

Жұмыс №1. Мурасиге және Скуг қоректік ортасын дайындау әдістемесі.

Мақсаты: Мурасиге және Скуг қоректік ортасын дайындау әдістемесін үйрену.

Қажетті материалдар мен құрал-жабдықтар: химиялық стакандар, колбалар, 5 мл - 1 л дейін межеленген цилиндрлер, пробиркалар, 0,01 мл - 10 мл пипеткалар немесе дозаторлар, аналитикалық таразы, пинцеттер, қайшы, шпательдер, штативтер, электр плитасы, магнит араластырғыш, рН-метр, 0,1 н HCl және 0,1 н КОН ерітінділері, қоректік орта құрамына қосылатын компоненттер (макро және микротұздардың, витаминдердің концентрлі ерітінділері; мезоинозит, сахароза, агар-агар).

Әдістеме. 1000 мл Мурасиге және Скуг қоректік ортасын дайындау реті:

- 1) 1,5-2 л термотұрақты химиялық стаканға 30 г сахароза салып, үстіне 400 мл дистильденген су құйып, сахарозаны ерітеді.
- 2) Сахароза ерітіндісінің үстіне алдын ала дайындалған концентрлі ерітінділер: 50 мл макро тұздар, 1 мл микро тұздар, 5 мл темір-хелаты, 20 мл кальций хлориді құяды, 100 мг мезоинозит, витаминдер (50 мл тиамин-HCl, 10 мл пиридоксин-HCl, 50 мл никотин қышқылын қосады.
- 3) Қоректік ортаның жалпы көлемі 950 мл -ге дейін дистильденген сумен жеткізеді және жақсылап араластырылады.
- 4) рН -метрмен ортаның қышқылдығын рН 5,5 – 5,8-ге дейін жеткізеді.
- 5) Қоректік ортаны электр плитасында 65 °С дейін қыздырады, осыдан кейін ортаға 7 г агар салынады. Агар толық еріп, орта тұнық, мөлдір болғанша қайнатады, соңында жалпы көлемі 1000 мл – ге жеткенше дистилденген су құйып, шыны таяқшамен араластырып, қайнатады.
- 6) Дайын қоректік ортаны пробиркаларға 7-10 мл құйып, ауыздарын мақтадан жасалған тығындармен немесе алюминь фольгамен бітеп, металл штативтерге салады. Штативтерді пробиркалармен қоса бюкске салып, автоклавта 1 Атм қысымда 10-15 минут залалсыздандырады.

Жұмыс №2. Каллусогенезді индукциялауға арналған қоректік орталарға экспланттарды (сәбіздің өзектік паренхимасын) отырғызу техникасы.

Мақсаты: сәбіздің өзектік паренхимасының каллусогенез белсенділігіне гормондардың тигізетін әсерін анықтау.

Зерттеу объектісі: сәбіздің өзектік паренхимасы.

Қажетті материалдар мен құрал-жабдықтар: 1 л стакан немесе колба, 50 мл стакандар, 0,5-5 мл пипеткалар, 25 мл межеленген пробирка, цилиндрлер, шыны таяқшалар, Петри табақшалары, пинцет, скальпель, ине, мақта, алюминь фольгасы, қайшы, шпагат, крафт қағазы. Электр плитасы, рН –метр, магнит айналдырғышы, таразы, автоклав, ламинар боксы, ультракулгін сәулелі шам, спирт шамы, сіріңке. Тұздардың ерітінділері, мезоинозит, витаминдер, 2,4 Д ерітіндісі, сахароза, агар, спирт, 2,6%-натрий гипохлорид ерітіндісі ерітіндісі, б/ДН₂О.

Әдістеме. Жұмыс орнын дайындау, қажетті химиялық ыдыстарды, инструменттерді жиыстыру және оларды жуып тазалау. Құрамында 0,7 % агар, 3 % сахароза, 2,4 Д (4 мг/л, 8 мг/л) және кинетин (1 мг/л, 2 мг/л) қосылған Мурасиге Скуг қоректік ортасын дайындау.

Зерттеу объектісін залалсыздандыру тәртібі: сәбізді ағынды сумен 20 минут жуу; КМnO₄ -әлсіз ерітіндісімен 30 минут өңдеу; дистильденген сумен 3 рет 5 минуттан шаю;

2,6 %-натрий гипохлорид ерітіндісімен 15 минут залалсыздандыру (ламинар бокстың астында); дистильденген сумен 3 рет шаю.

Залалсыздандырылған сәбізді ламинар бокстың ішінде Петри табақшасына салады. Осыдан кейін оны көлденеңнен кесіп (2,5-5 см дискідер) турады. Дискілерді одан әрі жұқартып, олардағы өзектік паренхима тұсынан өте жұқа кесінділер алады. Алынған кесінділерді алып, құрамына 2,4 Д (2 мг/л, 4 мг/л) қосылған Мурасиге Скуг орталарына отырғызады. Экспланттардан каллус ұлпасы түзілгенге дейін температурасы $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, қараңғы камераға орналастырады. Ауаның ылғалдылығы 55-60 % болуы тиіс.

Бақылау жұмысын жүргізу. Бақылау жұмысы аптасына 2 рет жүргізіледі, яғни экспланттардың каллусогенез белсенділігін анықтау, каллус ұлпасына морфологиялық сипаттама (түрі, түсі, ылғалдылығы, тығыздығы) беру, каллустың өсу қарқынын анықтау (ауданы, биомассасы) жұмыстары жүргізіледі. Тәжірибе соңында алынған мәліметтерді математикалық өңдеуден өткізеді.

Зерттеу нәтижесінде тиісті ғылыми-теориялық қорытындылар мен тұжырма жасалады. Олардың негізінде есеп құрастырылады. Есепте өңдеуден өткізілген соңғы мәліметтерді кесте, сурет, қисық сызық, нұсқа т.б. түрінде көрсетеді.

Жұмыс №3. In vitro жағдайында өсімдік меристемаларын жасанды қоректік ортаға отырғызу техникасы.

Мақсаты: клондық микрокалемшелеу әдісінің негізінде стевияның көбейту коэффициентін жоғарылату.

Зерттеу объектісі: дала жағдайында өскен стевияның 10-15 см жақсы жетілген, жас сабақтары.

Қажетті материалдар мен құрал-жабдықтар: 1 л стакан немесе қолба, 10-50 мл стакандар, 1-5 мл пипеткалар, 25 мл межеленген пробиркалар, цилиндрлер, шыны таяқшалар, Петри табақшалары, пинцет, скальпель, ине, мақта, алюминий фольгасы, қайшы, шпагат, крафт қағазы. Электр плитасы, рН –метр, магнит айналдырғышы, таразы, автоклав, ламинар боксы, ультракулгін сәулелі шам, спирт шамы, сіріңке. Тұздардың ерітінділері, мезоинозит, витаминдер, сахароза, агар, спирт, 0,1%-сулема ерітіндісі, Tween-60, б/ДН₂О.

Әдістеме. Жұмыс орнын дайындау, қажетті химиялық ыдыстарды, инструменттерді жиыстыру және оларды жуып тазалау. Жасанды қоректік ортаны дайындау.

Кесте. $\frac{1}{2}$ Мурасиге Скуг ортасын дайындау нұсқасы

№	Компоненттер	Қоректік орта құрамына қосылатын мөлшері
		1000 мл МС
1	Макроэлементтер ерітіндісі	25 мл
2	Микроэлементтер ерітіндісі	2,5 мл
3	Хелат-Fe –ерітіндісі	2,5 мл
4	б/ДН ₂ О	400мл
5	Сахароза	30гр
6	Мезоинозит	100 мг
7	Витамин тиамин –HCl (B ₁)	50 мл
8	Витамин пиридоксин –HCl (B ₆)	10 мл
9	Витамин никотин қышқылы (PP)	20 мл
10	CaCl ₂	10 мл

11	б/ДН ₂ О	300 мл
12	рН-5,8-ге теңестіріледі	
13	Ерітіндіні электр плиткасында 60 С ⁰ -деін жылыту	
14	Агар	7,0 гр
15	Қоректік ортаның мөлшерін	1000 мл-ге жеткізу

Зерттеу объектісін детергент ерітінділерімен алдын ала залалсыздандырады. In vivo-жағдайында немесе in vitro-жағдайында өсірілген стевия өсімдігінің жас, екінші реттік сабақтарын залалсыздандырылған ортада қалемшелейді. Қос бұршігі бар микроқалмшелерді (15 мм) ½ Мурасиге Скуг ортасына отырғызып, температурасы 25±2⁰С, ауаның ылғалдылығы 55-60 %, 16 сағаттық фотопериодтық жарық камерада өсіреді. Бақылау жұмысы күнделікті жүргізеді. Зерттеу нәтижесінде алынған мәліметтерді өңдеп, ғылыми тұрғыда қорытындылар жасалады.

Жұмыс 4. Бидайдан бөліп алған ұрықтардың каллус түзу белсенділігін анықтау

Мақсаты: бидай ұрықтарының каллус түзу белсенділігіне 2,4 Д мен кинетиннің тигізетін әсерін анықтау.

Зерттеу объектісі: бидай тұқымдары.

Қажетті материалдар мен құрал-жабдықтар: 1 л стакан немесе қолба, 50 мл стакандар, 0,5-5 мл пипеткалар, 25 мл межеленген пробирка, цилиндрлер, шыны таяқшалар, Петри табақшалары, пинцет, скальпель, ине, мақта, алюминь фольгасы, қайшы, шпагат, крафт қағазы. Электр плитасы, рН –метр, магнит айналдырғышы, таразы, автоклав, ламинар боксы, ультракулгін сәулелі шам, спирт шамы, сіріңке. Тұздардың ерітінділері, мезоинозит, витаминдер, 2,4 Д ерітіндісі, кинетин ерітіндісі, сахароза, агар, спирт, 2,6%-натрий гипохлорид ерітіндісі ерітіндісі, б/ДН₂О.

Әдістеме. Жұмыс орнын дайындау, қажетті химиялық ыдыстарды, инструменттерді жиыстыру және оларды жуып тазалау. Құрамында 0,7 % агар, 3 % сахароза, 2,4 Д (4 мг/л, 8 мг/л) және кинетин (1 мг/л, 2 мг/л) қосылған Мурасиге Скуг қоректік ортасын дайындау.

Детергенттермен залалсыздандырылған бидай тұқымдарынан пісіп жетілмеген ұрығын иненің ұшымен бөліп алып, құрамына 2,4 Д (4 мг/л, 8 мг/л) және кинетин (4 мг/л, 8 мг/л) қосылған Мурасиге Скуг орталарына отырғызады. Отырғызылған ұрықтарды каллус ұлпасы түзілгенге дейін температурасы 25±2⁰С, қараңғы камераға орналастырады. Каллус ұлпаларын өсіру үшін температурасы 25±2⁰С, ауаның ылғалдылығы 55-60 %, жарық камераға ауыстырады. Зерттеу нәтижесінде тиісті қорытындылар мен тұжырма жасалады. Олардың негізінде есеп құрастырылады. Есепте өңдеуден өткізілген соңғы мәліметтерді кесте, сурет, қисық сызық, нұсқа т.б. түрінде көрсетеді.

Жұмыс №5. Өсімдік регенеранттарын сыртқы ортаға бейімдету және топыраққа көшіру

Өсімдікті микроклондық жолмен көбейтудің соңғы кезеңі - сыртқы ортаға бейімдету және топыраққа көшіру болып табылады.

Мақсаты: жақсы дамыған стевия регенеранттарын сыртқы ортаға бейімдету және топыраққа көшіру.

Зерттеу объектісі: стевия регенеранттары.

Қажетті материалдар мен құрал-жабдықтар: 5 мл пипетка, 10-50 мл стакандар, б/ДН₂О, шыны қақпақтар немесе 500-1000 мл стакандар, тазартылған құм мен топырақ, желім ыдыстар.

Әдістеме. Пробиркалардан регенерант-өсімдіктерді шығарып, олардың тамырларын агар қалдықтарынан тазартып жуады. Регенерант өсімдіктерді нематадтардан тазартылған топырақ пен құмның 1:1 қатынасында араластырылған ыдыстарға көшіріледі. Топыраққа көшіру 2 әдіспен жүргізіледі. Олар: 1) өркеннің жоғарғы бөлігін 3-4 буынға қысқартып, ал қалған 1-2 буынын тамырмен қоса топыраққа көму; 2) өркеннің жоғарғы 2-3 буындарын қалдырып, төменгі және ортаңғы буындарын жапырақсыз топырақтың жоғарғы қабатына көлбеу бағытта көму.

Өсімдік регенеранттарын топыраққа көшіргеннен кейін, аздап суғарып, 2-3 аптаға шыны қақпақпен жабылады. Алғашқы күндері өсімдіктерді суғарумен қатар шыны қақпақтарды 2-3 минут ашып, өсімдіктерді желдету керек. Біраз күннен кейін, өсімдіктердің бейімделу дәрежесіне қарай желдету уақытын 20 минутқа дейін біртіндеп өсіріп, ал аяғына қарай шыны қақпақтарды аздап көтеріп ауа кіретіндей етіп саңылау қалдырады. Сыртқы ортаға біртіндеп бейімделген, жақсы дамып жетілген өсімдіктер жылы жайдағы ванналарға немесе арнайы ыдыстарға көшіріледі.

Өсімдіктерді күнделікті бақылап, тиісті мәліметтерді жұмыс дәптеріне түсіру қажет. Тәжірибе барысында өсімдіктің сыртқы ортаға бейімделуіне жоғарыда көрсетілген 2-кі әдістің қайсысы қолайлы болатынын анықтап, себебін түсіндіру керек. Тәжірибе соңында тиісті қорытындалар мен тұжырымдар қамтылған есеп құрастырылады.

Негізгі әдебиет

1. Уәлиханова Г.Ж. Өсімдік биотехнологиясы. Алматы:ЖШС «Дәурен», 2009. - 336 б.
2. Щелкунов С.Н. Генная инженерия. Новосибирск. Изд-во Новосибирского государственного университета. 2004.
3. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В., Е.А. Калашникова, Живухина Е.А. Биотехнология: теория и практика. Учебное пособие. Москва. «Оникс». 2009, 496 с.
4. Тұрашева С.Қ. Клеткалық биотехнология: Оқулық. Алматы: ЖШС РПБК «Дәуір». 2011. – 260 бет.
5. Асрандина С.Ш. Өсімдіктер биотехнологиясы курсы бойынша тест жинағы: оқу - әдістемелік құрал. - Алматы: Қазақ университеті, 2015. – 108 бет.

Қосымша:

1. Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития (Генетический аспект) М. МГУ, 2002, 264 с.
2. Мухамбетжанов С.К., Валиханова Г.Ж., Ережепов А.Е. Методическое руководство к лабораторным занятиям по культуре тканей и биотехнологии растений. Шымкент, 2007.
3. Мухитдинова З.Р., Мурсалиева В.К., Нам С.В., Кушнаренко С.В., Мухамбетжанов С.К., Рахимбаев И.Р. Эмбриокультура пшеницы: методические рекомендации. Алматы, 2003. – 28 с.
4. Биотехнология биологически активных веществ /под ред. Грачевой И.М. – «Элевар». – 2006. – 456 с.

Зертханалық сабақтарға арналған әдебиет:

1. Валиханова Г.Ж. Өсімдіктер физиологиясының үлкен практикумына арналған әдістемелік нұсқау. Алматы, Республикалық баспа кабинеті, 1995, -33 бет.
2. Мухамбетжанов С.К., Валиханова Г.Ж., Ережепов А.Е. Методическое руководство к лабораторным занятиям по культуре тканей и биотехнологии растений. Шымкент, 2007.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.

