

4. Өсімдіктердің клеткалық инженериясы. Клеткаларды және ұлпаларды жасанды қоректік ортада өсіру. Клеткалық инженерияның жетілу тарихы. Өсімдіктердің оқшауланған клеткалары мен ұлпаларын қоректік ортада өсіру әдістері мен жағдайлары. Дедифференциялану және каллусогенез. Жасанды қоректік ортада өскен клеткалар мен ұлпалардың типтері. Каллус ұлпаларының сипаттамасы. Каллус ұлпаларының морфогенезі. Тотипотенттілік.

Қазіргі кезде ағарды көбінесе порошок түрінде пайдаланады, оны жуу қажеті жоқ. Клетка өсіруде бірінші табыстарға жеткен Р.Готре мен Ф.Уайт клеткаларды ағар қосылған қоректік ортада өсіруді бастап еді. Қоректік ортаны таңдай өсімдіктің түріне және тәжірибенің мақсатына байланысты. Әдебиетте керек хабар (информацияны) табылмаған күнде, тәжірибені әдетінше кең қолданылатын Мурасиге Скугтың, Шенк-Хильдебрандтың, Гамборгтың В5, Уайттың, Хеллердің, Линемайер-Скугтың қоректік орталарын пайдаланады. Одан кейін гормондар мен органикалық қосымшалардың концентрациясын іріктеп ала бастайды. Қазіргі уақытта кейбір фирмалар МС-тың, Уайт, Хеллер орталарын (ішінде фитогормондар, сахароза және ағардан басқалардың бәрі бар) құрғақ ұнтақ түрінде шығарады. Мұндай дайын орталар тек қоректік ортаның құрамы өзгертілмейтін тәжірибелерде пайдаланылады. Барлық физиологиялық процестерді реттейтін фитогормондар болғандықтан, олар қоректік ортаның маңызды компоненттері деп есептеледі. Клеткаларға бөліну және дифференциялану үшін әсіресе ауксин мен цитокинин қажет. Тек қана ісік клеткалары мен «қалыптасқан» ұлпалар гормондары жоқ ортада өсе алады. «қалыптасқан каллус клеткалары гормондарды қажет етпейді, олар гормондарға прототрофты келеді, себебі өздерін-өздері қамтамасыз ете алады. КАЛЛУС-бұл ұлпаның ерекше түрі, өсімдік клеткалардың ретсіз бөлінуі нәтижесінде пайда болған ұлпа, басқаша айтқанда каллус – ол бүтін өсімдіктің зақымданған жері (жарасы) біте бастаған кезде түзілетін білеуленген бұлтық. Каллус зақым болған жерді әр түрлі инфекциядан қорғайды. Каллус ұлпасында қоректік заттар жиналып, арнаулы

қорғаныш қабат пайда болады немесе жойылған мүше қайта пайда болады, яғни регенерация процесі өтеді. Сондай каллус ұлпасы *in vitro* жағдайында да пайда болады.

Өсімдік мүшесінің кесіндісі, яғни эксплант лайықты қоректік ортаға отырғызғанда, оның құрамындағы клеткалар біраз уақыт өткен соң бөлініп, өсе бастайды, соның нәтижесінде каллус ұлпасы пайда болады, бұл процесті каллусогенез деп атайды (яғни каллус ұлпаны қалыптасу процесі-каллусогенез деп атайды). Клеткалардың бөліну арқылы көбейіп өсуін

ПРОЛИФЕРАЦИЯ деп атайды. Каллусты алу үшін және оны өсіру үшін залалсыздандырылған қоректік орта қажет. Каллустық клеткалардың құрылуын (түзілуін), бөлінуін, көбейіп өсуін фитогормондар реттейді.

Алғашқы каллусты шығару үшін және оны өсіру үшін ауксиндер пайдаланылады, мысалы .-ИСК (индолилсірке қышқылы), .-НСҚ (нафтилсірке қышқылы), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисірке қышқылы), әдетте ауксиннің концентрациясы жоғары болу қажет. Кейін каллусты өсіру үшін ортадағы ауксин мөлшерін төмендетеді. Ауксиннің табиғи түрі ИСК клеткаларда оңай тотықсызданады, сондықтан оны ортаға көп мөлшерде қосады, немесе көбінесе жасанды түрлерінде қосады (НСҚ, 2,4-Д). Кинетин (6-фурфуриламинопурин) және БАП (6-бензиламинопурин) клеткалардың бөлінуіне өте қажет (БАП цитокинин қатарына жатады, оның активтілігі жоғары). Өсімдіктің клеткалары, ұлпалары, мүшелері өсуіне қоректік ортадан басқа да жағдайлар әсер етеді. Өсімдіктер клеткаларының қатты және сұйық ортада жақсы өсуі үшін, оның рН көрсеткішінің маңызы өте зор. Табиғи жағдайында клетканың тіршілік әрекеттері сутегі иондарының қолайлы концентрациясында (рН 5,5-7,5) өтеді. Клеткаларды өсіру үшін 250 С шамасында температура қажет, бірақ бұл дағдылы болып кеткен көзқарастың себебі – нақтылы деректердің жетіспеушілігі, мысалы, темекі клеткаларына ең қолайлы

температура 320С, адыраспан клеткаларына ең қолайлы 30⁰С, шырмауық гүлдің суспензиясына ең қолайлы 30-32⁰ С. Клеткалардың өсуіне әсер ететін сыртқы факторлардың бірі – жарық. Жалпы *in vitro* жағдайында өсірілетін өсімдік клеткаларында жасыл пигмент яғни хлорофил түзілмейді, сондықтан олар әдеттегідей фототрофтық (автотрофтық) жолмен емес, гетеротрофты қоректенеді. Клеткаларда қосымша заттар түзілуіне жарықтың сапасы (яғни спектрлік құрамы), қарқындылығы және фотопериодтың әсер ететіндігі дәлелденген, сондықтан клеткалық технологияны жасаудағы басты мақсаттың бірі – клеткаларды өсіру үшін қажетті жарықтың сапасы мен қарқындылығын анықтау. Клеткалардың өсуіне аэрацияның әсері зор (бұл тұрғыда арнайы суспензияға қажет). Аэрация болмаса, жалпы алғанда, суспензияның өсуі мүмкін емес. Клеткаларды өсіргенде қоректік ортаның осмос қысымын да ескеру керек.

5. Өсімдіктердің азотты сіңіру мәселелеріне арналған гендік инженерлік жұмыстар. Өсімдіктердің фитопатогендерге, гербицидтерге, насекомдарға және ортаның абиотикалық стресстеріне тұрақтылығы.

In vitro жағдайында клеткалар өсуінің және дамуының ерекшелігі. Өсіретін өсімдік клеткалардың сипаттамасы.

Каллус ұлпаның сипаттамасы: 1)Каллус ұлпаларының клеткалары бәрі бірдей, біркелкі болмайды (яғни каллус ұлпа гетерогенді болады). 2) Каллустың түсі ақшыл, сарғыш, қоңыр, қызыл_қоңыр болады. Каллустың құрамында хлорофилл немесе антоциан пигменттері болуы мүмкін. 3) Шығу тегіне (яғни өсімдіктің қай түрінен, мүшесінен, ұлпасынан алынғаны, пайда болғаны, шыққаны) басқаша айтқанда «каллустың тегі»-не байланысты және өсіру жағдайына байланысты каллустар тұтас тығыз немесе сұйықтау және борпылдақ болып келеді. Клеткалық биологияны зерттеу мақсаты үшін өсімдік клеткалар модельдік жүйелер ретінде қолданылады. Барлық өсімдіктердің жасанды қоректік ортада өсірілетін клеткалары, көбінесе каллус клеткалары болып келеді. Каллус клеткаларында морфогенездің әр түрлі процестері өтуі мүмкін. Олардың сомалық эмбриогенез немесе органогенез жолдарымен даму қабілеті бар. Ол үшін қоректік ортаның құрамын өзгертіп, каллус ұлпасын белгілі бір даму жолына бұруға болады, соның арқасында жеке-дара клеткадан бүтін регенерант өсімдік өндіріп шығаруға болады. Бұл регенерация процесі өсімдік клеткасының бірегей қасиетін – тотипотенттікті дәлелдейді. *In vitro* өсірілетін клеткалардан клеткалық массаны және бүтін регенерант өсімдік алуға болады. Содан кейін клеткалық масса қажетті өнімдер биосинтезға және биотрансформацияға пайдаланады, ал регенерант өсімдіктер клондық көбейту мен сауықтыру үшін пайдаланады және де өсімдіктерді генетикалық жақсарту үшін пайдаланады. Каллус түзілуі экспланттың көлеміне де байланысты, себебі ірі эксплантта клеткалар өте көп және олар әр түрлі болады. Жас ұлпалардан каллус тезірек түзіледі, сондықтан каллусты алу үшін көбінесе өскіндердің ұлпалары мен мүшелерін пайдаланады. Каллустың түзілуі алынған экспланттың физиологиялық полярлығына да байланысты болады. Каллусты көшіріп отырғызатын қоректік ортаның құрамы, жасалатын тәжірибенің мақсатына байланысты болады. Мысалы, каллусты сол қалпында өсіріп, көпке дейін сақтау керек болса, онда қоректік ортаның құрамы өзгертілмейді. Ал, егер де каллуста дифференциялану, морфогенез процестерін жүргізу мақсаты қойылса, онда қоректік ортаның құрамын күрделі өзгерту қажет болады. Клеткалардың өзара әрекеттесуін, қарым-қатынас жасайтындығын еске алып, кейде каллусты өсіруге арнаулы тәсілдерді қолданады. Мысалы «ұлпа-өне», «бағушы» деген тәсіл, бұл тәсілде жақсы өсіп жатқан каллустың ықпал етуін екінші бір каллусты өсіру үшін пайдаланады. Ол үшін нашар өскен, немесе өсу қабілеті мүлдем төмен каллусты жақсы өсетін каллустың үстіне салады да, олардың екі арасына қоректік ортаға алдын ала малынып алынған сүзгіш қағазды қояды. Кейде бір ыдыстың ішінде әр түрлі өсімдіктердің клеткаларын қатар өсіреді. Анда-санда ұлпаларды бір-біріне теледі. Сөйтіп қарқынды өскен каллустан

бөлініп шығатын активті әлдеқандай заттар басқа каллустың өсуіне жағымды ықпалын тигізеді. Сұйық ортада өсірілетін клеткаларды клеткалық суспензиясы деп атайды. Сұйық орта ішінде клеткалар батпай, жүзген күйде тіршілік етуі үшін оларды аппаратпен үзбей араластыру керек. Тоқтамай айналу, шайқалу немесе сұйық орта арқылы стерильді ауаны үрлеу арқасында клеткалар оттегімен қамтамасыз етіледі. Мұндай жағдайда клеткаларды ауамен қамтамасыз ету едәуір жақсарады. Көбінесе сұйық ортаның құрамы агармен қатырған ортамен бірдей болады. Қатты ортада өсірген клеткалармен салыстырғанда суспензиядағы клеткалардың бірсыпыра артықшылығы бар. Клеткалар тіршілік ету үшін белгілі бір қолайлы жағдайларын қамтамасыз етуді қажет етеді, міне осындай барлық клеткаларға біркелкі әсер ететін жағдай туғызу суспензиялық өсіру әдісімен жүзеге асырылады. Бұл әдістің тағы бір пайдалы мәселесі – клеткалар өздері бөліп шығаратын зиянды метаболиттерден оңай айрылады және де әр түрлі факторлардың бұл клеткалардың зат алмасу мен өсу процестеріне тигізетін әсерін бақылап отыру жеңілденеді. Суспензияда өсетін клеткалар биохимия және молекулалық биология тұрғысынан зерттеулер жүргізуге қолайлы келеді. Суспензиядан өз ерекшеліктері бар тұрақты клеткалық популяцияны алуға болады. Борпылдақ дифференцияланбаған (маманданбаған) каллусты сұйық ортаға салып шайқап өсіру, клеткалар суспензиясын шығарудың негізгі жолы. Борпылдақ каллусты өсіргенде қоректік ортаға 2,4-Д қосады, ал цитокининнің мөлшерін азайтады немесе қоспайды. Тағы бір шарт – қоректік ортада Ca^{2+} ионы болмауы керек, себебі ол кальций пектинатының түзілуіне әсер етеді. Кальций пектинаты клеткаларды өзара байланыстырып тұратын негізгі зат, одан құтылу үшін каллуска пектиназа ферментімен әсер ету керек. Ең жақсы суспензияда жеке клеткалар үлесі 50-60% -тен аспайды, қалғаны 2-10 клеткадан тұратын және одан да көп клеткалар топтасқан агрегаттар болады.