одном литре дистиллированной воды. Хорошо перемешать и растворить, нагревая при частом помешивании. Кипятить одну минуту до полного расплавления агара. Затем профильтровать, разлить в пробирки или колбы. Стерилизовать в автоклаве при 121 °С в течение 15 минут. Охладить до 45-50 °С, хорошо перемешать и разлить по чашкам.

Минеральная синтетическая среда.

В пробирку налить 5 мл холодной дистиллированной воды и добавить:
сахарозы – 150 мг;
NaNO₃ – 10 мг;
раствор K₂HPO₄ – 0,5 мл;
KCl – 0,25 мг;
MgSO₄ – 0,25 мг;
FeCl₃ – 1-2 капли;
CaCO₃ – 20 мг;
агар-агар – 100 мг.

Задание 2. Познакомиться с основными приёмами стерилизации, изучить приборы, в которых осуществляется стерилизация, заполнить таблицу 1.

Таблица 1

Приёмы стерилизации

Приём стерилизации	Название прибора	Режим стерилизации	Объект стерилизации
Насыщенным паром			

Текучим паром			
Сухим жаром			
Механический (фильтрование)			
Ультрафиолетовое облучение			

Контрольные вопросы

1. Какие питательные среды для культивирования микроорганизмов вы знаете?
2. Что означает «элективные» питательные среды?
3. Перечислите способы стерилизации питательных сред, содержащих и не содержащих термолабильные компоненты.
4. В чем заключается порядок приготовления культуральных сред?

Тема 6. Микробиологический посев (2ч.)

Цель работы – познакомиться с методом культивирования микроорганизмов на твёрдых питательных средах.

Задание 1. Определить содержание бактерий в воздухе методом оседания, предложенным Кохом.

Методика выполнения работы.

Чашку Петри, залитую питательной средой, открывают на 5 мин. Установлено, что за 5 мин при спокойном состоянии воздуха на площадь 100 см² оседает столько микроорганизмов, сколько их находится в 10 л воздуха. Зная площадь чашки Петри и количество колоний (количество осевших за 5 мин микроорганизмов), можно определить содержание микробов в 1 м³ воздуха.

Объект исследования

Задание 2. Определить содержание бактерий в воде.

Методика выполнения работы.

а) Общая бактериальная загрязненность воды. В стерильную колбу взять пробу исследуемой воды. Воду 1 мл внести с помощью стерильной пипетки в стерильную чашку Петри, залить питательной средой и тщательно перемешать содержимое чашки Петри, дать застыть среде и поставить в термостат.

б) Определение коли-титра. Коли-титром называют наименьший объем воды, в котором обнаружена одна кишечная палочка. Для определения коли-титра пропускают определенный объем жидкости через бактериальный фильтр Зейтца, который после этого помещают в стерильную чашку Петри на застывшую питательную среду Эндо. Задержавшиеся на поверхности фильтра кишечные палочки образуют в нем ярко-красные с металлическим блеском колонии.

Чистой считается вода с общей обсемененностью не более 100 и коли-титром менее 333.

Объект исследования

Контрольные вопросы:

1. Назовите питательные среды для культивирования бактерий.
2. В чём сущность метода определения содержания бактерий в воздухе?
3. При какой бактериальной обсеменённости вода считается чистой?
4. Что такое коли-титр?

Тема 7. Укоренение черенков фасоли с помощью аналогов ауксина (1ч.)

Цель работы – изучить влияние аналогов ауксина на образование корешков у черенков фасоли.

Методика выполнения работы

Используя 0,01% раствор гетероауксина, приготовить 30 мл раствора нужной концентрации путем разбавления. Для этого взять указанное в таблице 1 количество исходного раствора и разбавить его до 30 мл водой. Налить изучаемый раствор в пробирку на 15-20 мм ниже края.

Взять по одному растению фасоли на каждый вариант. Подрезать их на 1 см под водой и поместить в воду (контроль) или в приготовленные растворы гетероауксина разной концентрации (опытные варианты). Через 30 минут черенки извлечь, концы ополоснуть водопроводной водой и поставить в колбу с водой. Горлышко заткнуть ватным тампоном. Через две недели провести учет числа образовавшихся корешков и их массу.

Таблица 1

№ п/п	Концентрация гетероауксина, %	Требуется в мл	
		Исходного раствора (гетероауксина 0,01%)	Воды
1	Вода (контроль)	00	30,0
2	0,01	30,0	00
3	0,005	15,0	15,0
4	0,0025	7,5	22,5
5	0,001	3,0	27,0
6	0,0005	1,5	28,5
7	0,00025	0,8	29,2
8	0,0001	0,3	29,7

Оформление результатов опыта

1) Заполните таблицу 2.

Таблица 2

Образование корешков под действием гетероауксина различной концентрации

№ п/п	Концентрация гетероауксина, %	Количество корешков		Масса корешков	
		штук	в % к контролю	в граммах	в % к контролю
1	Вода (контроль)				
2	0,01				
3	0,005				

4	0,0025				
5	0,001				
6	0,0005				
7	0,00025				
8	0,0001				

2) Сделайте вывод о влиянии гетероауксина различной концентрации на образование корней у черенков фасоли.

Контрольные вопросы

1. Перечислите фитогормоны растений.
2. Какие фитогормоны относятся к стимуляторам?
3. Какие фитогормоны относятся к ингибиторам?
4. Назовите синтетические аналоги гетероауксина.
5. Приведите примеры использования физиологически активных веществ в практике сельского хозяйства.

Тема 7. Задерживающее или стимулирующее действие гетероауксина на рост корней и ростков (1ч)

Цель работы – изучить влияние гетероауксина на рост корней и ростков.

Методика выполнения работы

Чашку Петри выстлать фильтровальной бумагой, на нижней стороне которой предварительно написать карандашом вариант опыта. Налить 10 мл заданного раствора. Поместить в каждую чашку по 5 зерновок пшеницы, закрыть и поставить их в темное место при температуре 20-25°C. Через 6-8 дней провести учеты: число корешков, длину корешков и ростков.

Оформление результатов опыта

- 1) Заполните таблицу 1.

Таблица 1

**Образование корешков и ростков пшеницы
под действием гетероауксина различной концентрации**

№ п/п	Концентрация гетероауксина, %	Длина на одно растение, см		Длина, % к контролю	
		корешков	ростка	корешков	ростка
1	Вода (контроль)				
2	0,01				
3	0,005				
4	0,0025				
5	0,001				
6	0,0005				
7	0,00025				
8	0,0001				

2) Сделайте выводы о влиянии гетероауксина различной концентрации на рост корней и ростков.

Контрольные вопросы

1. Почему гетероауксин относится к физиологически активным веществам?
2. Для чего используются гербициды?
3. Для чего используются дефолианты?
4. Для чего используются десиканты?
5. Где используются гаметоциды?

Тема 8. Клональное микроразмножение (4ч.)

Цель работы - приготовление и стерилизация питательной среды Мурасиге-Скуга для микрклонального размножения. Автоклавирование питательной среды. Черенкование микрорастений в операционном боксе.

Задание 1. Приготовить питательную среду согласно прописи Мурасиге-Скуга, разлить по пробиркам и упаковать в пакеты для стерилизации

Методика выполнения работы

Ознакомиться с готовым набором маточных растворов компонентов среды Мурасиге-Скуга, рассчитать необходимое количество их на заданный объем питательной среды. Изучить инструкцию по приготовлению и приготовить питательную среду.

Набор компонентов для приготовления 5 литров питательной среды
Мурасиге-Скуга

Компонент 1. Раствор макроэлементов 20-кратный на 5 л среды, стерильный (фильтрация), 250 мл/фл

Компонент 2. Раствор микроэлементов 1000-кратный на 5 л среды, стерильный (фильтрация), 5 мл/фл

Компонент 3. Раствор витаминов 1000-кратный на 5 л среды, стерильный (фильтрация), 5 мл/фл

Компонент 4. Хелат Железа для питательных сред, 100-кратный раствор на 5 л среды Мурасиге-Скуга, стерильный (фильтрация), 50 мл/фл

Компонент 5. Сахароза, на 5 литров среды, проверена на культуре клеток растений, 150 г

Компонент 6. Агар-агар, на 5 л среды, проверен на культуре клеток растений, 35 г

Инструкция по приготовлению 5 литров агаризованной среды Мурасиге-Скуга

К 4 литрам теплой дистиллированной воды (30-40°C) добавить в **указанной ниже последовательности** компоненты 1, 2, 3 и 4. Далее растворить компонент 5. В случае необходимости добавить нужное количество фитогормонов, после чего довести рН полученного раствора до 5.6-5.8, используя 1М раствор КОН или 1М раствор HCl.

К 500 мл дистиллированной воды в отдельной колбе добавить компонент 6 (агар-агар) и полностью растворить при нагревании до 90°C на водяной бане или в микроволновой печи.

К первому раствору быстро прилить горячий раствор агар-агара, довести смесь до 5 литров нагретой до 90°C дистиллированной водой и быстро, не давая остыть полученной агаризованной среде, разлить ее по пробиркам. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками и разложить по пакетам для стерилизации.

При приготовлении меньшего объема среды количество всех компонентов необходимо пропорционально уменьшить.

Задание 2. Ознакомиться с инструкцией работы автоклава и под руководством преподавателя запустить цикл стерилизации.

Температура начала гелеобразования равна +40°C. Готовую питательную среду стерилизуют автоклавированием при 120°C, в течение 20 минут при 1 атм.

Задание 3. Подготовить стерильную комнату, ламинар -боксы для черенкования. Освоить методику черенкования, и высадку растений в пробирки с питательной средой.

Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляют с помощью черенкования. Такое размножение основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушечного побега. Из пазушных почек на питательных средах образуются побеги. Растения, сформировавшие 5-6 листочков, в стерильных условиях извлекают из пробирок и разрезают на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Черенки высаживают на глубину междоузлия в питательные среды без гормонов, либо с добавлением ауксинов и цитокининов. Черенки культивируют в тех же условиях, что и меристемы: при температуре 24-25°C днем и 19-20°C ночью, освещенностью 2-6 Лх и продолжительности фотопериода 16 часов.

Рост стебля и корней начинается на 3-4 день после посадки на питательную среду, а полностью растение формируется через 12-15 дней. Каждое последующее черенкование проводят через 14-20 дней. Из одного растения можно получить 5-8 черенков, а через 2-3 месяца 3-5 тыс. черенков.

Контрольные вопросы:

1. Каким образом поддерживается асептика в операционном боксе для работы с культурами клеток?
2. Как стерилизуют посуду и инструменты для культивирования растительных объектов в условиях *in vitro*?
3. В чем заключается суть метода микроклонального размножения? Зачем необходимо микроклональное размножение растений?
4. На чем основано клональное микроразмножение?
5. Что такое *in vitro* и *in vivo*?
6. Какие растения размножаются с помощью метода микроклонального клонирования?

Тема 9. Почвенная биотехнология (2ч.)

Цель работы – познакомиться с методом определения содержания основных групп почвенных микроорганизмов.

Методика выполнения работы

10 г почвы помещают в колбочку со стерильной водой (90 мл) и тщательно взбалтывают в течение 3-5 мин. После чего почвенную взвесь разводят в 10-100 и более тысяч раз, в зависимости от содержания микроорганизмов в почве, для чего 1 мл почвенной взвеси переносят стерильной пипеткой в пробирку с 9 мл стерильной воды и т.д. до нужного разведения. Из последнего разведения 1 мл жидкости переносят в

стерильную чашку Петри, заливают питательной средой и тщательно перемешивают содержимое чашки, дают застыть среде и ставят в термостат для инкубации.

Объект исследования _____

Контрольные вопросы:

1. Назовите основные группы почвенных микроорганизмов.
2. Назовите условия культивирования бактерий.
3. Назовите питательную среду для культивирования микромицетов.
4. Опишите технику приготовления лабораторной посуды для микробиологического посева.
5. Опишите условия проведения микробиологического посева.

Тема 10. Биопрепараты для борьбы с вредителями, болезнями с/х культур. Биогербициды (2ч.)

Цель работы – освоить технику приготовления препарата для изучения биогербицидов и биопрепаратов.

Задание 1. Приготовить препарат из предложенного биопрепарата.

Методика выполнения работы

Приготовить препарат из предложенного биопрепарата: на предметном стекле стерильной петлей сделать мазок, нанести каплю фуксина и сразу смыть его водой. Покрывать мазок покровным стеклом и рассмотреть его при малом и большом увеличении. Зарисуйте препарат.

Задание 2. Дайте характеристику изучаемого биопрепарата.

Контрольные вопросы

1. Назовите известные Вам биопрепараты.
2. Перечислите отличия биологических и химических препаратов для борьбы с болезнями и вредителями сельскохозяйственных культур.
3. Для борьбы с какими вредными объектами используют биофунгициды?
4. Для борьбы с какими вредными объектами используют биоинсектециды?

Тема 11. Биологические удобрения (2ч.)

Цель работы – познакомиться с процессом азотфиксации и дать характеристику его возбудителям.

Задание 1. Изучить азотфиксирующие микроорганизмы, живущие в симбиозе с высшими растениями (клубеньковые бактерии).

Методика выполнения работы

Приготовить препарат из клубенька на корнях бобовых культур. На предметном стекле сделать мазок, не разводя его в воде, нанести каплю фуксина и сразу смыть его водой. Покрывать мазок покровным стеклом и рассмотреть его при малом и большом увеличении. Зарисуйте препарат.

Оформление результатов

а) Морфология клубеньковых бактерий

б) Схема образования клубеньков на корнях высших растений

в) Физиологические особенности клубеньковых бактерий

г) Значение клубеньковых бактерий в природе и сельскохозяйственном производстве. Условия, способствующие интенсивной азотфиксации

д) Практическое использование клубеньковых бактерий

Контрольные вопросы

1. Что такое азотфиксация?
2. На корнях каких растений поселяются клубеньковые бактерии?
3. Чем отличаются активные клубеньки от неактивных?
4. Что такое бактериоды?

Тема 12. Биотехнология в пищевой промышленности (2ч.)

Цель работы – познакомиться с методом определения количества и качества клейковины.

Определение качества и количества клейковины в пшеничной муке регламентируется ГОСТ 27839-88 «Мука пшеничная. Методы определения количества и качества клейковины».

Задание 1. Определение количества клейковины

Методика выполнения работы

Отвесьте на технических весах 25,0 г пшеничной муки (точность взвешивания должна составлять не менее 0,1г) и поместите навеску муки в стеклянную или фарфоровую чашку. Затем добавьте 13 мл (13 г) воды. Температура воды должна составлять 16 -20 °С, жесткость – не более 7 моль/м³. Из воды и муки шпателем замесите однородное тесто и скатайте его в шарик. Частицы теста не должны оставаться на стенках чашки или шпателе! Закройте чашку с шариком стеклом или полиэтиленовой пленкой и оставьте на 20 минут при температуре 16 - 20 °С для набухания белков клейковины. Затем 3-4 раза аккуратно промойте шарик теста в воде в соответствующей по объему емкости (во время промывания тесто необходимо разминать и выворачивать). Температура промывной воды: 16 - 20 °С. Мутную воду из емкости для отмывания клейковины следует сливать через густое шелковое сито, чтобы не потерять кусочки отмываемой клейковины. Кусочки клейковины, оставшиеся на сите, присоедините к отмываемому образцу. По мере отмывания образца клейковина становится более упругой и вязкой. Отмывание клейковины проводят до тех пор, пока промывная вода не станет прозрачной. Затем несколько раз отожмите отмытую клейковину между ладоней (ладони каждый раз протирайте сухой салфеткой). После того, как комочек клейковины начнет прилипать к рукам, взвесьте его на весах и запишите полученный результат. Повторите операцию отмывания, отжимания и взвешивания клейковины. Если результат повторного взвешивания совпадет с первым с точностью до 0,1 г, значит, клейковина отмыта качественно. Если результаты не совпадают, повторите отмывание еще раз. Доказательством хорошего отмывания клейковины является проба на йод. Выдавите из отмываемой клейковины 2-3 капли воды и добавьте к ним каплю раствора йода. Отсутствие синего окрашивания свидетельствует о том, что клейковина полностью отмыта от крахмала. Умножьте полученную при взвешивании массу отмытой клейковины (в граммах) на 4. Полученный результат соответствует массовой доле содержащейся в муке сырой клейковины.

Задание 2. Определение качества клейковины

Методика выполнения работы

О качестве сырой клейковины можно судить по ее консистенции, цвету, растяжимости и эластичности. Слабая клейковина после отмывания образует достаточно однородный и хорошо растягивающийся липкий комочек. Сильная (крепкая) клейковина после отмывания чаще всего выходит в виде отдельных долек или сплошного упругого пористого комочка. Цвет сырой клейковины определяют сразу после отмывания. Цвет образца может быть светлым, серым или темным. Для клейковины хорошего качества характерен светлый цвет с желтоватым оттенком.

Задание 3. Определение растяжимости клейковины.

Методика выполнения работы

От кусочка отмытой клейковины отделите образец массой 4 г, скатайте из него шарик и поместите в чашку с водой на 15 минут (температура воды должна составлять 18 °С). Возьмите образец клейковины тремя пальцами каждой руки и равномерно растяните его (без подкручивания) над линейкой до разрыва нити. Растягивание образца над линейкой должно продолжаться около 10 сек. Отметьте, на сколько сантиметров удастся растянуть нить клейковины до момента разрыва.

По способности к растяжению клейковину делят на:

- короткую (растягивается до 10 см);
- среднюю (10-20 см);
- длинную (растягивается более чем на 20 см).

Контрольные вопросы

1. Что такое клейковина?
2. Назовите процентное содержание клейковины в пшеничной муке высшего сорта.
3. Назовите параметры определения качества сырой клейковины.
4. Назовите цвет клейковины хорошего качества.