



## **ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ**

**Факультет Биология және биотехнология**

**Курстың атауы: «Ауылшаруашылық өсімдіктердің биотехнологиясы»**

**Автордың аты-жөні: Асрандина Салтанат Шынтаевна**  
**ғылыми дәрежесі, қызметі: б.ғ.к., доцент, профессор м.а.**

## 3-модуль

Өсімдіктердің генофондын сақтау

## 8, 9-дәрістер

Өсімдіктердің клеткаларын төмен температурада сақтау.

Өсімдіктердің ұлпаларын жасанды ортада сақтау әдістері

## Жоспар

1. Криосақтау
2. Суықтан туатын күйзеліс (шок)
3. Төменгі температурада клеткаларды сақтауда әсер ететін факторлар

# 1. Криосақтау

- Криосақтау (грек тілінен аударғанда-аяз) – өсімдік ұлпалары мен клеткаларын қатырылған күйде сақтау деген мағынаны білдіреді.
- Практикада ұлпалары сақтау төмендегі әдістермен жүргізіледі:
  - ✓ Құрғақ мұз ( $-79^{\circ}\text{C}$ ) температурасында сақтау;
  - ✓ Ультра төмен температуралы ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) тоңазытқышта сақтау;
  - ✓  $-140^{\circ}\text{C}$  буда сақтау;
  - ✓  $-196^{\circ}\text{C}$  сұйық азотта сақтау.

## Криосақтаудың негізгі артықшылығы

- өсімдік клеткаларындағы метаболиттік процестерді және биологиялық бұзылуды тежеу немесе тоқтату;
- Төменгі температурада сақталған материал генетикалық тұрақты болады;
- Құнды материалды сақтау мүмкіндігі;
- Экономикалық жағынан тиімді, көп қаражат мен еңбек күшін талап етпейді

## 2. Суықтан туатын күйзеліс (шок)

➤ Суықтан туатын күйзеліс (шок) - өсімдіктердің төменгі температураға сезімталдығын сипаттайды.

➤ Суықтан туатын күйзелісте зақымданған клетка мембранасы арқылы цитоплазма сұйықтығы мен ферменттер сыртқа ағып кетеді.

➤ Клетка мембранасының зақымдануы - клетка мембранасының дифференциалды жиырылуы немесе белоктардың қайтымсыз денатурациясынан туындайды.

➤ Суықтан туатын күйзеліс (шок) дәрежесі қату жылдамдығынан тәуелді болады, яғни неғұрлым қату жылдамдығы жоғары болса, клетканың зақымдану дәрежесі соғұрлым жоғары болады.

➤ Клетканың зақымдануы натрий хлоридінің жоғары концентрациясының тікелей әсерінен де туындайды.

Клетканың зақымдануын төмендету немесе  
жеңу ортаға төменгі заттарды қосу арқылы  
жүзеге асырылады:

- ✓ Криопротекторлар;
- ✓ Спецификалық фосфолипидтер;
- ✓ Басқа да қоспалар;
- ✓ Сондай-ақ, ортадағы спецификалық аниондардың концентрациясын өзгерту арқылы жүргізіледі.
- ✓ Ұлпаларды криосақтау кезінде суықтан туатын күйзеліс болмайды.



### 3. Суыққа және аязға төзімділік

Өсімдік клеткалары мен ұлпаларын ұзақ уақыт суықта немесе аязда ұстау арқылы олардың суыққа төзімділігін (акклиматизациясын) және нөлден төмен температураға, яғни аязға төзімділігін арттыруға болады.

Бұл процестер көбінесе табиғи жағдайларда кездеседі, мәселен қоршаған орта температурасының қыс айларында төмендеуі кезінде туындайды.

## Организмдердің суыққа және аязға төзімділігінің арту механизмдері

- Кейбір ұлпалардың тоңған (суық) күйде қалу қабілетінің жоғарылауы;
- Ұлпаларда криопротекторлар (қату нүктесін төмендетін, кейде клеткаларда мұздың қатуын тежейтін) синтезінің күшеюі;
- Клетка мембраналарындағы (клеткалар мен ұлпалар ұзақ уақыт суықтанғанда) липидтедің модификациясы

- Төмен температурада клетка мембранасының липидтері сатылы өзгерістерге (температура 10 – 20<sup>0</sup> С ауытқығанда) ұшырайды.
- Ферменттердің ырықтығы және мембрана арқылы судың және ондағы еріген заттардың тасымалдануы мембрананың сұйық күйінде қалғанда белсенді жүреді.
- Суықтан туатын шокқа сезімтал клеткалардың мембраналарындағы липидтер қатайюы олардың қатты зақымдануына әкеп соғады.
- Мембранадағы фосолипидтерді жоғарылату арқылы температураның теріс әсерін төмендетуге болады.

## 4. Қату процесіне әсер ететін факторлар

- Клеткаларды төменгі температурада өсіру олардың метаболизміне әсер етеді, әсіресе 20<sup>0</sup> С – тан төмен температурада өсіру клеткалардың криосақтауға төзімділігін арттырады;
- Сонымен қатар, жоғары айтылғандарды қоректік орта құрамындағы заттардың концентрациясын төмендету немесе 20<sup>0</sup> С-та метаболизм ингибиторларын культураға ендіру арқылы да ж,зеге асыруға болады.

- Клеткалардың суыққа (қатуға) сезімталдығы клетканың вакуольдену дәрежесінен тәуелді болады;
- Бұл клетканы өсіру жағдайына және клетканың жас-ерекшелігіне байланысты болады.
- Стационарлы фазадағы клеткалар экспоненционалды фазадағы клеткаларға қарағанда анағұрлым сезімтал болады.
- Әйтсе де, кейбір бір клеткалы жасыл балдырларда бұл құбылыс керісінше жүруі мүмкін.

## 5. Үсікке шалдығу

➤ Судың қату нүктесіне дейінгі температурада су қатты суиды, ал мұз қатпайды.

➤ Таза судың қату нүктесі  $0^{\circ}\text{C}$ -қа тең. Алайда оны  $-38^{\circ}\text{C}$ -қа дейін суытуға болады, бұл жағдайда кристалданудың біркелкі орталықтары түзіледі.

➤ Суға натрий хлоридін немесе криопртекторларды қосу судың қату нүктесін және кристалданудың біркелкі орталықтарының түзілу температурасын төмендетеді.

➤ Барометрлік қысымды жоғарылату да осындай әсерді береді.

➤  $0^{\circ}\text{C}$  -қа дейінгі суық температураға төзімді клеткалар одан да суық температурада тірі қалуға қабілетті болады.

➤ Клеткаларда майлардың, белоктардың, көмірсулардың синтезі күшейеді, олар клеткадағы суды байланыстырып судың қату нүктесінің температурасын төмендетеді және клеткалардың суыққа төзімділігін арттырады.

## 6. Мұз кристаллдардың түзілуі

➤ Тірі клеткаларда көптеген (энергиясы жоғары) молекулалары немесе олардың бөлшектері (кездейсоқ жағдайда) мұз кристаллдардың түзілу орталықтары бола алады.

➤ мұз кристаллдардың түзілу кезіндегі артық энергия жылу түрінде сыртқа шығады, бұл жағдайда клеткалар көп зақымданады.

➤ Клеткада мұз түзіле бастағанда температура ерітіндінің қату нүктесіне дейін лезде көтеріледі осыдан кейін тоңазытқыш камера температурасына дейін лезде төмендейді.



- Мұз кристаллдардың түзілу орталықтарының қалыптасуына және мұз кристалдарының өсуіне уақыт пен осы процестер өтетін жылдамдық қажет.
- Кристалдану жылдамдығы мен мұз кристалдарының түрін сипаттайтын факторлар:
  - ✓ Мұздың қату дәрежесі мен жылдамдығы,
  - ✓ Кристалдану орталықтарының потенциалды саны,
  - ✓ Орта тұтқырлығы,
  - ✓ Клеткадағы еріген заттардың түрлері,
  - ✓ Температура
- Бұл факторлар өзара тығыз байланыста болады.

➤ Егер кристаллизация қату температура-сында біртіндеп жүрсе кристалдар дұрыс гексогагоналды формада болады.

➤ Мұз кристалдары жоғары жылдамдықта қатса, клеткадағы мұз бұрыс дендрид формасында қатады.

➤ Мұз кристалдары өте жоғары жылдам-дықта қатса, әр бір кристалдар орталықтарының айналасында өте ұсақ мұз инелері қалыптасып, олардың айталасында мұз көпіршіктері пайда болады.

- Клеткадағы еріген заттардың табиғаты мен концентрациялары мұздың кристаллдардану түріне әсер етеді.
- Клеткада тұтқырлығы жоғары қоспалардың жоғары концентрациялары мұз көпіршіктердің түзілуін арттырады.
- Кейбір жоғары молекулалы массалы (мол.м= 30 000) полимерлердің (ПВА) судағы ерітінділері кристалданбайды, олар кез келген температурада және кез келген қату жылдамдығында аморфты күйде қалады.

## 7. Судағы еріген заттардың қоюлануы

- Бірінші саты. Ерітіндіні қатыру барысында ондағы еріген заттар сұйық күйден қатты күйге ауысады, бұл жағдайда таза су қатып, мұз түзіледі.
- Барлық еріген заттар қоюлана түседі, бұл ерітіндідегі судың шығуына байланысты болады.
- Қалған ерітіндінің қату температурасы еріген заттардың әсерінен төмендейді.
- Ерітіндіні одан әрі қатырғанда ондағы су жойылады, бұл құбылыс балқу температурасына жеткенге дейін жалғасады.
- Осыдан кейін Екінші саты басталады. Мұнда концентрленген ерітінді қатады.

- Клеткадағы мұздың қатуына клетка қабығы мен плазмалық мембрана тосқауыл ролін атқарады.
- Клетка цитоплазмасы клетканың сыртқа ортасына қарағанда гипертоникалық болғандықтан, мұз әуелі клеткадан тыс ортада қатады.
- Клеткадан тыс ерітіндінің концентрациясы жоғарылап, клетка мембранасы арқылы осмотық градиент бағыты өзгереді. Осының салдарынан клеткалар біртіндеп сусызданып, клетка ішіндегі еріген заттардың концентарциясы жоғарылайды.
- Бұл клетканы мұздату процесінде зақымдануының бір себебі болып табылады.
- Ал екінші себебі – клетка ішіндегі мұздың түзілуі болып табылады.

- Сондай-ақ, сыртқы ортадағы еріген заттрадың жоғарғы концентарциясы клетка ішіне өтуіне әкеп соғады;
- Клеткаға өткен еріген заттардың клеткаға тигізетін әсері төменгі температураның дәрежесі мен ұзақтығына байланысты болады.
- Криопротекторлар - клеткадағы еріген заттрадың концентрациясын төмендетіп, мұз кристалдарының (кез келген температурада) түзілуін тежейді.

## • Клеткалардың жиырылуы

- Клеткалардың сыртқы ортасында гипертоникалық ерітінді қалыптасатындықтан, клетка плазмолизденеді. Бұл жағдайда клетка жарылып кетуі мүмкін.
- Мұз клетка қабығы мен протопласт арасында түзіліп, протопласттың клетка қабығынан ажырауын (псевдоплазмолиз) тудырады.
- Кейбір организмдер клетка аралық кеңістіктерде мұздың қатуына байланысты, клетка ішіндегі судың қатуын тежейтін механизмдерге ие болған.

## 8. Төменгі температурада клеткаларды сақтауда әсер ететін факторлар

- Қатыру жылдамдығы – клеткаларды баяу немесе жылда қатыру олардың тіршілігін жояды. Сондықтан әр бір клетка түріне оларды мұздату температурасының оптималды варианты жеке таңдалады.
- Клетканы баяу мұздатқанда - липидтердегі сатылы ауысуы баяу жүреді, ал белоктық компоненттер мембрананың сұйық бөліміне қарай біртіндеп ауысады.
- Ал жылдам мұздатқанда – белоктар фиксацияланған күде қалып қояды, яғни зақымдануы жылдам жүреді.



- **Екі сатылы мұздату**

- 1) **Клеткаларды нөлден төмен температурада алдынала тез қатыру және осы жағдайда қысқа уақыт ұстау;**

- 2) **Сақтау температурасында тез қатыру**

## 9. Криопротекторлар

Клеткаларды мұздату алдында 1 сағат бұрын криопротекторлармен өңдеу клеткалардың өткізгіштігін, қату нүктесін, клеткалардың стрестік жағдайларына (клеткаларды мұздату немесе мұзды еріту кезінде) жауап реакцияларын өзгертіп, олардың тірі қалуына әсер етеді.

➤ Криопротекторлар - клеткаға енетін және енбейті деп екіге бөлінеді.

➤ Глицерин – бөлме температурасында және  $37^{\circ}\text{C}$  қосылса клеткаға енетін, ал  $0^{\circ}\text{C}$  қосылса енбейтін қасиетімен ерекшелінеді.

➤ Глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), гликопротеид, метанол, этандиол

- Криопротекторлар ретінде ортаға диметилсульфоксидпен (ДМСО) өзін ғана қосады, ал глицеринді ДМСО –мен немесе сорбит, манит, сахароза, пролин және полиэтиленгликольмен (жиі) қосады.
- Криопротекторлар - кез келген температурада мұз болып клеткадан шығатын су мен еріген заттардың концентрациясын азайтады. Олар ерітіндінің тұтқырлығын жоғарылатып, мұз кристаллдарының түзілуін тежейді. Витрификацияны жеңуге жағдай тудырады.

- Криопротекторларды дайындағанда олардың концентрацияларын (культурада өсіретін ортада) екі еселейді. Ал оны ортаға қосқанда криопротекторлардың концентрациясын сұйылтады, рН – стандартты күйге жеткізіп, филтрлеу арқылы (қанттардың карамельденуіне және басқа да заттардың автоклавтанғанда бұзылуын тудырмас үшін) залалсыздандырады.

- Криопротекторларды ортаға біртіндеп немесе бір рет қана (мысалы, мұзды ортада немесе бөлме температурасында) қосады.
- Криопртекторлар токсикалық улы әсері болатындықтан, оларды өте сақтықпен қолдану керек.
- Криопротекторларды объектілерді мұздан еріту кезінде бірден жуып тастау керек.

## ➤ Витрификация

- Клеткада мұздың әйнек түрінде қатуын – витрификация деп атайды.

## ➤ Витрификацияны болдырмау:

- 1) жоғары молекулалы криопротекторлардың (глицерин, этандиол) өте жоғары концентрациясын қолдану;
- 2) барометрлік қысымды жоғарылату

## ➤ Мұзды еріту

- 37<sup>0</sup>С су моншасында жылдам (баяу) еріту

### Қолданылған әдебиет тізімі:

1. Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Загорскина Н.В. Биотехнология. Москва: Изд. Юрайт, 2020. -390 с.
2. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Основы биотехнологии. Москва: Изд. Юрайт, 2018. - 162 с.
3. Калашникова Е.А Клеточная инженерия растений: учебник и практикум для вузов. Москва: Изд. Юрайт, 2020. - 333 с.
4. Лутова Л. А., Матвеева Т. В. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений. Изд.Эко-Вектор. 2016. - 245 с.

### Ғаламтор-ресурстары:

<http://elibrary.kaznu.kz/ru>; <https://www.litres.ru>; <https://studfiles.net/preview/3600804/>;  
<https://www.litres.ru>; [portal.tpu.ru/fond2/download\\_doc/63313/](https://portal.tpu.ru/fond2/download_doc/63313/) .