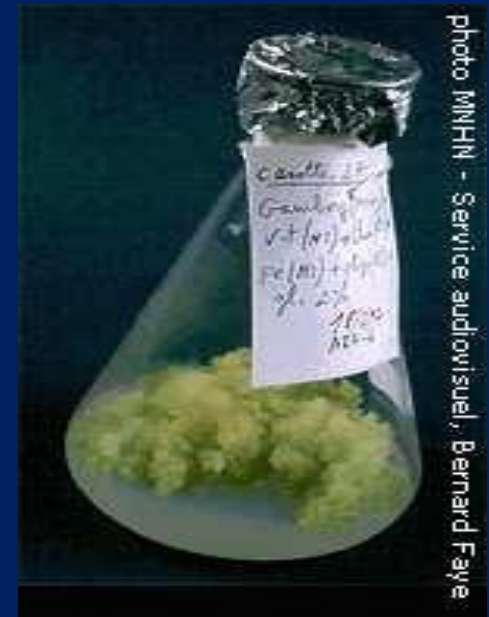


# Тақырып

## Өсімдік клеткаларын in vitro жағдайында өсіру әдістері



## **Жоспар:**

**1. Залалсыздандыру**

**2. Қоректік орталар**

**3. Клеткаларды өсіруге қажетті жағдайлар**

**4. Қаллусты алу және оны өсіру**

# 1. Экспланттарды залалсыздандыруға арналған заттар

Дезинфекант аталуы	формуласы
Этил спирті	$C_2H_5OH$
Натрий гипохлориді	$NaClO$
Кальций гипохлориді	$Ca(ClO)_2$
Хлорамин Б	$(C_6H_5SO_2N(Na)Cl \times 3H_2O)$
Сулема	$HgCl_2$
Сутегінің асқын тотығы	$H_2O_2$
Бром	$Br$
Фенол	$C_6H_5OH$
Конц.күкірт қышқылы	$H_2SO_4$

### Стерилизация исходного растительного материала

Объект	Время стерилизации, мин			
	дипацид 0,1 %	сулема 0,1 %	гипохлориты Na, Ca 5-9 %	перекись водорода 10-12 %
Семена сухие	15-20	10-15	15-20	12-15
Семена набухшие	6-16	6-8	10-15	6-8
Ткани стебля	20-40	20-25	20-25	-
Листья	1-3	0,5-3	3-6	3-5
Апексы	1-10	0,5-7	3-15	2-7

## Мурасиге-Скуг қоректік ортасы

Компаненттер	Концентр., мг/л.	Компаненттер	Конц., мг/л.
<u>Макроэлементтер</u>		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{KNO}_3$	1900	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	160	Темір хелаты	
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	<u>Органикалық заттар</u>	
<u>Микроэлементтер</u>		Мезо-инозит	100
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	Тиамин – HCl	0,1
KJ	0,83	Никотин қышқылы	0,5
$\text{H}_2\text{BO}_3$	6,2	Пиридоксин - HCl	0,5
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	<u>Сахароза</u>	30000
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	pH	5,6-5,8

✓ Негізгі минералды тұздар

Азот, фосфор, күкірт, темір;  
кальций, калий, магний иондары;

Бор, марганец, мырыш, мыс, молибден,  
кобальт т.б.

ЭДТА (этилдиаминтетрасірке қышқылы)  
немесе  $\text{Na}_2$  ЭДТА –қоректік ортадағы  
темірдің сіңімділігін жақсартады.

- ❖ **In vitro жағдайында клеткалар гетеротрофты қоректенетіндіктен оларға көмірсулар қажет (2-3 % сахароза, глюкоза);**
- ❖ **Витаминдер клеткалардағы биохимиялық процестерді ырықтандырып олардың тежелмеуіне және клеткалардың өсуіне әсер етеді.**

**В тобы (В<sub>1</sub> - тиамин, В<sub>2</sub> -рибофлавин, В<sub>6</sub> – пиридоксин, Са- пантотенат – В<sub>5</sub> );**

**никотин – РР және аскорбин- С қышқылдары; мезоинозит.**

❖ Фитогормондар – клеткадағы барлық физиологиялық процестерді реттейді

- ✓ ауксиндер – ИСК, 2,4-Д, НСК; ИМК, ФСК, ФМК
- ✓ цитокининдер (БАП, кинетин, зеатин);
- ✓ Гиббериллиндер
- ✓ Абсциз қышқылы

❖ Комплексті органикалық қосылыстар

- **экстракттар** (уыд, ашытқы, картоп, ісік
- ұлпалары т.б.);
- **шырындар** (қайың, томат, апельсин);
- пісіп жетілмеген **эндосперм** (кокос жаңғағы, каштан, жүгері);
- **казеин гидролизаты,**
- **амин қышқылдар.**



## ❖ Қоректік ортаның рН 5,5-6

(табиғи жағдайда рН 5,5-7,5)

- макромолекулалардың (**ферменттердің**) құрылымы мен ырықтығына әсер етеді;
- витаминдердің тұрақтылығына және сіңімділігіне әсер етеді;
- рН төмен ортада **агар** қатпайды;
- Казеин гидролизаты мен ашытқы экстракты бар қоректік ортаның рН клеткалар өсе келе аз өзгереді.

- Агар-агар – теңіз балдырларынан өндірілетін полисахарид.
- Бактериялық агар: Difco, Bacto-Agar
- қоректік ортаға 7-9 г/л қосады,
- Агар сумен қосылып - гель түзеді,
- 70-80<sup>0</sup>С балқиды,
- 45-50<sup>0</sup>С қатады.

при культивировании *in vitro*

Компоненты сред	Концентрация (мг/л) в средах по прописи				
	Мурасиге и Скуга	Гамборга и Эвелега	Уайта	Нича, Нич	Као и Ми- хайлюка
$KNO_3$	1900	3000	81	950	1900
$NH_4NO_3$	1650	—	—	720	600
$Ca(NO_3)_2$	—	—	142	—	—
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	—	—	—	—	—
$(NH_4)_2SO_4$	—	134	—	—	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	500	74	185	300
$CaCl_2 \cdot H_2O$	—	—	—	166	—
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	150	—	—	—
KCl	—	—	65	—	300
$KH_2PO_4$	170	—	12	68	170
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	150	—	—	—
$MnSO_4 \cdot H_2O$	—	10	—	—	10
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3	—	—	25	—
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8,6	—	—	—	2
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	—	2	—	10	—
$H_3BO_4$	6,2	3	—	10	3,6
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,075	—	0,025	0,025
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	—	0,25	0,25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	—	—	0,025
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	—	—	27,8	5,0
$NaEDTA \cdot 2H_2O$	37,3	—	—	37,3	—
Секвестрен 330–Fe	—	28	—	—	—
Мезоинозит	100	—	—	200	100
Аскорбиновая кислота	—	—	—	3	—
Тиамин–HCl	0,5	—	—	3	0,005
Пиридоксин–HCl	0,5	—	—	1	0,005
Никотиновая кислота	0,5	—	—	—	—
Сахароза	30000	20000	20000	60000	125

### 3. Клеткаларды өсіруге қажетті жағдайлар

#### ➤ **Температура**

- **каллустық** ұлпаларды өсіру -  **$25 \pm 2$  °С**;
- клетка мен ұлпа культураларын өсіру және **морфогенезді** индукциялау - **18-20 °С**;

#### ➤ **Жарық** (люминисцентті лампалар - **1000 люкс**);

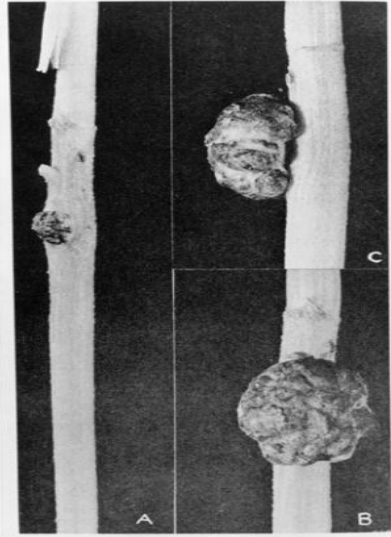
- морфогенезді индукциялайды;
- екінші реттік метаболиттердің синтезіне әсер етеді;
- жылу көзі;

## 4. Қаллусты алу және оны өсіру

Клеткалардың ретсіз бөлінуі нәтижесінде пайда болған ұлпаны **қаллус** деп атайды.

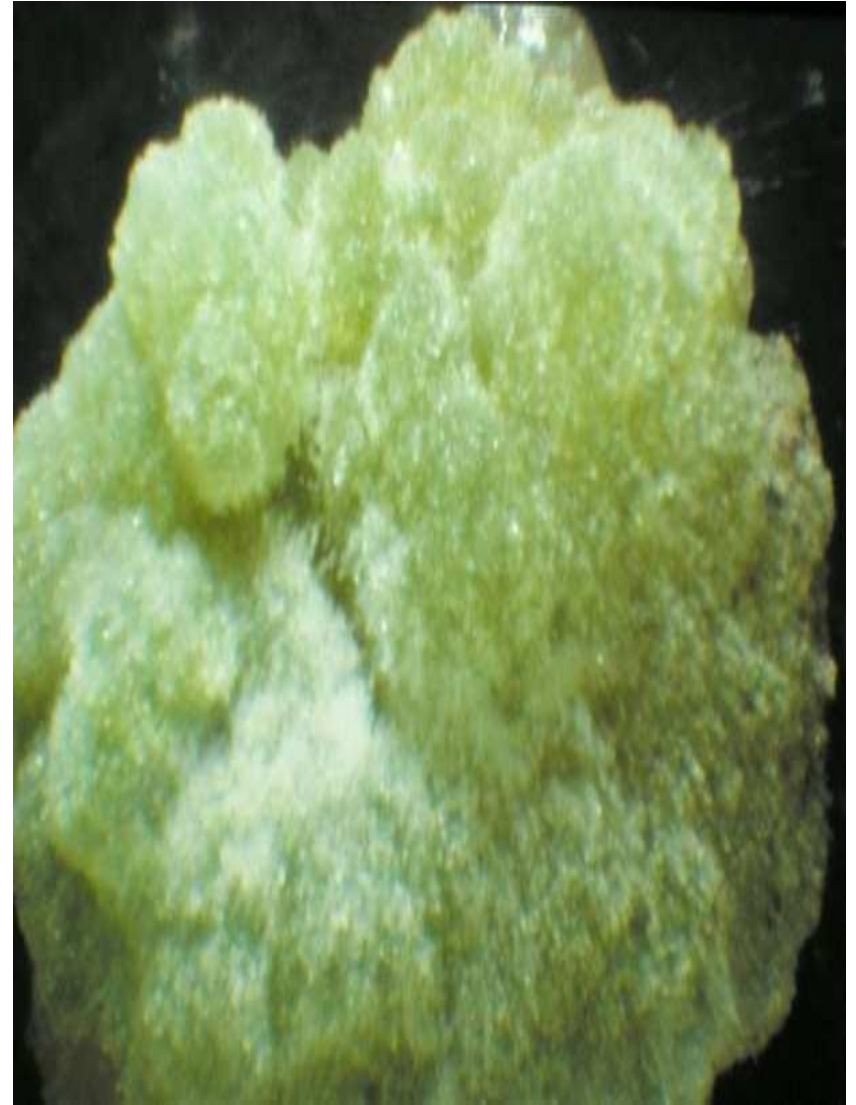
Клеткалардың бөлінуі арқылы көбейіп өсуін **пролиферация** деп атайды.







- *In vitro* жағдайында түзілген каллустар



- **Дифференциация** – даму процесінде біртекті клеткалардан морфологиялық белгілері және атқаратын қызметі әр түрлі клеткалар түзілуі (клеткалардың мамандануы);
- **Дедифференциация** – маманданған, бөліну қабілетінен айырылған клеткалардың жаңадан пролифферацияға (бөлінуге) көшуі;



## Каллус ұлпасына сипаттама

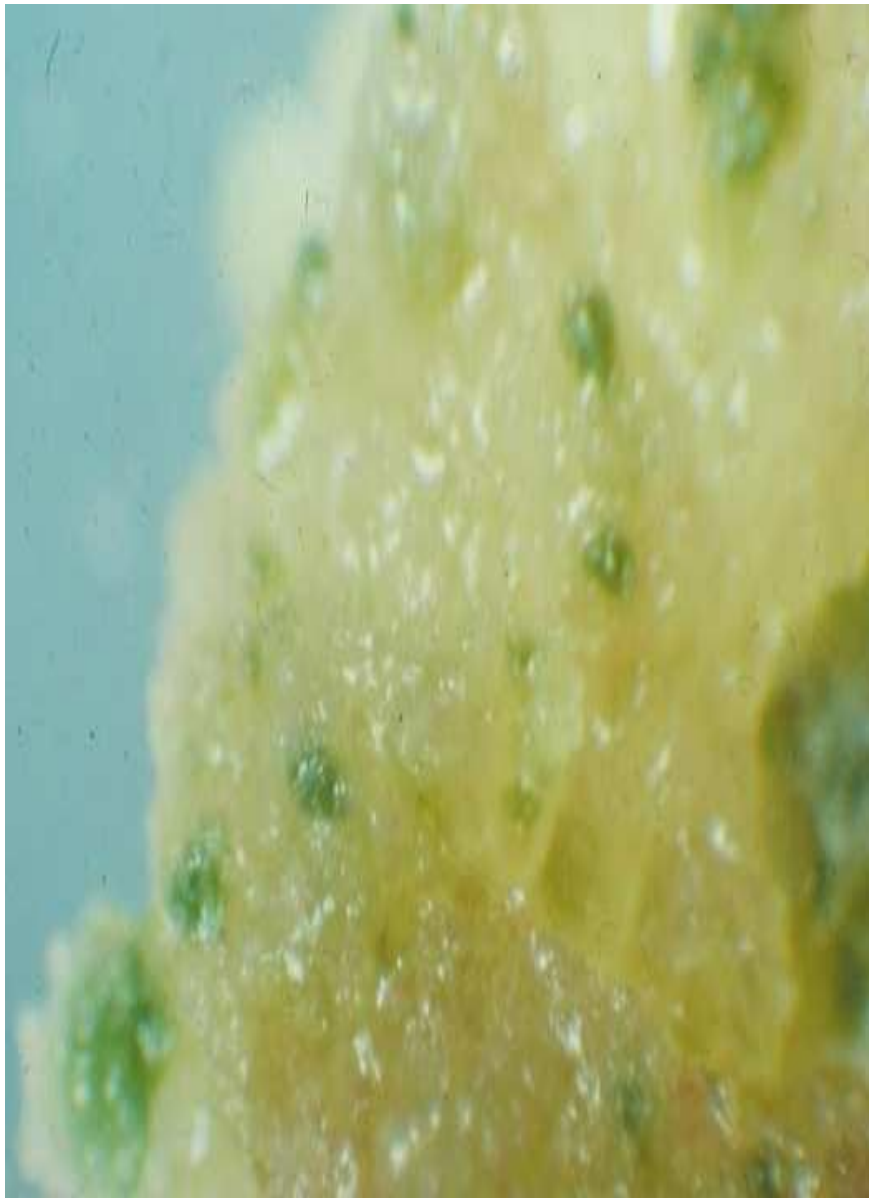
- ✓ түсі;
- ✓ тығыздығы;
- ✓ ылғалдылығы;
- ✓ борпылдақтығы;
- ✓ жылтырлығы;
- ✓ түйіршіктілігі;
- ✓ каллус бетінде басқа да ұлпалардың (ақ, сұр, жылтыр қырау тәрізді үлпек) болуы.

## **Каллустың түзілуі:**

- Экспланттың қоректік ортаға жанасқан бетінде;
- Жарақаттанған жерінде;
- Сабак кесіндісінің базалды немесе апикальді бөлігінде пайда болады;
- Сабактың өне бөйында пайда болады.

## **Каллустардың түрлері:**

- Морфогенді;
- Морфогенді емес,
- Эмбриогенді;
- Гистогенді



**Морфогенді каллус**



**Эмбриогенді каллус**



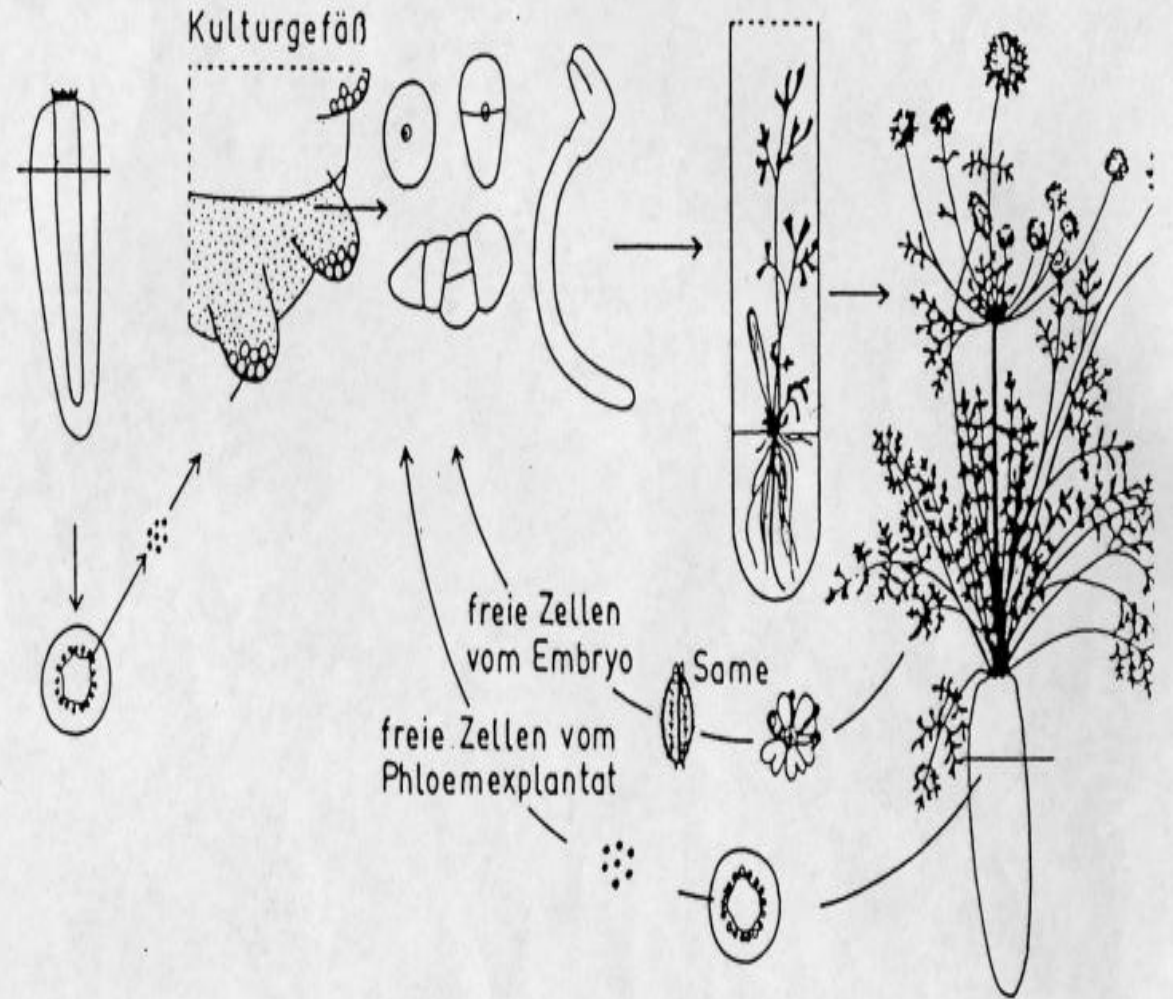
**Суспензия культурасы**

# Каллус ұлпасының түзілуі мен пайда болған каллустың табиғаты:

- ✓ **экспланттың тегінен,**
- ✓ **экспланттың жас ерекшелігінен,**
- ✓ **қоректік ортаның құрамынан,**  
**фитогормондардың табиғаты мен**  
**концентрациясынан,**
- ✓ **өсіру жағдайынан тәуелді.**

## Beweisführung für die Omnipotenz spezialisierter Zellen

Abb. 482. Der im Text näher geschilderte Weg vom Phloemexplantat aus einer Rübe von *Daucus carota* führt über freie Einzelzellen und daraus entstehende Embryoide zu einer in jeder Hinsicht normalen Karottenpflanze. Man kann die Einzelzellen auch aus Embryonen (jungen Sporophyten) herstellen. (Nach STEWARD et al., 1964)



PAXMET!!!