

Міністерство освіти і науки України

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Кафедра фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з науково-педагогічної роботи

_____ А.В. Пантелеймонов

_____ 2018 р.

Робоча програма навчальної дисципліни

Методи культури *in vitro* вищих рослин

(назва навчальної дисципліни)

рівень вищої освіти _____ перший (бакалаврський) _____

галузь знань _____ 0401 Природничі науки _____
(шифр і назва)

напрямок _____ 6.040102 Біологія _____
(шифр і назва)

освітня програма _____
(шифр і назва)

спеціалізація _____
(шифр і назва)

вид дисципліни _____ за вибором _____
обов'язкова / за вибором

факультет _____ біологічний _____

2018 / 2019 навчальний рік

Програму рекомендовано до затвердження вченою радою факультету

29 серпня 2018 року, протокол № 8

РОЗРОБНИКИ ПРОГРАМИ: Авксентьева О.О., кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів,
Шулік В.В., старший викладач кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

Програму схвалено на засіданні кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів
Протокол від 28 серпня 2018 року, № 1

В.о. завідувача кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

_____ В.Ф. Тимошенко
(підпис)

Програму погоджено методичною комісією біологічного факультету
Протокол від 28 серпня 2018 року, № 1

Голова методичної комісії біологічного факультету

_____ В.В. Мартиненко
(підпис)

ВСТУП

Програма навчальної дисципліни “**Методи культури *in vitro* вищих рослин**” складена відповідно до освітньо-професійної програми підготовки

перший (бакалаврський)

(назва рівня вищої освіти)

напряму 6.040102 Біологія

спеціалізації _____

1. Опис навчальної дисципліни

1.1. Мета викладання дисципліни: набуття студентами теоретичних знань з основ культивування рослинних клітин, тканин та органів за умов *in vitro* та навичок практичної орієнтації, необхідних для професійної діяльності в галузі біології.

1.2. Основні завдання вивчення дисципліни: сформувані цілісне уявлення про основні принципи та методи організації роботи в лабораторії культури *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів; ознайомити з різноманітністю видів культур *in vitro* (калусна, суспензійна, ізольованих протопластів, гаплоїдних клітин та ін.) та сучасних біотехнологій на базі культури *in vitro* клітин, тканин та органів вищих рослин

1.3. Кількість кредитів – 4.

1.4. Загальна кількість годин – 120.

1.5. Характеристика навчальної дисципліни	
за вибором	
Денна форма навчання	Заочна (дистанційна) форма навчання
Рік підготовки	
4-й	4-й
Семестр	
8-й	8-й
Лекції	
0 год.	0 год.
Практичні, семінарські заняття	
0 год.	0 год.
Лабораторні заняття	
60 год.	24 год.
Самостійна робота	
60 год.	96 год.
Індивідуальні завдання	
0 год.	

1.6. Заплановані результати навчання:

знати:

історичні відомості щодо розвитку, становлення та сучасності методів культури *in vitro* вищих рослин;

термінологію (понятійний апарат) сучасної біотехнології рослин;

особливості рослинного організму як об'єкту біотехнології;

різноманітність видів культур *in vitro* вищих рослин;

використання теоретичних знань основ культивування рослин *in vitro* у практиці сучасної біотехнології

вміти:

аналізувати, структурувати, інтегрувати теоретичний навчальний та лекційний матеріал;
організувати роботу лабораторії культури *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів;
проводити стерилізацію рослинного матеріалу;
вводити в культуру *in vitro* рослинні об'єкти, використовуючи різні види експлантів;
проводити роботи у ламінарному боксі;
досліджувати калусні та суспензійні культури;
проводити мікроклональне розмноження рослин.

2. Тематичний план навчальної дисципліни**Розділ 1. Основні принципи роботи в лабораторії культури *in vitro* вищих рослин**

Тема 1. Організація роботи в лабораторії біотехнології рослин. Основні принципи та методи організації роботи в лабораторії культури *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів. Приміщення та обладнання лабораторії (посуд, інструмент, матеріали). Методи та прийоми стерилізації посуду, інструментів; підтримання умов стерильності у приміщенні, робота у ламінарному боксі.

Тема 2. Загальна характеристика живильних середовищ. Макро- та мікроелементи, вуглецеве живлення, додаткові органічні сполуки. Роль вітамінів, фітогормонів та регуляторів росту як складових елементів живильних середовищ.

Лабораторні роботи. Приготування живильного середовища Мурасиге-Скуга (МС) для культивування вищих рослин *in vitro*. Методи та прийоми стерилізації: стерилізація посуду, матеріалів та інструментів, живильних середовищ, насіння та рослинного матеріалу. Техніка роботи в ламінарному боксі.

Розділ 2. Види культур *in vitro*

Тема 1. Особливості стерилізації рослинного матеріалу. Стерилізація рослинного матеріалу – насіння, листки, апікальні меристеми та ін. Методи стерилізації насіння та вирощування асептичних проростків на безгормональному середовищі МС.

Вичленення експлантів. Дедиференціювання тканин вищих рослин та отримання первинного калюсу з різних експлантів асептичних рослин. Явище фізіологічної полярності.

Тема 2. Різновиди культур *in vitro*. Калюсна культура. Типи калюсних культур та їхні морфологічні, фізіологічні, біохімічні та генетичні характеристики. Показники росту калюсних культур, пасирування, (роль співвідношення фітогормонів). Використання калюсних тканин у фундаментальних дослідженнях та біотехнології.

Суспензійні культури. Методи отримання клітинних суспензій. Їхні типи, фактори, що впливають на ступінь агрегованості. Основні параметри суспензійних культур. Побудова кривої росту. Способи культивування клітинних суспензій (періодичне та проточне культивування).

Культивування окремих клітин. Методи ізолювання поодиноких клітин. Методи вирощування *in vitro* поодиноких клітин (метод «няньки», метод плейтинга, метод мікрокультури). «Фактор кондиціювання».

Культура ізолюваних протопластів. Методи отримання та умови культивування ізолюваних протопластів. Методи злиття протопластів, механізм злиття. Маніпуляції з ізолюваними протопластами. Використання культури ізолюваних протопластів для вирішення теоретичних та прикладних проблем біології.

Культура гаплоїдних клітин. Методи отримання гаплоїдних рослин *in vitro*. Основні шляхи андрогенезу та гіногенезу *in vitro*. Проблеми регенерації гаплоїдних рослин.

Тема 3. Вторинне диференціювання *in vitro*. Індукція та типи. Гістогенез та морфогенез *in vitro*. Прямий ембріогенез. Соматичний ембріогенез. Фактори, що впливають на диференціювання в культурі клітин. Регенерація рослин *in vitro*.

Лабораторні роботи. Вирощування стерильних (асептичних) проростків. Калюсна культура. Дедиференціювання та індукція калюсогенезу з асептичних проростків. Калюсна культура з листків асептичних та інтактних рослин. Калюсна культура з дорослої інтактною рослини. Пасивування первинної калюсної тканини. Побудова кривої росту калюсної

тканини. Суспензійна культура. Отримання суспензійної культури. Оцінка життєздатності та ступеню агрегованості. Підрахунок щільності суспензійної культури. Висів суспензії на тверде поживне середовище – метод Плейтингу. Культура ізольованих протопластів. Виділення протопластів: приготування ферментних розчинів та ферментизація тканин. Культивування протопластів, які виділяють з мезофілу листків. Гаплоїдія *in vitro*. Отримання калюсів з пиляків різних рослин. Отримання рослин-регенерантів з пилкових калюсів. Регенерація в культурі *in vitro*. Соматичний ембріогенез в калюсній тканині. Прямий морфогенез з листових експлантів.

Розділ 3. Сучасні біотехнології рослин

Тема 1. Біотехнології на базі культури *in vitro* клітин, тканин та органів вищих рослин. Мікроклональне розмноження та отримання безвірусного рослинного матеріалу. Оздоровлення посадкового рослинного матеріалу. Методи отримання культур клітин – продуцентів цінних біологічно активних речовин. Культури *in vitro* у селекції та генетичній інженерії рослин. Використання культур рослинних клітин для збереження генофонду вищих рослин. Кріозбереження культур клітин та меристем.

Лабораторні роботи. Мікроклональне розмноження та отримання безвірусного матеріалу. Виділення та культивування апікальних меристем картоплі. Виділення та культивування апікальних меристем полуниці. Індукція коренеутворення за мікроклонального розмноження. Отримання безвірусного посадкового матеріалу методом термотерапії у поєднання з культивуванням апікальних меристем.

3. Структура навчальної дисципліни

Назви розділів і тем	Кількість годин											
	денна форма					заочна форма						
	усього	у тому числі					усього	у тому числі				
		л	п	лаб.	інд.	с.р.		л	п	лаб.	інд.	с.р.
Розділ 1. Основні принципи роботи в лабораторії культури <i>in vitro</i> вищих рослин												
Тема 1. Організація роботи в лабораторії біотехнології рослин.	7			3		5	7			2		5
Тема 2. Загальна характеристика живильних середовищ.	13			7		5	7			2		5
Разом за розділом 1	20			10		10	14			4		10
Розділ 2. Види культур <i>in vitro</i>												
Тема 1. Особливості стерилізації рослинного матеріалу.	14			4		10	8			4		15
Тема 2. Різновиди культур <i>in vitro</i> .	34			30		10	34			8		36
Тема 3. Вторинне диференціювання <i>in vitro</i> .	22			6		10	40			4		15
Разом за розділом 2	70			40		30	82			16		66
Розділ 3. Сучасні біотехнології рослин												
Тема 1. Біотехнології на базі культури <i>in vitro</i> клітин, тканин та органів вищих рослин.	30			10		20	24			4		20
Разом за розділом 3	30			10		20	24			4		20
Усього годин	120			60		60	120			24		96

4. Теми семінарських (практичних, лабораторних) занять

Теми лабораторних занять

№ з/п	Назва теми	Кількість годин	
		денна форма	заочна форма
Розділ 1. Основні принципи роботи в лабораторії культури <i>in vitro</i> вищих рослин			
1	Робота 1. Знайомство з організацією роботи та обладнанням у біотехнологічній лабораторії	1	1
2	Робота 2. Підготовка біотехнологічної лабораторії до роботи	1	0
3	Робота 3. Робота у ламінарному боксі	1	1
4	Робота 4. Приготування маточних розчинів макро- та мікросолей, вітамінів та фітогормонів	4	1
5	Робота 5. Приготування агаризованного живильного середовища Мурасиге і Скуга (МС)	3	1
Розділ 2. Види культур <i>in vitro</i>			
6	Робота 6. Стерилізація рослинного матеріалу. Вирощування асептичних паростків.	4	4
7	Робота 7. Отримання первинного калусу з асептичних проростков	4	2
8	Робота 8. Отримання первинного калусу зі зрілих зародків	4	2
9	Робота 9. Субкультивування (пасивування) калусів. Визначення приросту калусної тканини	4	2
10	Робота 10. Отримання та культивування суспензії клітин	4	0
11	Робота 11. Підрахунок щільності суспензії клітин	2	0
12	Робота 12. Визначення ступеню агрегованості та життєздатності суспензійної культури	4	0
13	Робота 13. Отримання клітинних клонів на агаризованих середовищах методом Плейтинга	4	0
14	Робота 14. Отримання калусів з пиляків	4	2
15	Робота 15. Андрогенез: отримання рослин-регенерантів з пилякових калусів	3	0
16	Робота 16. Індукція різноманітних шляхів морфогенезу <i>in vitro</i> калусної тканини за дії фітогормонів	3	4
Розділ 3. Сучасні біотехнології рослин			
17	Робота 17. Виділення та культивування апікальних та пазушних меристем картопля	2	0
18	Робота 18. Виділення та культивування апікальних меристем суниці	4	4
19	Робота 19. Проліферація пагонів та мікрочеренкування стерильних паростків	2	0
20	Робота 20. Індукція коренеутворення за мікроклонального розмноження	2	0
	Разом	60	24

5. Завдання для самостійної роботи

№ з/п	Види, зміст самостійної роботи	Кількість годин	
		денна форма	заочна форма
1	Опрацювання навчального матеріалу (складання опорного конспекту)	10	46
2	Підготовка до лабораторних робіт (опрацювання протоколу)	15	15
3	Ведення лабораторного журналу	10	10
4	Складання глосарію (словник термінів)	5	5
5	Підготовка до допуску та захисту лабораторних робіт	10	10
6	Підготовка до поточних та підсумкової контрольних робіт	10	10
	Разом	60	96

6. Індивідуальні завдання

Навчальним планом не передбачено.

7. Методи контролю

Самоконтроль. Посібники з відповідних розділів курсу містять завдання для самопідготовки і самоконтролю.

Поточний контроль. Програма передбачає наступні форми поточного контролю:

1) усне опитування – здійснюється впродовж практичних занять з метою контролю засвоєння теоретичних положень щодо теми, яка обговорюється

2) доповідь - призначена для контролю та формування здатності студентів узагальнювати набуті знання та отриману самостійно інформацію за обраною темою з даного курсу

3) тестова контрольна робота проводиться під час практичного заняття і передбачає обрання правильної відповіді (правильних відповідей) на завдання тестів.

Підсумковий контроль. Залікова робота у письмовій формі.

8. Схема нарахування балів

Поточний контроль, самостійна робота, індивідуальні завдання						Разом	Залік	Сума
Розділ 1		Розділ 2			Розділ 3			
T1	T2	T1	T2	T3	T1	60	40	100
10	10	10	10	10	10			

Примітка: T1, T2 ... – теми розділів.

Шкала оцінювання

Сума балів за всі види навчальної діяльності протягом семестру	Оцінка
	для заліку
90 – 100	зараховано
70-89	
50-69	
1-49	не зараховано

9. Рекомендована література

Основна література

1. Авксентьева О. О., Шулік В. В. Біотехнологія вищих рослин: культура in vitro: навчально-методичний посібник // Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2017. – 96 с.
2. Биотехнология сельскохозяйственных растений. – М.: Агропромиздат, 1987. – 301 с.
3. Биотехнология растений : культура клеток. – М.: Агропроиздат, 1989. – 280 с.
4. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: наука, 1986. – 285 с.
5. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. – К.: Наукова думка, 1984. – 160 с.
6. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
7. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
8. Кунах В.А. Біотехнологія рослин для поліпшення умов життя людини // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 28-39.
9. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. Ун-та, 2003. – 228с.

Додаткова література

1. Бабинова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. И Растение как объект биотехнологии // Комаровские чтения. - Вып. LV. - 2007. - С. 184-211.
2. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений // Соросовский Образовательный журнал. –1998. – Т.6. №6, - С.30-39.
3. Журавлев Ю. Н., Омелько А. М. Морфогенез растений in vitro // Физиология растений. – Т. 55, № 5, 2008. – С. 643-664.
4. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: учебное пособие. Саратов: Изд-во СГУ. – 2002. – 125 с.
5. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. - 2014. Т.46, №1. – С.3-18.
6. Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высшая школа, 1998. – 416 с.
7. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – К.: Наукова думка, 1990. – 280 с.

10. Посилання на інформаційні ресурси в Інтернеті, відео-лекції, інше методичне забезпечення

<http://www.biotechnolog.ru/pcell>

Інше методичне забезпечення

1. Навчально-методичний посібник «Біотехнологія вищих рослин: культура in vitro».
2. Електронні презентації матеріалів лекцій.
3. Електронний матеріал щодо методичних вказівок до виконання лабораторних робіт з курсу.
4. Бібліотечний фонд кафедри.

Контрольні питання
до спецпрактикуму «Методи культури in vitro вищих рослин»

1. Історія культури рослинних клітин, тканин та органів.
2. Культура клітин вищих рослин – унікальна модельна система.
3. Особливості рослинної клітини як об'єкту для створення культури клітин, тканин та органів.
4. Основні принципи та методи організації роботи лабораторії культури клітин, тканин та органів.
5. Приміщення та обладнання лабораторії (посуд, інструмент, матеріали; підтримання умов стерильності).
6. Загальна характеристика поживних середовищ.
7. Макро- та мікроелементи, вуглецеве живлення, додаткові органічні сполуки.
8. Роль вітамінів, фітогормонів та регуляторів росту як складових елементів поживних середовищ.
9. Методи стерилізації.
10. Стерилізація рослинного матеріалу – насіння, листки, апікальні меристеми та ін.
11. Вирощування асептичних проростків in vitro.
12. Отримання експлантів.
13. Дедиференціювання тканин вищих рослин та отримання первинного калусу.
14. Явище фізіологічної полярності.
15. Калусна культура.
16. Морфологічні, фізіологічні, біохімічні та генетичні характеристики калусів.
17. Ріст калусних культур, пасирування, (роль співвідношення фітогормонів).
18. Культура клітинних суспензій.
19. Отримання, способи культивування, поживні середовища для культивування суспензій.
20. Крива росту суспензійної культури.
21. Культивування окремих клітин.
22. Методи ізолювання поодиноких клітин.
23. Методи вирощування in vitro поодиноких клітин (метод «няньки», метод плейтинга, метод мікрокультури).
24. «Фактор кондиціювання».
25. Культура ізолюваних протопластів.
26. Методи отримання та культивування ізолюваних протопластів.
27. Методи злиття протопластів.
28. Соматична гібридизація.
29. Гаплоїдія в системах in vitro.
30. Методи отримання гаплоїдних рослин in vitro.
31. Основні шляхи андрогенезу та гіногенезу in vitro.
32. Андрогенез: отримання гаплоїдів у культурі пильників.
33. Проблеми регенерації гаплоїдних рослин.
34. Вторинне диференціювання in vitro. Індукція та типи.
35. Гістогенез та морфогенез in vitro.
36. Прямий ембріогенез.
37. Соматичний ембріогенез.
38. Фактори, що впливають на диференціювання в культурі клітин.
39. Культура рослинних клітин, тканин та органів як основа сучасних біотехнологій.
40. Мікроклональне розмноження рослин.
41. Отримання здорового (безвірусного) рослинного посадкового матеріалу.
42. Культура рослинних клітин, тканин та органів у селекції рослин.
43. Культура рослинних клітин, тканин та органів та генна інженерія рослин.
44. Культури рослинних клітин – продуценти цінних біологічно активних речовин – речовин вторинного метаболізму.
45. Кріозбереження рослинних культур клітин, тканин, органів.