

ынша алынған ірімшіктің майлылығы, белок, лактоза, майсызданған сүттің құрғақ затының мөлшері көрсетілген (кесте 3).

Дромедар сүтінен дайындалған ірімшіктің шығымы 11,8%, сиыр сүтінен дайындалған ірімшіктің шығымы 18%. Бұл жақсы нәтиже болып есептеледі. «Camifloc»™ ашытқысын қолдану арқылы өнімділігі жоғары көрсеткіштегі ірімшік алынды. Әдеттегі ашытқылар бұндай нәтиже көрсете алмайды.

Ірімшікті сақтаған кезде, ол ірімшіктің түріне тәуелсіз басқа түске ие болады. Түйе сүтінен алынған ірімшіктің түсіндегі өзгерістерді ақ түтен ақшыл сарғыш түске боялуынан анықтауға болады. Ал, сиыр сүтінен алынған ірімшіктің түсі ақшыл сарғыштан сары түске боялады. Түйе сүтінен жасалынған ірімшіктің пісіп жетілу және сақтау кезінде оның құрылымы тығыз формадан тығыздалып үгілген формаға өзгереді. Жұмыстың нәтижесінде түйе сүтінен *Camifloc*™ ұйытқысын қолдана отырып, пресстелген жартылай қатты ірімшікті алу технологиясы жасалды.

Әдебиеттер

- 1 Rao M. B., Gupta R. C. & Dastur N. N. Camel's milk and milk products // Indian Journal of Dairy Science. -1970. -V.23. -P.71-78.
- 2 Sharmanov T.S., Kadyrova R.K., Shlygina O.E., Zhaksylykova R.D. Evolution des résultats d'examen radioisotopique du foie après traitement de l'hépatite chronique avec du lait de chamelle ou de jument (en russe) // Voprosy. Pitaniya. -1978. - №1. -P.9-13.
- 3 Ramet, J.P. The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedarius*). Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations // Animal Production and Health Paper. -2001. -№ 113. – P-25-30.
- 4 El Zubeir, Ibtisam, E. M. and Samah O. Jabreel. Fresh cheese from camel milk coagulated with *Camifloc* // International Journal of Dairy Technology. -2008. -№ 61(1). –P.90-95.
- 5 Yagil R. Camels and Camel Milk // FAO animal production and health paper Series. -1982. -№ 26. – P.69 .
- 6 Farah, Z., Fischer A. Milk and Meat form the Camel. Handbook on Products and Processing. - ETH Zurich, ISBN 978-3-7281-2527-9 or as e-book. -2004.
- 7 Saima I, Arain M. A, Khaskheli M. and Malik A. H. Study on the effect of processing on the chemical quality of soft unripened cheese made from camel milk // Pakistan Journal of Nutrition. -2003. -№2. - P.102-105.
- 8 Farah Z. Composition and characteristics of camel milk // J. Dairy Res. -1993. -№60. -P. 603-626.
- 9 ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титрометрические методы определения кислотности.
- 10 Барабанщиков Н.В. Контроль качества молока на ферме. Москва: Агропромиздат. -1986. – 160 с.

УДК 573.6.086.83:633.31/37

А.А. Нуржанова*¹, С.К.Турашева², С.Ораз¹, Ж.Е.Жумашева¹, К.А. Кашкеев¹

¹Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет им.аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: gen_asil@mail.ru

Генотипические особенности морфогенеза и регенерации в культуре пыльников ярового ячменя

Обсуждаются результаты скрининга на морфогенетическую и регенерационную способность гибридов первого поколения ярового ячменя (*Hordeum vulgare*). Выявлены генотипические различия по способности к гаплопродукции у перспективных гибридов ячменя. Установлено положительное влияние мальтозы на формирование эмбриогенных клеток в культуре пыльников ячменя.

Ключевые слова: ячмень, культура пыльников, морфогенез, регенерация, гаплоиды.

A.A. Nurzhanova, S.K. Turasheva, S. Oraz, Zh.E. Zhumasheva, K.A. Kashkeev

Genotypic peculiarities of morphogenesis and regeneration of barley in anther culture

The results of screening of morphogenetical and regeneration ability of barley hybrids (F₁) have been discussed. The genotypical differences of ability to haploproduction of the perspective barley hybrids were studied. It was showed, that the maltose in the cultural medium positive influenced on produce of embryogenic cells in anther culture of barley.

Keywords: barley, anther culture, morphogenesis, regeneration, haploids.

A.A. Nurzhanova, S.K.Турашева, С.Ораз, Ж.Е.Жумашева, К.А. Кашкеев

Жаздық арпа тозаңқаптарының дақылдарында морфогенез және регенерацияның генотиптік ерекшелігі

Мақалада жаздық арпаның (F₁) будан гибридының морфогенетикалық және регенерациялық қабілеттері бойынша скрининг нәтижелері талқыланды. Арпаның тиімді будан гибридының гаплопродукция қабілеті бойынша генотиптік ерекшелігі анықталған. Арпаның тозаңқап культурасындағы эмбриогендік клеткалардың түзілуіне мальтоза көмірсудың оң әсері көрсетілген.

Түйін сөздер: арпа, тозаңқап культурасы, морфогенез, регенерация, гаплоидтар.

Гаплоидные технологии на основе культивирования *in vitro* пыльников, микроспор, неоплодотворенных завязей и семян имеют практическую значимость, поскольку позволяют создавать генотипы с комплексом признаков, представляющих интерес для генетико-селекционных исследований /1, 2/. Основное селекционное преимущество использования гаплоидов исходит из возможности одноэтапного получения гомозигот, что позволяет быстро фиксировать морфофизиологические параметры адаптивности и сокращать сроки создания приспособленных к различным климатическим условиям стрессоустойчивых сортов, способных стабильно формировать высокие урожаи зерна и отвечающих всем потребностям рынка/3/. Отбор потомства диплоидизированных гаплоидов, представляющих линию и состоящих из нескольких растений, облегчает селекционную оценку, по сравнению с традиционными методами. Как известно, отбор в традиционной селекции проводится по одному колосу или одному растению, а на проявление признака в сложной гибридной популяции оказывают влияние как внутривидовые взаимоотношения между растениями, так и различные эффекты взаимодействия генов, что делает классический отбор малоэффективным /4/.

Для массового получения гаплоидов ячменя широко используются два метода – культуры пыльников и селективной элиминации хромосом чужеродного вида-опылителя. Несмотря на значительные успехи, достигнутые при разработке этих методов и создании на их основе ряда сортов важнейших видов зерновых культур, их эффективное применение сдерживается рядом причин, главными из которых являются воспроизводимость полученных результатов в различные сезоны и для различных генотипов в сочетании со снижением затрат на получение. Наиболее часто применяемый метод для создания гаплоидных растений в условиях *in vitro* является метод андрогенеза – образование гаплоидного растения из спорогенной клетки пыльника, как правило, находящейся в фазе сильновакуолизированной микроспоры /5/. Однако этот процесс зависит от ряда взаимосвязанных факторов, каждый из которых оказывает свое влияние на морфогенетические процессы при культивировании изолированных пыльников и микроспор *in vitro*.

К началу 90-х годов прошлого века андрогенные гаплоиды были индуцированы практически у всех возделываемых растений /6/, в том числе и у ячменя /7/. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что эмбриогенез в культуре пыльников *in vitro* происходит спонтанно, имеет низкую частоту выхода гаплоидных растений (в пределах 1-4%). Кроме того, был накоплен обширный экспериментальный материал относительно факторов, влияющих на морфогенез в культуре пыльников *in vitro*. В частности установлено, что образование андрогенных структур (каллус, эмбриоиды) и растений-регенерантов зависит от генотипа растений-доноров пыльников /8, 9/ и условий получения гаплоидов /10, 11/. В настоящее время не вызывает сомнения, что именно генотипическая обусловленность гаплопродукционного процесса препятствует реализации больших потенциальных возможностей пыльниковой культуры и сдерживает широкое внедрение этого метода в селекционную практику. Поэтому вопрос о природе андрогенеза *in vitro* и механизмах генетического контроля этого явления, включая наследование, хромосомную локализацию и функционирование генов, детерминирующих спорофитное развитие микроспор, является актуальным как в теоретическом, так и прикладном аспектах.

Материалы и методы

Материалом исследований служили гибриды первого поколения ярового ячменя (*H. vulgare*), созданные на основе реципрокного скрещивания между устойчивыми, относительно устойчивыми и чувствительными к засолению сортами и сортообразцами: Арна х Сыр Аруы, Сыр Аруы х Арна, Арна х Сауле, Сауле х Арна, Сыр Аруы х 49/99-11, Сыр Аруы х 49/99-15, Сыр Аруы х 164/99-6, 164/99-6 х Сыр Аруы, Илек 16 х Сыр Аруы, Сыр Аруы х 3/24-01.

Для получения гомозиготных форм ярового ячменя была использована культура пыльников и микроспор вышеупомянутых гибридных линий. Колосья отбирались в фазе, соответствующей 1-ядерной стадии развития микроспор и подвергались холодной предобработке (+4...+7⁰ С) в течение 3-5 суток. Затем в стерильных условиях пыльники изолировали и культивировали на базовой питательной среде Гамборга-Эвелера В5, содержащей 1 мг/л ауксина 2,4-Д /12/. С целью увеличения выхода эмбриогенных структур, в качестве стимулирующего хлоропластогенез, а также в качестве источника углерода был использован 9% моносахарид мальтоза (питательная среда Вм) и 6% дисахарид сахароза (питательная среда Вс). Экспланты инкубировали в темноте при температуре 25±2⁰ С до образования морфогенных структур, которые затем пассировали на среду для индукции

регенерации – минеральный состав по прописи питательной среды Гамборга-Эвелега В5 с добавлением 20% сахарозы, 1,5 мг/л ИУК и 0,5 мг/л кинетина. Эмбриониды в стадии глобулы субкультивировались на безгормональной питательной среде Гамборга-Эвелега В5. Образовавшиеся морфогенные структуры культивировали при интенсивности освещения 3 тыс.лк, 16 часовом фотопериоде, 60% влажности воздуха и температуре $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Статистическую обработку всех полученных экспериментальных данных проводили по общепринятой методике /13/.

Результаты и их обсуждение

Для получения гомозиготных форм ярового ячменя, несущего хозяйственно-ценные признаки, из расщепляющихся гибридных популяций необходимо было, в первую очередь, в культуре пыльников индуцировать процессы морфогенеза и регенерации. После дигаплоидизации сформировавшихся растений-регенерантов и получения семенного потомства дигаплоидов, их подвергают структурно-генетическому анализу, молекулярно-генетическому анализу, а также оценивают по физиолого-биохимическим и технологическим параметрам.

На первом этапе исследований нами был проведен скрининг наиболее перспективных гибридов ярового ячменя с целью выявления их генетически детерминированной способности к морфогенезу. Для этого пыльники различных гибридов ячменя культивировали на средах рекомендуемых и широко применяемых для культуры мужского гаметофита злаковых растений – питательной среды Гамборга-Эвелега В5, содержащей два различных углевода – сахарозу и мальтозу. Из литературных источников известно, что мальтоза стимулирует развитие хлорофиллсодержащих растений-регенерантов /14/. Поскольку образование альбиносных растений в культуре пыльников является одним из недостатков метода, резко снижающим продуктивность гаплотехнологии важно было нивелировать этот дефект добавлением в состав культуральной среды моносахарида.

Анализ способности исследованных гибридных линий к морфогенезу показал, что по каллусообразованию, эмбриогенезу и последующему образованию из морфогенных структур регенерантов, гибриды резко различались между собой (таблицы 1). В культуре пыльников 10 различных гибридов ячменя развитие одноядерных микроспор происходило преимущественно по пути прямого андрогенеза, т.е. процессы образования эмбрионидов непосредственно из клеток экспланта преобладали над процессами формирования каллусов и вторичным эмбриогенезом.

Таблица 1– Индукция морфогенеза и регенерации в культуре пыльников гибридных линий ярового ячменя на вариантах питательной среды Гамборга-Эвелега В5

Генотипы	Кол-во пыльников, шт.		Частота эмбриогенеза, %		Частота каллусогенеза, %	
	Вм*	Вс*	Вм	Вс	Вм	Вс
Арна х Сыр Аруы	210	40	55,71 \pm 3,43	70,0 \pm 7,33	0	0
Сыр Аруы х Арна	200	40	93,00 \pm 1,80	0	7,50 \pm 1,86	0
Арна х Сауле	255	40	49,01 \pm 3,13	0	5,49 \pm 1,43	0
Сауле х Арна	160	40	18,12 \pm 3,05	0	4,37 \pm 1,62	0
Сыр Аруы х 49/99-11	180	40	70,55 \pm 3,41	0	0	0
Сыр Аруы х 49/99-15**	620	40	51,61 \pm 2,01	0	4,83 \pm 0,86	0
Сыр Аруы х 164/99-6	40	30	20,00 \pm 6,40	0	7,50 \pm 0,42	0
164/99-6 х Сыр Аруы	70	30	58,57 \pm 5,93	0	4,28 \pm 0,24	0
Илек 16 х Сыр Аруы	40	30	7,50 \pm 0,42	0	0	0
Сыр Аруы х 3/24-01	35	30	42,85 \pm 8,48	0	0	0

Примечание: *Вм – модифицированная питательная среда Гамборга В5, содержащая 9% мальтозу; Вс – модифицированная питательная среда Гамборга В5, содержащая 6% сахарозу.
**для гибридной линии Сыр Аруы х 49/99-15 была также использована питательная среда N6 /11/, содержащей 9% мальтозу (см. таблицу 3).

Этот факт является, несомненно, положительным, поскольку растения-регенеранты, образующиеся из эмбрионидов являются исключительно гаплоидными, в то время как регенерация через каллусообразование сопровождается спонтанными генетическими изменениями, приводящими к появлению растений-регенерантов с различным уровнем ploidy. При равных условиях культивирования степень отзывчивости к андрогенезу исследованных гибридов различались, в

частности, наибольшим морфогенетическим потенциалом обладала гибридная линия Сыр Аруы х Арна, далее по убывающей следуют гибриды Сыр Аруы х 49/99-11, 164/99-6 х Сыр Аруы, Арна х Сыр Аруы. Для последней линии было характерно образование только эмбриоидов, причем как на среде, содержащей в качестве источника углерода мальтозы, так и на среде с сахарозой (55,71% и 70,0% соответственно). Как видно из таблицы 1, частота эмбриогенеза колебалась от 7,5% (Илек 16 х Сыр Аруы) до 93% (Сыр Аруы х Арна). Следует отметить, что проявление морфогенетического потенциала сорта Сыр Аруы было больше, когда сорт выступал в качестве материнской родительской формы, чем когда сорт использовался в качестве отцовской родительской формы. Это положение справедливо для всех комбинаций скрещивания с участием сорта Сыр Аруы. Такая же картина генотипических различий в двух комбинациях скрещивания наблюдалась для гибридов (Арна х Сауле) и (Сауле х Арна). При использовании сорта Арна в качестве материнской родительской формы в 2 раза увеличивался выход морфогенных структур (каллусов и эмбриоидов) в культуре пыльников. Эти данные свидетельствуют о степени влияния генотипа на морфогенетическую способность гибридных линий ярового ячменя.

Лидирующее положение среди изученных гибридов по уровню гаплопродукции занимает гибрид Сыр Аруы х Арна (частота эмбриогенеза 93,0% и 7,5% каллусообразования). Данная линия оказалась единственной, которая продуцировала на среде, содержащей мальтозу зеленые растения-регенеранты с частотой 1,61% (таблица 2). Также она отличилась и тем, что продуцировала небольшой процент альбиносных растений-регенерантов (2,15%). Для межсортового гибрида при комбинации скрещивания, где сорт Сыр Аруы выступал в качестве отцовской родительской формы оптимальной питательной средой, индуцирующей процессы эмбриогенеза и регенерации, оказалась среда, содержащая углевод сахарозу. Несмотря на то, что частота эмбриогенеза для этого гибрида составила 70%, что в 1,3 раза меньше, чем для гибрида Сыр Аруы х Арна, при этом процент регенерации жизнеспособных растений-регенерантов на сахарозосодержащей среде был выше в 4,6 раз.

Таблица 2 – Частота регенерации в культуре пыльников гибридов первого поколения ярового ячменя, %

Гибриды	Кол-во пыльников, шт.		Частота регенерации, %			
	Вм	Вс	Вм		Вс	
			Альбиносы	Зеленые	Альбиносы	Зеленые
Арна х Сыр Аруы	210	40	1,71±0,12	0	2,5±0,2	7,50±0,4
Сыр Аруы х Арна	200	40	2,15±0,10	1,61±0,9	0	0
Арна х Сауле	255	40	2,87±0,14	0	0	0
Сауле х Арна	160	40	10,34±4,75	0	0	0
Сыр Аруы х 49/99-11	180	40	4,72±1,88	0	0	0
Сыр Аруы х 49/99-15	620	40	1,56±0,48		0	0
Сыр Аруы х 164/99-6	40	30	12,5±1,2	0	0	0
164/99-6 х Сыр Аруы	70	30	2,44±0,24	0	0	0
Илек 16 х Сыр Аруы	40	30	0	0	0	0
Сыр Аруы х 3/24-01	35	30	0	0	0	0

Примечание: Вм – модифицированная питательная среда Гамборга В5, содержащая 9% мальтозу; Вс – модифицированная питательная среда Гамборга В5, содержащая 6% сахарозу; Нм – питательная среда N6, содержащая 9% мальтозу.

Количество альбиносов у реципрокных гибридов (Сыр Аруы х Арна и Арна х Сыр Аруы) как на среде с мальтозой, так и на среде с сахарозой было практически на одном уровне (2,1% и 2,5%). При этом пыльники гибрида Арна х Сыр Аруы, культивированные на среде с моносахаридом мальтозой образовывали только бесхлорофилльные растения-регенеранты (1,7%). Добавление в базовую питательную среду сахарозы стимулировало образование зеленых растений-регенерантов и небольшой процент альбиносов (на 1,4 раза выше, чем на мальтозосодержащей питательной среде). Соотношение количества альбиносных растений регенерантов к зеленым жизнеспособным растениям-регенерантам для прямого гибрида Сыр Аруы х Арна на среде с мальтозой составило 1,3:1, в то время как для обратного гибрида Арна х Сыр Аруы на среде с сахарозой это соотношение было 1:3.

Для большинства гибридов, где солеустойчивый сорт Сыр Аруы выступал в качестве материнской родительской формы, наблюдалась высокая частота формирования морфогенных структур. К примеру, на среде с мальтозой у гибрида Сыр Аруы х 49/99-11 с частотой 70,55% происходило образование эмбриоидов, из них 4,72% регенерировали растения. У гибрида Сыр Аруы х 49/99-15 частота эмбриогенеза хотя и была в 1,3 раза меньше, чем у первой линии, однако наблюдалось образование морфогенных каллусов (4,83%), четверть которых развивались с образованием бесхлорофилльных растений. Примечательно то, что для данного гибрида при замене минерального состава базовой питательной среды и использовании в качестве альтернативы среды N6 частота эмбрио-каллусогенеза увеличивается в 3,2-3,6 раза, однако при этом регенерации не происходит.

Высокая частота морфогенеза отмечалась также у обратного гибрида 164/99-6 х Сыр Аруы. Развитие микроспор *in vitro* у гибрида происходило как по пути эмбриогенеза с частотой 58,57%, так и по пути каллусогенеза (4,28%). При этом выход альбиносных растений-регенерантов был сравнительно низким – 2,44%. В противоположность у прямого гибрида Сыр Аруы х 164/99-6, в котором сортообразец 164/99-6 выступал в качестве отцовской формы, количество морфогенных структур уменьшалось в 2 раза, и в 6 раз повышалась частота регенерации бесхлорофилльных нежизнеспособных растений. Необходимо заметить, что среди всех изученных гибридов у данного гибрида наблюдался самый высокий выход альбиносных растений, что является негативным моментом в технологии гаплопродукции. Подобная картина, когда происходит смена высокоотзывчивой к андрогенезу материнской родительской формы на сорт с низкой способностью к гаплопродукции, наблюдалась при скрещивании среднеустойчивых сортов (гибрид Арна х Сауле). Как было выше сказано, сорт Арна характеризовался высокой способностью к морфогенезу. Это подтверждают экспериментальные данные по частоте эмбриогенеза (49,01%) и каллусообразования (5,49%). В то время у гибрида Сауле х Арна выход эмбриоидов в культуре пыльников уменьшился в 2,7 раза, а количество альбиносных растений-регенерантов, наоборот, увеличилось в 3,5 раза. Вышесказанное свидетельствует о том, что геном материнской родительской формы гибрида оказывает определяющую роль в формировании и развитии эмбрио-морфогенных структур в культуре пыльников ячменя. Низким выходом морфогенных структур отличились гибриды Сыр Аруы х 3/24-01 и Илек 16 х Сыр Аруы. По-видимому, устойчивый к засолению сортообразец 3/24-01 и чувствительный к засолению сорт Илек 16 обладают низкой отзывчивостью к андрогенезу, но благодаря тому, что в комбинации скрещивания участвует сорт Сыр Аруы, отличающийся высокой гаплопродукционной способностью. У данных гибридов отмечается небольшой процент эмбриогенеза, однако эмбриоиды не получают дальнейшего своего развития, о чем свидетельствует отсутствие растений-регенерантов.

Таким образом, результаты свидетельствуют, что развитие мужских половых клеток с образованием гаплоидного спорофита у изученных гибридов первого поколения ячменя на базовой среде Гамборга В5, содержащей в качестве источника углерода мальтозу, происходило преимущественно посредством эмбриогенеза. Это свидетельствует о положительном влиянии моносахарида на формирование эмбриогенных клеток в культуре пыльников ячменя. Наибольшая частота морфогенеза и регенерации была характерна для гибрида, полученного в результате прямого скрещивания солеустойчивого сорта Сыр Аруы и среднеустойчивого к засолению сорта Арна казахстанской селекции. Для обратного гибрида (Арна х Сыр Аруы) наиболее благоприятной средой для индукции регенерации жизнеспособных растений-регенерантов являлась сахарозосодержащая среда Гамборга-Эвелега В5. На данной среде отмечалось высокое соотношение зеленых регенерантов к альбиносным растениям-регенерантам – 3:1. В перспективе, полученные дигаплоидные линии будут оценены на солеустойчивость по физиолого-биохимическим параметрам и использованы в рекомбинационной селекции ячменя.

Литература

- 1 Devaux P. Haploidy in barley and wheat improvement. In: Dattee Y. et al. (eds) Reproductive Biology and Plant Breeding. Springer-Verlag, Berlin, 1992. – P.139-151.
- 2 Бутенко Р.Г. Создание гаплоидов и гомозиготных дигаплоидных линий методами *in vitro*. /В кн.: Основы сельскохозяйственной биотехнологии (под ред. Г.С.Муромцева). М.: Агропромиздат, 1990. – С. 179-187.
- 3 Чистякова В.Н. Гаплоиды неполовых пшенично-пырейных амфидиплоидов, мягкой пшеницы и ячменя: получение и использование. – М.:МАКС Пресс, 2000. – 355 с.
- 4 Беккужина С. С., Калашникова Е. А. Отбор стрессоустойчивых растений пшеницы на основе малатдегидрогеназного комплекса // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2008. – N 4. – С.115-117.