

**БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
Ханты-Мансийского автономного округа – Югры
«Сургутский государственный университет»**

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-методической работе

Е.В. Коновалова

_____ 2023 г.



Институт естественных и технических наук
Кафедра биологии и биотехнологии

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ
ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ**

Клеточная и тканевая биотехнология растений

Трудоемкость: 36 академических часов

Авторы программы:

Макарова Т.А., кандидат биологических наук, доцент
Самойленко З.А., кандидат биологических наук, доцент
Макаров П.Н., кандидат биологических наук, доцент

Согласовано:
Директор
Регионального модельного центра
Дополнительного образования детей
Ханты-Мансийского автономного округа – Югры



Титаренко Е. С.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОГРАММЫ

1.1. Цель освоения программы:

программа направлена на повышение теоретической и практической квалификации, уровня профессиональной компетентности преподавателей ВУЗов, учителей биологии и экологии, работающих в современных условиях развития системы образования; углубление знаний и навыков использования современных методов клеточной и тканевой биотехнологии растений.

С этой целью разработана система заданий, способствующих активному усвоению слушателями курсового материала.

1.2. Категория слушателей: преподаватели, педагоги с высшим и среднеспециальным образованием в области биологии, экологии и биотехнологии.

1.3. Трудоемкость: 36 часов, 2 недели (очно – 1 неделя; дистанционно – 1 неделя)

1.4. Форма реализации программы: очно-заочная

1.5. Сроки освоения программы: сентябрь – октябрь 2023

1.6. Режим занятий: 3 часа в день (18 ч в неделю).

2. ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ

2.1 Планируемым результатом освоения дополнительной профессиональной программы повышения квалификации является совершенствование имеющейся у специалиста компетентности, что обеспечивается овладением им необходимым перечнем профессиональных знаний, умений и навыков, регламентируемых профессиональными стандартами, квалификационными требованиями, ФГОС.

2.2 Перечень знаний, умений и навыков

По окончании обучения слушатели должны *знать*:

- Преподаваемую область научного знания и профессиональной деятельности, актуальные проблемы и тенденции развития новейшей биотехнологии, современные методы клеточной и тканевой биотехнологии растений.
- Методологию, теоретические основы и технологии научно-исследовательской и проектной деятельности.
- Научно-методические основы организации учебно-профессиональной, проектной, исследовательской и иной деятельности обучающихся.
- Условия работы с культурой клеток и тканей растений.
- Методы получения растений-регенерантов в условиях *in vitro*.
- Методы получения каллусных и суспензионных культур.
- Факторы и условия индукции органогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусной ткани.
- Методологию проведения лабораторных исследований в области клонального микроразмножения растений.

По окончании обучения слушатели должны *уметь*:

- Знакомить обучающихся с опытом успешных профессионалов, работающих в осваиваемой сфере профессиональной деятельности,
- Создавать условия для воспитания и развития обучающихся, мотивировать их деятельность по освоению учебного предмета, курса, дисциплины, выполнению заданий для самостоятельной работы.

- Пользоваться лабораторным оборудованием при стерилизации посуды, питательных сред, растительных материалов в соответствии с инструкциями по эксплуатации специализированного оборудования.
- Организовать экспериментальную работу на всех этапах клонального микроразмножения: получения хорошо растущей стерильной культуры, микрочеренкования стерильных проростков, укоренения и адаптации микропобегов.
- Получать каллус из различных органов растений на твердых и жидких питательных средах (суспензионная культура).
- Получать растения-регенеранты из каллусных тканей в условиях *in vitro*.

По окончании обучения слушатели должны **владеть**:

- Современными методами и технологией научно-исследовательской и проектной деятельности в области клеточной и тканевой биотехнологии растений.
- Навыками научно-методических основ организации учебно-профессиональной, проектной, исследовательской в области биотехнологии.
- Навыками приготовления маточных растворов и питательных сред для клеточных и тканевых культур.
- Методами проведения работ по экспериментальному определению оптимальных значений ключевых параметров роста и развития растений на этапах получения асептических культур *in vitro*, мультипликации, укоренения и адаптации выбранных генотипов культивируемых растений.
- Навыками получения безвирусного посадочного материала методом термотерапии и химиотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем.

2.3 Описание перечня профессиональных компетенций, подлежащих совершенствованию в результате освоения дополнительной профессиональной образовательной программы повышения квалификации «Клеточная и тканевая биотехнология»

Программа разработана с учетом профессионального стандарта («Педагог профессионального обучения, профессионального образования и дополнительного профессионального образования», утвержденного приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 8 сентября 2015 г. № 514; «Мастер растениеводства», утвержденного приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 17 июня 2019 г. № 133)

3. УЧЕБНЫЙ ПЛАН

Код	Наименование элементов учебного плана	Всего часов	Л	ЛР	Д	СРС*	Форма контроля
1.	Модуль: клеточная и тканевая биотехнология растений						
1.1	Раздел 1. Культура клеток и тканей растений	12	6	0		6	Устный опрос Промежуточный контроль
1.2	Раздел 2. Клональное микроразмножение растений	12	4	2		6	Устный опрос Промежуточный контроль

1.3	Раздел 3. Оздоровление растительного материала от вирусов	12	4	2		6	Устный опрос Промежуточн ый контроль
2.	Итоговая аттестация						<i>Зачет</i>
Всего		36	14	4		18	

Л - лекции;

Д – дистанционные занятия;

ЛР – лабораторная работа;

СРС - самостоятельная работа

4. КАЛЕНДАРНЫЙ УЧЕБНЫЙ ГРАФИК

Дни недели	ПН	ВТ	СР	ЧТ	ПТ	СБ
Периоды учебного времени	3 Т, ПК	3 Т, ПК	3 Т, ПК	3 Т, ПК	3 Т, ПК	3 Т, ИА

Т – теоретическое обучение;

Д – дистанционное обучение;

ПК – промежуточный контроль;

ИА – итоговая аттестация.

5. РАБОЧИЕ ПРОГРАММЫ УЧЕБНЫХ ДИСЦИПЛИН

5.1 Рабочая программа дисциплины «Клеточная и тканевая биотехнология»

5.1.1 Структура дисциплины

Код	Наименование элементов учебного плана	Всего часов	Л	ЛР	Д	СРС *	Форма контроля
1.	Модуль: клеточная и тканевая биотехнология растений						
1.1	Раздел 1. Культура клеток и тканей растений						
1.1.1	Тема 1. Организация лаборатории биотехнологии, оборудование и материалы, необходимые для получения клеток и тканей растений.	2	1			1	Устный опрос Промежуточн ый контроль
1.1.2	Тема 2. Создание асептических условий для проведения работ с культурой клеток и тканей: стерилизация лаборатории, посуды, инструментов, материалов, ламинар-бокса, питательных сред, растительного материала.	2	1			1	Устный опрос Промежуточн ый контроль
1.1.3	Тема 3. Приготовление маточных растворов и питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений.	2	1			1	Устный опрос Промежуточн ый контроль

1.1.4	Тема 4. Культура каллусной ткани.	2	1			1	Устный опрос Промежуточный контроль
1.1.5	Тема 5. Суспензионные культуры.	2	1			1	Устный опрос Промежуточный контроль
1.1.6	Тема 6. Гормональная регуляция в культуре клеток и тканей.	2	1			1	Устный опрос Промежуточный контроль
Раздел 2. Клональное микроразмножение растений							
1.2.1	Тема 7. Технология (этапы) микрклонального размножения.	12	4	2		6	Устный опрос Промежуточный контроль
1.3	Раздел 3. Оздоровление растительного материала от вирусов						
1.3.1	Тема 8. Получение безвирусного посадочного материала методом термотерапии и химиотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем.	6	4	2		6	Устный опрос Промежуточный контроль
2	<i>Итоговая аттестация</i>						<i>Зачет</i>
Всего		36	14	4	0	18	

5.1.2 Содержание дисциплины

Раздел 1. Культура клеток и тканей растений

Клеточная биотехнология растений базируется на способности изолированных клеток к размножению, дифференцировке и регенерации растений в условиях *in vitro*. Технологии предусматривают использование специализированного оборудования и препаратов, а также возможность проводить исследования круглогодично, независимо от погодных условий, занимая небольшие площади помещения. Эти преимущества имеют непосредственное отношение к культуре клеток, тканей и органов растений. Важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерации и лежащих в их основе процессов.

Тема 1. Организация лаборатории биотехнологии, оборудование и материалы, необходимые для получения клеток и тканей растений.

Для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные изолированные помещения, а также современное оборудование и высококачественные реактивы. В помещениях для проведения дезинфекции полы, стены и потолок должны иметь водостойкое и ультрафиолетоустойчивое покрытие. Изолированные помещения включают следующие комнаты: моечная комната, комната для приготовления питательных сред, автоклавная, стерильный бокс, световая и темновая культуральные комнаты. Каждое помещение оснащено специальным оборудованием.

Тема 2. Создание асептических условий для проведения работ с культурой клеток и тканей: стерилизация лаборатории, посуды, инструментов, материалов, ламинар-бокса, питательных сред, растительного материала.

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей, клеток и протопластов является соблюдение строгой стерильности, поскольку на искусственных питательных средах хорошо развиваются и микроорганизмы, что представляет двойную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред, во-вторых,

изолированные от растения ткани, клетки и в особенности протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Стерилизация предусматривает уничтожение в стерилизуемом материале (объекте) всех вегетативных и споровых, патогенных и непатогенных микроорганизмов. Стерилизацию производят различными способами: паром, сухим горячим воздухом, кипячением, фильтрацией и т. д. Выбор того или иного способа стерилизации определяется качеством и свойствами микрофлоры стерилизуемого объекта. Стерилизуют помещение, ламинар-бокс, инструменты, посуду, растительный материал, питательные среды, ватные пробки и все другие материалы.

Тема 3. Приготовление маточных растворов и питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений.

Культивирование изолированных клеток и тканей осуществляется на питательных средах, включающих все необходимые растениям вещества (Диксон, 1989; Шевелуха и др., 1995). В работе с культурами клеток и тканей растений используют как твердые (агаризованные), так и жидкие питательные среды. Состав питательной среды подбирают индивидуально для каждого вида растений. На микроклональное размножение влияют такие группы веществ как гормоны, минеральные соли, витамины и углеводы.

В настоящее время существует большое число различных прописей питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений. Наиболее часто для роста различных одно- и двудольных растений применяются среды Мурасиге-Скуга (МС, MS) и Шенка-Хильдебрандта (ШХ). Их считают средами с высоким содержанием солей. Среда Шенка-Хильдебрандта отличается очень высоким, десятикратным содержанием мезоинозита. Среда Шенка-Хильдебрандта и Мурасиге-Скуга содержат железо в хелатированной форме в комплексе с ЭДТА, что обеспечивает его доступность при рН до 8,0 в течение всего роста культуры.

Тема 4. Культура каллусной ткани.

Культура каллусных тканей – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов растений. В ответ на поранение паренхимные клетки, помещенные в питательную среду, содержащую фитогормоны, дедифференцируются, переходят к делению и образуют каллус. Образование и рост каллусной ткани контролируются фитогормонами из группы ауксинов и цитокининов. Каллусную культуру можно иницировать из разных частей растения: стеблей, корней, тканей клубня, листьев, зародышей и др. Кривая роста каллусной ткани, также, как и суспензионной культуры имеет S-образный характер. Для того чтобы сохранить способность к делению и дальнейшему росту, кусочек каллусной ткани переносят на свежую питательную среду.

Тема 5. Суспензионные культуры.

Суспензионные культуры – это одиночные клетки, мелкие, средние и крупные агрегаты (группы клеток), выращиваемые в жидкой питательной среде при постоянной аэрации (доступ кислорода) в асептических условиях. Суспензии получают из каллусов. Модельная кривая роста суспензии имеет S-образную форму и включает: лаг-фазу, экспоненциальную фазу, стационарную фазу и фазу деградации. Суспензии используют для получения важных химических веществ: органических кислот, ферментов, алкалоидов, красителей, белков, аминокислот, которые применяются в фармакологии, парфюмерии, пищевой и химической промышленности, сельском хозяйстве.

Тема 6. Гормональная регуляция в культуре клеток и тканей.

Развитие каллусных клеток может быть различным. Существует несколько путей, по которым может пойти клетка после ее дедифференцировки. Первый путь – это вторичная регенерация целого растения, возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей, органов. Второй путь – это утрата клеткой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растения, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов, т. е. превращение в опухолевую. Такими свойствами часто характеризуются клетки старых пересадочных культур. Третий путь – это нормальный

онтогенез каллусной клетки, заканчивающийся ее старением и отмиранием. Клетка претерпевает вторичную дифференцировку и прекращает делиться (стационарная фаза роста). Однако такая дифференцировка не ведет к морфогенезу, а закрепляет за ней свойства старой каллусной клетки. Для сельскохозяйственной биотехнологии наибольший интерес представляет регенерация в культуре тканей из отдельной клетки целого растения.

Раздел 2. Клональное микроразмножение растений.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – микрклональное размножение. Микрклональное размножение – получение *in vitro*, неполовым путем, генетически идентичных исходному экземпляру растений. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность. В соответствии с научной терминологией клонирование подразумевает получение идентичных организмов из единичных клеток. Этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения.

Тема 7. Технология (этапы) микрклонального размножения.

Этапы (фазы) клонального микроразмножения: выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры; собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мериклонов (микропобегов); укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (от 2 до 10 °С); выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле. Первая фаза микрклонального размножения связана со стимулированием исходного изолированного экспланта к дальнейшему развитию. Вторая фаза – размножение мериклонов связано со стимулированием, активно протекающих процессов дифференцировки, вновь образуемых морфогенных структур. Третья фаза – укоренение вновь образованных *in vitro* побегов связано с индуцированием адвентивных корней. Четвертая фаза – акклиматизация мериклонов происходит при переносе укорененных мериклонов в теплицу.

Существует несколько методов микроразмножения, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки: 1. Активацией развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля); 2. Индукцией возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта; 3. Индукцией соматического эмбриогенеза; 4. Дифференциацией адвентивных почек в первичной и пересадочной к

Раздел 3. Оздоровление растительного материала от вирусов

Тема 8. Получение безвирусного посадочного материала методом термотерапии и химиотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем.

Для получения оздоровленного посадочного материала применяют метод клонального микроразмножения, который широко используется для размножения цветочных, декоративных, лекарственных и других растений. Метод термотерапии применяется как в условиях *in vivo*, так *in vitro* и предусматривает использование сухого йорячего воздуха. Метод химиотерапии заключается в добавлении в питательную среду, на которой культивируют апикальные меристемы, аналога гуанозина (вирозол). Это противовирусный препарат широкого спектра действия. Одним из наиболее важных условий при получении безвирусного посадочного материала является наличие надежных методов тестирования вирусов. Наиболее чувствительными методами, позволяющими диагностировать не только вирусные, но и виroidные патогены, являются новейшие методы моноклональных антител и ДНК-зондов.

5.1.3 Перечень лабораторных работ (ЛР)

№ темы	Наименование лабораторных занятий
Раздел 2. Клональное микроразмножение растений	
Тема 7.	Технология микрклонального размножения. Первый этап: выбор растения-донора и получение хорошо растущей стерильной культуры.
	Технология микрклонального размножения. Второй этап: пролиферация побегов и микрочеренкование стерильных проростков (собственно микроразмножение).
Раздел 3. Оздоровление растительного материала от вирусов	
Тема 8.	Вычленение апикальных меристем и регенерация растений.
	Получение безвирусного посадочного материала методом термо- и химиотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем

5.1.4 Виды самостоятельной работы слушателей (СРС)

№ темы	Вид СРС	Трудоемкость
Раздел 1. Культура клеток и тканей растений		
1.1	Организация лаборатории биотехнологии, оборудование и материалы. Принципы работы. Техника безопасности	1
1.2.	Стерилизация лаборатории, посуды, инструментов, материалов, ламинар-бокса, питательных сред, растительного материала.	1
1.3.	Приготовление маточных растворов и питательных сред.	1
1.4.	Каллусной ткань на растениях	1
1.5.	Культивирование суспензионных культур	1
1.6.	Гормональная регуляция в культуре клеток и тканей.	1
Раздел 2. Клональное микроразмножение растений		
2.1	Наличие законодательных ограничений в Российской Федерации, связанных с применением технологии микрклонального размножения. Требования, предъявляемые к продукции, выпускаемой с использованием данной технологии.	2
2.2	Анализ практик применения технологии микрклонального размножения in vitro на территории Российской Федерации и в мире. Лидеры рынка.	2
2.3	Разработка технологии выращивания in vitro лесных ягодных растений (голубики, княженики, брусники, клюквы).	2
Раздел 3. Оздоровление растительного материала от вирусов		
3.1	Получение элитных генотипов быстрорастущих незараженных вирусами растений.	6

6. ОРГАНИЗАЦИОННО-ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

6.1 Учебно-методическое и информационное обеспечение

6.1.1 Список литературы

№ п/п	Название учебника, автор	Выходные данные	Кол-во
-------	--------------------------	-----------------	--------

1	Лутова Л.А. Биотехнология высших растений: учебник	СПб., 2003: Издательство С.- Петербургского университета. - 227 с.	4
2	Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухина Е. А. Основы биотехнологии: учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности "Биология"	М.: Academia, 2006	12
3	Тихонов Г. П., Минаева И. А. Основы биотехнологии: Методические рекомендации для самостоятельной подготовки студентов	Москва: Московская государственная академия водного транспорта, 2009,	Режим доступа: http://www.iprbookshop.ru/46298
4	Турашева С.К., Оразова С.Б., Турашева С.К., Валиханова Г.Ж. Учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов по дисциплине «Основы биотехнологии. Биотехнология растений»	Алматы: Казахский национальный университет им. аль- Фараби, 2014. - 260 с.	Режим доступа: http://www.iprbookshop.ru/58722.html
5	Наумова А.А., Наумова Т.А., Наумова А.А., Кусачева С.А Основы клеточной инженерии растений: практикум	Саратов: Вузовское образование, 2019. - 45 с.	Режим доступа: http://www.iprbookshop.ru/86301.html
6	Назаренко Л.В., Долгих Ю.И., Загоскина Н.В., Ралдугина Г.Н. Биотехнология растений: учебник и практикум	Москва: Издательство Юрайт, 2019. - 161 с.	Режим доступа: https://www.biblio-online.ruInternetaccesshttps://www.biblio-online.ru/bcode/437437

6.1.2 Интернет ресурсы:

1. Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)
2. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» (ссылка доступа – <http://cbio.ru>)
3. On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)
4. сайт «Основы биотехнологии» (ссылка доступа - <http://www.biotechnolog.ru/map.htm>)
5. Федеральный центр информационно-образовательных ресурсов (ссылка доступа - <http://fcior.edu.ru/>)

6.2.2 Материально-техническое оснащение

№ п/п	Наименование специальных* помещений и помещений для самостоятельной работы	Оснащенность специальных помещений и помещений для самостоятельной работы
-------	--	---

1	Учебные аудитории 620	Мультимедийное оборудование и презентации по темам/
2	Учебные аудитории 639	Лабораторное оборудование.

6.3. Кадровые условия реализации программы:

Макарова Т.А., кандидат биологических наук, доцент
 Самойленко З.А., кандидат биологических наук, доцент
 Макаров П.Н., кандидат биологических наук, доцент

7. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ОСНОВЕНИЯ ПРОГРАММЫ

7.1 Текущий контроль:

7.1.1 Типовые задания.

Раздел 1. Культура клеток и тканей растений

1.1. Организация лаборатории биотехнологии, оборудование и материалы, необходимые для применения технологии микроклонального размножения.

Задание:

1. Изучить требования, предъявляемые к производственному помещению для организации лаборатории биотехнологии.
2. Ознакомиться со списком необходимого оборудования, материалов и иных средств, необходимых для применения технологии микроклонального размножения, поставщики и стоимость оборудования.
3. Освоить принцип работы автоклава, сухожарового шкафа, дистиллятора, термостата, климатической камеры (климатостата).
4. Правила техники безопасности при работе в лаборатории биотехнологии.

1.2. Создание асептических условий для проведения работ с культурой клеток и тканей: стерилизация лаборатории, посуды, инструментов, материалов, ламинар-бокса, питательных сред, растительного материала.

Задание:

1. Заполнить таблицу 1. Условия стерилизации.

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей и клеток является соблюдение строгой стерильности. Стерилизации подвергаются помещения, питательные среды, инструменты, посуда, растительный материал. Для каждого объекта определяют особые условия стерилизации.

Таблица 1

Условия стерилизации помещения, инструментов, посуды, питательных сред и материалов

Объект	Режимы стерилизации (подготовка к стерилизации, температура, время)
1. Лаборатория	
2. Питательные среды	
3. Инструменты	
4. Посуда	
5. Ламинар-бокс	
6. Материалы (бумага, пробки, одежда)	
7. Вода	

2. Заполнить таблицу 2. Стерилизация растительного материала (эксплантов)

Для стерилизации растительного материала применяют стерилизующие вещества, в состав которых входит активный хлор или ртуть. Время стерилизации определяется конкретно для определенного растительного объекта.

Стерилизация растительных эксплантов

Растительный объект	Стерилизующий раствор	Концентрация раствора, %	Время экспозиции, мин
1. Семена сухие			
2. Семена опушенные			
3. Меристемы			
4. Корнеплоды			
5. Корни			
6. Цветочные бутоны			
7. Молодые побеги			
8. Одревесневшие побеги			
9. Изолированные почки			
10. Листья в период вегетации			

3. Описать последовательность стерилизации растительных эксплантов _____

1.3. Приготовление маточных растворов и питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений.

Приготовить маточный раствор среды Мурасиге-Скуга для культивирования изолированных клеток и тканей растений. Для быстрого приготовления питательных сред используют маточные растворы солей, витаминов и гормонов. Маточные растворы солей готовят на дистиллированной воде. Каждую соль из списка макросолей растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, а затем сливают и объем доводят до 1 л маточного раствора, причем раствор $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ вливают последним без нагревания в охлажденную смесь, что предотвращает выпадение осадка. Маточный раствор соли $CaCl_2$ (1000 мл) готовят и хранят отдельно. Маточный раствор хелата железа (раствор $FeSO_4$ и Na_2 ЭДТА) (100 мл), готовят при нагревании и хранят отдельно. Каждую соль микроэлементов также растворяют отдельно и сливают в общий стаканчик, а объем доводят до 100 мл.

1.4. Получение и культивирование каллуса и получение растений-регенерантов.

Задание:

Получить каллус из стебля картофеля.

1. Протереть ламинар изнутри спиртом. Пробирку протереть спиртом, горлышко обжечь.

2. Пинцетом (держать в левой руке) вынуть стерильное растение из пробирки и выложить его на стерильный матрасик.

3. Придерживая растение пинцетом, вырезать скальпелем (держать в правой руке) участки стебля длиной 5-10 мм, не захватывая междоузлия.

4. Надсечь экспланты стебля острым скальпелем в нескольких местах для появления в дальнейшем раневого каллуса.

5. Надсеченные экспланты стебля разместить на поверхности агаровой среды, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой. В одну чашку помещают 10-20 эксплантов.

6. Закрыть чашку Петри и заклеить парафилом в 2 слоя. Парафилм следует равномерно натягивать для предотвращения разрывов при его усыхании.

7. Поставить чашки Петри в кондиционер без освещения при температуре 22-25° и влажности 70%.

8. Рассмотреть и зарисовать образовавшийся каллус.

1.5. Получение и культивирование суспензии.

Задание 1:

Получить суспензионную культуру из каллуса.

1. В асептических условиях извлечь каллус из пробирки и поместить в колбу с питательной средой, из расчета 2-3 г на 100 мл среды: 1. МС+2,4-Д; 2. МС+ИУК; 3. МС+ИУК+6-БАП; 4. МС без гормонов.

2. Колбы с суспензией поместить на круговые качалки при 100-120 об./мин. и оставить на 2 недели.

3. Результаты культивирования суспензии на различных по составу средах зарисовать и сделать выводы.

Задание 2:

Определить степень агрегированности и жизнеспособности суспензии.

Приготовить препарат суспензии: встряхнуть суспензию в колбе, пипеткой отобрать небольшое количество суспензии, поместить каплю суспензии на предметное стекло, добавить каплю красителя, накрыть покровным стеклом, излишки жидкости убрать фильтровальной бумагой.

Поместить препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива и подсчитать клетки и агрегаты в 3-х полях зрения (просмотреть не менее трех препаратов).

Один препарат зарисовать, описать морфологию клеток суспензии (форму, величину).

Сделать вывод о степени агрегированности суспензий (какие фракции преобладают, %) и жизнеспособности суспензии (неокрашенных клеток, %).

1.6. Индукция органогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусной ткани под действием фитогормонов.

Задание 1:

Получить растения-регенеранты путем прямого органогенеза у бегонии.

1. С растения срезают молодые, полностью развернувшиеся листья с черешками.

2. Срезанные листья дезинфицируют с помощью раствора 6% хлорамина в течении 15-20 минут.

3. Листья промывают стерильной дистиллированной водой 3 раза.

4. Разрезают их на фрагменты длиной 5 мм, делают ряд надрезов по всей площади листовой пластинки (вдоль жилок) и помещают в чашки Петри на поверхность агаризованной среды МС, содержащей добавки витаминов по прописи среды Нича (аскорбиновая кислота – 3 мг/л, тиамин HCl – 3 мг/л, пиридоксин HCl – 1 мг/л), фитогормоны: 6-БАП – 0,4 мг/л, НУК – 0,1 мг/л.

5. Культивирование эксплантов осуществляется при температуре 25-29° С, 16-часовом световом дне и освещенности 1000 лк. Придаточные побеги образуются без образования каллуса прямо из экспланта (через 4 недели).

6. Делят каждую культуру и вновь переносят на ту же питательную среду. Эту процедуру повторяют до получения необходимого числа растений.

7. Укореняют побеги, пересаживая их на агаризованную среду МС, содержащую НУК – 0,1 мг/л.

8. Укоренившиеся побеги пересаживают в почву.

Раздел 2. Клональное микроразмножение растений

Этапы (фазы) клонального микроразмножения.

Задание:

Перечислите основные этапы клонального микроразмножения.

2.1. Перечислите какой (какие), из представленных ниже первичных эксплантов, можно использовать при клональном микроразмножении растений:

- Изолированные зародыши
- Изолированная меристема
- Листовые сегменты
- Корневые сегменты
- Изолированные протопласты
- Изолированные пыльники
- Верхушечные и пазушные почки
- Все перечисленные выше

2.1. Технология микроразмножения. Первый этап: выбор растения-донора и получение хорошо растущей стерильной культуры.

Задание:

1. Опишите основные мероприятия первого этапа микроразмножения растений _____

2. Конечный результат первого этапа работ _____

2.2. Технология микроразмножения. Второй этап: пролиферация побегов и микрочеренкование стерильных проростков (собственно микроразмножение).

Микроразмножение пробирочных растений осуществляют с помощью черенкования. Такое размножение основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушки побега. Из пазушных почек на питательных средах образуются побеги. Растения, сформировавшие 5-6 листочков, в стерильных условиях извлекают из пробирок и разрезают на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Черенки высаживают на глубину междоузлия в питательные среды либо без гормонов, либо с добавлением ауксинов.

Задание:

1. Опишите основные мероприятия второго этапа микроразмножения растений _____

2. Конечный результат второго этапа работ _____

2.3. Технология микроразмножения. Третий этап: индукция корнеобразования при клональном микроразмножении растений (укоренение микропобегов).

Для укоренения растений, образовавшихся при микрочеренковании, их необходимо пересадить на новую питательную среду. Черенки и побеги легко укореняются на средах с обедненным составом минеральных солей (среда Уайта, Мурасиге-Скуга, разбавленная вдвое), либо на средах с добавлением ауксинов: ИУК, НУК, ИМК.

Задание:

1. Опишите основные мероприятия третьего этапа микроразмножения растений _____

2. Конечный результат третьего этапа работ _____

2.4. Технология микрклонального размножения. Четвертый этап: адаптация пробирочных растений к почвенным условиям выращивания (адаптация в нестерильных условиях).

Задание:

1. Перечислите приемы, применяемы для адаптации растений *in vitro*, к условиям *in vivo*.

2. Рассчитайте себестоимость одного растения при микрклональном размножении из расчета, что первоначально получено 1 стерильное растение:

а) продолжительность культивирования 1 мес.

Коэффициент размножения _____

б) продолжительность культивирования 6 мес.

Коэффициент размножения _____

Стоимость агара 2200 руб/кг. стоимость среды 90 руб/л

Посадочный материал культивируют в пробирках с объемом среды 10 мл.

Расход агара 7 г/л. 1 л среды разливают на 100 пробирок.

Раздел 3. Оздоровление растительного материала от вирусов.

Задание:

1. Перечислите способы получения безвирусного посадочного материала

3.1. Получение безвирусного посадочного материала методом термотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем.

Задание:

1. Дайте теоретическое обоснование, почему меристематические ткани свободны от вируса?

3.2. Получение безвирусного посадочного материала методом химиотерапии в сочетании с методом апикальных меристем.

Задание:

1. Изучить приемы получения безвирусного посадочного материала методом термотерапии на примере картофеля. Здоровые клубни картофеля тщательно промыть проточной водой. Клубни обработать стерилизующим раствором (спирт, хлорамин), промыть проавтоклавированной водой. Вырезать глазки с частью паренхимы (1,5 × 1,5 см) и поместить в кюветы для проращивания и термотерапии. Проростки, прошедшие термотерапию, поместить в 6 % раствор хлорамина на 5 минут, промыть стерильной дистиллированной водой. В ламинар-боксе под микроскопом вычленить апикальные меристемы и поместить их в пробирки с питательными средами. Весь растительный материал перенести в культуральную комнату.

7.2 Промежуточный контроль:

7.2.1 Типовые тестовые задания.

1. Отметьте название питательных сред, применяемых для культивирования клеток растений:

- а) Питательная среда Гамборга-Эвелега В5;
- б) Питательная среда Дюльбека;
- в) Питательная среда Игла;
- г) Питательная среда Мурасиге-Скуга;
- д) Питательная среда ВМ;
- е) Питательная среда Уайта;
- ж) Питательная среда Эрла;
- з) Питательная среда Эрлиха.

2. Ученые, которые ввели понятие «Морфогенез и регенерация растений» в биотехнологию растений:

- а) П. Опарин;
- б) Ф. Сэнгер;
- в) К. Эреки;
- г) Ф. Скуг;
- д) Т. Шван;
- е) С. Мурасиге;
- ж) Р. Готре;
- з) Д. Дженнер.

3. Каллусная ткань появляется в результате процесса:

- а) Ризогенез;
- б) Дифференциации;
- в) Органогенез;
- г) Дедифференциации;
- д) Геммогенез;
- е) Деление неспециализированных клеток;
- ж) Деспециализация дифференцированных клеток;
- з) Эмбриогенеза.

4. Скорость роста каллусной ткани определяют при помощи следующих показателей:

- а) Увеличение плотности;
- б) Увеличение содержания воды;
- в) Интенсивно растущая каллусная ткань имеет ярко-желтый цвет;
- г) Увеличение массы;
- д) Увеличение количества растений на поверхности каллусной ткани;
- е) Увеличение клеточной биомассы;
- ж) Увеличение объема каллуса;
- з) Изменение консистенции каллуса.

5. К какому классу соединений относятся ауксины?

- а) Алкалоиды;
- б) Фитогормоны;
- в) Ферменты;
- г) Липиды;
- д) Витамины.

7.3 Итоговая аттестация:

7.3.1 Требования к итоговой аттестации.

Для успешной аттестации слушателю необходимо посетить все занятия, выполнить практические и самостоятельные задания. Принести все выполненные задания по СРС в письменном виде.

7.3.2 Типовые задания для итоговой аттестации.

Для итоговой аттестации в виде зачета слушателю необходимо ответить на контрольные вопросы:

1. Каковы главные направления исследования культуры изолированных клеток и тканей растений в биотехнологии?
2. Какие требования предъявляются к устройству лаборатории клонального микроразмножения? Какое оборудование используется при выращивании растений *in vitro*?
3. Назовите компоненты основных типов питательных сред, используемых для клонального микроразмножения ягодных растений.
4. Назовите способы стерилизации помещения, посуды, инструментов, питательных сред, растительных материалов.
5. Какие вещества необходимо применять для освобождения растительных тканей от внутренней инфекции при получении асептических культур *in vitro*?
6. От чего зависят переход дедифференцированных каллусных клеток к вторичной дифференцировке и образование организованных структур в каллусной ткани?
7. С помощью каких внешних факторов можно индуцировать морфогенез в культуре каллусной ткани?
8. Какую роль играют фитогормоны в преобразовании каллусных клеток в организованные структуры?
9. На чем основан метод регенерации растений путем прямого органогенеза?
10. При каких условиях протекает процесс прямого органогенеза у растений?
11. Что представляет собой суспензионная культура?
12. Как получают и используют культуру клеточных суспензий?
13. Какие вещества можно синтезировать в культуре клеток? Каковы условия роста суспензии?
14. Как получить суспензию клеток из каллуса?
15. Как определить жизнеспособность суспензии?
16. Назовите способы и этапы стерилизации растительного материала.
17. Что такое клональное микроразмножение растений? В чем отличие данного метода от традиционных? Перечислите достоинства метода *in vitro*.
18. Назовите и охарактеризуйте основные этапы клонального микроразмножения растений.
19. В чем суть метода активации существующих в растении меристем? Приведите примеры.
20. В чем суть метода индукции возникновения адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте? Приведите примеры.
21. Какова роль гормонов в клональном микроразмножении растений?
22. На чем основаны методы оздоровления посадочного материала от вирусов?
23. Как генотип и возраст первичного экспланта влияют на эффективность клонального микроразмножения растений?
24. Назовите условия, обеспечивающие успешное выращивание ягодных растений на всех этапах клонального микроразмножения. Приведите примеры.

8. ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1.1 Текущий материал

Схема оценивания правильности выполнения лабораторной работы (оценивается по двухбалльной шкале с оценками):

Тип задания	Критерии оценки	Оценка
Лабораторная работа и отчет к ней	- в процессе защиты в ответах и выводах обучающийся уверенно оперирует фактами и практическими результатами, полученными в результате выполнения лабораторной работы; его ответы точны и развернуты. Результаты оцениваются по следующим критериям: полнота выполнения задания; точность и развернутость ответов студента на вопросы преподавателя в ходе защиты лабораторной работы.	Зачтено
	- в процессе защиты в ответах и выводах обучающийся демонстрирует фрагментарный, разрозненный характер знаний материала, допускает грубые ошибки в формулировках основных понятий и не способен использовать полученные знания при решении практических задач.	Не зачтено

1.2 Промежуточный контроль

Схема оценивания тестового задания.

На выполнение тестового задания обучающемуся отводится 20 минут. Предлагается выбрать один или несколько правильных ответов из предложенных вариантов.

Оценка (стандартная)	Оценка (тестовые нормы)
Отлично	90-100%
Хорошо	75-89%
Удовлетворительно	60-74%
Неудовлетворительно	Менее 60%

1.3 Итоговая аттестация

Критерии оценивания знаний, умений, навыков на зачете

Оценка	Критерий оценивания
Зачтено	Обучающийся дает правильные ответы на поставленные вопросы, изъясняется логично, последовательно. Делает обоснованные выводы. Демонстрирует глубокие знания по предмету и дает правильный ответ на дополнительные вопросы. Умеет применять полученные теоретические знания в области охраны биоразнообразия; применять методы полевых и лабораторных исследований при решении поставленных задач. В полной мере владеет методами зоологических исследований (полевых и лабораторных); способен самостоятельно оценить экологический ущерб; владеет навыками поиска и обработки информации в глобальных и локальных компьютерных сетях.
Не зачтено	Обучающийся не имеет определенной системы знаний по изученному курсу. Не ориентируется в базовой общепрофессиональной информации. Не владеет методами клеточной и тканевой биотехнологии.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ

Внутренняя оценка качества реализации включает в себя результаты текущего контроля по освоению программы, результаты промежуточного контроля по освоению программы, результаты итогового контроля по освоению программы, анкетирование слушателей для оценки удовлетворенности качеством реализации дополнительной образовательной программы.