НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ ОВОЧІВНИЦТВА І БАШТАННИЦТВА

Методичні вказівки до виконання семінарських, лабораторних занять та самостійної роботи з дисципліни

СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКА БІОТЕХНОЛОГІЯ ОВОЧЕВИХ І БАШТАННИХ ВИДІВ РОСЛИН

напрям підготовки ____**доктор філософії**__
у галузі знань 20 – аграрні науки та продовольство,
за спеціальністю 201 – агрономія

Розглянуто та затверджено на засіданні групи
забезпечення спеціальності 201 Агрономія
протокол № 6 від 22.09.2021 р.

Селекційне – 2021 р.

Методичні вказівки до виконання семінарських, лабораторних занять та самостійної роботи з дисципліни «Сільськогосподарська біотехнологія овочевих і баштанних видів рослин» за напрямом підготовки доктора філософії у галузі знань 20 – аграрні науки та продовольство, за спеціальністю 201 – агрономія, за спеціалізацією 06.01.05 – селекція і насінництво /Укл. Т. В. Івченко. Селекційне: ІОБ НААН, 2021. 21 с.

Укладач: Т. В. Івченко, доктор с.-г. наук

Навчальне видання

Методичні вказівки до виконання семінарських, лабораторних занять та самостійної роботи з дисципліни «Сільськогосподарська біотехнологія овочевих і баштанних видів рослин» для усіх форм навчання за напрямом підготовки доктора філософії у галузі знань 20 – аграрні науки та продовольство, за спеціальністю 201 – агрономія, за спеціалізацією 06.01.05 – селекція і насінництво усіх форм навчання

©Івченко Т. В., 2021 рік
©ІОБ НААН, 2021 рік

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Мета проведення семінарських, лабораторних занять та самостійної роботи з навчальної дисципліни «Сільськогосподарська біотехнологія овочевих і баштанних видів рослин» є формування у здобувача наукового ступеня доктора філософії системи фундаментальних знань про шляхи вирішення комплексної проблеми щодо підвищення в умовах глобальної зміни клімату ефективності селекції і насінництва овочевих і баштанних культур за рахунок використання безпечних для довкілля методів сільськогосподарської біотехнології. Основні завдання навчальної дисципліни професійної підготовки спрямовані на формування у здобувача (аспіранта) вмінь і навичок до засвоєння нових концепцій, розуміння теоретичних і практичних проблем інтенсифікації селекції і насінництва для вирішення яких ефективним є застосування біотехнологічних методів, формування системи знань щодо для прискореного створення і розмноження нових, генетично удосконалених генотипів овочевих і баштанних рослин, безпечних для навколишньої середовища, формування наукових узагальнень, оволодіння правилами і засобами представлення одержаних результатів науково-дослідної роботи до висвітлення у науковій періодиці та під час написання дисертаційної роботи

У результаті проведення семінарських і лабораторних занять здобувачі повинні ***знати***: теоретичні основи використання в селекції овочевих і баштанних видів рослин нових біотехнологічних методів, які доповнюють традиційні селекційні інструменти і відкривають додаткові можливості для покращення селекції рослин; концепції та підходи щодо раціонального застосування різних біотехнологічних методів у вирішенні продовольчої безпеки людства; еколого-генетичні особливості стійкості рослин до біотичних стресів, типи стійкості та генетичну природу стійкості рослин проти біотичних і абіотичних факторів навколишнього середовища; практичні підходи щодо диференціації та виділення ефективних джерел і донорів з тривалим проявом ознак стійкості для використання у селекції; практичні прийоми застосування в селекційній практиці біотехнологій прискореного створення в культурі *in vitro* подвоєних гаплоїдів, нових мутантних форм, віддалених гібридів, тетраплоїдних форм та ін., направлених на прискорене створення конкурентноздатного лінійного селекційного матеріалу; стандартизовані протоколи молекулярно-генетичної ідентифікації генотипів овочевих і баштанних культур; екологічні та економічна доцільність застосування методів біотехнології; методи виявлення зв’язку між біологічними ознаками, методи порівняння двох і більше сукупностей; знати і застосовувати на практиці принципи білетики.

Після проведення семінарських і лабораторних занять здобувачі повинні ***вміти:*** застосовувати отримані знання та розуміння для вирішення проблем сучасної агрономії; володіти інформацією стосовно сучасного стану і тенденцій розвитку методів сільськогосподарської біотехнології, метою використання

яких є удосконалення і прискорення селекційного процесу; обирати адекватні методи біотехнологічні для ефективного вирішення конкретних науково-практичних задач у селекційному процесі і виробництві для створення, ідентифікації і розмноження селекційного матеріалу; застосовувати методи статистичного аналізу для оцінки вихідного матеріалу; проводити індивідуальний і масовий добір вихідного матеріалу за комплексом господарсько-цінних ознак та показниками адаптивності до різних стресових чинників навколишнього середовища; планувати біотехнологічні процеси, збагачуючі їх новими методами під час роботи із овочевими і баштанними видами рослин; працювати з науково-методичною та довідково-інформаційною літературою з питань молекулярної біології, імунології, клітинних технологій овочевих і баштанних видів рослин; здатність інтерпретувати дані, отримані в результаті наукового дослідження і зіставляти виявлені факти з сучасними концепціями, гіпотезами та теоріями.

До початку практичного і лабораторного заняття здобувачі мають вивчити відповідний теоретичний матеріал за підручниками, конспектами лекцій та іншою рекомендованою літературою, ознайомитися зі змістом і порядком виконання практичної роботи за даною темою.

Виконання практичних і лабораторних робіт оформлюється у вигляді письмового звіту і подається викладачеві для перевірки в кінці заняття. У звіти необхідно відмітити мету роботи, коротко викласти основні теоретичні положення і дати відповіді на контрольні запитання.

Оцінки, отримані здобувачем за окремі практичні, лабораторні заняття, та семінарські заняття враховуються при виставленні підсумкової оцінки з навчальної дисципліни.

Критерії оцінювання занять

Виконання лабораторних, практичних робіт оцінюється у 0-4 балів (за одне заняття).

– 0 балів – відсутність на занятті;
–1 бал – присутність на занятті;
–2 бал – об’єм робіт не виконаний у повному обсязі;
–3 бали – об’єм робіт виконаний у повному обсязі, але допущені незначні помилки, які підлягають корекції;
– 4 бали – об’єм робіт виконаний у повному обсязі, помилки відсутні.

Семінарське заняття оцінюється у 0-4 балів (за одне заняття).

– 4 бали – повна, вичерпна відповідь на поставлене запитання;
– 3 балів – відповідь по суті запитання із незначними неточностями;
– 2 бал – відповідь по суті запитання із суттєвими неточностями;
–1 бал – присутність на занятті, відсутність знань за сформульованим запитанням;
– 0 балів – відсутність на занятті

Семінарське заняття № 1

Тема: Перспективи створення ГМО-генотипів овочевих і баштанних культур

Мета роботи – набуття аспірантом знань з перспектив використання технології ГМО в селекції овочевих і баштанних культур

Практичні завдання.

1. Ознайомлення із основними етапами проведення досліджень у напрямі генетичної інженерії сільськогосподарських рослин
2. Ознайомтесь із Законом України, який регламентує проведення дослідження із ГМО рослинами
3. Проаналізуйте перелік організацій, яким надано право використовувати у своїй роботі ГМО рослини.
4. Порівняйте вимоги до обігу ГМО у різних країна (США, країни ЄС, Аргентина, Україна)

Завдання для перевірки знань

1. Коли вперше було зареєстровано ГМО сорти?
2. Якими законодавчими документами в Україні регулюється виробництво і реалізація генетично модифікованих рослин?
3. Які завдання селекції вирішуються за використання технології переносу генів для овочевих і баштанних видів рослин.

Семінарське заняття № 2

Тема: Аналізування ефективності використання різних систем молекулярних маркерів для розв'язання завдання під час проведення селекційних досліджень і насінництва овочевих і баштанних культур

Мета роботи - формування у аспірантів знань та умінь з установлення ефективності використання різних систем молекулярних маркерів для розв'язання завдання під час проведення селекційних досліджень і насінництва овочевих і баштанних культур

Практичні завдання

1. Проаналізувати основні типи молекулярних маркерів і особливості їх використання в селекційній практиці.
2. Проаналізуйте перелік ефективних молекулярних маркерів необхідна для ідентифікації локусами кількісних ознак (QTL) помідора
3. Проаналізувати перспективи застосування SSR та SNP маркерів для розв'язання завдань практичної селекції овочевих культур
3. Проаналізувати ефективність використання ISSR-аналізу як експрес-методу встановлення генетичного поліморфізму овочевих культур
4. Проаналізувати ефективність використання RAPD для вивченні генетичної структури популяцій, встановленні родинних зв'язків між таксонами, порівняння геномів різних видів овочевих культур.

5. Основні переваги і недоліки застосування технології MAS у селекції овочевих видів рослин

Завдання для перевірки знань

1. Який наявний досвід використання молекулярних маркерів у світовій практиці?
2. Які перспективи використання ДНК-маркерів в селекції овочевих і баштанних видів рослин у світовій практиці?
3. Який стан використання паспортизації та сертифікації генотипів сільськогосподарських рослин в Україні?
4. Які фактори лімітують/стимулюють використання паспортизації та сертифікації генотипів сільськогосподарських рослин у світовій практиці?

Семінарське заняття № 3

Тема: Особливості використання ДНК-паспортів для захисту авторських прав оригінаторів сортів і гібридів

Мета роботи - закріпити теоретичні відомості щодо процедури ДНК ідентифікації сортів, гібридів і селекційних ліній для контролю їх генетичної чистоти та отримати практичні навички проведення аналізу у лабораторних умовах

Практичні завдання

1. Проаналізувати принципи молекулярно-генетичної ідентифікації цибулі ріпчастої, розробленої на основі використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
2. Законспектуйте основні етапи проведення ідентифікації генотипів за допомогою мікросателітних локусів
3. Особливості проведення добору проб для проведення ДНК аналізу зразків
4. Проведення лабораторної роботи із ПЛР аналізу селекційних ліній (виділення ДНК, проведення ПЛР реакції, електрофоретичний розподіл та візуалізація продуктів ампліфікації)
5. Документування результатів ДНК аналізу
6. Особливості розробки ДНК паспортів та складання ідентифікаційних формул, у яких відображено алельний склад мікросателітних локусів
7. Процедура оформлення результатів випробувань в лабораторному журналі та в протоколі випробувань

Завдання для перевірки знань

Які принципи молекулярно-генетичної ідентифікації на основі використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) забезпечують точність методу?
2. Які основні етапи проведення ідентифікації генотипів за допомогою мікросателітних локусів ви знаєте?
3. В чому полягає відмінність проведення добору проб для проведення ДНК аналізу зразків порівняно із ВОЗ тестом
4. Як контролюється достовірність проведення ідентифікації генотипів?
5. Яким документом регламентується процедура документування результатів аналізу?

6. Яку кількість праймерів необхідно використати для розробки ДНК паспортів сорту та гібриду?

Семінарське заняття № 4

Тема: Сучасні підходи до обмеження розповсюдження вірусних хвороб рослин в країнах ЄС

Мета роботи – проаналізувати сучасні проблеми виробництва помідора пов'язані з проблемою розповсюдження вірусу ToBRV

Практичні завдання

1. Проаналізуйте сучасні проблеми виробництва помідора в країнах ЄС пов'язані з проблемою розповсюдження вірусу ToBRV.
2. Джерела розповсюдження вірусних хвороб і методи її запобігання за використання біотехнологічних методів.
3. Проаналізуйте законодавчу базу у країнах ЄС згідно з якою регламентуються технологічні заходи щодо запобігання розповсюдження вирощування вірусу ToBRV помідора у захищеному ґрунті.

Завдання для перевірки знань

1. Яка шкодочинність вірусу ToBRV помідора?
2. Які методи для запобігання розповсюдження вірусу ToBRV ви знаєте?
3. Назвіть перелік біотехнологічних методів, які дозволяють обмежувати розповсюдження вірусу ToBRV помідора?

Семінарське заняття № 5

Тема Основні підходи щодо створення нових генотипів із застосуванням технології CRISPR/Cas

Мета роботи - формування у аспірантів знань стосовно останніх результатів наукових досліджень щодо створення нових генотипів із застосуванням технології CRISPR/Cas

Практичні завдання

1. Проаналізуйте за допомогою джерел Інтернету, в яких країнах, селекційних компаніях і наукових установах проводяться дослідження щодо створення нових генотипів із застосуванням технології CRISPR/Cas**.** Складіть їх повний перелік.
2. Опрацюйте технологічні особливості реалізації цього напряму створення нових генотипів. Складіть загальну схему їх створення.
3. Проаналізуйте думки різних фахівців стосовно екологічних аспектів вирощування культур відредагованих за технології CRISPR/Cas
4. Визначте найбільш перспективні селекційні ознаки овочевих і баштанних видів рослин які можуть бути покращені за використання CRISPR/Cas

Завдання для перевірки знань

1. Які можливості для селекційної практики забезпечує використання технології CRISPR/Cas**?**

2. Які селекційні ознаки овочевих і баштанних видів рослин які можуть бути покращені за використання CRISPR/Cas

3. В чому полягає принципова відмінність між ГМО рослинами і рослинами відредагованими за використання CRISPR/Cas

Семінарське заняття № 6

Тема: Сучасні підходи до інтродукції колекцій овочевих культур з використанням методів біотехнології

Мета роботи - формування у аспірантів знань та умінь щодо сучасні підходи до інтродукції колекцій овочевих культур з використанням методів біотехнології

Практичні завдання

1. Проаналізуйте особливості використання методів in vitro для відновлення життєздатності насіння колекційних зразків НЦГРРУ
2. Особливості тривалого депонування колекційного матеріалу
3. Зберігання колекційних зразків в умовах кріогенних температур
4. Сучасні підходи до інтродукції колекцій овочевих культур з використанням методів біотехнології

Завдання для перевірки знань

1. Яка тривалість зберігання колекційних зразків в умовах кріогенних температур
2. Яки способи уповільнення ростових процесів колекцій in vitro ви знаєте?
3. Як відбувається зберігання колекційних зразків культур з вегетативним типом розмноження?

ПРАКТИЧНІЗАНЯТТЯ

Практичне заняття № 1

Тема: Розробка протоколу проведення ДНК аналізування зразків відповідно до ДСТУ 8667:2016 «Культури овочеві. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації сортів і гібридів

Мета роботи – розробити протокол проведення ДНК аналізування зразків відповідно до ДСТУ 8667:2016 «Культури овочеві. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації сортів і гібридів відповідно до інтересів здобувачів

Практичне завдання

1. Провести добір проб та попередня підготовка досліджуваного матеріалу
2. Виділення ДНК із зразків.
3. Проведення полімеразно-ланцюгової реакції.
4. Візуалізація отриманих даних.

5. Документування результатів складанням формул і розробка генетичних паспортів

Завдання для перевірки знань

1. Які вимоги до лабораторії, в якій проводиться молекулярно-генетичний аналіз зразків?
2. Які правила для маркування і транспортування зразків ви знаєту?
3. Який алгоритм використовують щодо добору ефективних ДНК-маркерів?
4. Який принцип враховують при оформлення ідентифікаційні формули генотипу?

Практичне заняття № 2

Тема: Розробка протоколу культивування рослинних об'єктів в культурі ізольованих клітин і тканин in vitro умовах із дотриманням вимог ISO 17025 та ДСТУ 7645:2014 "Культури овочеві. Метод вегетативного розмноження "

Мета роботи - розробити протоколу культивування рослинних об'єктів в культурі ізольованих клітин і тканин in vitro умовах із дотриманням вимог ISO 17025 та ДСТУ 7645:2014 "Культури овочеві. Метод вегетативного розмноження відповідно до наукових інтересів здобувачів

Практичне завдання

1. Приготування маточних середовищ.
2. Критерії розробки складу поживних середовищ з урахуванням біологічних особливостей експлантатів
3. Приготування твердих поживних середовищ.

Завдання для перевірки знань

1. Яка тривалість зберігання маточних розчинів макро і мікро елементів?
2. Який pH середовища встановлюють при приготуванні штучних середовищ?
3. Які режими стерилізації поживних середовищ забезпечують їх стерильність?

Практичне заняття № 3

Тема: Розробка селективних схем для проведення клітинної селекції в культурі тканин *in vitro*

Мета роботи - розробити селективну схему для проведення клітинної селекції в культурі тканин in vitro відповідно до наукових інтересів здобувачів

Практичне завдання

1. Проаналізувати видовий склад збудників некротрофних хвороб помідора.
2. Провести добір гербарних зразків для виділення чистої культури збудників хвороб
3. Розробка схеми клітинної селекції для добору джерел стійкості помідора до некротрофних хвороб

4. Добір еталонів стійкості для проведення скринінгу стійких генотипів в культурі in vitro

Завдання для перевірки знань

1. Яким вимогам повинен відповідати ефективний селективний фон для добору джерел стійкості?
2. На якому поживному середовищі отримують чисту культуру збудників некротрофних хвороб помідора
3. Як підбирають еталони стійкості до хвороб?
4. Які критерії оцінки ростових процесів на селективних середовищах використовують при проведенні клітинної селекції.

Практичне заняття № 4

Тема: Розробка бізнес-плану розмноження в культурі ізольованих клітин і тканин *in vitro* комерційно затребуваних генотипів

Мета роботи - розробка бізнес-плану розмноження в культурі ізольованих клітин і тканин *in vitro* комерційно затребуваних генотипів відповідно до наукових інтересів здобувачів (бізнес-кейс)

Практичне завдання

1. Проаналізувати структуру витрат на проведення клонального мікро розмноження
2. Встановити тривалість клонування пробіркового матеріалу з урахуванням потреб
3. Проаналізувати собівартість отриманих пробіркових рослин та порівняти її з ринкової ціною
4. Розрахувати рентабельність виробництва пробіркових рослин

Завдання для перевірки знань

1. Обґрунтувати економічну доцільність/збитковість розмноження пробіркових рослин комерційно затребуваної культури.
2. Визначити слабкі місця і переваги даного способу розмноження рослин
3. Розрахувати вартість лабораторії, яка забезпечує високу рентабельність виробництва

ЛАБОРАТОРНІ ЗАНЯТТЯ

Лабораторне заняття № 1

Тема: Методи ідентифікації сортів та гібридів на основі морфологічних і агрономічних ознак, використання ДНК маркерів для генетичної диференціації.

Мета роботи – закріпити теоретичні відомості щодо процедури ДНК ідентифікації сортів, гібридів і селекційних ліній для контролю їх генетичної чистоти та отримати практичні навички проведення аналізу у лабораторних умовах

Практичне завдання

1. Проаналізувати принципи молекулярно-генетичної ідентифікації цибулі ріпчастої, розробленої на основі використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
2. Законспектуйте основні етапи проведення ідентифікації генотипів за допомогою мікросателітних локусів
3. Особливості проведення добору проб для проведення ДНК аналізу зразків
4. Проведення лабораторної роботи із ПЛР аналізу селекційних ліній (виділення ДНК, проведення ПЛР реакції, електрофоретичний розподіл та візуалізація продуктів ампліфікації)
5. Документування результатів ДНК аналізу
6. Особливості розробки ДНК паспортів та складання ідентифікаційних формул, у яких відображено алельний склад мікросателітних локусів
7. Процедура оформлення результатів випробувань в лабораторному журналі та в протоколі випробувань

Завдання для перевірки знань

1. Які принципи молекулярно-генетичної ідентифікації на основі використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) забезпечують точність методу?
2. Які основні етапи проведення ідентифікації генотипів за допомогою мікросателітних локусів ви знаєте?
3. В чому полягає відмінність проведення добору проб для проведення ДНК аналізу зразків порівняно із ВОЗ тестом
4. Як контролюється достовірність проведення ідентифікації генотипів?
5. Яким документом регламентується процедура документування результатів аналізу?
6. Яку кількість праймерів необхідно використати для розробки ДНК паспортів сорту та гібриду?

Лабораторне заняття № 2

Тема: Приготування штучних поживних середовищ для культивування калюсних клітин (томат, морква) і меристематичних тканин та розмноження пробіркового матеріалу

Мета роботи – формування у аспірантів знань та умінь стосовно особливостей розробки протоколів поживних середовищ для культивування калюсних клітин (томат, морква) і меристематичних тканин

Практичні завдання

1. Проаналізувати відмінності у складі поживних середовищ на різних етапах морфогенезу рослинних експлантатів томата
2. Проаналізувати відмінності у складі поживних середовищ для культивування рослинних експлантатів моркви на різних етапах морфогенезу
3. Проаналізувати особливості складу поживних середовищ для ініціації розвитку меристематичних тканин культур для овочевих культур з вегетативним типом розмноження (батат, часник).
4. Визначити особливості складу поживних середовищ для тривалого депонування колекційних зразків

5. Приготування поживних середовищ для укорінення рослин-регенерантів

Завдання для перевірки знань

1. Який алгоритм розробки складу поживних середовищ для культивування клітин і тканин в культурі in vitro ?
2. Які відмінності у складі поживних середовищ при культивуванні для культивування рослинних експлантатів моркви на різних етапах морфогенезу?
3. Чим відрізняються поживні середовища для укорінення пробіркових рослин.
4. За рахунок яких речовин у складі поживних речовин можливо подовжити тривалість пасажування рослинних експлантатів?

Лабораторне заняття № 3

Тема: Сомаклональна мінливість. Вихідний генотип. Стадії розвитку експланту. Вплив мінеральних компонентів поживних середовищ на розвиток клітин. Регулятори росту і розвитку рослин в культурі ізольованих клітин і тканин *in vitro*

Мета роботи – – закріпити теоретичні відомості щодо впливу мінеральних компонентів поживних середовищ, регуляторів росту на розвиток клітин і тканин *in vitro*

Практичне завдання

1. Проаналізуйте значення сомаклональної мінливість у культурі ізольованих клітин і тканин *in vitro* для селекційної практики і насінництва овочевих і баштанних видів рослин.
2. Проаналізуйте особливості використання різних типів донорських експлантатів однорічних, однорічних, багаторічних овочевих культур для створення нових селекційно-цінних джерел і прискореного розмноження перспективних зразків.
3. У вигляді таблиці проаналізуйте відмінності у складі поживних середовищ для різних видів овочевих культур
4. Проаналізуйте основні групи регуляторів росту і особливості їх застосування для регулювання морфогенезу рослинних експлантатів

Завдання для перевірки знань

1. Які завдання селекції овочевих і баштанних видів рослин вирішує використання сомаклональної мінливості?
2. Який тип донорських експлантатів використовують для клонального мікро розмноження стерильних форм цибулі ріпчастої?
3. Які ауксині використовують в поживних середовищах для ініціації різогенезу рослин-регенерантів?
3. За якою формулою визначають приріст розвитку калюсної тканини?
4. Які показники біологічних об’єктів в біотехнології є найбільш інформативними при доборі кращого за досліджуваними ознаками селекційного матеріалу.

Лабораторне заняття № 4

Тема: Селекція на стійкість до біотичних стресових чинників. Селективні фони, специфіка їх створення, способи використання у селекційних програмах на імунітет

Мета роботи – закріпити теоретичні відомості щодо використання клітинної селекції для створення нового вихідного матеріалу для селекції стресотолерантних генотипів

Практичне завдання

1. Визначить, за якими критеріями відбувається відбір ефективних селекційних агентів для проведення клітинної селекції
2. Складіть схему добору джерел стійкості з використанням біотехнологічних методів
3. Особливості використання експериментального мутагенезу в клітинній селекції
4. Проаналізуйте перспективи використання клітинної селекції для добору стресотолерантного вихідного матеріалу в селекції овочевих культур

Завдання для перевірки знань

1. Які головні критерії необхідно враховувати, відбіраючи ефективні селекційні агенти для проведення клітинної селекції ?
2.Чим відрізняється схема клітинної селекції на стійкість до біотичних і абіотичних факторів?
3. Яким чином визначають ефективні дози пля проведення клітинної селекції методами експериментального мутагенезу?
4. Опишіть послідовність приготування культуральних фільтратів фітопатогенів.

Лабораторне заняття № 5

Тема: Технологія клонального мікро розмноження і оздоровлення рослин. Адаптація рослин регенерантів до ґрунтових умов

Мета роботи – закріпити теоретичні відомості щодо принципів ефективного застосування технологій клонального мікророзмноження овочевих культур для прискореного розмноження, оздоровлення і збереження перспективних для застосування в селекції і насінництві генотипів

Практичне завдання

1. Охарактеризуйте основні принципи використання клонального мікророзмноження в селекції і насінництві овочевих культур.
2. Представьте схематично тапи технології клонального розмноження.
3. Проаналізуйте особливості розмноження безвірусного матеріалу
4. Основні критерії успішної організації адаптації рослин-регенерантів та прийоми підвищення життєздатності клонованого матеріалу
5 Принципи організації комерційного розмноження рослин в культурі in vitro та прийоми здешевлення собівартості пробіркового матеріалу

Завдання для перевірки знань

1. Які завдання клонального мікророзмноження є визначальними, для організації розмноження генотипів?
2. Я якою метою проводять хімотерапію вихідних зразків?
3. Охарактеризуйте оптимальні типи донорського матеріалу для розмноження культур, з вегетативним типом розмноження?
4. Які чинники найбільше впливають на собівартість пробіркових рослин?

САМОСТІЙНА РОБОТА ЗДОБУВАЧА

Загальні рекомендації до організації самостійної роботи здобувачів

Обов'язковим елементом успішного засвоєння навчального матеріалу дисципліни «Сільськогосподарська біотехнологія овочевих і баштанних видів рослин» є самостійна робота здобувачів вищої освіти з вітчизняною і зарубіжною літературою з питань теоретичних основ та заходів сортового і насіннєвого контролю овочевих і баштанних культур, особливостей технологій вирощування насіння однорічних, дворічних і багаторічних овочевих. Самостійна робота є основним засобом оволодіння навчальним матеріалом у час, вільний від нормованих навчальних занять, тобто лекційних, семінарських, практичних і лабораторних занять.

Основні види самостійної роботи, на які повинні звертати увагу здобувачі:

- вивчення лекційного матеріалу;
- робота з опрацювання та вивчення рекомендованої літератури;
- підготовка до практичних занять;
- підготовка до дискусій та пропонованих викладачем завдань в межах семінару;
- робота над рефератом (тезами, доповіддю);
- робота над індивідуальними науково-дослідними завданнями здобувачів згідно тематики їх наукової роботи;
- самоперевірка студентом власних знань за запитаннями для самодіагностики;
- підготовка до поточного та підсумкового контролю.

Опрацювання лекційного матеріалу. У системі різних форм навчально виховної роботи особливе місце належить лекції, де викладач надає здобувачу основну інформацію, навчає розмірковувати, аналізувати, допомагає опанувати ключові знання, а також спрямовує самостійну роботу здобувача.

Зв'язок лекції і самостійної роботи здобувача розглядається в таких напрямах:

- лекція як головна початкова ланка, що визначає зміст і обсяг самостійної роботи здобувача;
- методичні прийоми читання лекцій, що активізують самостійну роботу здобувачів;

- самостійна робота, яка сприяє поглибленому засвоєнню теми на базі прослуханої лекції.

Перший етап самостійної роботи починається з процесу слухання і записування лекції. Правильно складений конспект лекції – найефективніший засіб стимулювання подальшої самостійної роботи студентів. Здобувач повинен чітко усвідомити, що конспект – це короткий тезовий запис головних положень навчального матеріалу. Складання і вивчення конспекту – перший етап самостійної роботи студента над вивченням теми чи розділу. Конспект допомагає в раціональній підготовці до практичних занять, заліку, у визначенні напряму і обсягу подальшої роботи з літературними джерелами.

Під час підготовки до лекції здобувач повинен опрацювати матеріал попередньої лекції з використанням підручників та інших джерел літератури. На лекціях висвітлюють тільки основні теоретичні положення та найбільш актуальні проблеми, тому більшість питань виноситься на самостійне опрацювання.

Підготовка до практичних, лабораторних і семінарських занять. Підготовка до практичних, лабораторних і семінарських занять розпочинається з опрацювання лекційного матеріалу. Здобувач повинен самостійно ознайомитися з відповідним розділом робочої програми, підготувати відповіді на контрольні запитання, які подані в програмі у певній послідовності згідно з логікою засвоєння навчального матеріалу.

Практичні, лабораторні і семінарські заняття збагачують і закріплюють теоретичні знання здобувачів, розвиваючи їх творчу активність, допомагають у набутті практичних навичок роботи за предметом навчальної дисципліни.

У процесі підготовки до практичних, лабораторних і семінарських занять самостійна робота здобувачів є обов'язковою частиною навчальної роботи, без якої успішне і якісне засвоєння навчального матеріалу неможливе. Це свідчить про необхідність керування самостійною роботою з боку викладача завдяки проведенню цілеспрямованих організаційних і контрольних заходів.

У разі, коли здобувач не може самостійно розібратися в якомусь питанні, він може отримати консультацію у викладача (згідно з графіком проведення консультацій). Добре організовані консультації дозволяють спрямувати самостійну роботу в потрібному напрямі, зробити раціональною і підвищити її ефективність.

Питання для самостійного опрацювання

до змістовного модуля 1.

Тема 1. Сільськогосподарська біотехнологія – сучасний науковий мультідисциплінарний кластер.

1. Напрями досліджень та досягнення вітчизняних учених і провідних наукових шкіл НААН у галузі молекулярної біології, генетичної і клітинної інженерії

Тема 2. *Генетична інженерія рослин і біобезпека*. Нормативі документи, які регулюють створення та розповсюдження ГМО в Україні, США та ЄС. Біозахист і біобезпека при виконанні генетично-інженерних досліджень.

Тема 3. Молекулярні технології у підвищенні ефективності селекції сільськогосподарських культур.

Будова і функції ДНК. Методи дослідження поліморфізму ДНК. Результати досліджень із вивчення геному роду *Solanum* і їх вплив на подальший розвиток селекції пасльонових культур.

Біоінформатика у дослідженні геному сільськогосподарських рослин. *Тема 4. Специфіка використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів у овочевих культур*.

Стан та перспективи використання паспортизації та сертифікації генотипів сільськогосподарських рослин у світовій практиці

Використання молекулярно-генетичних маркерів в селекції і біотехнології овочевих культур, відповідно до наукових інтересів здобувачів ОНП

Тема 5. Сучасні методи редагування генома сільськогосподарських культур.

Питання біоетики при використання рослин овочевих видів рослин із відредагованим геномом

до змістовного модуля 2.

Тема 6. Проблеми овочівництва і використання методі в культури ізольованих клітин і тканин in vitro для прискорення сортової і гібридної селекції.

Історія розвитку клітинних технологій *in vitro* в Україні та за кордоном.

Основні напрямки використання біотехнологічних методів в селекції і насінництві овочевих рослин.

Особливості біології однорічних і дворічних овочевих культу і їх значення у розробці біотехнологічних методик.

Напрямки застосування клітинних технологій для овочевих культур з вегетативним типом розмноження.

Тема 7. Біотехнології отримання лінійного матеріалу на основі гаплоїдів, їх можливості, проблеми, результати практичного застосування на овочевих культурах.

Технологія створення лінійного матеріалу сільськогосподарських рослин за традиційних селекційних методів. Андрогенез *in vitro*.

Гіногенез *in vitro*. Індукований апоміксіс. Результати використання технології індукції подвоєних гаплоїдів в селекції овочевих культур.

Тема 8. Методичні підходи до використання клітинної селекції для створення нового вихідного матеріалу для селекції стресотолерантних генотипів.

Методичні підходи до створення джерел стійкості до біотичних і абіотичних культур методами клітинної селекції. Відбір ефективних селекційних агентів для проведення клітинної селекції.

Схеми добору джерел стійкості з використанням біотехнологічних методів. Експериментальний мутагенез і його використання в клітинній селекції. Результати і перспективи використання клітинної селекції для добору стресотолерантного вихідного матеріалу в селекції овочевих культур.

Тема 9. Збереження генофонду з використання методів біотехнології. Використання методів *in vitro* для відновлення життєздатності насіння

колекційних зразків НЦГРРУ. Особливості тривалого депонування колекційного матеріалу. Зберігання колекційних зразків в умовах кріогенних температур. Сучасні підходи до інтродукції колекцій овочевих культур з використанням методів біотехнології.

Тема 10. Методи клонального мікророзмноження рослин.

Особливості застосування технології клонального мікро розмноження в системі насінництва овочевих культур з вегетативним типом розмноження

ПІДСУМКОВИЙ КОНТРОЛЬ

Для визначення рівня засвоєння аспірантами навчального матеріалу, враховуючи, що вид контролю – **залік**, приймається наступне оцінювання:

- поточне оцінювання на семінарських, практичних і лабораторних заняттях;
- виконання індивідуального завдання (підготовка реферату).

Підсумковий контроль знань здійснюється шляхом написання заліку. На заліку, що проводиться методом тестування, рейтинг здобувача вищої освіти з атестації (**$R_{АТ}$**) (**не більше 30 балів**) визначається за формулою:

$$R_{АТ} = \frac{К_{прав}}{К_{заг}} \cdot 30$$

$К_{заг}$ - загальна кількість елементів у бланку еталонних відповідей;

$К_{прав}$ - кількість правильних елементів у бланку відповідей.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. Івченко Т.В., Баштан Н.О., Кондратенко С.І., Яровий Г.І. Капуста головчаста, морква, буряк столовий, цибуля ріпчаста, помідори, огірок, перець. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації сортів і гібридів. Методичні рекомендації . – Мерефа: .ІОБ УААН, 2010. – с.
2. Івченко Т. В., Корнієнко С. І., Кондратенко С. І., Сергієнко О. Ф., Віценя Т. І., Баштан Н. О. та ін.. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro* (методичні рекомендації). Харків : Плеяда, 2013. – 47 с.
3. Chapter10. Realization of Genetic Potential for Mutant Variability in Tomato Breeding / S. Kornienko, T. Ivchenko, M. Gurin // Mutagenesis: Exploring Novel Genes and Pathways / Book editors N. Tomlekova, I. Kozgar, W. Rafiq / Wageningen Academic Publishers: The Netherlands, 2014. – P. 57-77ю
4. Корнієнко С. І. Методологія створення гібридів F_1 моркви на основі ЦЧС / С. І. Корнієнко, Т. К. Горова, Т. І. Івченко та ін. // ІОБ НААН. – Х., 2016. – 80 с.
5. Волкова Н. Е. Молекулярно-генетичні дослідження ядерного геному кукурудзи: монографія. Одеса : Астропринт, 2015. – 120 с.
6. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Київ: Поліграф консалтинг, 2003. 520 с. 11. От микроспоры к сорту / Т. Б. Батыгина и др. Москва: Наука, 2010. 174 с.

7. Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів: Закон України від 04.10.2018 р. № 1103-V. Відомості Верховної Ради України. 2007. № 35. С. 484.
8. Сатарова Т. М. Молекулярно-генетичні та біохімічні методи контролю за сортовими якостями насіння кукурудзи. Насінництво кукурудзи: навчальний посібник. Київ: Аграрна наука, 2019. С. 150–175.
9. Сатарова Т. М., Абраімова О. Є., Вінніков А. І., Черенков А. В. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. Дніпропетровськ: Адверта, 2016. 136 с.
10. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Календар Р. Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. Одесса: Астропринт, 2011. 336 с.
11. Тимофеева О. А., Румянцева Н. И. Культура клеток и тканей растений: учебное пособие. Казань, 2012. 92 с.
12. Гончаренко Г. Г. Основы генетической инженерии.- Минск: Изд-во Вышэйшая школа, 2005. – 254 с.
13. Сатарова Т. М. SNP-аналіз у паспортизації та ідентифікації ліній кукурудзи / Т. М. Сатарова, Б. В. Дзюбецький, В. Ю. Черчель, В. В. Борисова М. М. Таганцова // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин № 3, 2014. – С. 4–9.
14. Сиволап Ю. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці, ячменю, кукурудзи, соняшнику за допомогою аналізу мікросателітних локусів (метод. реком.) підгот.: Ю. Сиволап, В. Волкодав, М. Бальвінська, Н. Кожухова, А. Солоденко, С. Чеботар. — ПБЦ в рослинництві УААН. Одеса. – 2004. – 14 с.
15. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
16. Егорова Н. А. Методические указания по самостоятельной подготовке для выполнения лабораторно-практических занятий по дисциплине "Основы биотехнологии растений" // Н. А. Егорова, И. Р. Зильберварг. – Симферополь: ЮФ "КАТУ" НАУ, 2009. – 40 с.
17. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro* / С. А. Игнатова. – Одесса : Астропринт, 2011. – 224 с.
18. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наук. думка, 1980. – 488 с.
19. Беззадіна С. О. Генна інженерія в сільському господарстві. Вісник СНТ ННІ бізнесу і менеджменту ХНТУСГ. 2019. № 1. С. 87-90.
20. ДСТУ 7645:2014 Культури овочеві. Метод вегетативного розмноження *in vitro* / Т. В. Івченко, В. Ю. Гончаренко, О. М. Гончаров, Г. І.Яровий, Т. І. Віценя. – [Чинний від 2015–01–01]. – Київ: Держспоживстандарт України, 2014. – 21с.
21. ДСТУ 8667:2016 Культури овочеві. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації сортів і гібридів / Т. В. Івченко, Ю. М. Сиволап, Н. Е. Кожухова, Н. О. Баштан А. В. Солоденко, О. Є. Гузеватий [Чинний від 2017–01–01]. – Київ: Держспоживстандарт України, 2016. – 21с.

Допоміжна

1. Мірошніченко В. П., Самовол О. П. Івченко Т. В. Методичні рекомендації з одержання і розмноження в культурі *in vitro* рослин міжвидових гібридів томата Мерефа: ІОБ УААН, 2010. – 9 с.
2. Івченко Т. В., Віценя Т. І., Шабетя В. В. Методичні рекомендації з середньотривалого зберігання колекційних зразків озимого часнику в умовах *in vitro*. – Мерефа: ІОБ НААН, 2010, 15 с.
3. Шабетя О. М., Івченко Т. В., Кондратенко С. І., Задорожна О. А., Баштан Н. О. та ін. Збереження насіння пасльонових культур у стані життєздатності та генетичної автентичності: методичні рекомендації. Харків, 2014. – 24 с.
4. Івченко Т. В., Корнієнко С. І., Баштан Н. О. та ін. Біотехнологічний спосіб створення поліплоїдних форм кавуна (Методичні рекомендації). Мерефа: ІОБ НААН, 2015. – 28 с.
5. Івченко Т. В., Корнієнко С. І., Колєснік І. І., Мозговська Г. В., Віценя Т. І. Біотехнологічний спосіб подолання посгамної несумісності при міжвидовій гібридизації гарбуза в культурі *in vitro* (Методичні рекомендації). Мерефа: .ІОБ НААН, 2015. – 28 с.
6. Мірошніченко Т. М., Самовол О. П., Івченко Т. В. Клональне мікророзмноження в культурі *in vitro* стерильних генотипів томата. Методичні рекомендації. Селекційне: ІОБ НААН, 2018. – 15 с.
7. Івченко Т. В., Мозговська Г. В., Віценя Т. І., Баштан Н. О. Методичні підходи щодо селекції та сучасних технологій розмноження і вирощування батату *Ipomoea batatas* L.) (методичні рекомендації). Селекційне: ІОБ НААН, 2018. 34 с.
8. Івченко Т. В. Баштан Н. О., Могильна О. М. Методичні рекомендації з ідентифікації сортів цибулі ріпчастої за допомогою аналізу мікросателітних локусів. Селекційне: Плеяда, 2018.
9. Інформаційні ресурси (сайти)
Міністерство освіти та науки України [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.mon.gov.ua
Національна бібліотека України ім. В.І. Вернадського [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.nbuv.gov.ua/
Науковий вісник [Електронний ресурс]. – Режим доступу: : http://www.nbuv.gov.ua/ portal/Soc Gum /Gilleya 32/ F4_doc.pdf
Наука і освіта [Електронний ресурс]. – Режим доступу: : http://www.nbuv.gov.ua/ portal/Soc Gum /NIO /metod/sagk.htm
Періодичні наукові видання: журнал “Селекція і насінництво”; журнал “Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів”; журнал “Овочівництво і баштанництво: міжвідомчий тематичний науковий збірник”
http://www.vir.nw.ru – (Всеросійський інститут рослинництва ім. М.І. Вавилова, Санки-Петербург, Росія)
http://vnis.com.ua – (Всеукраїнський науковий інститут селекції)
http://www.icrisat.org – (Міжнародний інститут с.-г культур для засушливих тропіків)
http://cipotato.org– (Міжнародний центр по картоплі)
http://www.cgiar.org – (Міжнародний інститут сільського господарства тропіків)
http://avrdc.org– (Світовий центр овочевих культур)
http://plantscience.cals.cornell.edu– (School of Integrative Plant Science)

http:// www.plantbreeding.org– (National Association of Plant Breeders)
http://www.extension.org– (Journal Plant Breeding and Genomics)
http://www.academicjournals.org/journal/jpbcs - (Journal of Plant Breeding and Croup Science)
http://sbio.info
http://www.biotechnolog.ru
http://www.genetika.ru
www. agroinsurance. com
http://www. gaftakyiv. com
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/
http://iopi.csu.edu.au/iopi/
http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/
http://www.nal.usda.gov/pgdic/
http://www.upov.int/portal/index.html.en

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ …… 3
СЕМІНАРСЬКІ ЗАНЯТТЯ …… 4
Семінарське заняття № 1 Перспективи створення ГМО-генотипів овочевих і баштанних культур…… 4
Семінарське заняття № 2 Аналізування ефективності використання різних систем молекулярних маркерів для розв'язання завдання під час проведення селекційних досліджень і насінництва овочевих і баштанних культур …… 5
Семінарське заняття № 3 Особливості використання ДНК-паспортів для захисту авторських прав оригінаторів сортів і гібридів ……... 5
Семінарське заняття № 4 Сучасні підходи до обмеження розповсюдження вірусних хвороб рослин в країнах ЄС …….. 6
Семінарське заняття № 5 Основні підходи щодо створення нових генотипів із застосуванням технології CRISPR/Cas ……. 7
Семінарське заняття № 6 Сучасні підходи до інтродукції колекцій овочевих культур з використанням методів біотехнології …….. 7
ПРАКТИЧНІ **ЗАНЯТТЯ** 8
Практичне заняття № 1. Розробка протоколу проведення ДНК аналізування зразків відповідно до ДСТУ 8667:2016 «Культури овочеві. Молекулярно-генетичний метод ідентифікації сортів і гібридів …… 8
Практичне заняття № 2. Розробка протоколу культивування рослинних об'єктів в культурі ізольованих клітин і тканин in vitro умовах із дотриманням вимог ISO 17025 та ДСТУ 7645:2014 "Культури овочеві. Метод вегетативного розмноження "…….. 9
Практичне заняття № 3. Розробка селективних схем для проведення клітинної селекції в культурі тканин in vitro …… 9
Практичне заняття № 4. Розробка бізнес-плану розмноження в в культурі ізольованих клітин і тканин *in vitro* комерційно затребуваних генотипів …… 10
ЛАБОРАТОРНІ ЗАНЯТТЯ …… 10
Лабораторне заняття № 1. Методи ідентифікації сортів та гібридів на основі морфологічних і агрономічних ознак, використання ДНК маркерів для генетичної диференціації …….. 10
Лабораторне заняття № 2 Приготування штучних поживних середовищ для культивування калюсних клітин (томат, морква) і меристематичних тканин 11
Лабораторне заняття № 3 Сомаклональна мінливість. Вихідний генотип. Стадії розвитку експланту. Вплив мінеральних компонентів поживних середовищ на розвиток клітин. Регулятори росту і розвитку рослин в культурі ізольованих клітин і тканин *in vitro* …… 12
Лабораторне заняття № 4 . Селекція на стійкість до біотичних стресових чинників. Селективні фони, специфіка їх створення, способи використання у селекційних програмах на імунітет …….. 13
Лабораторне заняття № 5.Технологія клонального мікро розмноження і оздоровлення рослин. Адаптація рослин регенерантів до ґрунтових умов 13
САМОСТІЙНА РОБОТА ЗДОБУВАЧА 14
ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОГО ОПРАЦЮВАННЯ …… 15
ПІДСУМКОВИЙ КОНТРОЛЬ 17
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА 17

Укладач: Т. В. Івченко

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

ДО ВИКОНАННЯ СЕМІНАРСЬКИХ і ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ УСІХ ФОРМ НАВЧАННЯ

з дисципліни **«Сільськогосподарська біотехнологія овочевих і баштанних видів рослин»**

для здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії у галузі знань 20 – аграрні науки та продовольство, за спеціальністю 201 – агрономія.

Комп’ютерна верстка : Івченко Т. В.