

Центральноукраїнський національний технічний університет
Кафедра загального землеробства

БІОТЕХНОЛОГІЯ В РОСЛИННИЦТВІ

**Методичні рекомендації до проведення лабораторних робіт
для здобувачів вищої освіти освітньої програми «Агрономія»
спеціальності 201 «Агрономія»**

Затверджено
на засіданні кафедри
загального землеробства
Протокол № 2 від 30.08.2022 року

Кропивницький – 2022

Методичні рекомендації до проведення лабораторних робіт з біотехнології в рослинництві для здобувачів вищої освіти освітньої програми «Агрономія» спеціальності 201 «Агрономія» / [уклад. Т. П. Шепілова., В. П. Резніченко]. - Кропивницький : ЦНТУ, 2022. 64 с.

Укладач: Т. П. Шепілова кандидат сільськогосподарських наук, доцент, В. П. Резніченко кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Рецензент: Г. А. Кулик, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Методичні рекомендації призначені для здобувачів вищої освіти освітньої програми «Агрономія» спеціальності 201 «Агрономія» денної та заочної форми навчання. Спрямовані на розвиток практичних навичок і знань з біотехнології в рослинництві.

Методичні рекомендації будуть використані, як для аудиторної роботи під керівництвом викладача, так і для самостійної роботи здобувачів.

Зміст

	стор
Вступ	4
Лабораторна робота № 1	6
Використання традиційних біотехнологій та поєднання їх з новими	
Лабораторна робота № 2	9
Знезараження рослинного матеріалу, лабораторного обладнання та поживних середовищ	
Лабораторна робота № 3	16
Дослідження клітинного матеріалу рослин та вивчення методів їх трансформації	
Лабораторна робота № 4	21
Лабораторне приготування і використання поживних середовищ	
Лабораторна робота № 5	29
Технології вирощування рослинного матеріалу <i>in vitro</i>	
Лабораторна робота № 6	35
Методики виділення та очищення біотехнологічної продукції	
Лабораторна робота № 7	40
Вивчення технології отримання біогазу	
Лабораторна робота № 8	49
Застосування біотехнологій в системі захисту рослин	
Лабораторна робота № 9	55
Використання біотехнологій для покращення якості кормів та їх засвоюваності	
Список літератури	60
Словник термінів	61

Вступ

Біотехнологія для постіндустріального суспільства, на порозі якого ми стоїмо, має особливе значення та визнана ООН технологією 21 століття.

Біотехнологія – це промислове використання біологічних процесів та агентів на основі одержання різних форм мікроорганізмів (МО), культур клітин і тканин рослин та тварин із заданими властивостями, тобто застосування мікробних, тваринних або рослинних клітин чи ферментів для виробництва, розщеплення або перетворення матеріалів. Втім, ні це, ні інші компактні визначення не можуть охопити суть біотехнології, т. я. остання містить цілий комплекс нових методів роботи з живими організмами (насамперед одноклітинними), нові ділянки застосування результатів цієї роботи, а також нові філософсько-методологічні підходи до живого. Біотехнологія сприяє охороні біосу, подоланню енергетичної кризи та реалізації інших пунктів біополітики.

МО, як один з найважливіших об'єктів біотехнології, беруть участь в кругообігу молекул в органічному світі, являються найпотужнішим виробником і являються джерелом багатьох цінних речовин. Завдяки виключно малим розмірам вони мають високе відношення поверхні до об'єму і підвищену швидкість дифузії поживних речовин в клітину, що забезпечує високу інтенсивність мікробного метаболізму. З існуючих більш ніж 1 млн. МО людина використовує всього кількесот, - загалом це 4 види МО: дріжджі, бактерії, мікроміцети і актиноміцети.

Перелік традиційного використання біопроцесів сьогодні розширюється новаторськими методами:

- культивування рослинних або тваринних клітин поза відповідними організмами – на живильних середовищах, так як традиційно вирощують бактерії, що необхідні для масового виробництва цінних продуктів. З культивованих рослинних клітин можна одержати цілі рослини, ідентичні за спадковими ознаками (клони);

- промислове виробництво біологічних продуктів у великих масштабах та мізерних кількостях (відповідно бактеріальні кормові препарати та ліки); ро-

зробка біотехнологічних індустріальних апаратів (ферментерів, біореакторів) і виробничих процесів;

- біодеградація пестицидів за допомогою особливих штамів МО;
- використання антиовіпозитантів;
- генетичної інженерії – доцільної зміни генів організму шляхом маніпуляцій із його ДНК та ін.

Методи біотехнології застосовуються в сільському господарстві (біотехнологічні засоби захисту рослин, що заміняють пестициди; вирощування стійких до патогенів або вільних від них рослин; створення нових порід тварин методами генетичної інженерії; мікробна біомаса та інші кормові добавки для тварин; нові засоби профілактики і лікування хвороб сільськогосподарських тварин), медицині, фармакології, харчовій промисловості, енергетиці, гірничодобувній промисловості, охороні природи, військовій галузі (біологічна зброя та ін.).

Даний курс є водночас ознайомлювальним і фундаментальним, оскільки, як було сказано, нині важко знайти галузь, де б не використовувалась біотехнологія. Розглянуто біотехнологічні процеси, які є найбільш використовувані в сільському господарстві та актуальні сьогодні. Виконання лабораторних робіт розраховано на використання знань з ботаніки, мікробіології, ґрунтознавства, генетики та основ селекції, ґрунтознавства, первинної переробки сільськогосподарської продукції, а також на самостійну роботу з літературою.

Лабораторна робота № 1

Тема: Використання традиційних біотехнологій та поєднання їх з новими

Мета: Ознайомитись із традиційними технологіями біопроеесів та вивчити основи сучасних біотехнологій

Хід роботи:

1) Окреслити традиційні біотехнологічні процеси, що використовуються в сучасній промисловості та господарстві; знайти аналогію між ними.

2) Записати відомі на побутовому рівні біопроееси.

3) Виконати заквашування овочів або фруктів для спостереження за результатами роботи мікроорганізмів, використовуючи сіль як консервант і цукор як поживне середовище.

4) Проаналізувати суть давніх і простих біотехнологій та дати пропозиції їх вдосконалення.

5) Визначити найвагомші сучасні біотехнології, що виникли на основі побутового використання біологічних агентів.

Терміни “нова біотехнологія” і “традиційна біотехнологія” розділяють біопроееси, що використовують методи генної інженерії, нову біопроеесорну техніку від більш простих форм біопроеесів, які відомі вже багато десятиліть і століть. Нова і традиційна біотехнологія нині в деяких випадках нині вдало поєднуються.

Традиційні біотехнології наступні:

- квашення (капуста, помідори, яблука і т.д.)
- виноробство (виноград, ягоди)
- хлібопекарське виробництво (хлібобулочні вироби)
- технологія кисломолочних продуктів
- пивоваріння
- виробництво спирту
- силосування

Давня технологія силосування, або квашення – це спосіб консервування зелених кормів, при якому рослинна маса зберігається у вологому стані в спеціальних спорудах. Спресований та ізольований від доступу кисню корм піддається бродінню, внаслідок чого він набуває характерного запаху, кислого смаку, видозмінюється, але не втрачає соковитості і поживної цінності. Відомі 2 способи силосування: холодний спосіб – названий так тому, що під час дозрівання силосу у ньому протікає помірне підвищення температури, до 25- 30°C, не вище 40°C, - всю масу одразу спресовують, утрамбовують у кормосховищах і ізолюють від повітря. При гарячому способі силосування силосний бункер заповнюють поступово. Зелену масу вкладають пухким шаром у 1-1,5 м, і вона повинна лежати 1-2 дні. При великій кількості повітря мікробіологічні та ферментативні процеси протікають енергійно, при цьому температура корму піднімається до 45-50°C. Потім додають другий шар, який також розігрівається, і так далі до заповнення кормосховища. Під вагою верхніх шарів відбувається видалення повітря із нижніх, і швидкість аеробних процесів у них знижується. Верхній шар трамбується і закривається від доступу повітря.

При силосуванні у кормі накопичуються кислоти, які утворюються в процесі бродіння цукристих речовин. Головну роль при цьому грають молочно-кислі бактерії, які зброджують моно- та дисахариди до молочної та, у меншій мірі, оцтової кислот, які мають приємний смак і запобігають розвитку гнильної мікрофлори, яка не може розвиватись при $\text{pH} < 4,5-4,7$. Плісняві гриби, що переносять високу кислотність, є строгими аеробами і в добре закритому кормі розвиватись не можуть. Таким чином, герметизація та кислотність силосу є найголовнішими факторами, які визначають його стійкість при зберіганні. Для нормального силосування різних кормів потрібна різна ступінь підкислення у зв'язку з буферними властивостями клітинного соку, який нейтралізує більшість іонів водню H^+ .

Тому pH не змінюється, поки не буде використаний весь буфер. Буферну роль грають деякі мінеральні солі і білки, що входять до складу рослинного соку. Відомо, що деякі рослини не силосуються зовсім, інші силосуються важко,

такі як кукурудза та соняшник добре піддаються заквашуванню. До вказаних культур можна в невеликих кількостях додавати важко- і несилосуємі культури та отримувати силос задовільної якості. Слід запобігати перекисленню силосу, так як в цьому випадку він не поїдається тваринами.

При квашенні продуктів харчування промислового масштабу та в побуті теж використовується молочно-кисле бродіння, і так само для збереження продукту від плісняви слід запобігати потраплянню повітря в ємності.

Поєднуючи традиційну біотехнологію отримання спирту за допомогою дріжджів з використанням дріжджів, вдосконалених методом генетичної інженерії, отримують більший вихід спирту.

Контрольні запитання:

1. Що покладено в основу традиційних біотехнологій?
2. Поясніть принцип силосування.
3. Наведіть власний приклад поєднання традиційних біотехнологій з новими.

Лабораторна робота № 2

Тема: Знезараження рослинного матеріалу, лабораторного обладнання та поживних середовищ

Мета: Ознайомлення з сучасними методами знезараження

Хід роботи:

- 1) З'ясувати необхідність стерильних умов при роботі з рослинним матеріалом.
- 2) Розглянути способи стерилізації клітин і компонентів та певних середовищ, правила асептики і антисептики.
- 3) Вивчити стаціонарне обладнання для роботи із стерильним клітинним матеріалом, зробити схематичне креслення.

Будь-яке поживне середовище для вирощування рослинних тканин чи клітин є цілком придатним для росту бактерій чи грибової мікрофлори, яка вичерпує середовище, забруднюючи його кінцевими метаболітами і отруює власними біологічно активними речовинами. Врешті рослинні клітини в такому середовищі гинуть. Це особливо небезпечно тому, що швидкість росту мікробних культур в кілька разів вище, ніж клітин вищих організмів. В деяких випадках забруднюючі бактерії і грибки можуть використовувати для власного росту не лише поживне середовище, а й культивовані клітини.

Метою вирощування часто буває противірусне оздоровлення сільськогосподарських культур або клітинна діяльність для дослідження вірусів. В такому разі при вирощуванні культура має бути абсолютно позбавлена природного вірусного фону. Практично будь-яка клітина містить в собі певний набір паразитичних нелетальних вірусів. В організмі вони себе не проявляють внаслідок дії імунітету, а в лабораторній культурі можуть призводити до аутолізу клітин. Навіть якщо зовні культура росте нормально, вірусна зараженість позначиться на властивостях клонованих організмів і зведе нанівець результати клонування.

Для знезараження поживних середовищ і обладнання використовують методи дезінфекції і стерилізації.

Дезінфекція – це процес знищення вегетативних форм мікроорганізмів, коли субстрат чи середовище не стають повністю стерильними, а лише позбавляються тих форм мікрофлори, що можуть почати розвиватися негайно. Найчастіше для дезінфекції використовують хімічні методи: протирання, промивання або замочування в розчинах бактерицидних речовин. Також фізичні методи: пастеризація, нетривале кип'ятіння.

Стерилізація – комплекс методів знищення всієї мікрофлори, в т.ч. спор. Застосовують частіше фізичні методи: тривале кип'ятіння, використання **сухожарових приладів** (температура нагрівання понад 100°C за схемами часового режиму: 160°C – 2 год., 200°C – 10-15 хв.), нагрівання під тиском в рідині або парі (автоклавування та використання пароформалінових шаф). Стерилізація вологою парою під тиском (автоклавування) базується на прогріванні будь-якого матеріалу насиченою парою при тиску, вищому за атмосферний. З підвищенням тиску температура насиченої пари збільшується, що дозволяє стерилізувати рідини при 100°C та вище, не допускаючи кипіння, і, відповідно, випаровування та розбризкування. Тривалість автоклавування залежить від хімічного складу матеріалу, що стерилізується, виду мікробів, що знаходяться в ньому, а також об'єму (теплоємності) посудин, де проводять стерилізацію. Умови підвищеного тиску насиченої пари створюють у спеціальних товстостінних апаратах, що герметично закриваються - **автоклавах**. Різні за конструкцією, вони мають однакову принципову схему (Рис. 2.1).

Дві камери – велика (робоча) та маленька (водопарова) з'єднані між собою трубопроводом з вентилем. Водопарова камера, куди вміщують матеріал, що стерилізується, має кран для виходу повітря, манометр для визначення тиску пари та запобіжний клапан для виходу пари при занадто високому тиску.

Воду у водопаровій камері нагрівають за допомогою вмонтованих електродів, температура регулюється автоматично. Початком стерилізації вважають момент, коли стрілка манометра показує заданий тиск. Тиск підтримують регулюванням підігрівання. Коли час стерилізації закінчується, нагрівання припиняють. Слід дочекатися, коли тиск в автоклаві зрівняється з атмосферним. По-

тім відкривають кран, що виводить пару. Лише після зниження тиску до нуля і виходу пари повільно відкривають кришку автоклава. До роботи з автоклавом допускають лише осіб, що пройшли спеціальне навчання. Для перевірки ефективності теплової стерилізації слугують термоіндикатори.

Для поживних середовищ підходять ті методи знезаражування, які не змінюють хімічну природу середовища. Оскільки середовища для клітин завжди складні будь-який фізичний вплив на цілісність середовища призведе до його руйнування: під дією температури чи ультрафіолету утворюються кетонцукри і аміноцукри, що не засвоюються клітинами, тому обеззаражуються маточні розчини, кожен з урахуванням його стійкості, а робочий розчин готують із стерильних компонентів маточних розчинів.

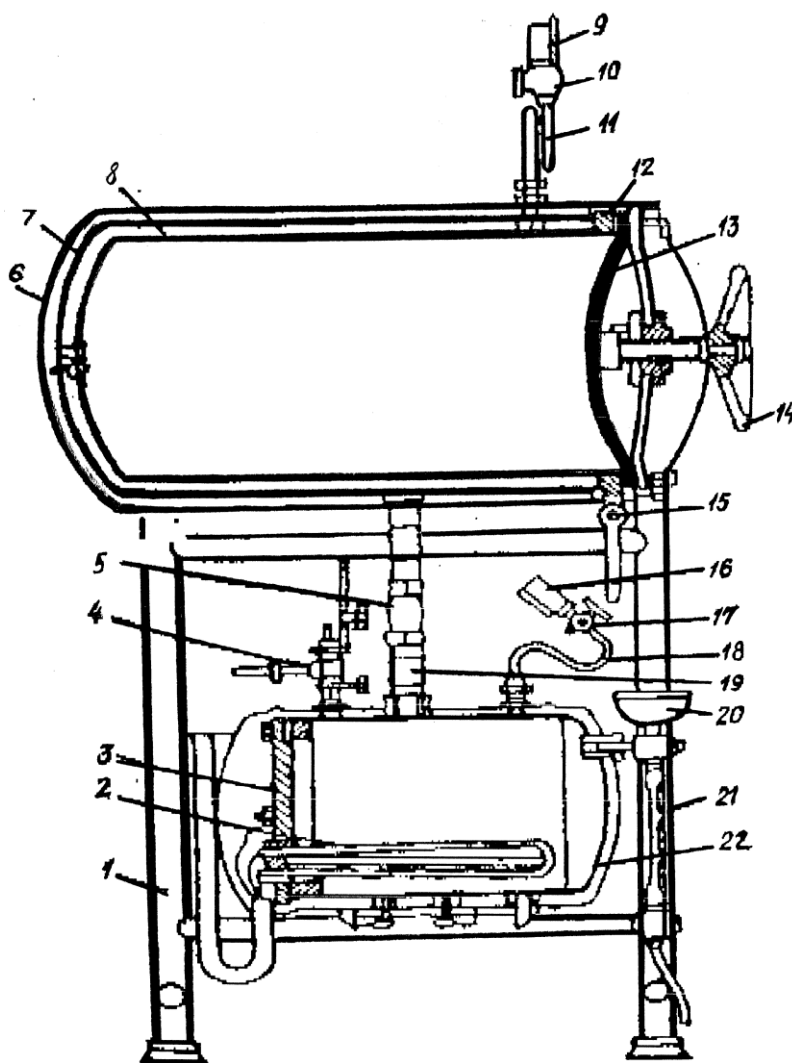


Рис.2.1. Принципова схема автоклава:

- 1 – постамент;
- 2 – нагрівальний елемент;
- 3 – кришка котла;
- 4 – запобіжний клапан;
- 5 – вентиль; 6 – кожух;
- 7 – парова камера;
- 8 - стерилізаційна камера;
- 9 – манометр парової камери;
- 10 – трьохходовий кран;
- 11 – сифонна труба парової камери;
- 12 – опорне кільце;
- 13 – кришка парової камери;
- 14 – штурвал;
- 15 – спускний кран;
- 16 – кран котла;
- 17 – трьохходовий кран котла;
- 18 – сифонна трубка;
- 19 – патрубок;
- 20 – воронка;
- 21 – повітрявказуюча воронка;
- 22 – котел.

Способи приготування маточних розчинів:

1. Глюкоза і солі макроелементів витримують термостерелізацію розчину.
2. Вітаміни і фітогормони часто продаються у вигляді готового розчину в стерильних флаконах чи ампулах, їх необхідно відкривати перед використанням в стерильних умовах. Якщо вони не стерильні і робиться наважка, в маточний розчин додають пропіон лактон або антибіотик в концентрації, що є бактерицидною в маточному розчині, але цілком біологічно безпечною при розведенні до об'єму робочого розчину.
3. Солі мікроелементів та інших додаткових речовин стерилізуються в розчинах у відповідності з властивостями конкретної речовини. Це може бути термостерилізація, ультрафіолетове опромінення, хімічне знезараження.

Стерильні маточні розчини мають ***термін зберігання:***

1. Глюкоза і більшість макросолей – 1 тиждень.
2. Деякі макросолі і більшість мікросолей – 2 тижні.
3. Біологічно активні речовини – 3 доби, в холодильнику при температурі $+2 - 4^{\circ}\text{C}$ з етикетками, де чітко вказані хімічна формула, концентрація речовини та термін закладання на зберігання. Розчини, термін зберігання яких вичерпався, перестерилізації не підлягають і списуються.

Стерилізація обладнання:

Для більшості обладнання підходять всі види стерилізації і хімічного обеззараження, але є і обмеження:

1. Ріжучі інструменти не допускається стерилізувати в сухожарах і випалювати над відкритим вогнем.
2. Індивідуально підбирається режим стерилізації інструментів з дерев'яними і пластмасовими держаками і ручками.

Стерилізація лабораторії:

Оптимальним є влаштування приміщення лабораторії ізольованим і цільовим, тоді підлога і стіни викладаються кахельною плиткою, поверхня столів виготовляється із гладкого вогнетривкого пластика, жодних м'яких меблів. Ос-

новними конструктивними матеріалами інструментальних стелажів шаф є фарбоване нітрофарбою залізо і скло. В лабораторії передбачається санітарний режим, за виконанням якого відповідає технічний персонал. Це передбачає щонайменше два рази на добу вмикання кварцової бактерицидної лампи і проведення вологого прибирання розчином антисептика (хлорамін, хлорвапно, лізол).

Вимоги до персоналу по дотриманню стерильності:

1. Використання змінного взуття та одягу, - для цього повинна бути забезпечена можливість переодягання у приміщенні передбоксника, наявність шаф для речей.

2. На порозі приміщення вкладається підлога ганчірка змочена розчином сильного антисептика (лізол).

3. На робочому місці використання марлевих пов'язок на органи дихання і гумових стерильних рукавичок, а при необхідності спеціальних головних уборів і герметичних окулярів.

4. Миття рук. При вході в лабораторію кожен співробітник повинен вимити руки з милом, а перед операцією додаткове знезараження одним з із двох способів:

а) при вході в лабораторію – з милом;

б) перед маніпуляціями з рослинним матеріалом – додати знезараження 96% спиртом, або 0,2% хлораміном.

Забезпечення стерильності операційного поля:

Можна виконати тільки шляхом використання **лам і нар-боксів** – лабораторних приладів для роботи з біологічними об'єктами в стерильних умовах. Останні можна придбати або виготовити в умовах ремонтно-виробничої майстерні.

Основні вимоги до нього:

1. Найкращі розміри 65 x 30 x 30 см.

2. Матеріали для виготовлення: металеві кутки будь-якого профілю із сплавів алюмінію та нержавіючої сталі, органічне та мінеральне скло,

скло текстоліт, стрічковий гумовий ущільнювач (бажано із самоклеючою), патрони під електропостачання, краще керамічні.



Рис. 2.2 Зовнішній вигляд сучасного ламінар-бокса

Внутрішнє обладнання ламінарбокса:

Ламінар-бокс – це шафа, обладнана наступним чином: кришка і передня стінка повинні легко відкриватися і закриватися. З торцевих стінок на затискачах з ущільненням монтується гумові рукавиці. В кришці монтується система освітлення, що складається з 1-2-х ламп денного освітлення потужністю 15 ват і 15 ват лампа розжарення із віддзеркалювачем, направленим на операційне поле. Вмикання цієї лампи треба передбачити всередині боксу. На задній непрозорій стінці боксу монтується полиця і штатив для пробірок. Зліва до центру розміщується робочий столик площею 25x15см, на якому виконуються операції. В залежності від розміру і мети, бокс комплектується інструментами та лабораторним посудом. В стандартних боксах в кришку вмонтована лампа для кварцування. В інших її треба вміщувати і включати відповідно до режиму обеззараження. Справа в кутку монтується повітряний термометр. Забезпечується подача стерильного повітря. Встановлюють бокс на стійку рівну поверхню на рівні зору дослідника.

Контрольні запитання:

1. Чому необхідно дотримуватися стерильності при роботі з рослинним матеріалом?
2. Для чого використовують автоклавування, а для чого – обробку в сухожаровій шафі?
3. Яке призначення та будова ламінар-боксу?
4. Пояснити значення термінів дезінфекція і стерилізація.
5. Які вимоги до лабораторії та персоналу?

Лабораторна робота № 3

Тема: Дослідження клітинного матеріалу рослин та вивчення методів їх трансформації

Мета: Узагальнення знань та навичок цитологічних досліджень, вивчення прийомів генної інженерії рослин

Хід роботи:

- 1) Визначити задачі цитології та методи.
- 2) Пояснити роль мікроскопії у вивченні тонких структур та їх функцій в клітині; замалювати принципову схему мікроскопа.
- 3) Пояснити значення окремих органоїдів та їх використання в біотехнології.
- 4) Скласти перелік вимог при роботі з біоматеріалом в цитологічній лабораторії.

Цитологія – наука про клітину (cito). Розміри клітин живих організмів, виявлених на Землі, коливаються в значних межах (від 20 мкм до 30 см). Клітини за будовою є прокаріотичні і еукаріотичні. Прокаріоти на мають оформленого ядра. Це, наприклад, одноклітинні бактерії. З ними простіше працювати, ніж з еукаріотами – клітинами рослинних і тваринних організмів, поширеність яких значно більша (від одноклітинних зелених водоростей до вищих квіткових рослин, тварин і людини). Еукаріоти мають ядро й органоїди (Рис.3.1).

Клітинна мембрана складається в основному з ліпідів, забезпечує тургор клітин, проходження мінеральних солей, води, молекул органічних речовин.

Методи цитологічних досліджень:

- 1) цитохімічні і цитоспектрофотометричні;
- 2) швидкісне центрифугування;
- 3) рентгеноструктурний аналіз;
- 4) авторадіографія (радіоактивних ізотопів, або мічених атомів).

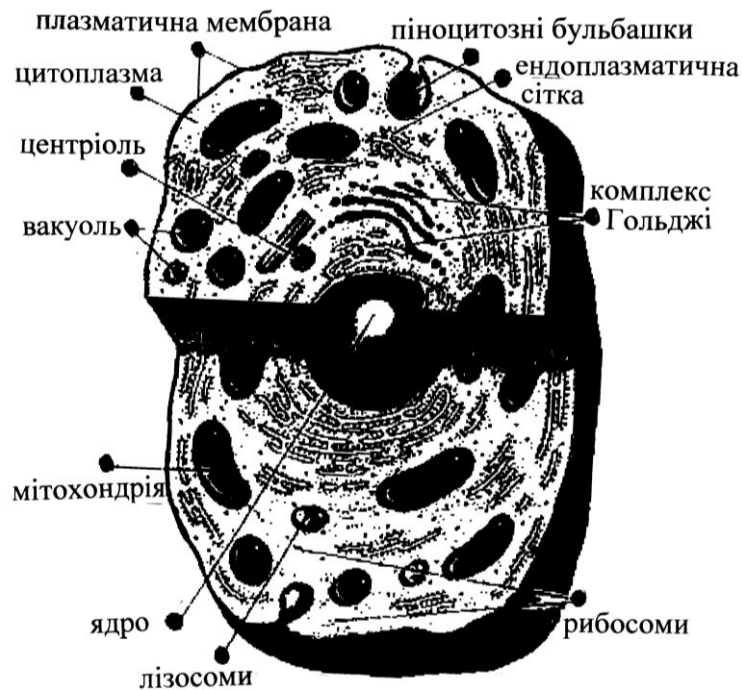


Рис. 3.1. Будова еукаріотичної клітини

Всередині клітини міститься цитоплазма – водяниста желеподібна субстанція, в якій розміщуються органели. Генетичний матеріал міститься в ядрі. Апарат Гольджі зберігає білки. Рибосоми синтезують білок. Мітохондрії – енергетичні станції клітини, в них синтезується АТФ. Крім того, мітохондрії мають власну ДНК. Мітохондріальна ДНК успадковується тільки по материнській лінії. Вакуолі транспортують речовини в клітині. Пластиди містяться тільки в рослинних клітинах (є червоні, оранжеві й жовті (хромопласти), а також безбарвні (лейкопласти).

Усі клітини рослинних і тваринних організмів, а також мікроорганізмів містять більшість елементів таблиці Менделєєва. Найбільше тих, що легкі за атомною масою – О, С, N, Н – біля 98% в клітині. Вода складає біля 80% маси тіла клітини.

Ядро – носій генетичної інформації, що міститься в ДНК. Лише чотири типи органічних азотистих основ (нуклеотидів) кодують абсолютно всю генетичну інформацію рослин, тварин і мікроорганізмів, аналогічно як в комп'ютерних технологіях вся інформація закодована в нулі і в одиниці. Це – аденін, тимін, гуанін і цитозін. В РНК тимін замінюється урацилом. Послідов-

ність із трьох основ, названа “кодоном” кодує одну з двадцяти специфічних амінокислот, що входять в склад білків. Якщо білок включає 300 амінокислот, код складається із 900 основ. Певна послідовність з трьох нуклеотидів (триплет) кодує у всіх живих організмів одну і ту ж амінокислоту. Білки в клітині мають структурну функцію, контролюють утворення енергії, всі хімічні реакції в клітині, беруть участь в діленні клітин і виведенні продуктів обміну речовин. Визначивши, які білки і в якій кількості утворюються, можна контролювати клітину. Знаючи генетичний код, можна за допомогою генно-інженерних методів приєднати одну амінокислоту до іншої створювати необхідний білок.

Будь-яка ознака організму (холодостійкість, стійкість до хвороби, стійкість до пестицидів, зовнішній вигляд і т.д.) визначається певним геном. Більшість генів, що визначають ці ознаки, беруть з бактеріальних геномів та геномів дикорослих рослин. Такі гени не можна ввести в організм культурної рослини методом схрещень через біологічну несумісність рослин, що відносяться до різних видів, родів, сімейств і царств. Так, наприклад, введення бактеріоплазми *Agrobacterium tumefaciens* в геном дводольних та деяких однодольних рослин спричиняє перебудову метаболізму трансформованих рослинних клітин і вони починають виробляти сполуки, необхідні тільки для бактерій.

Одним з найпоширеніших методів отримання трансгенних рослин є *метод кокультивації з агробактерією* (Рис.3.2,б). Він базується на трансформації рослинних експлантів агробактеріями, що несуть векторну конструкцію, яка містить чужорідний ген, вбудований в область Т-ДНК. В залежності від виду рослин вихід отриманих трансгенних рослин при застосуванні даного методу складає 10-60%.

В якості вихідного матеріалу необхідно мати штам агробактерії з векторною конструкцією. Вектор повинен містити послідовність гена, який необхідно ввести в геном рослини. Ген має бути під контролем промотора, здатного експресуватися в рослинній клітині. Крім функціонального гену вектор повинен містити селективний маркер трансформації (зазвичай це ген стійкості до

антибіотиків канаміцину, гігроміцину та/або гербіцидів хлорсульфону, фосфинотрицину).

Також підбираються сорти рослини-реципієнта. В якості експлантів для трансформації використовують стерильні листові диски, гіпокотилі (томати), сім'ядолі (томати), міжвузля (картопля).

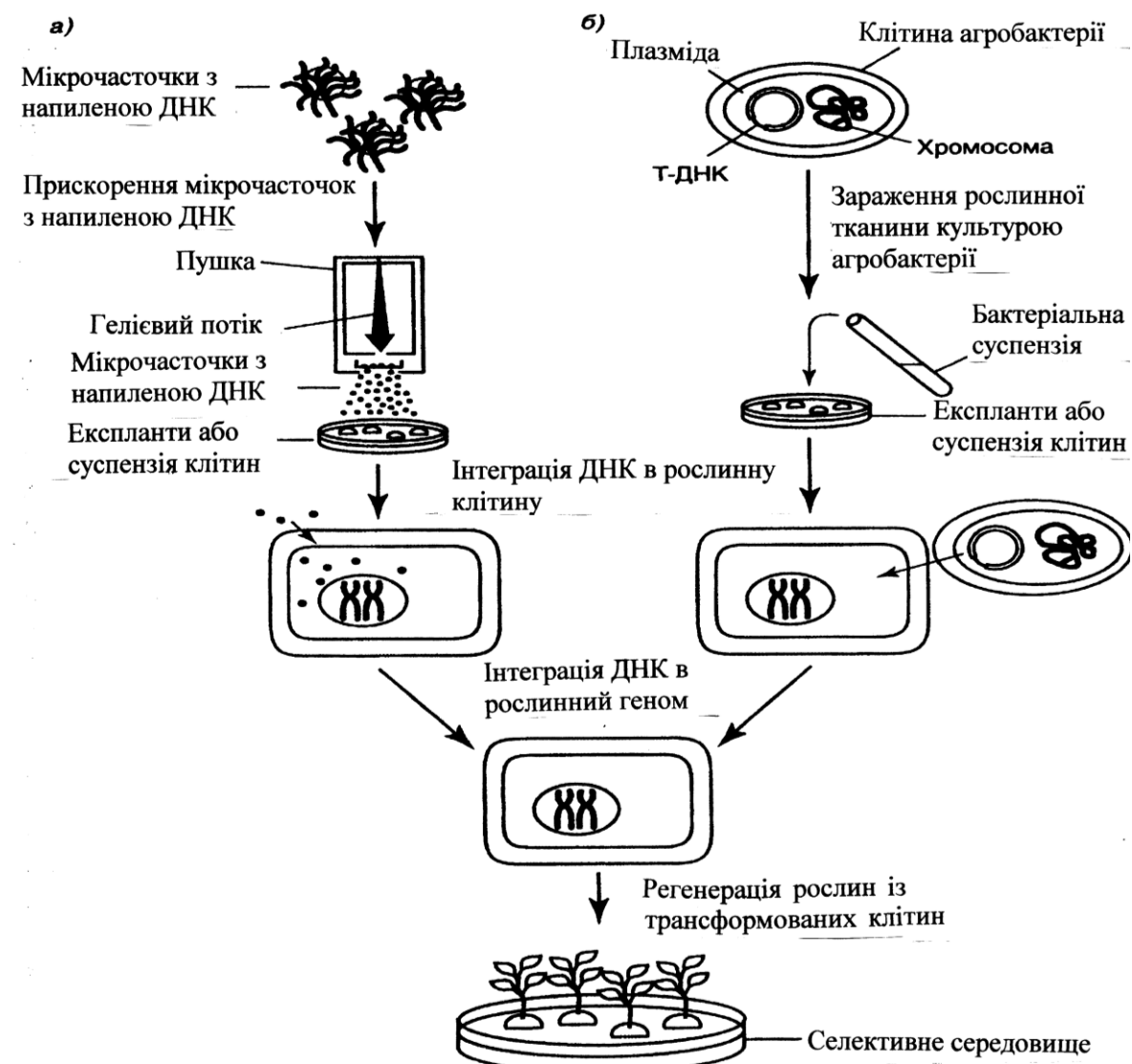


Рис. 3.2. Отримання трансгенних рослин:

а) методом біобалістики; б) методом кокультивації з агробактерією.

Експланти інокуюють рідким середовищем, що містить агробактерію з векторною конструкцією. При цьому відбувається враження клітин раньової поверхні експлантат, і після 24-48 год. Кокультивування в деяких клітинах відбувається вбудовування в рослинний геном фрагмента Т-ДНК з чужорідним

(вибраним) геном. Далі експланти переносять на середовище з антибіотиком (карбеніцилін або цефатоксим), що призводить до вибіркової загибелі клітин агробактерій. Крім того, в середовище додають відповідні фітогормони (для прямої регенерації або калюсоутворення) і антибіотик/гербіцид для проведення селективного відбору трансформованих клітин. Такі трансгенні рослини, експресуючі ген стійкості до антибіотика чи гербіциду, будуть рости на середовищі з додаванням селективного агента, в той час як нетрансгенні рослини загинуть. За 2-5 тижнів на трансформованому експланті розвинуться пагони, які надалі відсаджують або переносять в ґрунт для проведення додаткового молекулярного аналізу.

Методом кокультивації з агробактеріями отримано трансгенні рослини практично всіх сільськогосподарських дводольних рослин; метод можна застосовувати і для кукурудзи, рису та пшениці.

Метод біобалістичної трансформації (Рис.3.2.,а) застосовують для однодольних; допустимий і для дводольних рослин. Вихідний матеріал – суспензійна культура, калюсна тканина або культивовані незрілі зародки однодольних.

Суть методу: на дрібні часточки вольфраму, платини або золота напиляється ДНК вектора, що містить необхідну для трансформування генну конструкцію. Далі ці часточки поміщують всередину біобалістичної пушки. Калюс або суспензія клітин вноситься в чашку Петрі з агаризованим середовищем і поміщується під біобалістичну пушку на відстані 10-15 см. В пушці створюють тиск 0,1 атм. В момент падіння тиску вольфрамові чи ін. часточки з напиленням ДНК з великою швидкістю викидаються з пушки і, розриваючи клітинні стінки, входять в цитоплазму і ядро клітин. Зазвичай клітини, що містяться по центру, гинуть, а ті, що знаходились в зоні 0,6-1 см від центру, трансформуються. Їх переносять на середовище для подальшого культивування. Методом отримано стійкі трансгенні сорти кукурудзи, рису, пшениці, ячменю.

Для роботи з біоматеріалом необхідні інструменти:

1. Предметне скло (комплект).

2. Накривне скло.
3. Обслуговуючі рідини (консерванти, барвники).
4. Препарувальні голки.
5. Пінцети, леза, скальпель.
6. Піпетки.
7. Мікробіологічна петля з вогнетривкого дроту.
8. Спиртівка.
9. Сильний дезінфікуючий розчин.

Контрольні запитання:

1. Поясніть будову і функції органоїдів рослинних клітин.
2. Що саме в клітині є об'єктом роботи генних інженерів?
3. Якими інструментами повинна бути забезпечена лабораторія?
4. Що вивчає цитологія?
5. Розкрити суть методів отримання трансгенних рослин.
6. Які ви знаєте методи цитологічних досліджень?
7. Що використовують в якості експлантів при трансформації?

Лабораторна робота № 4

Тема: Лабораторне приготування і використання поживних середовищ

Мета: Вивчення правил приготування поживних середовищ для вирощування рослинних клітин і калюсних тканин та вирощування останніх

Хід роботи:

- 1) Вивчити основні складові компоненти поживних середовищ для рослинних клітин.
- 2) Розглянути правила приготування та зберігання маточних розчинів.
- 3) З'ясувати самостійно роль різних компонентів робочого розчину для життєдіяльності рослинних клітин.

4) Самостійно скласти рецепт експериментального поживного середовища і довести його біологічну придатність для вирощування рослинних клітин.

5) Дослідити процес росту калюсної тканини

Компоненти для отримання складних поживних середовищ повинні:

- забезпечувати енергетику клітин;
- забезпечувати мінеральне живлення (макросові, NPK-комплекс);
- забезпечувати мікроелементне живлення (солі Fe, Ca, Cu, S, I, Zn, тощо);
- стимулювати ріст культури та калюсоутворення (вітаміни та фіогормони);
- забезпечення рН- та іонної стабільності розчину (розчини питної соди, ортофосфорної кислоти, динатрієва сіль (трилон-Б), NaEDTA)

*Примітка. EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота.

Поживні середовища для культивування ізольованих тканин і клітин повинні включати всі необхідні рослинам макро- і мікроелементи, а також вітаміни, вуглеводи, фітогормони або їх синтетичні аналоги (табл.4.1).

Деякі поживні середовища містять гідролізат казеїну, амінокислоти.

EDTA або NaEDTA покращує доступність заліза для клітин. Іноді при вирощуванні калюсної тканини до поживного середовища додають рідкий ендосперм кокосового горіха (кокосове молоко), каштана, кукурудзи та ін.

Вуглеводи – обов'язковий компонент поживного середовища, т.я. ізольовані клітини і тканини не здатні житись автотрофно.

Калюс – це недиференційована група біотехнологічно культивованих соматичних клітин вищих рослин з моменту першого поділу клітин в поживному субстраті до моменту появи морфологічних відмінностей між окремими клітинами колонії (Рис.4.1).

В рідкому середовищі зрілий калюс має вигляд блідої забарвленої кульки $d=3-5$ мм (якщо він виростає більше, то починається аутоліз – саморозпад

внутрішніх клітин), на твердому агаризованому середовищі калюс має вигляд диска $d=5-8$ мм.

Фітогормони необхідні для дедиференціювання клітин і для індукції клітинних поділів. Тому для отримання калюсних тканин в склад поживного середовища повинні входити ауксини, що викликають клітинне дедиференціювання, і цитокініни, що індують ділення клітин. Якщо будь-який рослинний експлант, що складається із спеціалізованих (диференційованих) клітин помістити в поживне середовище без гормонів, то ділення не відбудеться і калюсна тканина не утвориться. Це пов'язано з нездатністю диференційованих клітин до ділення. Кожна клітина проходить три фази росту: 1)ділення; 2)розтяг; 3)диференціювання. Ростова крива калюсних клітин має S-подібну форму (Рис.4.2) та включає 5 фаз. Під час першої латентної фази збільшення числа і маси клітин не відбувається, т.я. вони готуються до ділення. 2-а фаза – логарифмічна – характеризується найбільшою мітотичною активністю і збільшенням маси калюсної культури, причому з прискоренням. 3-я фаза – лінійна, швидкість росту клітин постійна. 4-а фаза – вповільнення росту. 5-а – стаціонарна фаза – ростова крива виходить на плато. Далі настає відмирання клітин.

У випадку індукції стеблового морфогенезу вміст ауксинів в середовищі може бути зменшений або повністю виключений. На безгормональних середовищах ростуть пухлинні і “звиклі” тканини, які набули здатності самостійно синтезувати гормони. В якості ауксину використовують ІОК (індоліл-3-оцтова кислота), цитокініну – кінетин.

Таблиця 4.1.

Розрахунки для виготовлення маточних розчинів

Речовина	Величина нава- жок		Об'єм ма- точного р- ну	На 1 літр середовища
	мг	г		мл/1л
1	2	3	4	5
NH_4NO_3	25000	25	1000	50
KNO_3	22000	22	1000	50
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15340	15,3	1000	50
KH_2PO_4	19400	19,4	1000	50

FeSO ₄ * 7H ₂ O	278	-	500	25
NaEDTA	373	-	500	25
Ca(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	11000	11,0	200	10
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	62	-	500	25
H ₃ BO ₃	1550	1,6	250	1,0
MnSO ₄ * 5H ₂ O	5575	5,6	250	1,0
або « »* 4H ₂ O	5575	5,6	250	1,0
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2150	2,2	250	1,0
або « »* 4H ₂ O	2150	2,2	250	1,0
KJ	208	2,2	250	1,0
CuSO ₄ * 5H ₂ O	6,2	2,2	250	1,0
CuCl * 6H ₂ O	6,2	2,2	250	1,0
Вітамін В ₁ (1 ампула)	50		50	1,6
Вітамін В ₆ (1 ампула)	50		50	1,0
Аскорбінова к-та	25		25	3,0
Індоліл-оцтова кислота (ІОК)	25		10 мл. спирту + дистил.води до 25 мл	0,5
Аденін	25		25	0,25 -0,5
Кінетин	12,5		100	0,25 -0,5
	або 6,25		50	100

Правила приготування поживних середовищ:

1. Після приготування наважок компонентів маточні розчини мікро- і макроелементів необхідно відфільтрувати.

Каламутні розчини не придатні для приготування середовищ!

2. При приготуванні солей мікроелементів першою розчиняють Na₂MoO₄ * 2H₂O у половині об'єму води, що попереджає випадання осаду.

3. При приготуванні ІОК наважку розчиняють у 10 мл етилового спирту. Для запобігання утворення осаду до повного об'єму розчин доводять двічі дистильованою водою у день приготування середовища.

4. Для кращого розчинення наважки аденіну розчин підігривають.

5. При приготуванні розчину кінетину, його наважку розчиняють в короткій біологічній пробірці, додаючи 1-2 краплі 1 н КОН.

6. Маточні розчини аденіну і кінетину при зберіганні в холодильнику утворюють кристали. При приготуванні середовища їх необхідно **розчинити!**

7. Маточні розчини мікросолей, вітамінів В₁, В₆, аденіну, кінетину можна зберігати 1-2 тижні.

Концентровані розчини інших інгредієнтів слід готувати щоразу перед приготуванням середовища.

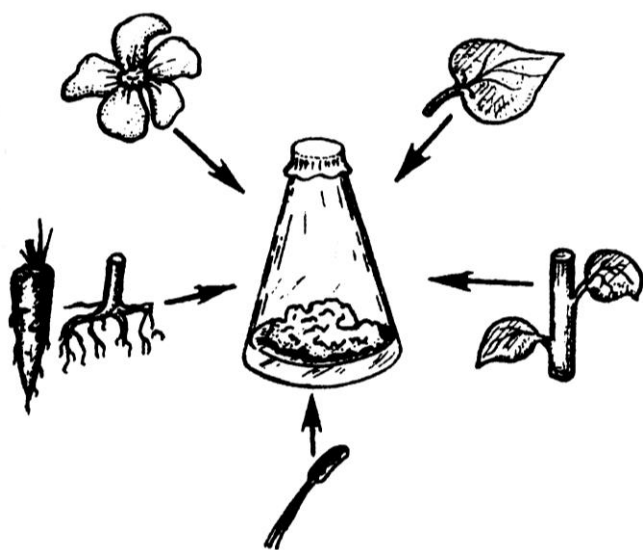


Рис.4.1. Отримання культури калюсної тканини з різноманітних експлантів.

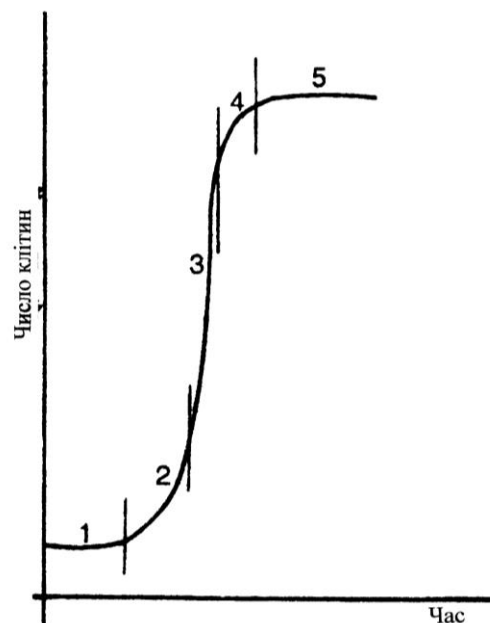


Рис. 4.2. Модельна крива ростового циклу при періодичному вирощуванні калюсних тканин.
Фази росту: 1 – латентна; 2 – логарифмічна; 3 – лінійна; 4 – вповільнена; 5 – стаціонарна.

Таблиця 4.2.

Основні поживні середовища, що застосовуються для вирощування рослин з меристем та живців,
мг/л

Основні інгредієнти (макросоли)	Середовище Мурасіге-Скуга (оригінальна)	Модифікація середовищ для вирощування рослин з меристем і живців				Середовище Уайта
		НДІКГ		УкрНДІКГ		
		для початкового росту меристем	для пересадки меристем, що почали рости і мікроживцювання	для початкового росту меристем	для мікро- живцювання in vitro	
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650	1650	1250	-
KNO ₃	1900	1900	1900	1900	1100	80
CaCl ₂ * 2H ₂ O	440	440	440	440	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	-	-	307	200
MgSO ₄ * 7H ₂ O	370	370	370	370	370	739
KCl	-	-	-	-	-	65
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	970	-
Na ₂ H ₂ PO ₄	-	-	-	-	-	16,5
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	200
Na ₂ ЕДТА	37,3	37,3	37,3	37,3	37,8	-
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃ * 6H ₂ O	-	-	-	-	50,8	2,5
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	1,5
MnSO ₄ * 4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	4,5
MnCl ₂	-	-	-	-	-	-
ZnSO ₄ * 4H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	1,5
KI	0,83	0,75	0,75	0,83	0,83	0,75
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	-
Na ₂ MO ₄ * 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-
HMnO ₄	-	-	-	-	-	-
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	-
Мезоінозит	100	100	-	-	-	-
Нікотинова к-та	0,5	2,0	-	-	-	0,5
Піродоксин	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1
Тіамін	0,1	1,0	0,2	1,6	1,6	0,1
Аскорбінова к-та	-	-	0,2	3,0	3,0	-
Пантотенат Са	-	10,0	-	-	-	-
Сахароза	30000	20000	20000	20000	10000	20000
Гідролізат казеїну	1000	-	40	-	-	-
Фолієва кислота	-	0,5	-	-	-	-
Гліколі	-	-	-	-	-	3,0
Рибофлавін	-	0,5	-	-	-	-
Біотин	-	1,0	-	-	-	-
В ₁₂	-	0,015	-	-	-	-
Гібереллова к-та	1,0	2,0	-	2,0	3,0	-
Кінетин	0,01	0,5	0,04	0,5	0,25	-
ЮК	2,0	-	1,0	-	1,0	-
Аденін	-	40,0	-	0,5	0,25	-
Ферулова кислота	-	-	0,02	-	-	-
8-гідроксихінолін	-	-	0,03	-	-	-
Хлорогенова к-та	-	-	-	-	0,05	-
Агар-агар	10000	7000	7000	7000	7000	7000
Активоване вугілля	-	10000	-	-	-	-

Найчастіше використовують середовище Мурасіге-Скуга. Для виготовлення твердих поживних середовищ використовують агар-агар (полісахариди з морських водоростей).

Таблиця 4.3.

Склад деяких поживних середовищ, що використовуються при культивуванні тканин рослин

Компоненти середовища	Модифікація середовища для вирощування рослин із меристем і живців						
	Мурасіге і Скуга, 1962 г.	Гамборга и Евелета (Б ₅), 1968 г.	Уайта, 1939 г.	Ніч, 1974 г.	Као і Михайл-люка, 1975 г.	Китайські середовища	
						N ₆	З картоплян. екстрактом
KNO ₃	1900					2830	1000
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	720	600	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	2085	-	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ * 4H ₂ O	-	-	-	-	-	-	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-	-	463	100
MgSO ₄ * 7H ₂ O	370	250	360	185	300	185	125
CaCl ₂ * H ₂ O	-	-	-	166	-	166	-
CaCl ₂ * 2H ₂ O	440	150	-	-	-	-	-
KCl	-	-	65	-	300	-	35
KH ₂ PO ₄	170	-	12	68	170	400	200
Na ₂ SO ₄	-	-	200	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	-	169,6	18,7	-	-	-	-
MnSO ₄ * H ₂ O	-	10	-	-	10	-	-
MnSO ₄ * 4H ₂ O	22,3	13,2	7	25	-	4,4	-
ZnSO ₄ * 4H ₂ O	8,6	-	-	-	2	-	-
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	-	2	3	10	-	1,5	-
H ₃ BO ₃	6,2	3	1,5	10	3,6	1,5	-
KJ	0,83	0,75	0,75	-	0,75	0,8	-
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025	0,025	0,001	0,025	0,025	-	-
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25	0,25	0,0025	0,25	0,25	-	-
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,025	0,025	-	-	0,025	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃						-	-
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27,8	27,8	-	27,8	27,8	27,8	27,8
Na EDTA * 2H ₂ O	37,3	377,3	-	37,3	37,3	37,3	37,3
Мезоинозит	100	100	-	200	100	200	-
Аскорбиновая кислота	-	-	-	3	-	3	-
Тиамин*HCl	0,4	10	0,1	3	0,005	3	1
Пиридоксин*HCl	0,5	1	0,5	1	0,005	1	-
Никотиновая кислота	0,5	1	0,5	-	-	-	-
Глицин	2	-	3	-	-	-	-
Гидролизат казеїна	10000	-	-	400	-	400	-
Картофельный екстракт	-	-	-	-	-	-	100000
Кинетин	*	*	*	-	-	-	0,5
БАП	*	*	*	6	-	6	-
НУК	*	*	*	2	-	2	-
2,4 – Д	*	*	*	-	0,2	-	1,5
Сахароза	30000	20000	20000	60000	125	60000	20000
Агар «Дифко»				7000		7000	

*Примітка: Середовище Као і Михайлюка містить додатково (мг/л): фруктози, рибози, ксилози, маннози, рамнози, целлобизи, сорбіту – по 125; манніта, нікотинаміду, аскорбінової кислоти – по 1; вітаміну А - 10; вітаміну D_3 - 0,5; пантотенату кальцію–0,01; вітаміну B_{12} - 0,2; п-амідобензойної кислоти - 0,01; біотину – 0,005; холінхлориду – 0,5; рибофлавіну – 0,1; 2,4-Д –0,2; зеатину – 0,5; НУК – 1; гідролізату казеїну – 125; кокосового молока – 10; $CaCl_2$ (30%) – 1,5; глюкози – 68400; пірувату натрію –5; лимонної, яблуневої і фумарової кислоти – по 10.

*Склад екзогенних гормональних препаратів вар'ює в залежності від об'єктів.

Таблиця 4.4.

Склад поживного середовища для отримання мікробульб картоплі в залежності від об'єму

Компоненти середовища	1 літр мл/л	5 літрів мл/л	7 літрів мл/л	10 літрів мл/л
Макросолі	50	250	350	500
Fe-хелат	25	125	175	250
$Ca(NO_3)_2$	10	50	70	100
Мікросолі	1	5	7	10
Тіамін B_1	1,6	8	11,2	16,0
Піридоксин B_6	1	5	7	10
Аскорбінова кислота	3	15	21	30
Аденін	0,25	1,25	1,75	2,5
Кінетин	0,25	1,25	1,75	2,5
ІОК	0,5	2,5	3,5	5
Сахароза	40 г/л	200 г/5л	280 г/7л	400 г/10л

Контрольні запитання:

1. Які мікро- та мікроелементи повинні бути присутні в поживному середовищі?
2. Що таке “калюс”?
3. Наведіть характеристику фаз росту калюсної культури.
4. Які поживні середовища ви знаєте? Чим вони відрізняються?
5. Яких правил треба дотримуватися при приготуванні поживних середовищ?
6. Для чого в поживному середовищі необхідні фітогормони?

Лабораторна робота № 5

Тема: Технології вирощування рослинного матеріалу *in vitro*

Мета: Ознайомитися з основними прийомами клітинної і тканинної біотехнології в селекції і рослинництві

Хід роботи:

- 1) З'ясувати необхідність використання соматично-клональних методів розмноження сільськогосподарських культур.
- 2) Вивчити техніку виділення мерістемних клітин.
- 3) Ознайомитися з методами та особливостями клонального мікророзмноження.
- 4) Розглянути методи оздоровлення посадкового матеріалу.

За допомогою клітинних і тканинних біотехнологій можливо отримувати цінні речовини вторинного синтезу (медичні, кормові, косметичні препарати та ін.); отримувати швидкоростучі рослини, стійкі до несприятливих умов, генномодифіковані рослини; також здійснювати оздоровлення посадкового матеріалу та клональне мікророзмноження рослин.

Вирощування соматичних клонів сільськогосподарських культур, необхідно для:

- 1) отримання якісного матеріалу для селекційного процесу;
- 2) для масового розмноження нових елітних сортів;
- 3) для противірусного оздоровлення елітних сортів, які тривалий час вирощуються в польових умовах і знизив планову продуктивність у зв'язку з накопиченням в клітинах нелетальних вірусів, які починають виконувати роль супресійних генів. При клонуванні проводиться антивірусне оздоровлення, що сприяє відновленню родючості сорту.

Для виділення мерістемних клітин обирають молоді пагони, наприклад: для картоплі – це паростки здорових бульб довжиною 3-5 см. Для виділення клітин існує мікроскальпель, можна використовувати уламок леза безпечної

бритви або добре заточену медичну голку, що вставлені в цанговий тримач. Виділення проводиться під контролем спостереження в біокулярну штативну лупу із верхньої точки росту; якщо сорт дефіцитний і кількість матеріалу обмежена, то виділення можна проводити із бічних апікальних меріستم. Стерилізації в розчині 0,1% пропіон лактону, при відсутності можливе використання інших протимікробних речовин, наприклад: 0,3 % фурацилін.

В процесі виділення вирізається шматок верхівкової мерістеми розміром біля 1 мм і вміщується на поверхню поживного середовища із суворим дотриманням правил асептики і антисептики (в ламінар-боксі). Ізольовані експланти (фрагменти) і насіння рослин стерилізують протягом 5-20 хв. в стерилізуючих розчинах (табл.5.1) з наступною промивкою експланту водою.

Вирощування культури складається з таких основних етапів:

1. Підготовка обладнання, інструментарію, матеріалу.
2. Виділення та посів мерістемних клітин.
3. Вирощування калюсу.
4. Активація диференціації калюсу.
5. Вирощування клонованих рослин в пробірках (in vitro).

Вирощування проводиться в термостаті, де температура емпірично підбирається під вирощуваний вид рослин, для більшості культур оптимальними є межі 24-28 °С. Калюс більшості культур витримує тимчасове нагрівання до 38-40 °С, але для вірусів, що містяться в геномі клітин, ця температура зависока, саме в цьому полягає один з найрозповсюдженіших методів оздоровлення клітин. На певному етапі вирощування калюс нагрівають на 2 - 4 години до 38 °С. Метод термооздоровлення часто суміщають з біохімічним оздоровленням, для цього калюсну культуру обробляють розчином антивірусної ДНК – рестриктази (існує кілька ДНК і РНК – рестриктаз, які можуть розкласти віруси безпосередньо в клітині, ці ферменти також отримані біотехнологічним шляхом).

Таблиця 5.1.

Стерилізуючі розчини для вихідного рослинного матеріалу
(по Р.Г.Бутенку, 1990)

Об'єкт	Час стерилізації, хв..			
	діацид 0,1%	сулема 0,1%	гіпохлорити Na, Ca 5-9%	H ₂ O ₂ 10-12%
Насіння сухе; набужнявіле	15-2	10-15	15-20	12-1
	6-10	6-8	10-15	6-8
Тканини: м'ясистого кореня, бульб; здерев'янілі стебла	20-3	15-25	15-2	-
	20-4	20-25	20-25	-
Листя	1-3	1-3	3-6	3-5
Апекси	1-10	1-7	3-15	2-7

Можна для стерилізації використовувати розчин пропіон-лактону 0,1%, фурациліну 0,3% та ін. Якщо неможливо добитися стерильності експланту, в поживне середовище вводять антибіотики.

Клональне мікророзмноження – це метод вегетативного розмноження, оснований на тотіпотентності. Процес клонального мікророзмноження іде в 4 етапи:

- 1) вибір рослини-донора, ізолювання експлантів і отримання стерильної культури, що швидко росте;
- 2) власне мікророзмноження, коли досягається отримання максимальної кількості мериклонів;
- 3) вкорінення розмножених пагонів з послідуною їх адаптацією до ґрунтових умов; при необхідності – депонування (затримка розвитку) рослин-регенерантів при пониженій температурі (+2-+10°C);
- 4) вирощування рослин в умовах теплиці з послідуною пересадкою в поле (Рис.5.1).

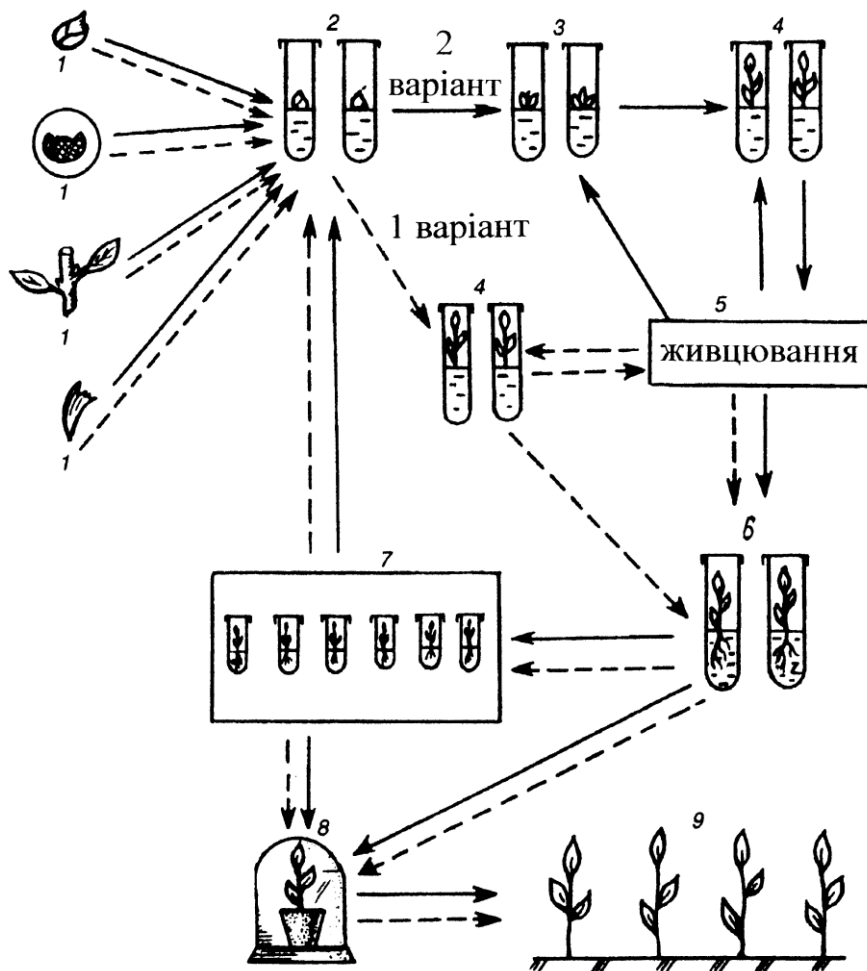


Рис. 5.1. Схема клонального мікророзмноження рослин методом активації розвитку існуючих меристем (1 варіант), індукції виникнення адвентивних бруньок на експланті (2 варіант): 1 – вибір вихідного експланту; 2 – отримання стерильної культури; 3 - утворення адвентивних бруньок безпосередньо на первинному експланті; 4 – ріст бруньок і формування мікропагонів; 5 – розмноження мікропагонів (живцювання); 6 – вкорінення мікропагонів; 7 – депонування рослин-регенерантів при пониженій температурі; 8 – переведення рослин в тепличні умови; 9 – висадка рослин-регенерантів на полі.

Методи клонального мікророзмноження:

1) Основний метод – активація розвитку вже існуючих в рослині меристем виключенням апікального домінування. Це досягається:

а) видаленням верхівкової меристеми стебла і наступним мікроживцюванням пагона *in vitro* на безгормональній середовищі;

б)при додаванні гормонів, індукуючи розвиток багато численних пазушних пагонів – цитокинінів. Такі пагони відділяють від первинного материнського експланту і знову культивують на свіжому поживному середовищі.

Метод широко використовується для виробництва безвірусного посадкового матеріалу технічних (цукровий буряк, хміль, тютюн та ін.), овочевих (томати, картопля, огірки, спаржа та ін.), декоративних (хризантема, гербера, троянда та ін.), деревних (тополя, туя, самшит, яблуня, вишня та ін.) порід.

2)Індукція утворення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експланта. Метод оснований на здатності ізольованих часточок рослин при сприятливих умовах поживного середовища відновлювати органи і регенерувати цілі рослини. Таким чином з будь-яких органів і тканин, вільних від інфекції, можна виростити адвентивні бруньки – в присутності цитокиніну або цитокиніну з ауксином у співвідношенні 10:1 або 100:1. Цим методом розмножують капусту, цибулеві квіткові рослини, часник, томати та ін., навіть сосну.

3)Метод соматичного ембріогенезу – базується на диференціації із соматичних клітин зародкоподібних структур, які зовні нагадують зиготичні зародки. Соматичні зародки проходять три стадії розвитку: глобулярну, серцевидну, торпедовидну і набувають тенденції до розвитку в паросток. Формування ембріодів відбувається поетапно:

а)клітини експланта диференціюються за рахунок додавання в поживне середовище ауксинів і перетворюються в ембріональні;

б)сформовані клітини розвиваються в ембріюди внаслідок низької концентрації ауксинів або повного їх виключення з поживного середовища.

Посадковий матеріал, отриманий таким методом, генетично нестабільний по відношенню до рослини-донора, проте за рахунок цього методу значно скорочується третій етап клонального мікророзмноження (вкорінення), а при використанні техніки капсулювання соматичних зародків, що являють собою повністю сформовані рослини, можна отримати штучне насіння;

в)диференціація адвентивних бруньок в первинній і пересадочній калюсній тканині. Доцільно застосовувати до генетично стабільних калюсних куль-

тур (амариліса, томатів, рису, соняшника та ін.); при пересадці на свіже поживне середовище можуть виникати генні мутації.

Оздоровлення від вірусів при мікроклональному розмноженні

Зона розповсюдження вірусів залежить від сорту і виду рослин, а також від виду вірусів. При неможливості виділення стерильного експланту застосовується попередня термо- і хемотерапія. Термотерапія можлива в умовах як *in vitro* так і *in vivo*.

Рослини поміщують в спеціальні камери. На протязі першого тижня температуру підвищують від 25°C до 37°C шляхом щоденного збільшення на 2°C.

Підтримують освітленість 5 тис.ЛК, фотоперіод 14-16 год./добу, вологість повітря в термокамері 90%. Тривалість термотерапії залежить від стійкості вірусів – 10-12 і більше тижнів. В умовах *in vitro* термотерапія на 50-60% ефективніша.

Хемотерапія – додавання в поживне середовище вірозола (противірусний препарат).

Термо- і хемотерапія економічно не вигідні, тому розробки щодо даного питання ведуться в напрямку трансгенезу.

Контрольні запитання:

1. Які традиційні способи розмноження насінневих рослин?
2. Наведіть недоліки вегетативного розмноження.
3. Що таке меристема?
4. Поясніть термін “апикальне домінування”; для чого “включають” або “виключають” цей механізм?
5. Що таке адвентивні бруньки і для чого вони слугують в біотехнологіях?
6. Як досягають противірусного оздоровлення біотехнологічного матеріалу?
7. Який принцип дії термо- і хемотерапії?
8. Наведіть методи клонального мікророзмноження.

Лабораторна робота № 6

Тема: Методики виділення та очищення біотехнологічної продукції

Мета: Ознайомлення з основними фізичними та хімічними методами виявлення біотехнологічних продуктів та із заснованими на них промисловими технологіями

Хід роботи:

- 1) Перелічити відомі методи та методики виділення цільового продукту з культуральної рідини.
- 2) З'ясувати фізико-хімічні принципи розповсюджених методик.
- 3) Вивчити технологію виробництва та очищення харчового етанолу, відзначити переваги і недоліки стандартних методів очищення.
- 4) Спроекувати варіант технологічного обладнання для виділення біотехнологічного продукту з культуральної рідини. За власним вибором довести комплектність та технічну придатність проекту.

Характеристика зернової сировини. На спирт переробляють будь зерно, в тому числі і непридатне для харчових і кормових цілей. Із зернових культур кращою сировиною для виробництва спирту є кукурудза (*Zea mays*). У ній міститься достатньо крохмалю та жиру, менше клітковини. Також широко використовується жито, пшениця, ячмінь і овес; у невеликих кількостях переробляють круп'яні культури - просо, гречку і рис, деякі продовольчі (горох) і кормові (вику). Для оцукрювання крохмалю на спиртових заводах використовується солод і ферментні препарати.

Солодом називають зерно, яке проросло у певних умовах. При проростанні в зерні утворюються амілолітичні, протеолітичні та інші ферменти. Солод на спиртових заводах одержують з ячменю, жита, пшениці, вівса і проса за наступною схемою: 1) очищення зерна; 2) замочування; 3) пророщування; 4) подрібнення; 5) змішування з водою.

Для оцукрювання крохмалю у спиртовому виробництві крім солоду використовуються ферментні препарати, отримані з міцеліальних грибів роду *Aspergillus*, бактерій *Bac. mesentericus*, *Bac. subtilis* та інших. Ці мікроорганізми утворюють α -амілазу, а деякі глюкоамілазу (фермент, що розщеплює крохмаль до глюкози). Застосування ферментних препаратів мікробного походження в спиртовій промисловості замість солоду дозволяє істотно знизити витрату високоякісного зерна на отримання солоду і сприяє підвищенню виходу спирту.

Дріжджі. У спиртовому виробництві в якості збудників бродіння використовуються дріжджі сімейства сахароміцетів. Вони продукують комплекс ферментів, під дією якого цукор сусла перетворюється на етиловий спирт і діоксид вуглецю. У спиртовому виробництві застосовують раси (різновиди, що відрізняються кількома особливостями) дріжджів верхового бродіння, що володіють високою енергією бродіння. Вони утворюють максимальну кількість спирту, зброджують моно-і дисахариди і частину декстринів. Дріжджі, що використовуються у виробництві спирту з м'яса, повинні швидко зброджувати субстрат в середовищі з високим осмотичним тиском (осмофільні дріжджі).

Спочатку дріжджі розмножують за методом чистої культури з однієї дріжджової клітини в стерильних умовах. Спиртові заводи отримують чисту культуру дріжджів і розмножують їх за певною схемою. Далі їх культивують за методом природно чистої культури, при якому створюються оптимальні умови для розвитку дріжджів (температура, рН, аерація та ін) і несприятливі для сторонніх мікроорганізмів, в першу чергу бактерій.

В якості живильного середовища для розмноження дріжджів служить сусло, що містить речовини, необхідні для їх живлення. Для пригнічення розвитку сторонніх мікроорганізмів сусло підкисляють сірчаною або молочною кислотою до рН 3,8-4,0. Температуру підтримують на рівні 28-30°C. Розмноження дріжджів здійснюють в апаратах – дріжджанках. Апарат являє собою вертикальний циліндр з конічним днищем, забезпечений двома змійовиками для нагріву та охолодження сусла. *Процес розмноження дріжджів ведуть періодичним або напівбеззупинним способами.*

При *періодичному* суслі з оцукрювачем перекачують у дріжджанку, нагрівають до 70°C і витримують при цій температурі 20 хв. з метою пастеризації. Потім охолоджують до 50°C, підкисляють сірчаною кислотою, перемішують, охолоджують до 30°C і вносять 10% дріжджів від обсягу сусли. При розмноженні дріжджів підтримують температуру на рівні 30°C, регулюючи її шляхом подачі в змішувачі дріжджанки холодної води. При зниженні концентрації сусли на 1/3 від початкової проводять відбір дріжджів. Тривалість розмноження дріжджів близько 20 год.

Напівбеззупинний спосіб розмноження дріжджів проводять в установці з двох дріжджанок і пастеризатора, в якому пастеризують, підкисляють і охолоджують сусли. Підготовлене сусли подають в одну з дріжджанок, вводять в неї дріжджі і залишають на 6-8 год при 28°C. Потім половину обсягу дріжджів переводять у другу дріжджанку і обидві доливають суслим з пастеризатора. Через 6-8 год. зрілі дріжджі з однієї дріжджанки спускають в бродильний апарат. Вільну дріжджанку миють і стерилізують, після чого половину дріжджів з другої дріжджанки переводять у вільну, доливають обидва апарати суслим з пастеризатора і процес повторюється.

Технологія виробництва спирту

Технологія спирту включає в себе такі процеси: підготовка сировини до розварювання, розварювання зерна водою для руйнування клітинної структури і розчинення крохмалю, охолодження розвареної маси і оцукрювання крохмалю ферментами солоду або культур цвілевих грибів, зброджування цукрів дріжджами на спирт, відгонку спирту з бражки і його ректифікацію.

Для приготування солоду використовують високоякісні ячмінь, жито, овес і просо. Колір ячменю світло-жовтий, допускається потемнілий; вівса білий або жовтий; проса жовтий, червоний, сірий, білий; жита жовтий і зелений різних відтінків; запах, властивий зерну, - не допускається затхлий, цвілевий та інші сторонні запахи.

Якість зерна, що йде на розварювання, не регламентується. Бажано, щоб зерно було здорове, високої крохмальності, вологістю 14-17% залежно від ку-

льтури і з невеликою засміченістю. Попередньо здорове зерно оцінюють органолептично.

Підготовка зерна. Всі види зерна, що надходить у виробництво, очищають від пилу, землі, каменів, металевих та інших домішок. Зерно, призначене для приготування солоду, звільняють також від щуплих зерен, половинок і насіння бур'янів.

Розварювання сировини – здійснюють для руйнування клітинних стінок, звільнення крохмалю з клітин і переведення його в розчинну форму, в якій він оцукрюється ферментами. Розварювання крохмальвмісної сировини проводять шляхом обробки його парою з надлишковим тиском 400-500 кПа.

При розварюванні відбувається ряд складних фізичних, фізико-хімічних і хімічних змін. При тепловій обробці в процесі розварювання йде інтенсивне набухання крохмалю, його кластеризація і перехід в розчинну форму, обумовлені інтенсивним поглинанням води. При виході розвареної маси з варильного апарату тиск знижується до атмосферного, що викликає перетворення міститься в клітинах води в пару, обсяг якого в кілька разів перевищує об'єм води. Таке різке збільшення обсягу приводить до розриву клітинних стінок сировини і перетворення його в однорідну масу. Процес розварювання супроводжується збільшенням вмісту цукрів і декстринів за рахунок часткового гідролізу крохмалю під дією власних ферментів сировини і природної кислотності. Висока температура на стадії розварювання викликає протікання процесів взаємодії цукрів з амінокислотами, термічного розкладання цукрів (карамелізація) та інших, що призводить до зниження кількості зброджують цукор.

Безперервне розварювання подрібненої сировини включає операції: дозування сировини та води, приготування замісу і розриванню в дві стадії (нагрівання замісу до температури варіння і витримка замісу при цій температурі).

Охолодження розвареної маси і її оцукрювання. При оцукрюванні охолоджену розварену масу обробляють солодовим молоком або ферментними препаратами для розщеплення крохмалю та білків. При цьому основним процесом є гідроліз крохмалю до зброджуваних дріжджами цукрів.

Готове сушло повинно містити 16-18% сухого цукру, в тому числі 13-15% зброджують цукор; кислотність 0,2-0,3 град. При пробі на йод забарвлення сушла не повинно змінюватися.

Зброджування сушла починається з моменту введення виробничих дріжджів; Під дією ферментів дріжджів йде розщеплення мальтози до глюкози, яка потім зброджується на спирт і діоксид вуглецю – основні продукти бродіння. Також утворюються вторинні та побічні продукти бродіння: вищі спирти, кислоти та ефіри. У міру зброджування моно- і дисахаридів під дією амілолітичних ферментів відбувається дооцукрювання декстринів і крохмалю, що містяться в суслі. Від швидкості цього процесу залежить тривалість бродіння.

Процес бродіння проводять в закритих бродильних апаратах для запобігання втрат спирту і виділення діоксиду вуглецю у виробниче приміщення. Герметично закритий бродильний апарат являє собою вертикальний циліндр з сферичним або конічним днищем, всередині нього встановлений зміювик для охолодження бродячого сушла.

Відгонка спирту з бражки і його ректифікація. Отримана в результаті бродіння зріла бражка в складі, крім води і спирту містить різні органічні і неорганічні сполуки: цукри, декстрини, мінеральні речовини, леткі сполуки (ефіри, спирти, альдегіди, кислоти) та ін. Склад і зміст домішок залежить від виду сировини, його якості, режимів його переробки в ході технологічного процесу.

Для виділення спирту з бражки і його очищення застосовується ректифікація. Ректифікацією називається процес поділу суміші, що складається з двох або більшого числа компонентів, киплячих при різних температурах.

Очищення спирту-сирцю від домішок виробляють в даний час переважно на ректифікаційних установках безперервної дії, в яких спирт-сирець звільняється від домішок у відповідності зі значеннями коефіцієнтів випаровування. Такі установки використовуються на лікєро-горілочних заводах, де основною сировиною є спирт-сирець.

Контрольні запитання:

1. Яка зернова сировина використовується для отримання спирту?

2. З чого виготовляють ферментні препарати для даного виробництва?
3. Перерахуйте етапи отримання спирту із зернової сировини.
4. Яке середовище необхідне для розвитку дріжджів?
5. Що являє собою солод?
6. Які переваги ферментних препаратів над солодом у спиртовому виробництві?

Лабораторна робота № 7

Тема: Вивчення технології отримання біогазу

Мета: Ознайомитися із напрямками біотехнологічних розробок та сферою їх застосування

Хід роботи:

- 1) Зробити аналіз поновлювальних джерел енергії.
- 2) Засвоїти принцип організації використання вторинної енергії.
- 3) Визначити переваги енергетичної утилізації гною.
- 4) Провести розрахунок отримання кількості енергії від біогазової установки в залежності від виду і кількості тварин
- 5) Визначити, для яких цілей можна використати отриману кількість енергетичного ресурсу.

В сучасному світі впроваджуються різноманітні біотехнології, що суттєво знижують негативний вплив виробництв на довкілля, сприяють утилізації відходів, допомагають вирішити проблеми продовольства і кормів і т.д.

Розробка поновлювальних джерел енергії – технологічна біоенергетика, сприятиме розробленню безвідходних циклічних виробничих процесів.

Біопаливо можна отримувати із етанолу, що містить вуглеводні, за допомогою дріжджів і бактерій; із водню; метаногенною асоціацією виробляється біогаз із гною та сміття; біонафта виробляється із біомаси морських одноклітинних водоростей; паливо з рослинних масел та ін. Розглянемо одне з най-

більш доступних і актуальних джерел енергії для наших кліматичних і господарських умов.

Робота дослідних установок по отриманню біогазу

Дослідна установка, яка виробляє біогаз, зокрема працює на одній із свиноферм колективного господарства "ОГРЕ" (Латвія). Проект установки виконав заступник керівника Б.С. Дубровський. Працюють два реактори: один вітчизняний, а другий – імпортований. Об'єм обох реакторів по 75 м³, вони переробляють увесь гній з ферми на 2500 свиней, даючи горючий біогаз і високоякісне добриво. Біогаз виробляється в кількості 300-500 м³ за добу.

Дана установка себе окупує і екологічно вигідна, інакше довелося б будувати гноєсховище і очисні споруди, тобто витратити великі кошти, і дуже багато енергії. Крім того, господарство отримує хороше добриво. В ньому немає, як у свіжому гної, насіння бур'янів, здатних проростати, менше треба втрачати гербіцидів, воно не має патогенної флори.

Реактор більшу частину року підігрівають так як бактерії метанового бродіння, на відміну від аеробів, при компостуванні тепла не виділяють, а працюють тільки при температурі 37-50°C.

В жаркій Індії, Китаї і деяких інших країнах нараховують мільйони біогазових установок. В "Огре" на підігрів реакторів витрачається майже половина газу, який отримується. Але навіть і в таких умовах біогазу, який залишається, вистачає, для забезпечення 1/3 енергетичних потреб ферми: тут і опалення і гаряча вода.

Вважають, що біогазова установка для свинокомплексу на 20000 голів окупиться через 5-6 років, біогазова установка може бути побудована в будь-якому господарстві із місцевих матеріалів і силами самого колективу Ферментація гною з відділенням метану і інших газів проходить в анаеробних умовах при 35-55°C. Тривалість ферментації, яка забезпечує обеззараженість гною не менше 12 діб. Ферментації підлягає як звичайний так і рідкий безпідстилковий гній, який легко подається в біореактор насосом Разом з гноєм можна використовувати сміття, стічні води, які містять органічні залишки.

Гній після ферментації зберігає свій азот, фосфор і сам майже не змінюється, якщо не рахувати води, яка випаровується і переходить в біогаз. Органічні речовини гною розкладаються на 30-40%. Деструкції підлягають легкокорозкладаючі сполуки: жир, протеїн, вуглеводи, целюлоза і лігніну, а гумусоутворюючі речовини зберігаються. Оптимізується співвідношення вуглевод - азот завдяки виділенню горючого газу-метану і вуглекислого газу. Збільшується доля аміачного азоту.

Отримане при ферментації органічне добриво має лужну реакцію (рН=7,2-8,8). Це робить добриво особливо цінним для більшості кислих ґрунтів. Досліди довели, що використання отриманого в біогазовій установці добрива збільшує врожайність різних культур не менш, як на 10-15%. Густина біогазу 1,2 кг/м³. Склад, %: метану 65, вуглекислого газу 34; сірководню 0,1; інших 1. Вміст води в біогаз при 40°C – 50 г/м³. При охолодженні вода конденсується, тому біогаз сушать; пропускаючи через теплообмінник, або прокладають труби з нахилом для її стікання у вигляді конденсату. Теплотворна здатність біогазу 23 мДж/м³ або 550 кКал/м³.

Обладнання біогазової установки

Основне обладнання простої біогазової установки – герметично закрита посудина з теплообмінником або нагрівачем. Теплоносій – вода, нагріта до 50-60°C. Насоси для введення і виведення гною і для відкачування газу.

Реактором може служити спрацювання свій строк залізнично-шляхова цистерна. Схема біореактора на базі стандартної паливної цистерни об'ємом 50м³ проілюстрована на рис. 7.1.

Внутрішні перегородки виготовляються з металу або цегли. Функція перегородок – збільшити шлях і направляти потік гною в середину реактора. Перегородки на схемі показані умовно: їх кількість і розміщення залежить від властивостей гною, його густини, кількості підстилки. Якщо добова кількість стоків гною відома, то потрібний об'єм реактора визначають, помноживши цю кількість на 12, оскільки 12 діб – мінімальний строк витримки гною в біореакторі.

Реактор наповнюють субстратом на 90%, тому отриману величину збільшують на 10%.

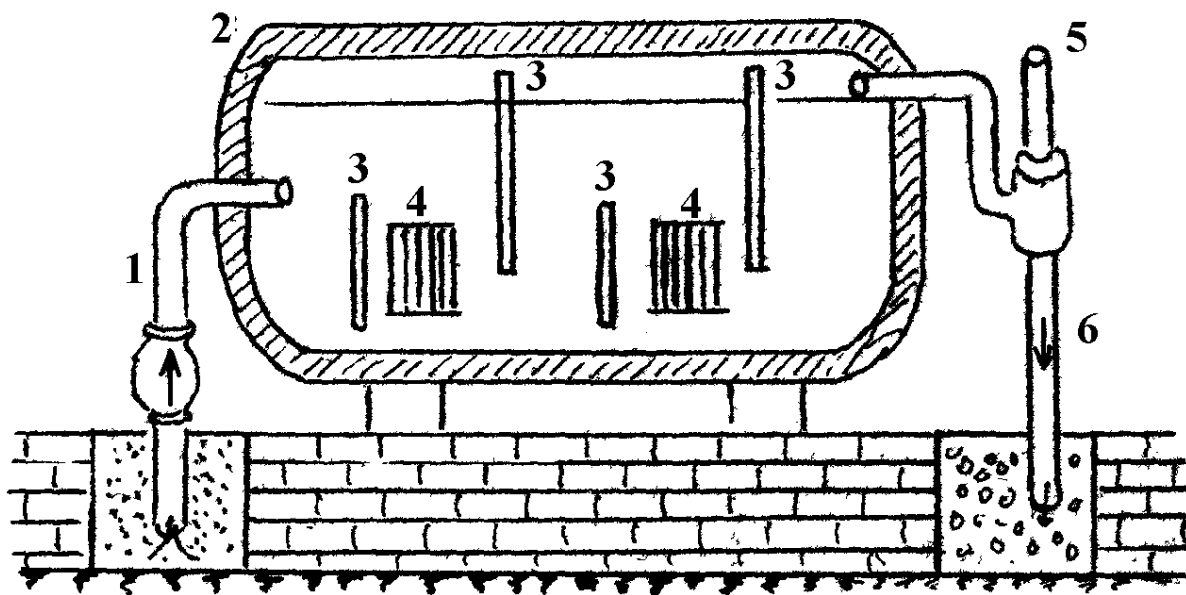


Рис. 7.1. Схема реактора для отримання біогазу: 1 – впуск гною; 2 – теплоізоляція; 3 – перегородки; 4 – теплообмінники; 5 – вихід біогазу; 6 – вихід добрива

Орієнтовна добова потужність біореактора при завантаженні гною з отриманням сухої речовини 4-8% — два об'єми біогазу на об'єм реактора. Тобто біореактор об'ємом 50 м^3 буде давати 100 м^3 біогазу на добу.

Вміст цистерни підігривають різними способами. Водонагрівальні апарати АГВ-80 – найкраще використовувати для цієї мети або АГВ-130. Ці апарати живлять біогазом, замість природного, але його потрібно відрегулювати, зменшуючи подачу повітря. Підігрів можна здійснювати за допомогою електронагрівача або кип'ятильників, використовуючи електроенергію в нічний час. Біореактор треба ретельно теплоізулювати для зменшення витрат тепла. Поставити навкруги цистерни каркас, заповнити його скловатою або шаром поліуретану. Тиск газу, який отримують в біореакторі, 100-200 мм рт. ст., достатній для його подачі на відстані до кількох сотень метрів без газодувок, вентиляторів або компресорів.

Біореактор заповнюють на 90% його об'єму субстратом і витримують його при температурі $35-40^\circ \text{C}$ не менше 12 діб. Після чого подають в реактор

нові порції субстрату і відбирають з нього відповідну кількість ферментованого добрива.

Показники роботи біогазової установки, техніка безпеки

Переробка безпідстилкового гною від 10 голів великої рогатої худоби дозволяє за добу отримати біля 20 м³ біогазу. Від 10 голів свиней 1-4 м від 10 голів овець 1-1,2 м³, від 10 кролів 0,4-0,5 м³. Одна тонна соломи дає 200 м³ газу, одна тонна комунально-побутових відходів у вигляді сміття 130 м³ газу. Підраховано, що потреба в біогазі односімейного будинку включаючи опалення і гаряче водопостачання, складає приблизно 10 м біогазу на добу, але може і значно коливатись в залежності від теплоізоляції будинку. Тепло, яке утворюється при згорянні біогазу, використовується не тільки для підігріву води в опаленні і гарячого водопостачання для приготування їжі на кухні, але і для опалювання теплиць. В літній період біогаз використовують для сушіння трави на сіно, виготовлення консервів тощо.

При живленні біогазом абсорбційного холодильника він може бути застосований для охолодження сільськогосподарської продукції: молока, молочних продуктів, м'яса та інших.

Біогаз можна також використати для отримання електроенергії при наявності необхідного обладнання. Але це менш вигідно.

Біогаз може служити джерелом отримання вуглекислого газу, для чого його пропускають крізь воду, в якій він розчиняється, а метан залишається в газі. Вуглекислий газ випускають в теплицю, як повітряне добриво, яке підвищує продуктивність рослин.

Біореактор об'ємом 50 м³ дає за добу 100 м³ біогазу, з якими на долю "товарного газу" припадає біля 70%, так як решта йде на підігрів реактора, що складає 25 тис. м³ на рік. Ця кількість еквівалентна 16,75 т рідкого палива.

Ескізу документацію на будівництво біореактора з різними конструкціями можуть підготувати інженер-механік, інженер-електрик або інженер-будівельник господарства за кілька днів. Документація повинна мати: техноло-

гічну схему установки, план розташування біореактора і теплогенератора, потік енергії і продуктів, які одержуються при роботі, трубопроводи, схему приєднання насосів, освітлюючої арматури і калькуляція.

На генплані необхідно показати основні трубопроводи, під'їзні шляхи, установка громовідводу. На рис. 7.2 наведена загальна схема біогазової установки.

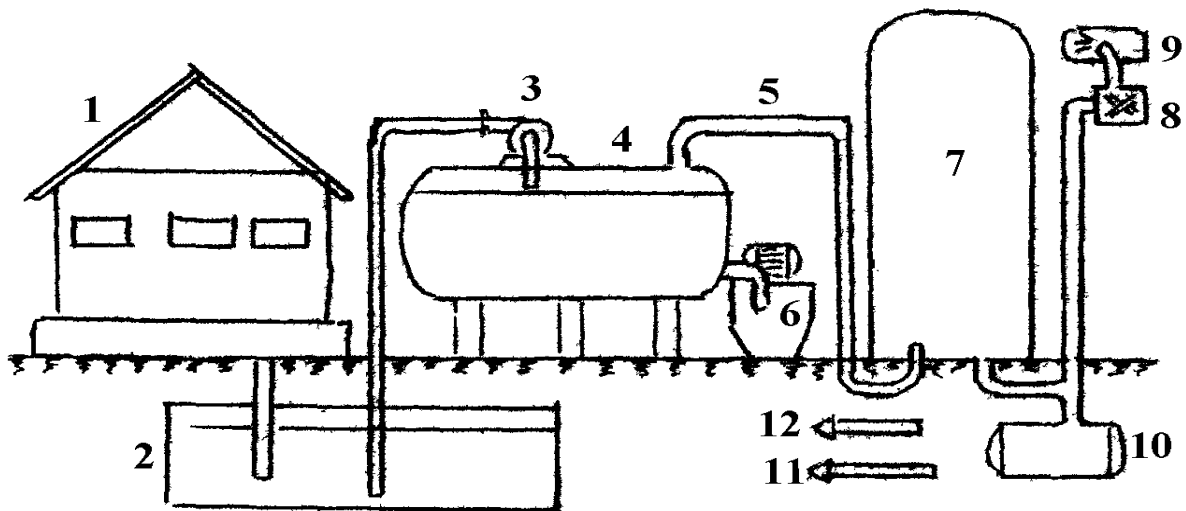


Рис. 7.2. Схематичне зображення отримання та використання біогазу: 1 – ферма; 2 – колодязь для гною; 3 – насос; 4 – біогазовий реактор; 5 – вихід біогазу; 6 – вихід добрива; 7 – сховище біогазу; 8 – пальник; 9 – тепла енергія; 10 – електроустановка; 11 – електроенергія; 12 – тепла енергія

При експлуатації біореактора необхідно дотримуватись усіх діючих норм і правил роботи з установками для згоряння природного газу. Біогаз має більш вузьку межу вибуховості, ніж природний газ: від 6 до 12%, замість від 5 до 15%. В документації потрібно передбачити вентиляцію, яка згідно СН 435-79 повинна забезпечити в приміщенні біореактора об'ємом до 300 м³ восьмикратний обмін повітря за годину.

Порядок виконання завдання

Спеціалістами-практиками підраховано, що за рахунок використання 1 м³ біогазу можна виконати:

- нагрівання 500 л води;

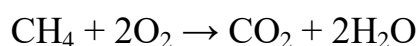
- приготування обіду на 6-7 чоловік;
- освітлення приміщення площею біля 25 м² протягом 6-8 годин;

Залишки отриманої енергії пристосувались використовувати для обігріву теплиць, тваринницьких комплексів і т.д.

Для опалення і приготування їжі на односімейний будинок площею біля 60-70 м² витрачається біля 10 м³ біогазу за добу.

Біогаз містить до 65% метану, до 35% вуглекислого газу, сліди інших газів. Для спалювання метану до пальника подається кисень, що входить до складу атмосферного повітря, приблизно можна прийняти в повітрі вміст кисню 22%, азоту – 78%. Крім того, на пальник подається ще 10% зайвого повітря (що не використовується).

Реакція горіння біогазу (метану) за участю кисню має вигляд:



16 кг 64 кг 44 кг 36 кг

Питома маса біогазу 1,2 кг/м³.

За даними варіантів (табл. 7.1) розрахувати, скільки біогазу можна отримати від наведеної кількості і виду тварин, враховуючи кількість його, що продукується за добу:

- від 10 корів – 20 м³
- 10 свиней – 1-4 м³
- 10 кролів – 0,4-0,5 м³

Враховавши, що біля 30 % отриманого біогазу використовується на підігрів реактора для стабільності протікання процесу метаногенезу, визначити оптимальне застосування тій кількості біогазу, що залишається, - в селищі чи господарстві.

Визначити необхідний об'єм реактора, враховуючи, що 10% його об'єму має бути незаповненим.

Скласти матеріальний баланс спалювання біогазу

Варіанти завдання

		Варіанти																				
Вид тварин, їх кількість		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	Корови	10	20	50	30	1500	2000															
	Свині							100	200	1000	2000	3000	5000	7000	8000							
	Кролі															5000	10000	12000	15000	18000	20000	

Приклад виконання завдання.

Варіант 16.

1. Від 10000 кролів ми отримаємо за добу кількість біогазу:

$$10000 \cdot 0,5/10 = 500 \text{ м}^3/\text{добу}$$

30% цієї кількості йде на обігрів, тоді на інші потреби залишається:

$$500 \cdot 30/100 = 150 \text{ м}^3$$

$$500 - 150 = 350 \text{ м}^3/\text{добу} \text{ – на інші потреби.}$$

Отже, можна цю кількість біогазу використати, приміром, на опалення будинків площею кожен 70 м^2 в кількості:

$$350/70 = 5 \text{ будинків.}$$

2. Об'єм біореактора, враховуючи 10% вільного місця:

$$500 + 50 = 550 \text{ м}^3.$$

3. Матеріальний баланс процесу згоряння біогазу (кг/год.):

а) визначимо, скільки необхідно спалити метану, кг (використовуючи густину біогазу):

$1,2 \cdot 500 = 600$ кг/добу або 25 кг/год спалюється біогазу, з нього метану 65%:

$$25 \cdot 65/100 = 16,25 \text{ кг/год.}$$

б) визначимо яка кількість кисню необхідна для підтримки процесу горіння:

$$16,25 \cdot 64 / 16 = 65 \text{ кг/год.}$$

Надлишок кисню 10% або 6,5 кг/год.

Так як кисню 22% в повітрі, а азоту 78%, то азоту поступає:

$$65 \cdot 100 / 22 = 295,45 \text{ кг/год.}$$

Всього використовується: $65 + 295,45 = 360,45 \text{ кг/год.}$

в) при цьому виділяється вуглекислого газу:

$$16,25 \cdot 44 / 16 = 44,68 \text{ кг/год.}$$

г) утворюється води:

$$16,25 \cdot 36 / 16 = 36,56 \text{ кг/год.}$$

Отримані дані звести в таблицю 2 по статтях балансу.

Таблиця 7.2.

Матеріальний баланс горіння біогазу

Статті балансу	Кількість, кг/год.	Кількість, %
Прихід		
Біогаз	25	
Повітря	360,45	
Всього	385,45	
Витрати		
Азот	295,45	
Вуглекислий газ	44,68	
Вода	36,56	
Кисень (надлишок)	6,5	
Всього	383,19	

Контрольні запитання:

1. Що таке “біоконверсія відходів”?
2. Які джерела енергії є вичерпними, які – відносно поновлюваними і які – умовно невичерпні?
3. Чим вигідна технологія отримання біогазу, окрім власне отримання енергії?
4. Який принцип дії біогазового реактора?
5. Яка асоціація мікроорганізмів “працює” на вироблення біогазу?

Лабораторна робота № 8

Тема: Застосування біотехнологій в системі захисту рослин

Мета: Вивчити механізм дії та переваги біологічних засобів захисту рослин перед хімічними

Хід роботи:

- 1) Розглянути (на основі набутих знань) ряд хімічних засобів захисту рослин та принцип їх дії на рослини.
- 2) Виділити недоліки хімічних засобів захисту рослин.
- 3) Визначити причини неширокого застосування біологічних препаратів в рослинництві і землеробстві.
- 4) Зробити огляд сучасного переліку біологічних засобів захисту рослин, їх особливості застосування, переваги і недоліки.
- 5) Запропонувати власну схему вирощування екологічно чистої рослинницької продукції, використовуючи біологічні методи захисту рослин.

За даними Всесвітньої сільськогосподарської організації (ФАО) в середньому загальні світові втрати від шкідливих організмів становлять близько 35% потенційної урожайності. Посівам сільськогосподарських культур, плодово-ягідним, лісовим та лісопарковим насадженням, продукції рослинництва завдають шкоди понад 400 видів шкідників. Рослини вражають 200 збудників небезпечних хвороб, поля засмічують близько 300 видів бур'янів.

Використання хімічних синтетичних сполук забруднює навколишнє середовище, погіршує здоров'я людей. З часом з'являються нові шкідники та стають більш агресивними старі, що спонукає до створення нових синтетичних препаратів для захисту рослин.

У зв'язку з цим розроблено методи захисту рослин – способи, за допомогою яких здійснюється захист рослин (організаційно-господарські, (агротехнічні, селекційні, фізичні, біологічні, хімічні та інші). Сучасний агробіоценоз пот-

ребує обов'язкового використання пестицидів. Подальша інтенсифікація хімічних методів захисту може призвести до критичних, недопустимих наслідків.

Оскільки Україна спрямована на інтеграцію в ЄС, вступу в СОТ та входу в світовий ринок органічної продукції рослинництва і тваринництва, вироблених за біологічними технологіями без використання пестицидів, біологічний метод є основним стратегічним еколого-біологічним заходом контролю шкідливих організмів в посівах сільськогосподарських культур та органічного землеробства.

Оптимальним вирішенням питання безпечного для середовища захисту рослин є використання біотехнологій в даній системі. Агресивні хімічні синтетичні пестициди для боротьби зі шкідниками можливо замінити біологічними: живими клітинами мікроорганізмів (бактерій, актиноміцетів, грибів), живими організмами (хижаками і паразитами шкідників і збудників хвороб) або продуктами їх життєдіяльності. Для цього необхідно розвивати мережу біолабораторій.

Організація біозахисту рослин від хвороб – дещо складніше питання. Насамперед це антибіотики, які здатні пригнічувати широке коло патогенів (гриби, бактерії і мікоплазми). Хоча антибіотики є продуктом біотехнологій, все ж їх важко назвати біологічними засобами захисту рослин. Вони мають всі недоліки і переваги хімічних пестицидів. Для запобігання негативних наслідків застосування антибіотиків використовують мікроорганізми – продуценти антибіотиків.

Для **боротьби з комахами-шкідниками** ефективно використовувати етомоакарифаги, які є найбільш ефективними в комплексі з іншими корисними організмами.

Trichogramma West. – паразит яєць більш ніж 60 шкідників (комплекс совок, кукурудзяного метелика, інших лускокрилих).

Застосування трихограми. Сигналом для розселення паразита слугують феромонні пастки, а також візуальні спостереження і обліки. Розселення трихограми (на стадії імаго або і вигляді паразитованих яєць лабораторного господа-

ря за 12-24 год. до відродження дорослих комах) здійснюється в ранкові (з 5 до 10) або вечірні (з 18 до 22) години. Норма випуску: 100.000 - 400.000 особин/га.

Encarsia formosa Gah. - ентомофаг, внутрішній паразит личинок білокрилки. Рекомендується для застосування в закритому ґрунті. Личинка паразита живиться гемолімфою господаря і заляльковується всередині його оболонки.

Оптимальні фактори розвитку, плодючості і активності самок: температура +27.....+30 °С, відносна вологість повітря 70%, довжина світлового дня 14-17 год.

Доросла комаха переміщується на відстань 10-15 м від точки випуску. Лялечок енкарзії розкладають через 2-3 м з розрахунку 3-5 особин/м².

Aphidoletes aphidimyza Rond. (галлиця) – рекомендується для використання в закритому ґрунті, живиться солодкими виділеннями тлі. Самки відкладають в колонії тлі яйця, з яких виходять личинки, в слині яких містяться ферменти, які паралізують жертву. Особливо ефективна галлиця в літньо-осінні періоди на овочевих культурах, як в комплексі з паразитами, так і самостійно.

Колонізацію хижака починають з появою перших вогнищ тлі, і проводять щотижня доти, поки відношення личинок галлиці і тлі в колоніях на рослинах не досягне 1:5. Приблизна норма випуску 100000-500000 коконів/га за період вегетації рослин.

Aphidius colemani Vier. – також паразит різних видів тлі. Самка афідіуса відкладає яйця в тіло тлі, де з них розвиваються личинки, перетворюючи господаря на мумію. Паразит гарно літає (до 80 м в радіусі від місця випуску). Оптимальні умови розвитку: температура +25°С, відносна вологість повітря 80%.

Застосовують афідіуса на молодих рослинах, випускають щотижня. Розрахунок – не менше 1 самки паразита на 20-30- тлей. При грамотній інтродукції знищує популяцію шкідника за 20-30 днів.

Amblyseius mckenziei Sch. et Pr. (амблісейус) - хижий кліщ. Живиться кліщами, трипсами. Стійкий до високих температур. Температурні зони оптимального розвитку тютюнового трипса и амблісейуса співпадають і знаходяться в інтервалі +25...+30 °С. Достатньо однократного випуску хижака при опе-

ративній сигналізації строків появи шкідника та обліку кількості пошкоджених рослин і чисельності трипса.

Інтродукцію хижака проводять недалеко від вогнища розмноження шкідника, витримуючи співвідношення хижак : жертва от (: 1 до 5 : 1), висипаючи висівки, що були субстратом для розмноження, під стебло або на листок біля вогнища розміщення шкідника.

Phytoseiulus persimilis Ath. - Н. (хижий кліщ) – найширше використовується для боротьби з павутинним кліщем на овочевих і декоративних культурах. Швидко розмножується (від яйця до статевозрілої особини – 6-10 днів). За добу самка знищує більш ніж 20 кліщів, відкладаючи 2-6 яєць. Живе самка 18-25 діб. З відкладених фітосейулюсом яєць витходять прудкі личинки, які доїдають колонію шкідника. Особливості живлення і розмноження фітосейулюса надзвичайно швидко призводять до знищення основної маси шкідника, їх дію можна порівняти з дією хімічних препаратів. Висока ефективність при значній вологості і помірних температурах.

Застосовують два способи колонізації хижака: вогнищевий і масовий, зважаючи на чисельність шкідника та ступінь ушкодження рослин. При слабкій заселеності павутинним кліщем норми випуску: 10...20 особин на рослину, при середній – 30...50. При значній заселеності кількість випущених хижаків повинна скласти в вогнищі співвідношення 1 : 10...1 : 20.

В сільськогосподарській практиці для **боротьби з хворобами рослин** застосовують наступні мікробіологічні препарати:

Нематофагін у препаративній формі культуральної рідини, що містить спори і міцелій хижого гриба *Arthrobotrys oligospora*.

Рекомендується для захисту рослин від галових нематод.

Хижі гриби можуть тривалий час розвиватись як сапрофіти в ґрунті або на рослинних залишках, живлячись органічними рештками і засвоюючи мінеральні сполуки азоту.

Застосування нематофагіну:

1. Внесення в ґрунт перед посівом. Норма витрати: 100 - 300 мл препарату/10 л води.

2. Внесення в ґрунт перед посадкою на глибину 15-20 см. Норма витрати: 1-3 л препарату/100 м².

3. Внесення в лунки при посадці. Норма витрати: 5-10 мл препарату/рослину.

4. Внесення в ґрунт на глибину 15-20 см у вогнищах враження при вегетації. Норма витрати: 20 - 30 мл препарату / растение.

Триходермін у препаративній формі культуральної рідини, що містить спори і міцелій гриба-антагоніста *Trichoderma lignorum*, та продуковані культурою гриба біологічно активні речовини.

Рекомендується для захисту від широкого спектра грибних і бактеріальних захворювань.

Застосування триходерміну:

Зернові колосові культури:

Передпосівна обробка насіння. Норма витрати: 2-15 л препарату/т насіння в залежності від культури.

Овочеві та квітково-декоративні культури:

1. Передпосівна обробка насіння. Норма витрати: 20 мл препарату / кг насіння.

2. Внесення в поживну суміш при посіві. Норма витрати: 2 мл препарату/ вазон.

Плодово-ягідні культури:

Оббризкування рослин від фази розпускання бруньок кожні 10-20 днів, в залежності від прогнозу на розвиток хвороби. Норма витрати: 100 мл препарату/ 10 л води або 5 л/ га.

Виноградник:

Обприскування рослин, починаючи з фази розпускання бруньок, кожні 10-20 днів в залежності від прогнозу на розвиток хвороби. Норма витрати: 50 мл препарату/ 10 л води або 2- 3 л /га.

Триходермін можна суміщати з прикореневим та позакореневими підживленнями мікроелементами.

В системі біологічного захисту рослин також використовуються препарати:

Вертициллін – застосовується для захисту сільськогосподарських і квітково-декоративних культур закритого ґрунту від тепличної білокрилки і різних видів тлі.

Боверин - застосовується для захисту сільськогосподарських і квітково-декоративних культур закритого ґрунту від тепличної білокрилки і трипсів.

Пентафаг-“С”- застосовується для профілактичної і лікувальної дії проти широкого спектру бактеріозів плодових і овочевих культур, пригнічує бактеріальний рак, знижує враженість мучнистою рососою і паршою.

Планріз – для захисту від кореневих гнилей, інших грибних і бактеріальних захворювань.

Гаупсин – для захисту від хвороб листового апарата і плодових гнилей; має інсектицидну активність по відношенню до гусениць молодшого віку.

Бітоксипациллін – ефективний при використанні проти листогризух, висмоктуючих і плодопошкоджуючих шкідників.

Лепідоцид – для захисту рослин від гусениць молодшого віку більш ніж 40 видів лускокрилих шкідників.

Бактороденцид – застосовується для боротьби з найбільш масовими і шкодочинними видами гризунів – різними видами мишей.

Контрольні запитання:

1. Чим викликана потреба звернутись до біологічних засобів захисту рослин?
2. Яка специфіка дії антибіотиків?
3. Які ентомоакарифаги ви знаєте?
4. З чого готують мікробіологічні препарати для захисту рослин?
5. Як “працює” фітосейулюс” у вогнищі шкідника?

Лабораторна робота № 9

Тема: Використання біотехнологій для покращення якості кормів та їх засвоюваності

Мета: Вивчити основні напрямки використання ферментних та мікробних препаратів

Хід роботи:

- 1) Розглянути необхідність сільського господарства у ферментних препаратах.
- 2) Дослідити біологічну дію ферментних препаратів.
- 3) Запропонувати схему годування певного виду сільськогосподарських тварин з використанням ферментних препаратів (вид корму – ферментний препарат та його кількість).

Важливим напрямком сучасної біотехнології є отримання на основі культивування мікроорганізмів і використання в сільському господарстві різноманітних ферментних препаратів, які можуть застосовуватися в процесі приготування кормів для сільськогосподарських тварин як добавки до кормів задля покращення їх засвоюваності, а також у ветеринарії для профілактики і лікування шлункових і паразитарних захворювань.

Основний компонент кормів сільськогосподарських тварин – рослинна продукція (зерно, силос, грубі корми та ін.) містить доволі багато важкоперетравлюваних речовин, - клітковина, лігнін, геміцелюлоза. Навіть у жуйних тварин, які мають у передшлунку (рубці) активні штами целюлозорозкладаючих мікроорганізмів, клітковина перетравлюється на 40-65%. Рослинні білки перетравлюються на 60-80%, ліпіди – на 60-70%, крохмаль і поліфруктозиди – на 70-85%.

Для покращення перетравності і підвищення ефективності використання рослинних кормів в раціони сільськогосподарських тварин вводять ферментні препарати (0,1-1,5% від сухої маси корму), отримані з мікроорганізмів і вміщуючі активні компоненти гідролітичних ферментів. Препарати мікробних фе-

рментів отримують із культур бактерій або мікроскопічних грибів (табл. 9.1). ферментні препарати позначаються буквеним і цифровим індексом. Буква “Г” в назві препарату вказує на те, що він отриманий із культуральної рідини при глибинному способі вирощування мікроорганізмів; “П” – що препарат отриманий з поверхневої культури мікроскопічних грибів. Індекс “2” в назві препарату означає, що це концентрований сироп, “3” – сухий ферментний препарат, “10” – очищений ферментний препарат, “Пх” – висушена поверхнева культура грибів.

Рубець тварин – це високоефективна природна система безперервного культивування анаеробних мікроорганізмів – бактерій (*Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Eubacterium* та ін.) і найпростіших (*Diplodinium*, *Entodinium*, *Ophryoscolex*, *Isotricha* та ін.). Слизова оболонка не утворює власних ферментів і процес перетравлювання їжі відбувається з допомогою ферментних білків, виробляємих мікроорганізмами. Внаслідок цього гідролізуються складні вуглеводи, білки і ліпіди, зброджуються моносахариди. Таким чином забезпечується енергія для життєдіяльності тварин і хід біосинтетичних процесів. Самі мікроорганізми перетравлюються в рубці і стають джерело повноцінних білків, незамінних амінокислот, поліненасичених жирних кислот вітамінів.

Таблиця 9.1.

**Найважливіші ферментні препарати, що застосовуються
в сільському господарстві**

Назва препарату	Область застосування
Амілосубтилін ГЗх	Додавання в кормові раціони сільськогосподарських тварин і птахів; отримання ферментних гідролізатів; лікування і профілактика шлункових, паразитарних захворювань
Протосубтилін ГЗх	Додавання в кормові раціони сільськогосподарських тварин, птахів і риби; отримання ферментних гідролізатів; лікування і профілактика шлункових, паразитарних захворювань
Глюкавамарин Пх	Додавання в кормові раціони телят і ягнят, свиней, ВРХ, при силосуванні картоплі, бобових трав; для отримання соломоконцентратів
П10х	Додавання в кормові раціони молодняку свиней і ВРХ
Пектаваморин Пх	Додавання в кормові раціони сільськогосподарських тварин і птахів; при силосуванні соломи, бобових трав, картоплі
П10х	Додавання в кормові раціони ВРХ, лікування і профілактика

	паразитарних захворювань птахів
Пектофоетидин ГЗх	Додавання в кормові раціони сільськогосподарських тварин і птахів; гідроліз рослинних відходів; отримання соломоко-нцентратів; силосування бобових трав
П10х	Гідроліз дріжджів
Амілоризин Пх	Додавання в кормові раціони ягнят і при відгодівлі свиней; силосування картоплі
Дріжджелітин ГЗх	Отримання ферментативних гідролігатів
Целловіридин ГЗх	Додавання в кормові раціони ВРХ і птахів; гідроліз рослинних відходів; силосування соломи, бобових трав
Глікозидаза ГЗх	Додавання в кормові раціони сільськогосподарських тварин і птахів; отримання ферментативних гідролігатів
Лізосубтилін Г10х	Отримання ферментативних гідролігатів; лікування паразитарних захворювань ВРХ
Протезим Г10х	Додавання в кормові раціони свиней і птахів
Лізоцеллюлозин Г10х	Гідроліз дріжджів і рослинних відходів; додавання в кормові раціони птахів
Лізогризеїн Г10х	Гідроліз дріжджів і рослинних відходів
Мальтаваморин Г10х	Гідроліз рослинних відходів
Целлолігнорин Пх	Гідроліз рослинних відходів
Целлокандин ГЗх	Гідроліз рослинних відходів; силосування соломи, бобових трав
Лізоцим ГЗх	Додавання в кормові раціони сільськогосподарських тварин і птахів; лікування і профілактика паразитарних захворювань

При втіленні в природну екосистему ШКТ тварин традиційним шляхом та методом мутагенезу і клонування генів високоактивних штамів мікроорганізмів, здатних до покращення перетравлюваності целюлози та ін. речовин, зверхсинтезу незамінних амінокислот і вітамінів забезпечується підвищення продуктивності тваринництва, що означає вирішення світової проблеми під назвою “нагодувати людство”.

Мікробні ферментні препарати широко використовуються для лікування і діагностики багатьох захворювань сільськогосподарських тварин. Деякі ферменти руйнують клітинну оболонку, тому застосовуються для лікування сальмонельозу і популорозу у птахів, ендометритів у корів та ін. Вони випуска-

ються промисловістю у вигляді препаратів лізоциму ГЗх, глікозідази ГЗх, лізо-субтиліну Г10х, мальтавомарину Г10х, дріжджелітину ГЗх.

Амілосубтилін ГЗх і *протосубтилін ГЗх* впливають на редуційну здатність бактерій в шлунково-кишковому тракті тварин, кількість і рухливість інфузорій, перетравлення целюлози та ін. вуглеводів; ці препарати використовуються для профілактики і лікування шлункових захворювань, зокрема атоній передшлунків у жуйних тварин. Ферменти вказаних препаратів також викликають гідроліз оболонок яєць гельмінтів.

Виготовляють мікробні препарати на основі пропіоновокислих, ацидофільних бактерій і азотобактерій.

Пропіовіт – в 1 г препарату міститься 4-6 млрд. бактерій і 80-100 мкг вітаміну В₁₂; застосовується для профілактики і лікування хвороб шлунково-кишкового тракту в телят, поросят, курчат. Нормалізує ріст і підвищує стійкість сільськогосподарських тварин до інфекційних захворювань.

Пропіацид і азотацид – сприяють формуванню в ШКТ тварин врівноважених біоценозів, ефективні при дисбактеріозах.

В раціоні ВРХ значну питому вагу займають соковиті і грубі корми, багаті клітковиною, пентозанами, пектиновими речовинами, які значно краще перетравлюються при додаванні в корм ферментних препаратів з активним комплексом гідролітичних ферментів пектофоетидин ГЗх і целловіридин ГЗх (1:1), амілосубтилін ГЗх і глюкаваморин Пх. При цьому знижується витрата кормів на 8-10%.

Позитивний вплив при відгодівлі свиней, особливо молодняка, чинять ферментні препарати з амілолітичною і протеолітичною активністю – амілосубтилін ГЗх, протосубтилін ГЗх, амілоризин Пх, глюкаваморин Пх, протезим ГЗх.

Травні залози птахів не утворюють ферментів, каталізуючих гідроліз клітковини і пектинових речовин, а мікрофлора кишківника малочисельна, тому в їх кормові раціони додають ферменти з целюлолітичною, пектолітичною і протеолітичною активністю, що підвищує яйценосність та приріст ваги, і зменшує витрату кормів.

При годуванні риб в раціони додають протосубтилін ГЗх, амілосубтилін ГЗх, пектаваморин Пх.

При силосуванні зеленої маси бобових трав, соломи, картоплі і при приготуванні соломоконцентратів також доцільно додавати ферментні препарати. Це сприяє більшому утворенню цукрів, що сприятливо для життєдіяльності молочнокислих бактерій, а отже – знижуються втрати поживних речовин та підвищується якісна цінність корму.

Ферментні препарати використовують в процесі отримання заміника цільного молока для молодняку ВРХ із кормових дріжджів, які піддаються гідролізу. В результаті гідролізу руйнується клітинна оболонка дріжджових клітин і мікробна біомаса переводиться в легкозасвоювану форму, підвищується вміст розчинних вуглеводів, незамінних амінокислот і поліненасичених жирних кислот.

Контрольні запитання:

1. В чому полягає біологічна дія ферментних і мікробних препаратів, що використовуються в тваринництві?
2. Особливості системи травлення жуйних тварин.
3. З чого організм тварин бере вітаміни?
4. Джерелом чого для ВРХ та ін. сільськогосподарських тварин є дріжджі?
5. Що є сировиною для виготовлення ферментних препаратів?
6. За рахунок чого мікробні ферментні препарати можна використовувати для профілактики і лікування сільськогосподарських тварин?
7. Який саме елемент сучасних біотехнологій присутній сьогодні у виготовленні ферментних препаратів?
8. Які ферментні препарати ви знаєте?

Список рекомендованої літератури

1. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ, 2014. 247 с.
2. Герасименко В. Г., Герасименко М. О., Цвіліховський М. І. Біотехнологія. К. : Фірма „ІНКОС”, 2006. 647 с.
3. Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин. Вінниця, 1998. 24 с.
4. Мостіпан М. І. Біотехнологія в рослинництві: Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 8.130102 “Агрономія”. Кіровоград : КНТУ, 2008. 24 с.
5. Дігтяр С. В., Єлізаров М. О., Мазницька О. В., Никифорова О. О. Галузі сучасної біотехнології : підручник для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія». Кременчук : ПП Щербатих О.В., 2021. 184 с.
6. Кривошей Ю. І. Біотехнологія : методичні вказівки до лабораторно-практичних занять для студентів агрономічних спеціальностей Кіровоград: КНТУ, 2006. 28 с.
7. Горова А.І., Лисицька С. М., Павличенко А. В., Скворцова Т. В. Біотехнології в екології : навч. посібник. Дніпропетровськ : Національний гірничий університет, 2012. 184 с.
8. Сатарова Т. М., Араїмова О. Є., Вінніков А. І., Черенков А. В. Біотехнологія рослин : [навчальний посібник]. Дніпропетровськ : Адверта, 2016. 136 с.

СЛОВНИК ТЕРМІНІВ

Адвентивні бруньки – бруньки, які утворюються не в пазусі листка, а в інших місцях тіла рослини. Можуть виникати з довільної групи живих клітин, які набувають здатності ділитися.

Андрогенез - отримання гаплоїдних рослин на штучному живильному середовищі із ізольованих пиляків і пилку.

Біотехнологія – напрямок сучасної науки і техніки, основним завданням якого є використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві. Термін “біотехнологія” походить від грецьких слів “bios” – життя, “techne” – майструвати, “logos” – вчення. Отже, це науковий напрямок, який поєднує можливості біології і техніки, коли біологія стає основою численних технологій.

Біотехнологія рослин – це сукупність технічних прийомів для модифікації, покращення, створення та розмноження рослинних організмів, одержання з них корисних речовин.

Вектор – молекула ДНК, що має здатність до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку можна ввести додатковий фрагмент чужорідної ДНК і надалі забезпечити його реплікацію (як вектор можна використовувати плазмід).

Генетична трансформація – перенесення чужорідних генів та інших носіїв спадковості у клітини рослин, тварин і мікроорганізмів, отримання трансгенних організмів з новими або покращеними властивостями і ознаками.

Дедиференціація – перехід спеціалізованих клітин до проліферації.

Диференціація – комплекс процесів. Які приводять до відмінностей між дочірніми клітинами, а також між материнськими і дочірніми клітинами.

Експлантат – фрагмент тканини або органа, який культивують на живильному середовищі самостійно або для отримання первинного калюсу.

Електропорація – метод перенесення генів у ізольовані протопласти за допомогою електричного розряду, який викликає утворення пор в клітинній мембрані.

Ізольований протопласт – це рослинна клітина, позбавлена клітинної стінки ферментативним або механічним способом.

Калюс – тканина, що виникла в результаті неорганізованої проліферації клітин органів рослин.

Клітинна селекція – один із важливих напрямків в біотехнології рослин. Відбір клітинних ліній і рослин з цінними спадковими ознаками відбувається на рівні клітин, що культивуються *in vitro* в селективних умовах.

Клон – сукупність генетично однорідних клітин (особин), що виникла в результаті ділення однієї клітини.

Кріобіологія (від грецького *kryos* – холод, мороз, лід) – розділ біології, який вивчає дію на живі системи низьких та наднизьких температур (від 0⁰ С до абсолютного нуля).

Культура клітинних суспензій – вирощування окремих або невеликих агрегатів у завислому (суспендованому) стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, яка забезпечує їх аерацію і перемішування.

Меристемоїди – це морфогенетично компетентні клітини, які відповідають на індуктори диференціації і склад середовищ формуванням пагонів, коренів, зародка.

Мікроклональне розмноження - це безстатеве вегетативне розмноження в культурі *in vitro* , при якому отримують рослини генетично ідентичні вихідній батьківській формі, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу.

Мітохондріон – сукупність генетичного матеріалу мітохондрій клітини.

Органогенез – процес виникнення в калюсній тканині зачатків органів (коренів і пагонів).

Парасексуальна гібридизація – див. соматична гібридизація.

Парасексуальний гібрид – див. соматичний гібрид.

Плазміда – невелика кільцева молекула ДНК, здатна до стабільного, незв'язаного з хромосомами існування і автономної реплікації (біосинтез дочірніх

ДНК). Плазміді можуть вбудовуватися у хромосоми. Плазміді локалізовані в цитоплазмі бактеріальних клітин і клітинах деяких дріжджів.

Плазмон – сукупність генетичного матеріалу клітини; включає, зокрема, гени пластид (пластом) і мітохондрій (мітохондріон), тобто всі гени, які знаходяться поза ядром.

Пластом – сукупність генетичного матеріалу пластид клітини.

Проліферація – новоутворення клітин і тканин шляхом розмноження.

Протокорми – особливі ембріональні структури у орхідей, які здатні до вегетативного розмноження.

Регенерант – рослина, яка виникла в результаті морфогенезу в культурі ізольованих тканин/клітин рослин.

Рекомбінантна ДНК – ДНК, яка утворюється коли ділянки ДНК одного чи різних організмів об'єднуються за допомогою ферментів.

Рекомбінантний ген – ген, який складається із компонентів різних генів.

Рекомбінація – зміна положення генів у хромосомах.

Рослина-регенерант – див. регенерант.

Соматональні варіації і варіанти – фенотиповий прояв непостійності геномів ядра та органел рослинних клітин. Від справжніх мутацій відрізняються більшою частотою виникнення та комплексністю змін (зміни в структурі генів, хромосом, геномів).

Соматична гібридизація – гібридизація рослин в обхід статевого схрещування, при якій як батьківські клітини використовують ізольовані протопласти соматичних клітин або клітини, що культивуються *in vitro*.

Соматичний гібрид – гібридна рослина, отримана шляхом гібридизації соматичних клітин.

Соматичний ембріогенез – це формування зародкоподібних структур (ембріодів) із соматичних клітин в умовах *in vitro*, які при перенесенні на відповідне живильне середовище здатні розвиватися у цілу рослину.

Субкультивування – перенесення трансплантата на свіже живильне середовище.

Суспензійна культура – див. культура клітинних суспензій.

Тотипотентність – властивість соматичних клітин рослин повністю реалізувати свій потенціал розвитку за певних умов вирощування.

Трансгенні організми – мікроорганізми. Тварини або рослини з новими ознаками, що кодуються чужорідними генами, які введені у ці організми за допомогою техніки генної або клітинної інженерії.

Трансплантат – частина калусної або суспензійної культури, яку використовують для перенесення на свіже живильне середовище.

Трансформація – передавання нової генетичної інформації клітині-реципієнту від клітини-донора за допомогою ДНК.

Хондріон – див. мітохондріон.

Цибрид – див. цитоплазматичний гібрид.

Цитоплазматичний гібрид – гібрид, який успадкував ядро (ядерні гени) одного з батьків поряд з цитоплазматичними генами обох батьків, або альтернативного батька.

Цитоплазмон – див. плазмон.

IN VITRO – вирощування живого матеріалу “у склі”, на штучних живильних середовищах, в стерильних умовах.

IN VIVO – вирощування живого матеріалу в природних умовах.