

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

О. М. Бедарева

Основы биотехнологии

Учебно-методическое пособие по изучению дисциплины для студентов,
обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки
35.03.04 Агрономия

Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2022

УДК 574 (075.8)

Рецензент

кандидат биологических наук, доцент кафедры агрономии и агроэкологии
ФГБОУ ВО «КГТУ» Е. А. Барановская

Бедарева, О. М.

Основы биотехнологии: учеб.-методич. пособие по изучению дисциплины для студ. бакалавриата по напр. подгот. 35.03.04 Агрономия / О. М. Бедарева. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2022. – 46 с.

В учебно-методическом пособии по изучению дисциплины «Основы биотехнологии» представлены учебно-методические материалы по освоению тем лекционного курса, включающие подробный план лекции по каждой изучаемой теме, вопросы для самоконтроля и материалы по выполнению контрольной работы, форма обучения очная, заочная.

Табл. 1, список лит. --13 наименований

Учебное пособие рассмотрено и рекомендовано к опубликованию кафедрой агрономии и агроэкологии 28 июня 2022 г., протокол № 8

Учебно-методическое пособие по изучению дисциплины рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 30 июня 2022 г., протокол № 8

УДК 574 (075.8)

© Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Калининградский государственный
технический университет», 2022 г.
© Бедарева О. М., 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ.....	6
2. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ КОНТРОЛЬНОЙ РАБОТЫ.....	38
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	42
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	43

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина изучается: по очной форме обучения – в седьмом семестре ОП, по заочной форме обучения – в седьмом семестре. При ее изучении используются базовые знания, умения и навыки, полученные при освоении всех предшествующих дисциплин ОП ВО по направлению.

Результаты освоения дисциплины используются на государственной итоговой аттестации, при обучении на следующей ступени высшего образования и в будущей профессиональной деятельности.

Целью освоения дисциплины «Основы биотехнологии» является формирование у студента способности к самостоятельному использованию биотехнологических методов и приемов при производстве целевой продукции растениеводства высокого качества.

При реализации дисциплины «Основы биотехнологии» организуется практическая подготовка путем проведения практических занятий (лабораторных работ), предусматривающих участие обучающихся в выполнении отдельных элементов работ, связанных с будущей профессиональной деятельностью.

Освоение дисциплины предполагает:

- изучение перспектив и возможностей производства высококачественной растениеводческой продукции благодаря внедрению биотехнологических методов и подходов;
- изучение и характеристика перспективных биотехнологий растениеводства, разрабатываемых в России и зарубежных странах;
- рассмотрение базовых теоретических принципов, лежащих в основе этих биотехнологий;
- ознакомление с новейшими биотехнологическими приемами и перспективами их внедрения в сельскохозяйственную практику.

В результате освоения дисциплины студенты должны:

Знать: биотехнологические термины и понятия; возможность использования биотехнологий для получения целевого конечного продукта высокого качества; научно-обоснованные принципы, методы и приемы современных агробiotехнологий; особенности физиолого-биохимических процессов, происходящих в сельскохозяйственных растениях, при использовании биотехнологий.

Уметь: изучать современную информацию, отечественный и зарубежный опыт по применению биотехнологий в растениеводстве; применять современные методы научных биотехнологических исследований согласно утвержденным планам и методикам; определять факторы и выбирать научнообоснованные приемы оптимизации биотехнологических процессов в растениеводстве; давать научное обоснование агробiotехнологическим мероприятиям для получения целевого продукта хорошего качества; консультировать по производству конкурентоспособной продукции растениеводства с использованием агробiotехнологий.

Владеть: навыками обработки и анализа экспериментальных данных, систематизации результатов агробиотехнологических исследований; базовыми навыками применения современных агробиотехнологических приемов (или их элементов) в научной и технологической деятельности.

Для успешного освоения дисциплины «Основы биотехнологии», студент должен активно работать на лекционных, лабораторных работах и практических занятиях, организовывать самостоятельную внеаудиторную деятельность.

Для оценивания поэтапного формирования результатов освоения дисциплины (текущий контроль) предусмотрены тестовые и практические задания. Тестирование обучающихся и решение практических задач проводится на практических занятиях после изучения соответствующих тем. Тестовое задание предусматривает выбор правильного ответа на поставленный вопрос из предлагаемых вариантов ответа. Перед проведением тестирования преподаватель знакомит студентов с вопросами теста, а после проведения тестирования проводит анализ его работы. Перечень примерных тестовых и практических заданий представлен в фонде оценочных средств по данной дисциплине.

Промежуточная аттестация проводится в виде зачета, к которому допускаются студенты, успешно освоившие темы курса и имеющие положительные оценки.

При необходимости для обучающихся инвалидов или обучающихся с ОВЗ предоставляется дополнительное время для подготовки ответа с учетом его индивидуальных психофизических особенностей.

Для успешного освоения дисциплины «Основы биотехнологии» в учебно-методическом пособии по изучению дисциплины приводится краткое содержание каждой темы занятия, перечень ключевых понятий, вопросов для самоконтроля и организации самостоятельной работы студентов.

1 МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ

Осваивая курс «Основы биотехнологии», студент должен научиться работать на лекциях, лабораторных работах и практических занятиях, а также организовывать самостоятельную внеаудиторную деятельность. В начале лекции необходимо уяснить цель, которую лектор ставит перед собой и студентами. Важно внимательно слушать, отмечать наиболее существенную информацию и кратко ее конспектировать; сравнивать то, что услышано на лекции с прочитанным и усвоенным ранее материалом в области основ биотехнологий, укладывать новую информацию в собственную, уже имеющуюся, систему знаний. По ходу лекции необходимо подчеркивать новые термины, определения, устанавливать их взаимосвязь с изученными ранее понятиями.

Тематический план лекционных занятий (ЛЗ) представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Объем (трудоемкость освоения) и структура ЛЗ

Номер темы	Содержание лекционного занятия	Кол-во часов ЛЗ	
		очная форма	заочная форма
1.	Тема 1. Биотехнология и генетическая инженерия в растениеводстве	2	2
2.	Тема 2. Биотехнология и сохранение генофонда растений	2	
3.	Тема 3. Фитобиотехнология	2	
4.	Тема 4. Регуляторы роста и развития растений в биотехнологии и растениеводстве	2	2
5.	Тема 5. Клеточная инженерия	4	2
6.	Тема 6. Производство кормового белка	2	
Итого		14	6

Если лектор приглашает студентов к дискуссии, то необходимо принять в ней активное участие. Если на лекции студент не получил ответа на возникшие у него вопросы, он может в конце лекции задать эти вопросы лектору курса дисциплины.

Тема 1. Биотехнология и генетическая инженерия в растениеводстве

Ключевые вопросы темы

1. Дайте определение что такое биотехнология, генетическая инженерия в растениеводстве.
2. История возникновения и развития биотехнологии.
3. Приоритетные направления и мировой уровень биотехнологии как науки. Отрасли производства продукции растениеводства.
4. Понятие о сельскохозяйственной биотехнологии.

Ключевые понятия: биотехнология, разделы биотехнологии, применение биотехнологии в сельском хозяйстве, роль биотехнологии в мировом сообществе.

Методические рекомендации

При ответе на первый вопрос акцентировать внимание на том, что биотехнология является новой областью биологической науки. Она использует методы генетики, молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, селекции и экологии.

Биотехнология – это наука о клеточных и генно-инженерных методах и технологиях при создании и использовании биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения. Современная биотехнология изучает возможности использования организмов и биологических процессов в системе производства. В связи с этим, специалисты, работающие в сельском хозяйстве, должны в совершенстве владеть методами биотехнологии, уметь использовать их для увеличения объемов сельскохозяйственной продукции.

Генетическая инженерия изучает проблемы изменения генетической программы клеток, то есть направленное конструирование новых живых организмов с заданными свойствами.

При ответе на второй вопрос необходимо показать этапы развития биотехнологии:

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

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

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

IV этап (1932–1940 гг.). Французский ученый Р. Готре продемонстрировал возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересеивания их на свежую питательную среду.

Впоследствии с помощью этого метода многие растения были введены в культуру.

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

VI этап (1960–1975 гг.). Профессор Ноттингемского университета Э. Коккинг разработал ферментативный метод получения изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивировать их в контролируемых условиях. Его сотрудником Пауэром было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. Французский ученый Ж. Морель разработал метод микроразмножения растений в условиях *in vitro* с использованием меристем культуры и применял его для получения оздоровленного посадочного материала орхидей.

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

При ответе на третий вопрос необходимо рассмотреть первоочередные задачи биотехнологии:

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

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

3) Создание ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов и др.) для повышения продуктивности животноводства; новых

методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных; ускоренное размножение животных в результате пересадки эмбрионов; создание трансгенных животных.

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

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

При ответе на четвертый вопрос следует обратить внимание на перспективы использования биотехнологии в сельском хозяйстве. сельскохозяйственная биотехнология призвана обслуживать отрасли сельского хозяйства. Она разрабатывает методы и методологии создания и использования генетически модифицированных биологических объектов для интенсификации сельскохозяйственного производства, получения новых видов продуктов различного назначения, охраны окружающей среды и др.

Приоритетными исследованиями по сельскохозяйственной биотехнологии являются:

- создание и испытание трансгенных растений, несущих новые хозяйственноценные признаки (устойчивость к болезням, насекомым, гербицидам, абиотическим стрессам);

- использование молекулярных маркеров для построения генетических карт растений, создания идентифицированных генетических коллекций и разработки новых технологий селекции с помощью генетических маркеров;

- исследования по соматической гибридизации растений для преодоления барьеров нескрещиваемости между видами;

- клеточная селекция, в первую очередь на устойчивость к абиотическим и биотическим факторам среды;

- разработка методов гаметной и зиготной селекции, отбора на уровне гаметофита и ранних стадий развития спорофита, эмбриокультуры;

- получение гаплоидов и дигаплоидов для быстрой гомозиготизации материала и ускорения селекционного процесса;

- создание и размножение в культуре *in vitro* уникальных генотипов растений, поддержание генетических коллекций, в том числе методом криосохранения;

- разработка, совершенствование и внедрение в практику методов микроклонального размножения растений для производства посадочного материала картофеля, плодовых, ягодных, овощных, декоративных культур;

- создание новых штаммов микроорганизмов и использование их для защиты растений, защиты окружающей среды, повышения плодородия почвы и др.;

- создание, испытание и внедрение в практику высокоэффективных и экологически безопасных регуляторов роста для повышения продуктивности и устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое биотехнология?
2. Что изучает современная биотехнология?
3. Что изучает генетическая инженерия?
4. Охарактеризуйте основные этапы становления и развития биотехнологии.
5. В чем состоят первоочередные задачи биотехнологии?
6. Перспективы использования биотехнологии в сельском хозяйстве.
7. Охарактеризуйте приоритетные исследования в сельскохозяйственной биотехнологии.

Тема 2. Биотехнология и сохранение генофонда растений

Ключевые вопросы темы

1. Химические способы защиты растений
2. Биологические способы защиты растений
3. Фиторегуляторы в системе защиты растений

Ключевые понятия: пестициды, инсектициды, гербициды, фунгициды, репелленты, аттрактанты, регуляторы роста растений, хемотренизаторы, бактериальные препараты, грибные препараты, антибиотики, фитоалексины, микробы антагонисты, вакцинные и иммунологические препараты.

Методические рекомендации

При ответе на первый вопрос необходимо отметить группы пестицидов:

Инсектициды – это химические средства уничтожения насекомых-вредителей растений, продуктов, материалов, паразитов и переносчиков заболеваний. По способу действия на насекомых различают: кишечные инсектициды – проявляют токсическое действие при попадании в кишечник вредителя; контактные инсектициды – убивают насекомых при попадании на наружные покровы (карбофос, дихлофос); системные инсектициды – проникают через листья или корни и делают растение токсичным для насекомого.

Гербициды – химические средства борьбы с сорняками. Выделяют: гербициды *сплошного действия* – уничтожают все виды растений; гербициды *избирательного действия* – уничтожают растения определенных видов.

В каждой из групп выделяют: *контактные гербициды* – они действуют при контакте с наземными частями растений; *системные гербициды* – они попадают внутрь растения при контакте или с почвенным раствором.

Фунгициды – средства для борьбы с грибковыми заболеваниями и болезнями растений.

Репелленты – вещества, которые защищают животных, людей, растения и помещения от нападения насекомых путем их отпугивания.

Аттрактанты – вещества, которые привлекают насекомых.

Регуляторы роста растений. К ним относят: *стимуляторы* – вещества, которые стимулируют рост семян и растений; *дефолианты* – вещества, которые вызывают опадание листьев; *десиканты* – средства для удаления лишних цветов и завязей; *ретарданты* – вещества, которые увеличивают прочность стебля.

Хемотрепериллизаторы – вещества, которые уменьшают или уничтожают способность вредных организмов к размножению.

Чрезмерное использование пестицидов приводит к нарушению биологического равновесия в экосистеме. Однако полный запрет применения всех пестицидов может привести к потере до 40% урожая. В связи этим будущее принадлежит специфическим методам борьбы с вредителями, в частности, методам биологического воздействия.

При ответе на второй вопрос отмечаем, что отечественная промышленность выпускает три группы энтомопатогенных препаратов:

1. Бактериальные препараты на основе *Bacillus thuringiensis* (энтобактерин, алестин, экзотоксин, дендробациллин и др.).

2. Грибные препараты.

3. Препараты на основе вирусов ядерного полиэдроза.

Для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов применяют следующие средства:

Антибиотики. Например, грибы *Trichoderma sp.* и *Trichotecium roseum* продуцируют триходермин и трихотецин, которые используют для борьбы с корневыми гнилями овощных, зерновых и технических культур.

Фитоалексины. Они синтезируются в тканях растений в ответ на внедрение фитопатогенов и являются высокоспецифичными заменителями пестицидов. Например, фитоалексин перца применяют при фитофторозе.

Микробы-антагонисты. Они вытесняют патогенный вид и подавляют его развитие.

Вакцинные и иммунологические препараты. Их вводят в прорастающие семена.

При ответе на третий вопрос рассмотреть возможность использования фиторегуляторов в борьбе с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений была показана на рубеже 40-50-х годов XX века. При их применении повышение устойчивости растений к вредоносным организмам обусловлено следующими причинами: препарат является токсином для какого-либо паразита; улучшаются морфологические показатели и общее состояние растения, это делает его менее уязвимым для атаки вредителями и болезнями; изменение метаболизма растения-хозяина неблагоприятно для паразита; изменение фазы развития растения-хозяина относительно фазы паразита ведет к сокращению периода питания, а, следовательно, и снижению вредоносного действия.

Вредители и возбудители заболеваний оказывают регуляторное действие на растение-хозяина, создавая тем самым для себя благоприятные условия.

Многие паразитические организмы синтезируют аналоги цитокининов, обогащают ими зараженные клетки и тем самым обеспечивают приток к месту своего развития питательных веществ из других частей растения. Эти участки остаются «зелеными островками» на пожелтевших листьях. Такие же «зеленые островки» на листьях образуют личинки насекомых, паразитическое растение повиллика.

Показано, что насекомые нуждаются для своего развития в некоторых гормонах растений, которые в организме насекомого превращаются в их

собственные регуляторные вещества. Так, фитогормон брассинолид ускоряет время наступления линьки насекомых.

В связи с этим предложено использовать гормоны растений или близких по строению веществ как нового поколения инсектицидов. При использовании этих препаратов снижение численности насекомых наступает не за счет блокирования какого-либо звена метаболизма, а за счет изменения времени наступления метаморфоза или влияния на половое созревание.

В ходе эволюции растения выработали собственную систему защиты. Так, под действием повреждений, вызываемых вредителем или патогеном, усиливается биосинтез этилена. Он распространяется во всем растении и разносится ветром. При этом в растении:

1) стимулируется образование фитоалексинов. Это вещества, выполняющие роль антибиотиков у растений;

2) повышается активность хитиназы. Это фермент, разрушающий пищеварительный тракт насекомых или хитиноподобное вещество, из которого состоят стенки гифов патогенных грибов, после чего их протопласты лизируются ферментами растительной клетки;

3) стимулируется синтез другого фитогормона – абсцизовой кислоты. Она затормаживает процессы роста и деления клеток и стимулирует синтез стрессовых белков.

Вопросы для самоконтроля

1. Какова роль биотехнологии в сохранении генофонда растений?
2. Что такое пестициды?
3. Каким требованиям должны удовлетворять пестициды?
4. На какие группы делят пестициды?
5. Что такое инсектициды? Каков механизм их действия?
6. Что такое гербициды? Каков механизм их действия?
7. Что такое фунгициды, репелленты, аттрактанты, хемостерилизаторы?
8. Какие химические вещества относят к регуляторам роста растений?
9. Какие биологические способы защиты растений Вам известны?
10. Охарактеризуйте группу бактериальных энтомопатогенных препараты на основе *Bacillus thuringiensis* (энтобактерин, алестин, экзотоксин, дендробациллин и др.).
11. Охарактеризуйте грибные энтомопатогенные препараты (боверин и вертициллин).
12. Охарактеризуйте препараты на основе вирусов ядерного полиэдроза.
13. Какие еще биологические способы защиты растений Вы знаете?
14. Роль фиторегуляторов в системе защиты растений.

Тема 3. Фитобиотехнология

Ключевые вопросы темы

1. Вегетативное размножение растений методом культур тканей
2. Поверхностное культивирование клеток растений
3. Культивирование клеток растений в глубинных условиях

4. Иммуобилизация растительных клеток

5. Сохранение культур клеток растений

6. Использование методов генетической инженерии в фитобиотехнологии

Ключевые понятия: фитобиотехнология, ферменты, стероиды, клетки, фитобиотехнологические процессы, микроразмножение *in vitro*, тотипотентность клеток, поверхностное культивирование, культивирование клеток, методы иммуобилизации клеток, криосохранение, замедление роста, генетическая инженерия в фитобиотехнологии.

Методические рекомендации

При ответе на первый вопрос дать определение что такое фитобиотехнология. *Фитобиотехнология* – составная часть биотехнологии (от греческих слов *phyton* – растение, *bios* – жизнь, *teken* – искусство и *logos* – наука, слово). Это наука об использовании растительных объектов в технике и промышленном производстве. *Объекты фитобиотехнологии* – клетки и ткани растений, а также биологически активные молекулы растительного происхождения (ферменты, нуклеиновые кислоты, стероиды и др.). *К фитобиотехнологическим процессам* относят процессы, которые базируются на клеточном уровне, в том числе, когда клетки уже использовались в генно-инженерном эксперименте.

С помощью методов фитобиотехнологии можно выращивать на питательных средах *in vitro* клетки и ткани высших растений, продуцирующих БАВ, в несвойственных им климатических зонах.

Растительные клетки и ткани способны культивироваться в форме неорганизованной клеточной массы – каллуса. Каллусную ткань можно «заставить» формировать зародышеподобные структуры, почки, побеги, а на их основе – растения-регенеранты. Все это происходит благодаря тотипотентности растительных клеток (от лат. *totus* – все, целый, *potentia* – сила, потенция). То есть клетка обладает способностью воспроизводить целый организм.

Микроразмножение *in vitro* осуществляют из зародыша растения, верхушки основного побега, пазушных побегов, суспензионной культуры клеток, промежуточного каллуса и некоторых других. Для этого соответствующие ткани отбирают, стерилизуют и переносят на подходящую питательную среду.

Установлено, что меристемные ткани, сердцевина луковиц, клубнелуковиц и корневищ, которые надежно защищены листьями и чешуйками и являются стерильными. Перед удалением покрывающих структур их каждый раз протирают 70 % этанолом. Если источниками тканей являются открытые органы, то их стерилизуют до 40 мин ртуть- или хлорсодержащими агентами (гипохлориты натрия и кальция, сулема) или пероксидом водорода.

После стерилизации растительный биообъект трижды промывают свежей стерильной дистиллированной водой.

Компоненты питательных сред делят на три группы: 1) источники органического углерода (чаще – сахароза); 2) неорганические соли (включая источники азота); 3) стимуляторы роста (некоторые витамины группы В и

растительные гормоны – цитокинины (усиливают или поддерживают рост каллусов и/или корнеобразование *in vitro*) и ауксины (стимулируют образование почек).

Питательные среды могут быть плотными и жидкими. Например, для микрокультуры ананасов предпочтительнее жидкие среды.

В целях предотвращения возможного бактериального и грибного загрязнения в питательные среды добавляют антибиотики (нистатин, цефалоспорин, левомецетин, гентамицин сульфат, канамицин моносульфат, рифампицин и др.).

С помощью метода культур тканей повысили коэффициент размножения садовых древесных растений (яблони) и травянистых декоративных растений (ирис, нарцисс, петуния, фиалка и др.). Доступными для производства стали клетки барбариса – продуцента спазмолитика ятроризина, табака – продуцента убихинона. Весьма перспективны каллусные культуры древесных растений. Перед высадкой проростков в грунт стимулируют корнеобразование с помощью индолилмасляной кислоты.

При ответе на второй вопрос отмечаем, что поверхностное культивирование клеток растений осуществляют на полужидкой агаризованной среде, среде с добавлением других желирующих полимеров, на дисках из полиуретана, на мостиках из фильтровальной бумаги, полупогруженных в жидкую питательную среду. Можно также использовать комочки ваты, пропитанные питательной средой, которые сверху покрываются кусочком фильтровальной бумаги.

Для того, чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, первичный каллус переносят на свежую питательную среду через 28–30 дней, т. е. проводят пассирование или субкультивирование каллусной ткани.

При пассировании ткани на среду, содержащую индукторы органогенеза, клетки приступают к делению. Это приводит либо к формированию почек и побегов (геммогенез), либо к ризогенезу.

При ответе на третий вопрос отмечаем наличие двух систем культивирования:

1) Закрытая система культивирования – наиболее изучена и распространена. Для нее характерен периодический режим выращивания. При этом клеточная масса помещается в определенный объем среды. Система закрыта по всем параметрам, кроме газов, до конца выращивания. Периодически подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. Клетки остаются в системе в течение всего цикла выращивания.

2) Открытая (проточная) система культивирования – поступает свежая питательная среда, при этом отбирается старая питательная среда и часть урожая. Первый крупномасштабный процесс по выращиванию культур клеток растений (воробейника) был осуществлен в начале 80-х годов для получения вторичного метаболита – шиконина. Это натуральный ярко-красный краситель, обладающий антисептическими свойствами. За один периодический процесс получается около 5 кг конечного 23 продукта, который накапливается в клетках.

На первой стадии клетки воробейника выращивают 9 суток в биореакторе объемом 200 л на среде с подачей стерильного воздуха. Затем культуру переносят в биореактор меньшего размера со средой, которая стимулирует продукцию шиконина. В третьем реакторе на 750 л ферментацию ведут две недели. Клетки на первой стадии белые, на последней – красные. Стоимость красителя в 1983 г. составляла 4000 долл. за килограмм.

Суспензионные культуры используют для промышленного получения вторичных метаболитов, которые используются в медицине, парфюмерной промышленности, растениеводстве и других отраслях промышленности. Это – алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пигменты, антиканцерогены, пептиды (ингибиторы фитовирусов). В настоящее время в разных странах в биосинтетической промышленности для получения экономически важных веществ используется около ста видов растений (женьшень, беладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клещевина, агава, мак снотворный и др.).

В четвертом вопросе необходимо рассмотреть иммобилизацию растительных клеток. Иммобилизация клеток и тканей растений – это новый подход, направленный на увеличение выхода вторичных метаболитов. В 1966 г. Мосбаху впервые удалось зафиксировать клетки лишайника *Umbilicaria pustulata* в полиакриламидном геле.

Методы иммобилизации клеток растений:

1) Иммобилизация клеток или субклеточных органелл в инертном субстрате – при этом клетки обволакиваются цементирующей средой (альгинат, агар, коллаген, полиакриламид).

2) Адсорбция клеток на инертном субстрате – клетки прилипают к заряженным шарикам из альгината, полистирола, полиакриламида.

3) Адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул (например, лектин). Применяется редко.

4) Ковалентное связывание с другим инертным носителем. Применяется редко.

Иммобилизованные клетки имеют следующие преимущества перед каллусными и суспензионными культурами:

1) они образуют биомассу гораздо медленнее, чем клетки, растущие в жидких суспензионных культурах. Это способствует синтезу вторичных метаболитов;

2) клетки растут в тесном физическом контакте друг с другом. Это благоприятно отражается и на химических контактах;

3) выход вторичных метаболитов можно регулировать путем изменения химического состава окружающей среды;

4) удобство выделения вторичных метаболитов.

Существует два типа систем культивирования иммобилизованных клеток:

1) Система культуры с плоской основой – клетки выращиваются в горизонтально расположенном сосуде.

2) Система колоночной культуры – клетки выращиваются в вертикальном сосуде.

В обеих системах жидкая среда циркулирует вокруг физически неподвижных клеток.

В пятом вопросе рассмотреть способы сохранения культур клеток растений. Одним из методов является криосохранение. Криосохранение – это замораживание при сверхнизких температурах. Обычно – в жидком азоте, при температуре минус 196 °С. Клетки для замораживания отбирают в середине экспоненциальной фазы ростовой кривой.

Предварительно проводят культивирование в особых условиях. В среду добавляют различные вещества, например, маннит или сорбит – для уменьшения размера вакуолей; аминокислота пролин – для связывания воды в клетке; диметилсульфоксид (ДМСО) – для увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны.

Кроме того, применяют искусственное закаливание к холоду. При этом клеточные культуры выдерживают несколько суток при температуре 8–10 °С, а затем до 6 недель при 2–5 °С.

За час до замораживания в культуру вносят криопротекторы (сахароза, декстран, этиленгликоль, поливинилпирролидон, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин). Они снижают повреждающее действие физико-химических факторов путем изменения проницаемости мембраны, а также точки замерзания и оттаивания.

Охлаждение проводят в два этапа:

1) От 20 до минус 35 °С со скоростью 0,5 град в минуту, выдерживают при этой температуре 15 мин.

2) Погружение в жидкий азот (мгновенное охлаждение до минус 196 °С).

Замораживание производят в ампулах объемом 1 мл.

Размораживают ампулы на водяной бане с температурой 37–40 °С в течение 0,5–1 мин.

После размораживания клетки отмывают 3–10 % раствором сахарозы.

Далее клетки проверяют на жизнеспособность сначала с помощью красителей, а затем по четкому возобновлению роста на стандартных питательных средах для данной культуры.

Вторым способом является замедление роста. Замедления роста можно добиться следующими методами: изменение газового состава и атмосферного давления внутри культурального сосуда; изменение светового режима; охлаждение до температуры прекращения активного роста; применение гормональных ингибиторов (хлорхолинхлорид); применение осмотических ингибиторов (манит) и др. Например, для картофеля рекомендуется клубнеобразование в пробирках.

В шестом вопросе остановиться на использовании методов генетической инженерии в фитобиотехнологии. В генноинженерном эксперименте изолируют конкретный ген, включают его в наследственный аппарат растительной клетки и регенерируют растение с измененным наследственным признаком, которое способно приносить жизнеспособное потомство.

Объединение геномов клеток разных особей осуществляют:

1) половая гибридизация – известна давно, реализуется в природных и искусственных условиях, используется для выведения новых сортов растений и для повышения их продуктивности.

2) соматическая гибридизация – реализуется только в искусственных условиях. При этом соматические клетки предварительно лишают клеточной стенки и трансформируют в протопласты. Протопласты способны сохраняться и метаболизировать, а также реконструировать клеточную стенку в подходящих условиях. Они были впервые получены Дж. Клеркером в 1892 г. из листьев водного растения – телореза.

Протопласты получают следующими методами:

1) механические методы – 0,1% раствором сахарозы добиваются плазмолиза растительных тканей, затем разрезают эпидермис и освобождают протопласты в окружающую питательную среду;

2) биохимические (энзиматические) методы – при этом используют целлюлазы, пектиназы, гемицеллюлазы.

Протопласты используют для регенерации растения или для образования гетерокариотических гибридов. Относительно легко регенерируют из протопластов картофель, люцерна, маниок, рапс, табак.

Первые трансгенные растения были получены в 1983 г. Это – растения табака со встроенными генами из микроорганизмов, устойчивые к вирусной инфекции. Первые успешные полевые испытания этих трансгенных растений были проведены в США в 1986 г. Первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 г. (томаты с замедленным созреванием, гербицидустойчивая соя), а через два года еще и кукуруза, картофель, табак, рапс, кабачки, редис, хлопчатник. В настоящее время в США генетически модифицированные растения составляют около 50 % посевов кукурузы и сои и более 40% посевов хлопчатника.

Первоначально трансгенные растения содержали дополнительные гены устойчивости (к болезням, гербицидам, вредителям, порче при хранении, стрессам). В настоящее время развивается «метаболическая инженерия». При этом ставится задача: научить растение производить новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях.

Вопросы для самоконтроля

1. Что понимают под термином «фитобиотехнология»?
2. Что является объектами фитобиотехнологии?
3. Какие процессы относят к фитобиотехнологическим?
4. Что такое каллус?
5. Что понимают под тотипотентностью растительных клеток?
6. Что такое растения-регенеранты?
7. Охарактеризуйте способ вегетативного размножения растений методом культур тканей.
8. Охарактеризуйте способ поверхностного культивирования клеток растений.

9. Охарактеризуйте закрытую систему культивирования растительных клеток в глубинных

10. условиях.

11. Охарактеризуйте открытую (проточную) систему культивирования растительных клеток в глубинных условиях.

12. Когда было впервые осуществлено крупномасштабное выращивание культур клеток растений?

13. Для каких целей используют суспензионные культуры клеток растений?

14. Какие методы иммобилизации клеток растений известны?

15. Какие преимущества имеют иммобилизованные клетки перед каллусными и суспензионными культурами?

16. Какие типы систем культивирования иммобилизованных клеток известны?

17. В чем заключается принцип криосохранения?

18. Какие операции проводят перед криосохранением культур клеток растений?

19. Каким образом проводят закаливание культур клеток растений на холоду?

20. С какой целью в культуру клеток растений вносят криопротекторы?

21. Какие вещества используют в качестве криопротекторов?

22. Как проводят охлаждение культур клеток растений при криосохранении?

23. Как проводят размораживание ампул с культурами клеток растений после криосохранения?

24. Как проверяют клетки растений на жизнеспособность после длительного хранения?

25. В чем заключается принцип генно-инженерного эксперимента при создании растений с новыми признаками?

26. Каким образом осуществляют объединение геномов клеток разных особей?

27. Что такое протопласты и какими методами их получают?

Тема 4. Регуляторы роста и развития растений в биотехнологии и растениеводстве

Ключевые вопросы темы

1. Понятие о фитогормонах. Их особенности и классификация

2. В чем заключаются особенности фитогормонов

3. Типы взаимодействий фитогормонов растений

4. Фитогормоны в онтогенезе растений

5. Физиологические функции отдельных фитогормонов

6. Фитогормоны и регуляторы роста в условиях *in vitro*

7. Фитогормоны и регуляторы роста в растениеводстве

Ключевые понятия: фитогормоны, стимуляторы, ингибиторы, синергизм, антагонизм, эмбриональный, ювенильный, этап зрелости и размножения, этап

старения и отмирания, ауксины, цитокинины, абсцизовая кислота, гибберелины, brassinosteroids, ретарданты, гидрозит малеиновой кислоты, дефолиация, ускорение созревания плодов, образование корней, стимуляция прорастания семян, регулирование процесса опыления, устойчивость растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Методические рекомендации

При ответе на первый вопрос рассмотрим фитогормоны, представляющие собой природные регуляторы. С помощью фитогормонов осуществляется взаимосвязь организма с окружающей средой, взаимодействие клеток, тканей и органов, запуск физиологических программ на отдельных этапах онтогенеза.

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

При ответе на второй вопрос рассмотрим главные особенности фитогормонов:

- 1) фитогормоны образуются в растениях эндогенно;
- 2) место синтеза фитогормонов удалено от места их функционирования, например, ауксины образуются в апикальных меристемах, а проявляют свое действие в зоне корней. Однако это не означает, что гормоны не проявляют активности в местах синтеза. К примеру, апикальное доминирование под действием ауксинов проявляется именно в точке роста побега. Ряд фитогормонов синтезируется не только растениями, но и микроорганизмами (индолилуксусная кислота, гиббереллины, цитокинины), что свидетельствует о возникновении гормональной системы регуляции на ранних ступенях развития организмов. У растений в отличие от животных нет специализированных органов, ответственных за образование гормонов, однако существует определенная приуроченность к органам растения. В апикальной меристеме стебля присутствуют в высокой концентрации ауксины, в корнях – цитокинины, в листьях – гиббереллины.
- 3) фитогормоны способны к перемещению, т. е. к транспорту по проводящей системе растений, а также по межклеточному пространству;
- 4) фитогормоны проявляют физиологическую активность при очень низких концентрациях (10⁻¹³–10⁻¹⁵ моль/л);
- 5) в действиях фитогормонов проявляется специфичность, то есть определенный фитогормон действует на специфический процесс (этилен вызывает созревание плодов, гибберелловая кислота способствует удлинению стебля и т. д.).

В третьем вопросе обратить внимание на типы взаимодействий фитогормонов в растениях. Фитогормоны выполняют важную роль, обеспечивая связь организма с окружающей средой. Изменение средовых условий приводит к преимущественному синтезу того или иного гормона. Гормон транспортируется к клеткам-мишеням, которые обладают компетентностью, то есть способностью реагировать на определенный гормон. Компетентность клетки связана с тем, что в ней вырабатывается специальный белок-рецептор, способный взаимодействовать с гормоном и образовывать активные гормон-рецепторные комплексы.

Регуляторный эффект на рост и развитие растений достигается двумя путями:

- 1) изменение дозы гормона;
- 2) взаимодействие фитогормонов.

В зависимости от концентрации гормона его действие на один и тот же процесс может изменяться от стимуляции до ингибирования. Кроме того, изменение концентрации может привести и к изменению характера действия гормона и физиологического ответа. Например, в культуре *in vitro* ауксины при оптимальных концентрациях способствуют корнеобразованию, а при высоких – вызывают каллусогенез.

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

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

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

При ответе на четвертый вопрос необходимо рассмотреть действие гормонов на различных этапах онтогенеза. Обычно развитие высших растений подразделяют на четыре этапа:

- 1) эмбриональный – развитие зародыша от образования зиготы до созревания семени;
- 2) ювенильный – этап от прорастания семян до формирования вегетативных органов;

3) этап зрелости и размножения – этап готовности к зацветанию и образованию органов вегетативного размножения, цветения, формирования плодов и семян;

4) этап старости и отмирания – период от полного прекращения плодоношения до естественной смерти организма.

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

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

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

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

В пятом вопросе следует рассмотреть физиологические функции отдельных фитогормонов. В частности:

Ауксины являются важными регуляторами передвижения и распределения ассимилятов и минеральных веществ по растению. Ткани с высоким содержанием ауксинов становятся центрами притяжения питательных веществ и интенсивного метаболизма (аттрагирующий эффект). На этом основано явление апикального доминирования, в результате которого верхушечная почка растет быстрее боковых и подавляет их развитие. При удалении верхушечной почки или изменении гормонального баланса в сторону цитокининов происходит развитие боковых почек. Ауксины задерживают старение тканей и органов.

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

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

Основным свойством *цитокининов* является стимуляция деления клеток в присутствии ауксинов. Цитокинины способствуют увеличению размера растущих листьев и семядолей, играют важную роль в развитии надземной части растений. Цитокинины участвуют в формировании хлоропластов, а также стимулируют синтез хлоропластных РНК и белков. Действие цитокининов на развитие корневой системы растений неоднозначно. При низких концентрациях может происходить стимуляция развития корней, при высоких – угнетение. 33

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

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

В шестом вопросе особую роль играет гормональный статус растения в культуре *in vitro*. Например, гормональный статус исходного растения и отдельных его органов определяет успех регенерации из эксплантов, взятых из растения. Для роста культуры клеток и тканей растений *in vitro* необходимо наличие в составе питательной среды природных или синтетических гормонов. Их концентрация и взаимодействие обуславливают направление и скорость процессов морфогенеза (образование каллуса, корней, побегов и др.). Согласно правилу Скуга-Миллера, образование 34 побегов стимулируется при преобладании в питательной среде цитокининов по отношению к ауксинам, преобладание ауксинов вызывает образование корней. К наиболее часто употребляемым регуляторам относятся ауксины и цитокинины. Могут использоваться гиббереллины и абсцизовая кислота, а также брассиностероиды.

К ауксинам относятся индолил-3-уксусная кислота (ИУК), нафтилуксусная кислота (НУК), индолилмасляная кислота (ИМК), 2,4-дихлорфеноксипуксусная кислота (2,4-Д).

Среди цитокининов используются аденин, кинетин, 6-бензиламинопуридин (6-БАП), зеатин, 2-изопентиладенин (2ип).

Гиббереллины не являются обязательными компонентами питательных сред. Наиболее часто применяют гибберелловую кислоту (ГК₃).

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

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

Брассиностероиды активно участвуют в процессах регенерации растений. К представителям этого класса относятся брассинолид, гомобрассинолид и эпибрассинолид

В седьмом вопросе рассмотреть использование в растениеводческой практике экзогенных регуляторов роста, которые повышают активность метаболических процессов. Регуляторы роста весьма эффективны для полевых, плодовых, ягодных, овощных и декоративных культур. Использование соответствующих регуляторов роста определяется этапом онтогенеза, средовыми условиями и задачами, решаемыми с помощью фиторегуляторов (корнеобразование, выведение семян из состояния покоя, регуляция развития вегетативных и генеративных органов, регуляция плодообразования и созревания, регуляция устойчивости растения, качества продукции и др.).

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

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

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

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

свободной воды в тканях, при этом увеличивается также устойчивость растений к недостатку влаги и заболеваниям, улучшается его водный режим.

Дефолиация растений. Этилен является высокоэффективным дефолиантом мягкого действия. Этилен вызывает опадение листьев без повреждений, а растения при этом хорошо переносят зиму и растут нормально. Применяется для обработки яблони, груши, сливы, смородины, крыжовника, розы, шиповника и др. Гидрел и кампосан применяются для дефолиации хлопчатника. Растения опрыскивают в период, когда на кусте раскрыто около половины коробочек. Препараты не снижают качество волокна и семян.

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

Образование корней у черенков плодовых и ягодных растений индуцируется экзогенными ауксинами. К числу часто употребляемых препаратов относится гетероауксин (содержит ИУК). Высокой эффективностью индукции корнеобразования обладают также ИМК и НУК. Эпибрассинолид (эпин) ускоряет развитие корневой системы у роз и тюльпанов. Хитодекстрин стимулирует корнеобразование у озимой ржи и пшеницы. Эндогенная стимуляция прорастания семян и покоящихся органов связана с действием гиббереллинов, цитокининов, brassinosteroidов.

Для регулирования процесса опыления и оплодотворения в семеноводстве гетерозисных гибридов (пшеница и др.) могут быть использованы гаметоциды (препараты, вызывающие мужскую стерильность). В этих целях применяют этефон, гибберелловую кислоту, ТИБК (2,3,5–трийодбензойная кислота).

Устойчивость растения к абиотическим и биотическим стрессам определяется физиологическим состоянием организма, в том числе его гормональным статусом. Известно, что стрессоустойчивость растения повышается под действием brassinosteroidов, цитокининов и абсцизовой кислоты. К препаратам, повышающим устойчивость растений, относят: гидрогумат – повышает устойчивость к болезням зерновых культур, картофеля, гороха и бобов; гисинар и инкор – повышают засухоустойчивость зерновых; оксигумат – повышает устойчивость зерновых, картофеля, огурцов, томатов к болезням; иммуноцитифит – повышает иммунитет у озимой пшеницы и ярового ячменя; хитодекстрин – у ярового ячменя; эпин – повышает устойчивость к болезням и абиотическим стрессам у картофеля, ячменя, устойчивость к болезням у декоративных растений.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение фитогормонам и регуляторам роста растений.

2. Опишите физиологическое действие фитогормонов (ауксины, гибберелины, цитокинины, brassinosteroids, абсцизовая кислота, этилен).
3. Приведите примеры синергизма и антагонизма фитогормонов.
4. Как гормональный статус изменяется в онтогенезе?
5. Назовите основные направления использования регуляторов роста в растениеводстве.

Тема 5. Клеточная инженерия

Ключевые вопросы темы

1. Сущность и задачи клеточной инженерии. Использование культуры изолированных клеток, тканей и органов в биотехнологии.
2. Культура каллусных тканей.
3. Суспензионные культуры, их получение, культивирование и использование.
4. Культуры одиночных клеток.
5. Изолированные протопласты растений, их получение и культивирование.
6. Регенерация и морфогенез растений в культуре *in vitro*.

Ключевые понятия: клеточная инженерия, штаммы микроорганизмов, вычленение экспланта, регулируемые условия выращивания, каллус, суспензионная культура, метод культуры няньки, метод микрокапель, метод плейтинга, регенерация, соматический эмбриогенез.

Методические рекомендации

При ответе на первый вопрос дать определение что такое инженерия. Клеточная инженерия – это раздел биотехнологии, занимающийся выполнением различных манипуляций с клетками и тканями в культуре *in vitro*.

Основные направления использования достижений клеточной инженерии.

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

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

3. В области защиты растений на основе достижений генетической и клеточной инженерии получены растения, устойчивые к насекомым, вирусам, болезням и другим патогенам; созданы новые средства защиты растений путем

культивирования бактерий и грибов (антагонистов патогенов), биологически активных веществ, полученных при культивировании организмов, и т. д.

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

5. В области защиты окружающей среды. Новые штаммы микроорганизмов позволяют решать экологически безопасным путем проблемы утилизации отходов промышленности и сельского хозяйства, уменьшать действие поллютантов (тяжелые металлы, нефтепродукты, пестициды и др.) на экосистемы и человека.

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

Все манипуляции клеточной инженерии основываются на 3-х основных принципах:

- 1) вычленение экспланта из растительного организма;
- 2) создание регулируемых условий выращивания; а) химические условия; б) физические условия (свет, температура, влажность);
- 3) соблюдение условий стерильности, то есть выполнение всех видов работ в абсолютно стерильных условиях или асептических условиях.

Вычленение экспланта.

Эксплант – это часть растения, помещенная в асептические условия на искусственную питательную среду. В качестве экспланта могут выступать любые части растения (корень, лист, стебель, семена, пыльца и т. д.). В зависимости от цели исследований выбирается объект, то есть культура и подбирается тип экспланта. Вычленение эксплантов производится из здоровых, типичных, соответствующих виду или сорту растений. Желательно растения, предназначенные для вычленения эксплантов, выращивать в культуральном помещении или предварительно за два месяца до предстоящей работы из полевых условий перенести в культуральное помещение. Экспланты от таких растений легче стерилизуются.

Создание регулируемых условий выращивания:

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

- 1) макроэлементы – азот, фосфор, калий, кальций, сера, магний, железо;
- 2) микроэлементы – марганец, молибден, кобальт, цинк, йод, бор, медь;
- 3) витамины – тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота;
- 4) сахароза или глюкоза как источники углеводов необходимы, так как в большинстве случаев экспланты в условиях *in vitro* не способны к автотрофному питанию;
- 5) регуляторы роста (ауксины, цитотоксины, ГК) при использовании следует применять правило Скуга-Миллера;

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

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

б) физические условия:

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

2) освещенность – 4–6 тыс. люкс;

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

4) аэрация – необходимо обеспечить эксплантам постоянный приток кислорода, для этого подбираются оптимальные объемы сосудов для культивирования, причем экспланты должны быть изолированы от окружающей среды, но не лишены доступа кислорода. Для этого используются ватно-марлевые пробки, металлическая фольга, в металлических крышках делается отверстие и вставляется пробочка из синтетического материала (поролон).

Соблюдение условий абсолютной стерильности.

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

При ответе на второй вопрос необходимо дать определение что такое каллусная ткань. Каллусная ткань представляет собой совокупность недифференцированных клеток и является ответной реакцией тканей организма на повреждающее воздействие.

Рост каллусной ткани выражается S-образной кривой (Кривая Сакса). В процессе субкультивирования клетки последовательно проходят следующие фазы:

1) лаг-фаза (латентная-скрытая);

2) логарифмическая фаза (напоказ);

3) фаза замедленного роста;

4) стационарная фаза;

5) фаза деградации.

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

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

1) высокий уровень содержания регуляторов роста в составе питательной среды, причем в большинстве случаев предпочтение следует отдать фитогормонам ауксиновой природы;

2) наличие на эксплантах раневой поверхности;

3) наиболее интенсивно каллусообразование происходит в темноте, при температуре 24–26 °С.

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

При ответе на третий вопрос необходимо дать определение суспензионной культуры. Это культуры одиночных клеток и клеточных агрегатов, растущие в аэрируемой жидкой питательной среде.

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

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

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

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

В четвертом вопросе необходимо акцентировать внимание на культуры одиночных клеток. Отдельная соматическая клетка является хорошей моделью для изучения взаимоотношений между клеткой и окружающей средой, клетками растения-хозяина и различными патогенами и для решения задач клеточной селекции. Источником одиночных клеток могут служить каллус, суспензионная культура, культура протопластов.

Выращивание одиночных клеток включает в себя два этапа:

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

Изолирование одиночных клеток осуществляют следующими методами:

- a) выращивание каллусной массы и разобщение её в суспензию;
- b) использование низкоагрегированной суспензии;
- c) изолирование отдельных клеток непосредственно из тканей целого растения.

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

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

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

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

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

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

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

В пятом вопросе акцентировать внимание для чего используются изолированные протопласты:

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

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

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

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

Техника выделения протопластов, например, из листьев (она аналогична и для других эксплантов):

1) отбираются с растения полностью развернувшиеся листья с черешками;

2) листья подвергаются стерилизации;

3) промываются стерильной дистиллированной водой;

4) удаляется нижний эпидермис и кусочки листьев переносятся в чашки Петри на поверхность среды для промывки протопластов (СПП);

5) из-под листьев пипеткой удаляется среда для промывки протопластов (СПП) и вместо неё вносится раствор фермента;

6) инкубируются кусочки листьев в течение 16 часов в темноте при температуре 27 °С;

7) удаляется раствор фермента, и кусочки листьев отжимаются в питательном растворе, чтобы высвободить протопласты;

8) суспензия протопластов переносится в центрифужные пробирки и центрифугируется в течение 10 мин, после чего протопласты всплывают на поверхность;

9) протопласты переносятся в пробирки с промеренным объёмом среды и подсчитываются. Работать удобнее с объёмом 10 мл. Подсчет протопластов необходим, чтобы контролировать при культивировании их плотность. Это важно для ведения последующих манипуляций с протопластами: слияния, трансформации, регенерации растений.

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

При ответе на шестой вопрос необходимо рассмотреть регенерацию и морфогенез.

Регенерация – (лат. восстановление, возрождение, возобновление) – восстановление организмов, утраченных или поврежденных органов и тканей, а также восстановление целого организма из его части. Восстановление целого растительного организма из отдельной клетки связано с уникальным свойством,

которым обладает любая растительная клетка, – тотипотентностью – это способность растительной клетки нести в себе генетическую информацию целого организма, и в результате процессов регенерации образовывать взрослое растение.

Регенерант – стерильное растение с развитой системой корней и побегов, сформировавшихся в условиях *in vitro*. В настоящее время имеются два основных положения об определяющих факторах морфогенеза (формообразование у растений включает в себя процессы заложения, роста и развития клеток, тканей и органов).

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

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

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

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

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

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

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

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение культуре *in vitro*. На каких принципах она основана?
2. Что такое эксплант? Каковы источники получения эксплантов?
3. Опишите методы стерилизации.
4. Каковы физические условия культивирования клеток и тканей *in vitro*?
5. Назовите компоненты питательных сред для культивирования *in vitro*.
6. Что такое каллус? Назовите особенности каллусных клеток.
7. Как используются каллусные клетки?
8. Дайте определение суспензионных культур. Опишите методы их получения и культивирования.
9. Каковы особенности получения и культивирования протопластов растений. Для каких целей их используют?
10. Дайте определение тотипотентности растительной клетки.
11. Каковы возможные пути морфогенеза растений *in vitro*? Какие факторы определяют эффективность морфогенеза?
12. В чем отличие органогенеза от соматического эмбриогенеза?

Тема 6. Производство кормового белка

Ключевые вопросы темы

1. Нетрадиционные источники кормового белка
2. Сырьевая база для синтеза комового белка
3. Принципиальная технологическая схема выращивания кормовой биомассы

Ключевые понятия: дрожжи, бактерии, водоросли, грибы, парафины нефти, метанол, этанол, растительная биомасса, молочная сыворотка, стадия ферментации, сгущение суспензии микроорганизмов, термообработка суспензии, концентрирование суспензии, сушка, грануляция и сушка, фасовка готового продукта.

Методические рекомендации

При ответе на первый вопрос рассмотреть преимущества производства биомассы с помощью микробного синтеза (перед другими источниками белка):

- 1) высокая скорость накопления биомассы, которая в 500 - 5000 раз выше, чем у растений или животных;

2) микробные клетки накапливают большое количество белка (дрожжи – до 60 %, бактерии – до 75 % по массе);

3) в производстве микробного белка отсутствует многостадийность;

4) процесс биосинтеза протекает в мягких условиях при температуре 30–45 °С, рН 3–6 и давлении $\approx 0,1$ МПа;

5) процесс менее трудоемок по сравнению с получением сельскохозяйственной продукции и органическим синтезом белков.

Дрожжи. Их легко выращивать в производственных условиях; они быстро растут и размножаются практически на любых субстратах; устойчивы к контаминантной микрофлоре; содержат белка больше, чем зерно злаковых культур, несколько уступая лишь по аминокислотному составу протеину молока и рыбной муки; богаты витаминами (тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, пиридоксин, фолиевая кислота, а также холин, инозит и др.); содержат микроэлементы и значительное количество жира, в котором преобладают ненасыщенные жирные кислоты. Так, 1 кг кормовых дрожжей содержит 1,03–1,16 кормовых единиц. К недостаткам дрожжей относят толстую клеточную стенку и большое количество нуклеиновых кислот.

Бактерии. Для них характерна высокая скорость роста; содержание белка в биомассе составляет 70–80 % при значительном количестве метионина; они легко поддаются селекции, что позволяет получать высокопродуктивные штаммы. Их недостатками являются трудная осаждаемость, вследствие малых размеров клеток; значительная чувствительность к инфекциям, особенно фаговым; высокое содержание в биомассе нуклеиновых кислот.

Водоросли. Микроскопические водоросли как фототрофы для образования своей биомассы используют только углекислый газ атмосферы. Так, с 0,1 га поверхности прудов можно получить столько же белка, сколько с 14 га посевов фасоли. В настоящее время особое внимание привлекает сине-зеленая водоросль спирулина (*Spirulina platensis* и *Spirulina maxima*). Биомасса ее соответствует лучшим стандартам пищевого белка, в ней достаточно витаминов А, D, а также группы В. В качестве кормовых добавок применяют также препарат спирустим, изготавливаемый из одноклеточных сине-зеленых водорослей *Spirulina platensis*, хлореллу. Новой добавкой к рациону является гипергалинная аквакультура (ГАК) Сиваша, которая включает микроводоросли, продукты их переработки, а также цисты, яйца, личинки, куколки и взрослые формы гидробионтов и галофильных насекомых, которые обитают в акватории высокой солености.

Грибы. Важным источником высококачественного белка могут быть как низшие, так и высшие грибы. Высокая питательная ценность плодовых тел высших грибов известна давно. Однако их валовой сбор в природных условиях, естественно, не может удовлетворить все возрастающие потребности в белке. Поэтому были сделаны попытки культивирования в промышленных условиях мицелия макромицетов. Благодаря микромицетам крахмалсодержащая пища обогащается белком и становится подобной мясным продуктам. Однако, по сравнению с эталонным белком, белки грибов лимитированы по сумме аминокислот, содержащих серу (цистеин и метионин). Вместе с тем они богаты лизином – основной аминокислотой, недостающей в белке зерновых культур.

Это позволяет на основе зерна и грибной биомассы составлять сбалансированные кормовые смеси.

Во втором вопросе рассматриваются сырьевые источники для синтеза микробного белка.

В качестве субстрата используются:

Парафины нефти (н-парафины). Высокий выход биомассы (до 100 % от массы субстрата) обеспечивается большим содержанием углерода, а качество продукта – степенью чистоты парафинов. Если парафины очищены недостаточно, то дрожжевая биомасса содержит неметаболизируемые компоненты: производные бензола, D-аминокислоты, липиды с нечетным числом углеродных атомов в жирных кислотах, токсины белковой природы. Поэтому парафины нефти должны быть тщательно очищены. Дрожжи, выращенные на н-парафинах, используются в количестве 8–15 % от общего белка рациона для откорма крупного рогатого скота, свиней, овец и бройлеров.

Метанол. Его получают методом микробного синтеза из древесины, соломы, городских отходов. Сложность использования метанола заключается в том, что молекула его содержит только один атом углерода, тогда как синтез большинства органических соединений осуществляется через двухуглеродные молекулы. Соединения же с нечетным числом атомов углерода, как правило, небезразличны для организма. В качестве продуцента используются бактерии рода *Methylomonas*. Метанол усваивают бактерии, дрожжи, грибы, актиномицеты. Получение белка на метаноле более экономично, чем при использовании н-парафинов. Например, продукт «Прутин» (Англия), содержащий 72 % сырого протеина, используется как высокобелковая добавка к комбикормам в рационах свиней, птицы, пушных зверей и в качестве заменителя молока для телят.

Этанол. Использование этанола как субстрата для микробного синтеза белка снимает проблему очистки биомассы от аномальных продуктов обмена с нечетным числом углеродных атомов. Стоимость производства этанола несколько выше, чем метанола. Разработаны технологические процессы получения белка на природном газе с использованием бактерий *Methylomonas*, усваивающих метан, *Hydrogenomonas* и *Pseudomonas*, утилизирующих метанол и др.

Растительная биомасса. Содержит большое количество сахаров (целлюлоза, состоящая из остатков молекулы глюкозы; гемицеллюлозы, состоящие из остатков арабинозы, галактозы, маннозы, фруктозы, ксилозы). На жидкой, содержащей сахара фракции гидролизата, выращивают дрожжи. Для получения кормовых дрожжей используется также послеспиртовая барда, подсолнечная лузга, хлопковая шелуха, отходы производства лубяных волокон (костер льна и конопли), свекловичный жом, отходы картофелекрахмального производства, пивоваренной, плодоовощной, консервной промышленности и др. В качестве сырья для гидролизной промышленности используется солома злаковых культур, которая обычно протеинизируется, например, дрожжеванием, или усвояемость соломы повышается действием ферментных препаратов (пектофетицина ГЗх в комплексе с целловиридином ГЗх или глюкавамоорином Пх). Используются способы прямой биоконверсии растительной биомассы с

помощью высших и низших грибов. С этой целью используются целлюлозоразрушающие грибы *Chaetomium cellulolyticum*, а также *Aspergillus niger*, *Trichoderma* и др.

Молочная сыворотка. Ежегодно в мире образуется около 200 млн. т молочной сыворотки. Каждая тонна сыворотки содержит 50 кг молочного сахара, до 10 кг высокоценного белка, 1,5 кг жира, а также витамины, микроэлементы и др. Использование сыворотки малоэффективно как для производства кормов, так и для скармливания животных. Это связано с тем, что степень утилизации молочной сыворотки снижается по мере увеличения ее доли в рационе. Кроме того, при этом возникают расстройства пищеварения, а конверсия белка сыворотки в белок тела животного весьма незначительна. Это касается и сухой сыворотки, так как организм животного усваивает только 20 % ее количества из-за неблагоприятного соотношения углеводов, белков и минеральных солей. В этом отношении более рациональным является производство молочно-белковых концентратов. При этом на основе белков сыворотки изготавливают заменители сухого обезжиренного молока, кормовые добавки и др.

Лактоза может быть источником энергии для многих видов микроорганизмов, сырьем для микробного производства белковой биомассы. Для ее получения чаще всего используют дрожжи. Установлено, что коэффициент конверсии белка сыворотки в микробный белок у дрожжей в 20 раз выше, чем степень преобразования его в животный белок. Кроме того, большинство видов дрожжей обогащает сыворотку витаминами. В качестве продуцентов применяют различные штаммы родов *Saccharomyces*, *Kluveromyces fragilis*, *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*.

При ответе на третий вопрос необходимо расписать технологический процесс.

Чистую культуру в log-стадии переносят в малый посевной аппарат (500 л) с питательной средой, рН которой доводится аммиачной водой или известковым молоком до 5,5–5,8. Сначала в аппарат подают около 40 л среды, разбавляют её в 4–4,5 раза стерильной водой и при интенсивной аэрации добавляют остальное количество питательной среды (80–100 л), рН среды – 4,5–5,5. Из качалочных колб вносят микробную суспензию объемом 1,5–2 л и производят культивирование до накопления в среде 3,5–4,0 г клеток/л по абсолютно сухому веществ (АСВ). Обычно для этого требуется 15–18 ч.

Суспензия из малого посевного аппарата подается в аппарат объемом 4–5 м³, предварительно заполненный питательной средой (≈ 200 л) и стерильной водой (1,2–1,5 м³), включается аэрация и при постоянном доливе (70–75 л/ч) питательной 39 среды и добавления аммиачной воды для поддержания заданного рН проводится культивирование 10–12 ч.

Выращивание засевной культуры проводится в ферментаторе объемом 15–20 м³. Аппарат на 10 % по объему заполняется стерильной или кипяченой водой, туда же вводится около 0,5 м³ питательной среды и полностью перекачивается все содержимое предыдущего аппарата (2,5–2,7 м³). Выращивание посевного материала без отбора суспензии продолжается 8–9 ч

при интенсивной аэрации и постоянном доливе питательной среды (170–200 л/ч) до накопления в ферментере биомассы в количестве 4–5 г АСВ/л. После этого засевную культуру начинают отбирать на основное производство в количестве 1,3–1,7 м³ /ч при одновременном доливе питательной среды.

Процесс ферментации длится от 5 до 10 сут, а затем цикл приготовления посевного материала возобновляется. К подготовительным стадиям производства относится приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, необходимых для нормального развития микроорганизмов. Этот участок имеет свою технологическую схему. Минеральные компоненты группируют в два раствора, которые параллельно подаются в основной ферментатор: раствор всех микроэлементов (N, P, K), необходимое количество которых составляет 5–70 г/л; раствор микроэлементов (Mg, Mn, Fe, Zn и др.), концентрации которых не превышают 5–10 мг/л.

Технологические потоки из всех подготовительных отделений (компримирование воздуха, хранение и подготовка сырья, получение засевной культуры, приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, технологическая вода, аммиачная вода, стерильная культуральная жидкость) поступают на главную стадию производства – стадию ферментации. Основным аппаратом в этом отделении является ферментатор – аппарат полного смешения по жидкой фазе, обеспечивающий рост и развитие популяций микроорганизмов в объеме жидкой фазы; транспорт питательных веществ к клеткам микроорганизмов; отвод от микробных клеток продуктов их обмена; отвод из среды тепла.

Затем следуют другие этапы технологической схемы получения кормовой биомассы:

- Сгущение суспензии микроорганизмов. При этом концентрация биомассы повышается до 12–16 % АСВ. Для этого используют сепараторы, а также флокуляцию, коагуляцию, флотацию или декантацию.

- Термообработка суспензии. При нагревании микроорганизмов до температуры 75–85 °С в течение 10–40 мин происходит гибель штамма-продуцента и практически всей сопутствующей микрофлоры.

- Концентрирование суспензии. Проводят в отделении выпаривания до концентрации 23–25 % АСВ. Для этого используется трехкорпусная вакуум-выпарная установка: I корпус – 90, II – 75 и III – 60 °С.

- Сушка. В этом отделении происходит образование готового продукта с влажностью ≈ 10 % (по массе). Для этого используются конвективные сушилки (распылительные, кипящего слоя, ленточные и барабанные).

- Грануляция и сушка. Обычно сухая биомасса, содержащая 8–10 % (по массе) влаги представляет собой готовый продукт и после упаковки направляется на склад к потребителю. Если продукт необходимо получить в виде гранул, то сухая и влажная (после выпарки) биомасса в соотношении 1:1 поступает в гранулятор. При этом влажная биомасса налипает на сухие частицы и вся масса влажностью 45–50 % движется в аппарате, формируя гранулы, которые затем подаются в сушилку кипящего слоя. Гранулы подсушиваются до

остаточной влажности 8–10 % (по массе) горячим воздухом 40 или топочными газами с температурой 260–300 °С.

– Фасовка и упаковка готового продукта. Сухая биомасса поступает в приемный бункер и фасуется в бумажные мешки с клапаном массой 25–30 кг. Эти мешки укладываются на специальные поддоны, которые отвозят их на склад или отгружают потребителю.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы последствия недостатка или полного отсутствия белка в рационе животного?

2. Перечислите преимущества производства биомассы с помощью микробного синтеза.

3. Дрожжи и бактерии как нетрадиционные источники белка, их преимущества и недостатки.

4. Какие водоросли можно использовать в качестве кормовых добавок?

5. Грибы как перспективный источник кормового белка.

6. Перечислите сырьевые источники для синтеза микробного белка.

7. Парафины нефти как сырье для синтеза микробного белка.

8. Спирты как субстрат для микробного синтеза белка.

9. Использование растительной биомассы для культивирования продуцентов белка.

10. Молочная сыворотка как сырье для производства белковой биомассы.

11. Технология выращивания засевной культуры для получения кормовой биомассы.

12. Охарактеризуйте главную стадию (стадию ферментации) и последующие этапы технологической схемы производства кормовой биомассы.

2 МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ КОНТРОЛЬНОЙ РАБОТЫ

Важным видом учебной работы в процессе изучения дисциплины «Основы биотехнологии» при реализации заочной формы обучения, является выполнение студентами контрольных работ.

Контрольная работа содержит следующие структурные элементы:

- титульный лист (приложение А);
- содержание;
- введение (если предусматривается содержанием работы);
- основную часть (вопросы);
- заключение/выводы (если предусматривается содержанием работы);
- список использованных источников.

Контрольная работа должна быть выполнена с использованием компьютера и принтера на одной стороне листа белой односортной бумаги. Текст работы следует печатать, соблюдая следующие размеры полей: левое – 30, правое – 15, верхнее и нижнее – по 20 мм. В качестве основного используется шрифт Times New Roman размером 12 pt и полуторным интервалом между строками. Обязательно выравнивание текста по ширине. Абзацный отступ – 1,25 см.

Вариант контрольных вопросов определяется по таблице самостоятельно в соответствии с шифром: *по горизонтали* берется последняя, а *по вертикали* – предпоследняя цифры шифра (приложение Б).

Защита контрольной работы осуществляется во время сессии (по графику) в устной форме.

Тема 1. Биотехнология как наука, связь биотехнологии с производством. Регуляторы роста и развития растений в биотехнологии

Биотехнологические и биоинженерные методы применяются во многих отраслях науки и экономики. Их использование может оказать существенное влияние на развитие агропромышленного комплекса. С учетом реальных достижений и значимости приоритетных научных направлений ведущие биотехнологи мира прогнозируют увеличение масштабов реализации биотехнологической продукции на мировом рынке в ближайшие годы на 20–25 % от общего объема товарооборота.

Одним из важных направлений биотехнологии является использование регуляторов роста и развития растений, которые широко применяются как для воздействия на процессы морфогенеза растений в культуре *in vitro*, так и для регуляции формирования урожая растений в полевых условиях. Регуляторы роста и развития растений – обширная группа природных и синтетических органических соединений, которые в малых дозах активно влияют на обмен веществ высших растений, что приводит к значительным изменениям в их росте и развитии. К природным регуляторам относятся фитогормоны – соединения, образующиеся в малых количествах в одной части растения,

транспортирующиеся в другую его часть и вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект. С помощью фитогормонов осуществляется взаимосвязь организма с окружающей средой, взаимодействие клеток, тканей и органов, запуск физиологических программ на отдельных этапах онтогенеза.

Вопросы для выполнения контрольной работы

1. Основные направления и задачи биотехнологии.
2. Биотехнология в промышленности.
3. Биотехнология в сельском хозяйстве.
4. Экологическая биотехнология.
5. Фитогормоны как основная регуляторная система растений.

Классификация фитогормонов.

6. Особенности метаболизма, транспорта и физиологическое действие ауксинов.

7. Особенности метаболизма, транспорта и физиологическое действие цитокининов.

8. Особенности метаболизма, транспорта и физиологическое действие гиббереллинов.

9. Особенности метаболизма, транспорта и физиологическое действие brassinosteroidов.

10. Особенности метаболизма, транспорта и физиологическое действие ингибиторов роста.

11. Молекулярный механизм действия фитогормонов.

12. Взаимодействие фитогормонов. Фитогормоны в онтогенезе растений.

13. Применение фитогормонов в сельскохозяйственной практике.

Тема 2. Клеточная инженерия

Клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению *in vitro*, их тотипотентности и регенерации. Метод культивирования изолированных тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) используют в биотехнологии для сохранения и размножения ценных генотипов, эмбриогенеза, оздоровления посадочного материала и т. д.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в трех направлениях. Первое связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей вещества вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др.

Второе направление – это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала.

Третье направление – использование изолированных клеток в селекции растений, дающее возможность получать быстрорастущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды: засуха, засоление, низкие и высокие температуры, фитопатогены, тяжелые металлы и др. Это направление предусматривает создание новых растений путем слияния изолированных

протопластов и получения неполовых (соматических) гибридов. Культивирование изолированных пыльников и семяпочек на искусственных питательных средах дает возможность получать гаплоиды, культивирование зародышей позволяет получать растения из невсхожих (с плохо развитым эндоспермом) гибридных семян. Оплодотворение в пробирке позволяет преодолеть нескрещиваемость некоторых видов растений.

Успех в применении культуры клеток и тканей в первую очередь зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и регенерацию растений из отдельных клеток.

Вопросы для выполнения контрольной работы

14. Условия культивирования клеток и тканей на искусственных питательных средах.

15. Методы стерилизации при работе с культурой *in vitro*.

16. Основные принципы составления искусственных питательных сред для тканевых и клеточных культур.

17. Культура каллусных тканей, получение, культивирование и использование.

18. Регенерация растений в культуре *in vitro*.

19. Суспензионные культуры, их получение, культивирование и использование.

20. Культура изолированных клеток и протопластов.

21. Соматическая гибридизация.

22. Культура изолированных зародышей (эмбриокультура).

23. Гаплоидия в селекции растений.

24. Клеточная селекция.

25. Криосохранение и создание банков клеток и тканей.

Тема 3. Клональное микроразмножение растений

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – клонального микроразмножения. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, т.е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму. Область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию постоянно расширяться. Это в первую очередь относится к размножению *in vitro* картофеля, плодовых, ягодных, декоративных, лесных растений.

Вопросы для выполнения контрольной работы

26. Клональное микроразмножение растений методом *in vitro* и его основные цели.

27. Классификация методов клонального микроразмножения.

28. Этапы клонального микроразмножения.

29. Методы оздоровления посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции.

30. Технология производства оздоровленного посадочного материала картофеля.

31. Технология производства оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и декоративных культур.

32. Преимущества и недостатки клонального микроразмножения растений.

33. Масштабы и перспективы использования клонального микроразмножения в сельском хозяйстве.

Тема 4. Основы генетической инженерии

Генетическая инженерия изучает проблемы направленного конструирования живых существ с заданными наследственными признаками и свойствами. Основными составляющими методологии генетической инженерии являются: конструирование и клонирование рекомбинантных ДНК, создание трансгенных организмов и их молекулярно-генетический анализ. Главной задачей генетической инженерии растений является создание генетически измененных растений, представляющих ценность для селекционной работы, растений – источников биомассы и источников важнейших фармацевтических веществ и ферментов, растений, способных очищать почву от техногенных загрязнений.

Вопросы для выполнения контрольной работы

34. Сущность и задачи генетической инженерии.

35. Ферменты генетической инженерии.

36. Методы выделения и клонирования генов.

37. Векторы для генетической инженерии.

38. Методы прямого переноса генов.

39. Роль генетической инженерии в селекции растений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биотехнология в растениеводстве: курс лекций / Т. В. Никонович, А. Н. Иванистов, В. В. Французёнок. – Горки: БГСХА, 2017. – 84 с.
2. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Т. А. Костенко, В. К. Костенко; под ред. П. А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь», 2008. – 296 с.
3. Блинов, В. А. Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: ОГУП «РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.
4. Блинов, В. А. Общая биотехнология: Курс лекций: в 2-х ч. – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – Ч. 2. – 144 с.
5. Блинов, В. А. Пробиотики в пищевой промышленности и сельском хозяйстве / В. А. Блинов, С. В. Ковалева, С. Н. Буршина. – Саратов: ИЦ «Наука», 2011. – 171 с.
6. Блинов, В. А. ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В. А. Блинов. – Саратов, 2003. – 205 с.
7. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак: пер. с англ. – Москва: Мир, 2002. – 589 с.
8. Елинов, Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. – Санкт-Петербург: Наука, 1995. – 600 с.
9. Клунова, С. М. Биотехнология: учебник / С. М. Клунова, Т. А. Егорова, Е. А. Живухина. – Москва: Академия, 2010. – 256 с.
10. Мотовилов, К. Я. Экспертиза кормов и кормовых добавок: учебно-справочное пособие / К. Я. Мотовилов, А. П. Булато, В. М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 336 с.
11. Никульников, В. С. Биотехнология в животноводстве: учеб. пособие / В. С. Никульников, В. К. Кретинин. – Москва: Колос, 2007. – 544 с.
12. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]. – Москва: Высшая школа, 2003. – 427 с.
13. Биотехнология. Теория и практика [Электронный ресурс] Биотехнология – Режим доступа: <http://www.biotechlink.org>

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Образец оформления титульного листа контрольной работы

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»
(ФГБОУ ВО «КГТУ»)

Институт агроинженерии и пищевых систем

Кафедра агрономии и агроэкологии

Контрольная работа защищена
Преподаватель ученая степень, звание

_____ И.О.Фамилия
(подпись, дата)

КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА

по дисциплине
«Название дисциплины»
Кр333АГ/бХУУ

Контрольную работу выполнил:
студент группы ZZ-3АГ/б
(зачетная книжка №ZZ-3АГ-0000)

_____ И.О. Фамилия
(подпись, дата)

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ А
ПОЯСНЕНИЯ

Обозначения в шифре КР 33ЗАГ/бХУУ:

Кр – контрольная работа.

33 – номер кафедры агрономии и агроэкологии.

ЗАГ – сокращенное название заочной формы обучения и направления подготовки «Агрономия»

б – уровень подготовки (бакалавриат).

Х – последняя цифра года, когда выполнена работа (например, 2022 год, будет цифра 2),

УУ – номер варианта контрольной работы.

Обозначения в «Контрольную работу выполнил»:

ZZ – шифр группы (например, 19-АГ, 19-ЗАГ).

0000 – номер зачетной книжки.

Варианты контрольных вопросов

Предпоследняя цифра шифра	Последняя цифра шифра									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	6, 20, 26, 34	1, 13, 33, 39	11, 25, 31, 35	2, 21, 30, 38	10, 17, 33, 36	12, 19, 27, 37	3, 14, 29, 34	2, 13, 26, 34	7, 14, 33, 39	11, 24, 27, 35
1	4, 18, 29, 37	8, 15, 27, 36	5, 18, 32, 34	7, 16, 26, 37	9, 23, 28, 38	2, 24, 26, 35	10, 21, 31, 39	3, 17, 32, 36	12, 20, 28, 38	1, 22, 31, 37
2	3, 17, 31, 35	11, 19, 26, 34	6, 20, 28, 36	3, 13, 29, 39	1, 19, 27, 34	5, 14, 30, 37	9, 15, 29, 38	8, 16, 29, 35	10, 21, 26, 37	6, 15, 30, 39
3	4, 25, 28, 39	8, 17, 32, 37	2, 15, 30, 38	4, 21, 33, 36	12, 16, 30, 35	11, 23, 28, 34	6, 17, 26, 36	7, 18, 33, 39	5, 23, 31, 38	9, 13, 27, 37
4	11, 13, 27, 38	12, 21, 31, 35	3, 22, 28, 34	1, 14, 29, 39	8, 18, 27, 37	7, 20, 31, 38	2, 21, 27, 39	10, 16, 30, 36	8, 19, 32, 39	4, 17, 26, 38
5	10, 16, 32, 36	9, 25, 29, 39	4, 24, 32, 38	5, 17, 30, 35	6, 19, 29, 36	1, 22, 26, 34	8, 16, 32, 37	3, 20, 27, 36	6, 23, 29, 35	11, 21, 31, 34
6	5, 15, 33, 34	9, 22, 26, 36	11, 24, 28, 37	7, 16, 32, 39	3, 18, 27, 37	6, 20, 29, 35	12, 23, 26, 36	4, 14, 30, 38	2, 18, 31, 39	1, 17, 27, 35
7	8, 13, 28, 35	10, 23, 30, 39	6, 14, 32, 36	5, 20, 33, 37	1, 22, 27, 38	2, 15, 29, 39	3, 21, 32, 38	5, 16, 26, 36	8, 18, 28, 35	10, 24, 30, 34
8	12, 18, 30, 38	1, 21, 26, 37	9, 20, 31, 39	7, 14, 28, 36	8, 17, 32, 34	10, 15, 27, 35	2, 19, 33, 37	9, 23, 26, 38	4, 14, 30, 39	3, 13, 29, 38
9	2, 17, 29, 36	8, 18, 27, 34	6, 15, 30, 38	5, 22, 3, 36	12, 24, 26, 29	3, 14, 31, 37	11, 19, 28, 35	7, 17, 32, 36	1, 21, 29, 34	5, 13, 30, 37

Локальный электронный методический материал

Ольга Михайловна Бедарева

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Редактор Е. Билко

Уч.-изд. л. 3,3. Печ. л. 2,9

Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»,
236022, Калининград, Советский проспект, 1