

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБОУ ВО НОВОСИБИРСКИЙ ГАУ
Агрономический факультет
Кафедра защиты растений

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Методические указания
к лабораторно-практическим занятиям,
контрольной и самостоятельной работе

Новосибирск 2016

УДК 632.937.147
ББК 44
Ш 907

Биотехнология в защите растений: Методические указания к лабораторно-практическим занятиям, контрольной и самостоятельной работе / Сост.: М.В. Штерншис, Т.В. Шпатова, И.В. Андреева - Новосибирск, 2016. -26 с.

Рецензент: Р.Р. Галеев, д-р с.-х. наук

Методические указания предназначены для студентов 4-го курса Агрономического факультета защиты по направлению 35.03.04 – Агрономия.

Утверждены методической комиссией факультета защиты растений (протокол № 8 от 14 октября 2016г.).

ВВЕДЕНИЕ

Защита растений от вредных организмов является одной из сфер приложения современной биотехнологии. Выделяют три основные проблемы защиты растений, которые решаются методами биотехнологии: 1) получение генетически модифицированных сортов растений, устойчивых к вредным организмам (с использованием методов молекулярной генетики); 2) создание биологических средств защиты растений (с использованием методов микробиологии, биохимии и технической энтомологии); 3) разработка методов и средств диагностики объектов защиты растений (с использованием методов клеточной и молекулярной биологии).

Формируемые компетенции при изучении данной дисциплины:

Общепрофессиональные компетенции (ОПК):

- способностью использовать основные законы естественно – научных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования (ОПК-2)

Профессиональные компетенции (ПК):

– Способностью применять современные методы научных исследований в агрономии согласно утвержденным планам и методикам (ПК-2)

Цель – формирование знаний и умений по биотехнологическим методам защиты растений.

Основные знания и умения: *знать* ассортимент трансгенных растений, устойчивых к вредителям и болезням, технологию выращивания растений из клеток, тканей и органов, биотехнологические методы диагностики фитопатогенных и энтомопатогенных вирусов, бактерий и грибов, биотехнологию получения регуляторов роста растений, основы культивирования искусственных популяций насекомых, основы получения и применения биопрепаратов для защиты растений; *уметь* определять титр спор бактериальных и грибных биопрепаратов, оценивать качество биопрепаратов, составлять технологические схемы производства биологических средств защиты растений и массового размножения насекомых и клещей.

ЗАНЯТИЕ 1

БИОПРЕПАРАТЫ КАК ОСНОВНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

В защите растений все большее значение приобретают биопрепараты, производство которых осуществляется биотехнологическими методами. Так, препараты против вредителей сельскохозяйственных (лесных, декоративных) культур создаются на основе энтомопатогенов, являющихся элементами природного биоценоза. В зависимости

от природы их разделяют на вирусные, микроспоридиальные, бактериальные, грибные и др. Биопрепараты, используемые против болезней растений, производят на основе антагонистов и гиперпаразитов возбудителей заболеваний, антибиотиков, подавляющих развитие фитопатогенов. Имеется опыт создания и применения микрогербицидов для регуляции численности сорняков. В последнее время против вредителей и возбудителей болезней растений используются препараты на основе биологически активных веществ (БАВ) (аллелопатиков). К ним относятся, например, антибиотики, микробные токсины (метаболиты) и другие продукты жизнедеятельности живых организмов. Их получают, например, путем экстракции из культуральной жидкости при глубинном способе размножения микроорганизмов – продуцентов.

Цель: Познакомиться с микроорганизмами, являющимися основой биопрепаратов, закрепить теоретический материал.

Основные термины:

Биопестицид - это биопрепарат, средство борьбы с вредителями, фитопатогенами и сорняками, активным ингредиентом которого являются агенты биологической природы.

Биотехнология – наука об использовании механизмов функционирования живой клетки для получения высокоэффективных форм живых организмов с заранее заданными свойствами, полезными для хозяйственной деятельности человека.

Культивирование – выращивание микроорганизмов или отдельных клеток растений и животных.

Учебные материалы и оборудование: учебные пособия «Биотехнология в защите растений» - электронный ресурс на сайте ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ, «Биопрепараты в защите растений», «Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации» за текущий год.

План занятия:

1. На основании учебных пособий, материалов лекций и «Списка разрешенных препаратов...» заполнить табл1.

2. Ответить на контрольные вопросы.

Таблица 1. Микробиологические препараты для защиты растений

№ п/п	Препарат, препаративная форма	Микроорганизм-продуцент	Основа препарата	Назначение препарата	Примечание
Энтомопатогенные биопрепараты					
1	Лепидоцид, стабилизированный порошок	Бактерия <i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i>	Споры, кристаллический дельта-эндотоксин	Против гусениц чешуекрылых вредителей	*
2					
...					
Биопрепараты для борьбы с фитопатогенами					
1.	Планриз, Ж	Бактерия <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Вегетативная стадия (бактерии)	-
2					
...					

* Наличие или отсутствие в «Списке разрешенных препаратов» в настоящее время.

◆ **Контрольные вопросы:**

1. Назовите биопрепараты на основе спорообразующих бактерий.
2. Перечислите препараты, в состав которых входят помимо спор токсины и антибиотики.
3. Назовите препараты на основе микробных метаболитов.

ЗАНЯТИЕ 2

ОСОБЕННОСТИ ПРОИЗВОДСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ БИОЛАБОРАТОРИИ

Производство микробиологических препаратов осуществляется в рамках биотехнологического процесса. Активным началом в биотехнологических процессах является биологический агент. Самым традиционным биологическим агентом является микробная клетка. Особенности биопрепаратов на основе живых организмов связаны с природой организма - продуцента. Так, для получения грибных и бактериальных препаратов микроорганизмы культивируют на питательных средах (ПС) тремя способами: 1) поверхностный; 2) глубинный; 3) глубинно-поверхностный. Особую группу составляют препараты на основе вирусов, поскольку они являются облигатными патогенами и их нельзя получать на ПС. Так, вирусные энтомопатогенные препараты получают путем культивирования вирусов на живых насекомых.

Цель: ознакомиться со способами производства биопрепаратов в зависимости от их природы.

Основные термины:

Биологический агент (агент биологической защиты)- полезный организм, используемый в биологической защите растений от вредных видов, основа биопрепаратов.

Учебные материалы и оборудование: методические указания по производству биопрепаратов, учебные пособия «Биопрепараты в защите растений», «Биотехнология в защите растений», плакаты.

План занятия:

Описать и зарисовать схемы производства бактериальных, грибных и вирусных препаратов.

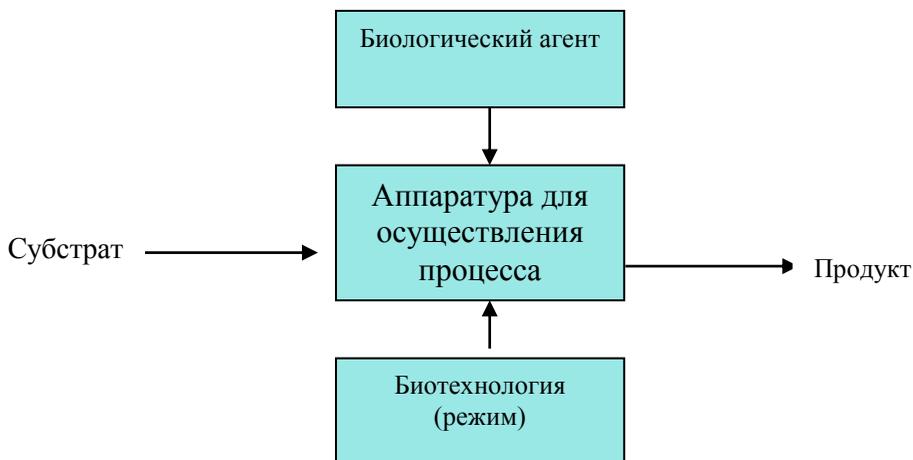


Рис. 1. *Схема биотехнологического процесса получения биопрепаратов*

◇ **Контрольные вопросы:**

1. *Перечислите способы наработки препаратов для защиты растений.*
2. *Дайте характеристику глубинно-поверхностному способу получения биопрепарата.*
3. *Приведите основные принципы, которые требуются для составления технологической карты производства биопрепарата.*

ЗАНЯТИЕ 3

СТАНДАРТИЗАЦИЯ БИОПРЕПАРАТОВ

Биологические препараты, получаемые методами биотехнологии, должны отвечать определенным требованиям, т.е. быть стандар-

тизованы. Стандартизацию и оценку качества биопрепаратов проводят по количеству действующего начала (споры, включения, клетки, метаболиты) в единице массы или объема и по биологической активности.

Для определения количества действующего начала (*титр препарата*) используют разные методы в зависимости от природы действующего агента. Так, количество жизнеспособных спор или клеток определяют посевом препарата на питательную среду (ПС) с дальнейшим подсчетом выросших колоний. Титр вирусных препаратов (и других организмов, не размножающихся на ПС) посчитывают в камере Горяева под световым микроскопом.

Количество токсинов, антибиотиков, других БАВ определяют хроматографическими, фотометрическими и спектрофотометрическими методами.

Биологическую активность как главного показателя качества биопрепарата измеряют реакцией тест-объекта на действие биопестицида. Тест-объектами являются насекомые (для энтомопатогенных препаратов) или фитопатогены (для препаратов против болезней растений).

Цель: ознакомиться с различными методами определения биологической активности и титра биопрепаратов.

Основные термины:

Биологическая активность препарата – ответная реакция тест-объекта на действие биопрепарата, выраженная в единицах активности.

Стандартизация – доведение всех качественных и количественных показателей биопрепарата до уровня стандарта (по количеству действующего начала, по биологической активности и др.).

Титр – количество жизнеспособных спор (клеток) в единице массы или объема (1 мл или 1 г) препарата, один из показателей качества биопрепарата.

Учебные материалы и оборудование: микроскопы, камеры Горяева, пипетки, спирт, суспензия биопрепарата (вирусного, грибного или бактериального), чашки Петри с колониями гриба (посев произведен за 3-7 дней до занятия), калькуляторы.

План занятия:

1. Описать метод определения титра грибных и бактериальных препаратов путем посева на питательные среды (ПС). Подсчитать титр грибного препарата (боверин, вертициллин или триходермин) путем подсчета выросших колоний после посева на ПС.

Определение титра методом посева на питательную среду

От каждой партии препарата отбирают 3-5 проб из разных мест по всей глубине и составляют общую пробу массой 70-100 г. Общую пробу тщательно перемешивают, после чего отвешивают навеску 10 г с точностью 0,01 г и переносят в колбу со 100 мл стерильной воды. Колбу закрывают стерильной пробкой и ее содержимое взбалтывают в течение 5 минут. Разведение препарата в приготовленной взвеси составляет 1:10. Параллельно готовят 7-9 пробирок, в каждую из которых добавляют по 9 мл дистиллированной воды, закрывают ватными пробками и стерилизуют. Затем готовят серию последовательных разведений. Для этого из колбы чистой пипеткой берут 1 мл суспензии и переносят в первую пробирку с 9 мл воды, получают разведение 1:100. Суспензию этого разведения тщательно перемешивают с помощью новой (чистой) пипетки, затем берут 1 мл полученного разведения и переносят его во вторую пробирку (разведение в 1000 раз). Таким же образом готовят и последующие разведения.

Для приготовления каждого разведения необходимо использовать отдельную стерильную пипетку.

Из трех последних разведений, предварительно тщательно перемешанных, производят посев в чашки Петри на агаризованную среду (для разных биологических агентов используют различные ПС) из расчета 1мл суспензии на чашку. Этот объем распределяют по поверхности среды стерильным шпателем. Из одного разведения делают не менее 5 параллельных высевок. Для параллельных высевок из одного разведения можно пользоваться одной стерильной пипеткой и одним шпателем. Засеянные чашки помещают в термостат с температурой, оптимальной для роста микроорганизма. Учет выросших колоний гриба проводят через 2-7 дней после посева (в зависимости от вида микроорганизма). При проведении чашечного метода все операции необходимо проводить в стерильном боксе.

Титр препарата вычисляют по формуле:

$$T = A \cdot K,$$

где T – титр препарата, спор / 1г;

A – среднее число колоний, выросшее при высеве из данного разведения (среднее арифметическое из пяти чашек Петри);

K – разведение, из которого проведен высев.

Определение титра методом посева на ПС требует значительных затрат времени, лабораторной посуды, оборудования и реактивов, однако этот метод позволяет определить количество *жизнеспособных* спор грибов или бактерий и дать заключение о пригодности использования исследуемых биопрепаратов.

2. Ознакомиться с правилами работы с камерой Горяева и подсчитать титр приготовленной суспензии (вирусного или грибного препарата).

Определение титра в камере Горяева

Готовят серию последовательных разведений, как указано выше (метод посева).

Камеру Горяева с хорошо притертым стеклом (покровное стекло перед заполнением камеры тщательно притирают до появления радужных колец), заполняют суспензией соответствующего разведения. Количество спор подсчитывают в 5 больших квадратах камеры (или в 20-100 малых квадратах), определяют среднее количество клеток в одном малом квадрате и рассчитывают титр по формуле:

где X – титр исследуемой суспензии, клеток в 1 мл;

N – среднее количество клеток в одном малом квадрате.

Количество клеток в малом квадрате не должно превышать 15-16, в противном случае для подсчета титра необходимо использовать следующее разведение.

Для определения титра исходного препарата необходимо титр исследуемой суспензии умножить на соответствующее разведение (10^i), где i – кратность разведения.

Определение титра в камере Горяева – достаточно точный, менее трудоемкий и быстрый способ по сравнению с методом посева на ПС.

3. Решение задач по определению биологической активности энтомопатогенных биопрепаратов.

Для определения биологической активности энтомопатогенных препаратов рассчитывают летальную концентрацию препарата, вызывающую гибель 50% особей тест-объекта (LK_{50}) и сравнивают с LK_{50} стандарта.

При постановке эксперимента заражение подопытных насекомых проводят обычно через корм. Для этого на естественный корм или в искусственную питательную среду (ИПС) вносят суспензию препарата (из расчета 1 мл (г) на 3 г корма), испытывают не менее 4 концентраций, при этом концентрации должны быть кратными, в контроле корм смешивают с водой. В каждом варианте используют от 3 до 5 повторностей, в каждой повторности – 10 или 15 особей тест-объекта. После учета гибели насекомых на определенную дату рассчитывают LK_{50} . Для расчета LK_{50} можно использовать формулу Кербера:

$$\lg LK_{50} = \lg C_M - \sigma(\sum L_i - 0,5),$$

где S_m – максимальная из испытанных концентраций;
 σ - логарифм кратности разведения суспензии;
 L_i – гибель насекомых в долях смертности (рассчитывается для каждой из испытанных концентраций).

$$L_i = \frac{P_0 - P_k}{N - P_k},$$

где P_0 – количество погибших насекомых в варианте;
 P_k - количество погибших насекомых в контроле;
 N - количество тест-насекомых, испытанных во всех повторностях в данном варианте.

При использовании этой формулы гибель в контроле должна быть нулевой. В других случаях применяют пробит-анализ.

Пример.

Гусениц черемуховой моли заражали препаратом дендробациллин в концентрациях 1; 0,5; 0,25 и 0,125%. Повторность опыта 3 кратная, в каждой повторности использовано по 15 особей тест-объекта. Через 48 часов учитывали гибель гусениц, результаты отражены в табл. 2. Необходимо рассчитать ЛК₅₀.

Таблица 2. Действие дендробациллина на черемуховую моль

Варианты опыта	Гибель гусениц, экз.
Контроль	0
Дендробациллин 1%	35
Дендробациллин 0,5%	16
Дендробациллин 0,25%	9
Дендробациллин 0,125%	5

Решение:

1. Определяем гибель насекомых в долях смертности для каждой концентрации (L_i):

$$L_{1\%} = \frac{35 - 0}{45 - 0} = 0,77,$$

$$L_{0,5\%} = \frac{16}{45} = 0,35,$$

$$L_{0,25\%} = \frac{9}{45} = 0,2,$$

$$L_{0,125\%} = \frac{5}{45} = 0,11.$$

2. Рассчитываем $\lg LK_{50}$ по формуле Кербера:

$$\lg LK_{50} = \lg 1 - \lg 2 \times (0,77 + 0,35 + 0,2 + 0,11 - 0,5) = 0 - 0,301 \times 0,93 = -0,280,$$

т.е. $\lg LK_{50} = -0,280$

3. Определяем LK_{50} с помощью калькулятора или по таблице Брадиса:

Антилогарифм числа $-0,280$ равен $0,518$.

Таким образом, LK_{50} дендробациллина для черемуховой моли через 48 часов после заражения составила $0,518\%$.

◆ **Контрольные вопросы:**

1. Что такое стандартизация и какие показатели характеризуют качество биопрепаратов?
2. Каким методом целесообразно определять титр препаратов на основе спор грибов и почему?
3. Назовите преимущества и недостатки метода определения титра биопрепаратов с помощью камеры Горяева.
4. Роль тест - объектов в стандартизации препаратов.

ЗАНЯТИЕ 4

ТЕХНОЛОГИЯ МАССОВОГО РАЗВЕДЕНИЯ НАСЕКОМЫХ И СПОСОБЫ НАРАБОТКИ ЭНТОМОФАГОВ

Биологическая защита растений предполагает использование:

- энтомофагов и акарифагов;
- насекомых как субстрата для наработки вирусных и микроспорициальных препаратов;
- насекомых - тест-объектов для оценки качества препаратов;

- насекомых для генетических методов борьбы (выпуск стерилизованных особей);
- насекомых-гербифагов и т.д.

Кроме того, методы технической энтомологии используются для наработки зоогумуса и вермикультуры.

Для этих целей необходимо уметь организовать массовое производство насекомых в условиях биолaborаторий.

Цель: ознакомление с технологией разведения чешуекрылых насекомых в лабораторных условиях, используемых в качестве тест-объектов и субстрата для наработки вирусных препаратов:

- капустной совки (*Mamestra brassicae* L.);
- лугового мотылька (*Loxostege sticticalis* L.);
- большой пчелиной огневки (*Galleria mellonella* L.)

и способами производства энтомо- и акарифагов.

Основные термины:

Акарифаг – организм, потребляющий в пищу клещей.

Вермикультура – процесс искусственного разведения червей на отходах.

Зоогумус – продукт переработки сельскохозяйственных и бытовых отходов с помощью насекомых и червей.

Тест-объект - насекомые (для энтомопатогенных препаратов) или фитопатогены (для препаратов против болезней растений) для оценки качества препаратов.

Энтомофаг – вид, потребляющий в пищу насекомых (хищник или паразит).

Учебные материалы и оборудование: живые и фиксированные образцы различных стадий развития чешуекрылых насекомых (яйцекладки, гусеницы, куколки, имаго); постоянные препараты половой системы (♀, ♂) насекомых; бинокулярные микроскопы.

План занятия:

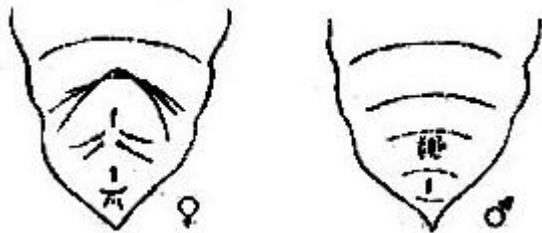
1. Описать процесс разведения лугового мотылька (методические рекомендации «Определение биологической активности препарата ЛЕСТ на луговом мотыльке»). Познакомиться с технологией разведения большой пчелиной огневки в условиях биолaborатории кафедры.

2. Определить пол насекомых (капустная совка, луговой мотылек) на стадиях развития куколки и имаго. Зарисовать рисунки, посмотреть фиксированные препараты.

☑ Устанавливать соотношение полов удобнее по куколкам. У куколок чешуекрылых самцы и самки легко различаются по расположению половой и анальной щелей. Анальная щель у обоих полов расположена на 10-м сегменте, а половая щель у самок – на 8-м, у самцов – на 9-м. Между этими двумя щелями у самцов хорошо заметна одна граница (бороздка) между 9-м и 10-м сегментами, у самок бороздки слабо выражены. Половая щель самцов хорошо видна из-за двух выпуклостей по бокам щели (рис. 2).

На стадии имаго легко различить самцов и самок у видов с ярко выраженным половым диморфизмом (рис. 3).

Если невозможно определить пол по внешним признакам прибегают к вскрытию имаго. Пол устанавливают по строению половой си-



стемы (препараты).

Рис. 2. Расположение половой и анальной щелей у куколок капустной совки

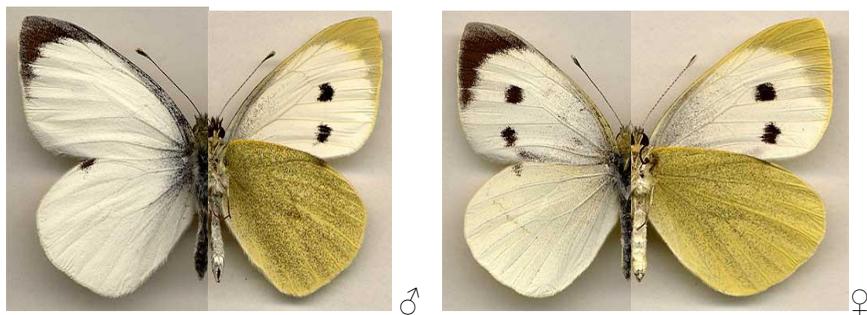


Рис. 3. Окраска крыльев самцов и самок капустной белянки (половой диморфизм)

3. Определить плодовитость насекомых на примере большой пчелиной огневки. Подсчитать с помощью бинокулярного микроскопа количество яиц из садка, приходящееся на одну самку.

4. Решить задачи по оптимизации условий разведения насекомых (карточки).

☑ Для сравнительной оценки искусственных питательных сред (ИПС) строят таблицы выживания, где указывают основные биологические показатели популяции, по которым рассчитывают обобщенный показатель – **критерий качества** (Y) по формуле:

$$Y = \alpha_1 \cdot \alpha_2 \cdot \Pi,$$

где α_1 – отрождение личинок, %;

α_2 – количество самок, %;

Π – плодовитость (яиц/самку), шт.

Эти показатели учитывают также при стандартизации и контроле качества культур насекомых.

Пример задачи. При разведении трихограммы использовали яйца разных хозяев: зерновой моли, лугового мотылька, капустной совки и озимой совки. Получены следующие показатели:

№п/п	Вид хозяина	α_1	α_2	Π
1	Зерновая моль	80	59,6	26,1
2	Луговой мотылек	82	62	21
3	Капустная совка	83	71,2	34,9

4	Озимая совка	45	47	8,5
---	--------------	----	----	-----

Ответ. Лучшим хозяином для разведения трихограммы является капустная совка, т.к. получен самый высокий критерий качества (206245,04).

5. Познакомиться с технологией наработки энтомофагов на примере трихограммы и галлицы- афидимизы.

Биологические методы защиты растений от вредных насекомых требуют разработки способов накопления либо фитофагов, либо энтомофагов. Для подавления вредных насекомых в открытом и защищенном грунте используют выпуски искусственно разводимых энтомофагов.

Разведение насекомых основано на принципе триотрофа (кормовое растение – фитофаг (консумент 1-го порядка) - энтомофаг (консумент 2-го порядка) (рис. 4).

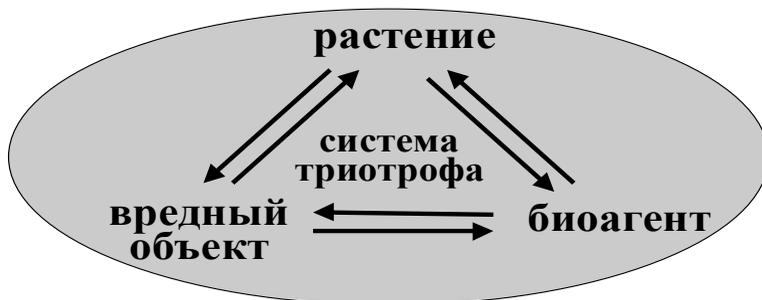


Рис.4. Схема системы триотрофа

6. Описать технологии получения зоогумуса, вермикомпоста.

7. Просмотр видеофильмов по производству энкарзии, фитосейулюса и получению зоогумуса.

7. Ответить на контрольные вопросы.

◆ **Контрольные вопросы:**

1. Перечислите направления технической энтомологии и приведите примеры.

2. *Какие этапы включает схема культивирования насекомых?*
3. *Назовите уровни культивирования искусственных популяций.*
4. *Какие типы культур насекомых вы знаете?*
5. *Перечислите факторы оптимизации культур насекомых.*
6. *Принцип разведения энтомофагов.*
7. *Перечислите основные принципы получения зоогумоса и вемикультуры.*

ЗАНЯТИЕ 5

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ КАРТЫ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ И ЭНТОМОФАГОВ

Создание экологически безопасных средств защиты растений является основной задачей биотехнологии в защите растений. Тенденция последних лет – развитие небольших региональных производств средств защиты растений, где основными специалистами должны быть выпускники, которые получают знания по защите растений, умеют составить технологическую карту производства биологического средства защиты растений в условиях биологической лаборатории. При проектировании технологических карт производства биологических агентов для защиты растений от вредных организмов требуется знание схемы производства и необходимого для этого оборудования, сырья, инструментов, а также техники безопасности.

Цель: составление технологической карты производства биологических средств защиты растений (энтомофагов, акарифагов и биологических препаратов) и проектирование биологической лаборатории.

Основные термины:

Биологическая лаборатория – подразделение, в составе которого имеются здания или помещения, различное оборудование, приборы, инструментальный для производства биопрепаратов или энтомо- и акарифагов.

Технологическая карта производства биологических средств защиты растений – подробный регламент получения биопрепарата или энтомо- и акарифага.

Учебные материалы и оборудование: технические условия (ТУ), государственные стандарты (ГОСТы), методические указания по производству биологических средств защиты растений, учебные по-

собия «Биопрепараты в защите растений», «Биотехнология в защите растений», плакаты.

План занятия:

1. Составить технологическую карту производства заданного энтомофага или акарифага по следующей схеме:

- характеристика конечного продукта производства (указать особенности энтомофага или акарифага или биопрепарата), которые отличают его от других средств.
- Технологическая схема производства. (перечислить стадии технологического процесса, представить блок-схему процесса производства биосредства).
- Сырье и материалы
- Оборудование и приборы
- Описание технологического процесса (дать подробное описание стадий технологического процесса, указанных в разделе «Технологическая схема производства»)
- Контроль качества продукта и стандартизация (назвать показатели и их значения, по которым оценивается качество производимого продукта: для биопрепаратов – титр, биологическая активность; для энтомо- и акарифагов - количество и масса яиц, % отрождения личинок, жизнеспособность, половой индекс, прожорливость и др.; описать методы оценки качества биологического средства).
- Техника безопасности, пожарная безопасность, производственная санитария
- Техничко – экономический расчет (для производства энтомофагов ориентироваться на фитосейулюса; для производства биопрепаратов – на триходермин).

◆ ***Контрольные вопросы:***

1. *Какие особенности вы можете выделить при проектировании биолaborатории для производства бактериальных, грибных и вирусных препаратов?*
2. *Назовите показатели необходимые для определения качества биопрепаратов, энтомо- и акарифагов.*

3. *Приведите основные принципы, которые требуются для составления технологической карты производства биологического средства.*

ЗАНЯТИЕ 6

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Методы клеточной инженерии относятся к новейшей биотехнологии. Для защиты растений от вредных организмов из клеточных технологий большое значение имеет микроклональное размножение растений. Оно осуществляется для ускоренного размножения и оздоровления цветочно-декоративных и сельскохозяйственных растений, а также для получения растений, свободных от фитопатогенов. При биологическом конструировании наиболее подходящими объектами являются изолированные протопласты, с помощью которых осуществляется соматическая гибридизация.

Методы клеточной инженерии позволяют получать растения, устойчивые к болезням, вредителям и гербицидам.

Цель: ознакомление с методами клеточной инженерии, используемыми в практике защиты растений.

Основные термины:

Изолированный протопласт - клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического способа.

Иммуноферментный анализ – метод обнаружения антигена с помощью антитела, меченого ферментом.

Меристема - кусочек меристемной ткани с первой парой листовых зачатков.

Соматическая (парасексуальная) гибридизация - система, вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла (слияние протопластов).

Тотипотентность - способность ядра одной клетки передавать информацию о формировании всех типов клеток, характерных для взрослого организма.

Учебные материалы и оборудование: проростки картофеля, инструменты для вычленения верхушечных меристем, наборы реактивов для проведения ИФА по выявлению вирусов картофеля, предметные стекла, бинокулярные и световые микроскопы.

План занятия:

1. Разобрать и зарисовать схему получения соматических гибридов и гибридом (Учебное пособие «Биотехнология в защите растений»).

2. Описать технологию получения безвирусного семенного материала на примере оздоровления картофеля (Учебное пособие «Биотехнология в защите растений»). Зарисовать схему.

3. Вычленив верхушечную зону роста у проростков картофеля. Просмотреть полученные срезы в световом микроскопе.

4. Познакомиться с технологией проведения иммуноферментного анализа (ИФА). Описать поэтапно ход анализа, зарисовать схему, расставить реактивы по мере их необходимости при проведении ИФА.

5. Ответить на контрольные вопросы.

◇ **Контрольные вопросы:**

1. Что такое гибридома? Как ее получают и для чего используют?
2. В чем суть метода оздоровления картофеля?
3. Для чего проводят термотерапию?
4. Что такое картофельное дерево?
5. Перечислите этапы проведения иммуноферментного анализа.
6. Как еще называют метод ИФА и почему?

ЗАНЯТИЕ 7

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ
(СЕМИНАР)**

Успехи современной биологии и, в первую, очередь расшифровка генетического кода и открытие методов манипуляций с ДНК позволили понять основные законы жизни, разработать новые технологии управления биологическими процессами и живыми организмами на клеточном и молекулярном уровнях.

Цель: Рассмотреть в приложении к защите растений основные понятия молекулярной биологии для ознакомления с процессами получения генетически модифицированных (трансгенных) растений, устойчивых к вредителям, болезням и гербицидам, а также с возможностями метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Основные термины:

Генная инженерия – технология манипуляций с ДНК (работа с рекомбинантной ДНК). Суть технологии заключается в воссоединении фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением новых рекомбинантных структур в живую клетку.

Генетический код – это система записи информации о последовательности расположения аминокислот в белках с помощью последовательности расположения нуклеотидов в ДНК.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод анализа нуклеиновых кислот, основанный на их способности к самокопированию.

Рестриктаза – фермент, расщепляющий нуклеиновую кислоту в определенных точках на фрагменты.

Учебные материалы и оборудование: Схемы, плакаты, учеб. пособия.

План занятия:

1. Ответить на вопросы семинара.
2. Ответить на тестовые задания.

◆ **Контрольные вопросы:**

1. Понятие гена, генетического кода. Структурные и регуляторные гены.
2. Транскрипция. Сплайсинг. Трансляция.
3. Ферменты, участвующие в генетической трансформации организмов: рестриктазы, лигазы, полимеразы, обратная транскриптаза.
4. Этапы типового эксперимента генной инженерии.
5. Принципы конструирования трансгенных растений.

6. *Диагностика инфекционных болезней растений с помощью методов на молекулярной основе.*

Контрольная работа проводится в тестовой форме, все виды тестов по всему изучаемому курсу представлены в электронном ресурсе – учебное пособие Биотехнология в защите растений. 2015. – с., размещенном на сайте ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ в методических пособиях по данной дисциплине.

Доступ к тестированию студенты получают при наличии персональных логина и пароля.

Примеры тестовых заданий:

1. Перечислить необходимые компоненты для проведения ПЦР
2. **Установите соответствие. Микробиологические препараты преимущественно нарабатываются способами:**

ОСНОВА	СПОСОБ
1. Бактерии	А. Глубинный
2. Грибы	Б. В теле живых организмов
3. Вирусы	В. Поверхностный
	Г. Глубинно-поверхностный

3. **Биологические препараты на основе *Bacillusthuringiensis* поражают насекомых из разных отрядов**

ОТРЯД	ПАТОТИП
1. Coleoptera	А.
2. Lepidoptera	В.
3. Diptera	С.

4. **Установите последовательность. Технологическая карта производства биологического средства включает пункты в следующей последовательности:**

1. Сырье и материалы
2. Описание технологического процесса
3. Техника безопасности

4. Контроль качества продукта
5. Техничко-экономический расчет
6. Характеристика конечного продукта
7. Оборудование и приборы
8. Технологическая схема производства

Дайте определение

5. *Биотехнология*

Самостоятельная работа

- **Самостоятельное заполнение таблицы** бактериальных препаратов для защиты от вредителей и болезней, грибных препаратов для защиты от вредителей и болезней, вирусных биопрепаратов и микогербицидов с использованием материалов лекций и литературных источников.

1. Принципы производства биопрепаратов.
2. Методы получения и характеристика бактериальных препаратов для защиты от вредителей и болезней. Бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas*
3. Методы получения и характеристика грибных препаратов для защиты от вредителей и болезней.
4. Производство вирусных биопрепаратов и микогербицидов

- подготовка и выполнение **контрольной работы** по темам разделов (выполнение контрольной работы проводится в тестовой форме при использовании электронного учебного пособия см. выше.)

2. Биотехнология получения микробных средств защиты растений.
3. Техническая энтомология, получение зоогумуса и бактериальных удобрений.
4. Использование энтомофагов и акарифагов в биологической защите растений.
5. Культуры клеток, регуляторы роста.
6. Молекулярные и генно-инженерные методы
7. Биотехнологические методы диагностики фитопатогенных и энтомопатогенных микроорганизмов

- подготовка **к устному опросу** по разделам (темам) –:

2. Биотехнология получения микробных средств защиты растений.
3. Техническая энтомология, получение зоогумуса и бактериальных удобрений.
4. Использование энтомофагов и акарифагов в биологической защите растений.
5. Культуры клеток, регуляторы роста.
6. Молекулярные и генно-инженерные методы
7. Биотехнологические методы диагностики фитопатогенных и энтомопатогенных микроорганизмов

Библиографический список

1. Штерншис М.В. Биотехнология в защите растений [Электронный ресурс] / М.В. Штерншис, О.Г. Томилова, И.В. Андреева, Т.В. Шпатова. - Новосибирск, 2015. – отдел электронных ресурсов НГАУ.
2. Штерншис М.В. Биотехнология в защите растений: Учебное пособие / О.Г. Томилова, И.В.Андреева. - Мин-во сел. хоз-ва РФ. Новосибир. гос. аграр. ун-т – Новосибирск, 2006. – 200с.
3. Сельскохозяйственная биотехнология / под ред. В.С. Шевелухи. М.: Высшая школа, 2003. – 469с.
4. Штерншис М.В. Биопрепараты в защите растений: Учебное пособие / М.В. Штерншис, Ф.С. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова - Мин-во сел. хоз-ва РФ. Новосиб. гос. аграр. ун-т, Новосибирск, 2003.- 140 с.
5. Биотехнология переработки органических отходов и экология / Под ред. И. И. Гудилина и А.Ф. Кондратова.- Новосиб. к. н. изд-во, 1999. –46 с.
6. Галеев Р.Р. Семеноводство картофеля на безвирусной основе: Лекция / Новосиб. аграр. ун-т. Новосибирск, 1993. – 32с.
7. Твердюков А.П., Никонов П.В., Ющенко Н.П. Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями в защищенном грунте. Справочник. – М.: Колос, 1993. – 159с.
8. Тамарина Н.А. Основы технической энтомологии. – М.: Изд-во МГУ, 1990. –203с.
9. Журнал Защита и карантин растений, за последние годы.
10. ТУ и ГОСТ по производству биологических средств

Составители

Штерншис Маргарита Владимировна
Шпатова Татьяна Владимировна
Андреева Ирина Валерьевна

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Методические указания
к лабораторно – практическим занятиям
контрольной и самостоятельной работе

Редактор

Тираж 100 экз.
Объем 1,6 усл. печ. л. Изд. №. Заказ №
Отпечатано в издательстве
Новосибирского государственного аграрного университета
630039, Новосибирск, ул.Добролюбова, 160, каб. 106
Тел/факс (383) 267-09-10, E-mail: 2134539@mail.ru