

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық технологиялық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

Хасен Қажымұхан

Арпаның гаплоидтық биотехнологиясы

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 - «Биотехнология мамандығы»

Алматы 2021

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық технологиялық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ

Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы менгерушісі,
профессор



Х.С. Рафикова

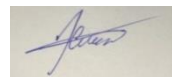
«18» мамыр 2021 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы : «Арпаның гаплоидтық биотехнологиясы»

5B070100 - «Биотехнология мамандығы»

Орындаған : Хасен Қажымұхан Қамарұлы



Ғылыми жетекші б.ғ.д. профессор



Б.Б. Анапияев

Алматы 2021

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты


Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы

5B070100 –«Биотехнология»

БЕКІТЕМІН

Биотехнология кафедра

меңгерушісі,

 Х.С.Рафиқова

«7» желтоқсан 2020 ж.

Дипломдық жұмыс орындауға

ТАПСЫРМА

Білім алушы: Хасен Қажымұхан Қамарұлы

Тақырыбы «Арпаның гаплоидтық биотехнологиясы»

Университет Ректорының 20 20 жылғы " 24 " қараша №2131-б бұйрығымен бекітілген

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі 20 21 жылғы "02 маусым"

Дипломдық жұмыстың бастапқы берілістері Диплом алды өнеркәсіптік практикадан алынған материалдар

Дипломдық жобада қарастырылатын мәселелер тізімі:

а). Арпаның сорттары мен будандарын егіс алқабында өсіру;

ә) Арпаның сорттары мен будандарының сұрыптанып алынған донорлық өсімдіктерін төмен температурада өңдеу;

б) Аспетикалық жағдайда арпаның сорттары мен будандарының микроспораларын in vitro жағдайында өсіру;

Ұсынылатын негізгі әдебиет: 42 атау


Дипломдық жұмысты дайындау

КЕСТЕСІ

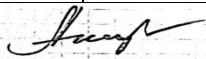
Бөлімдер атауы, қарастырылған мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кеңесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Әдебиетке аналитикалық шолу	Қаңтар	Орындалды
Материалдар мен әдістер	Ақпан	Орындалды
Зерттеу қорытындылары: лабораториялық жұмыстар	Наурыз	Орындалды

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кеңесшілері мен норма
бақылаушыларының аяқталған жұмысқа қойылған

Қолтаңбалары

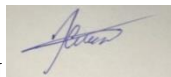
Бөлімдер атауы	Кеңесшілер аты, әкесінің аты, тегі(ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күн	Қолы
Норма бақылау	Нұрсұлтанов М.Е. лектор	31.05.2021	

Ғылыми жетекші б.ғ.д. профессор



Б.Б. Анапияев

Тапсырманы орындауға алған білім алушы



Қ.Қ.Хасен

АНДАТПА

Дипломдық жұмыстың тақырыбы: «Арпаның гаплоидтық биотехнологиясы».

Дипломдық жұмыстың көлемі қағаз түрінде 34 беттен тұрады. Дипломдық жұмыс кіріспеден, 3 бөлімнен, қорытындыдан, 42 атаудан тұратын ғылыми және оқу әдебиеттерінің библиографиялық тізімі, 6 кестеден және 7 суреттен тұрады.

Жұмыстың мақсаты: Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) сорттары мен будандарының *in vitro* оқшауланған микроспоракультурасында андрогенез процессінің жүру жиілігіне әсерететін факторларды зерттеу

Дипломдық жұмыс гаплоидты технологияны қолдана отырып, арпаның (*Hordeum vulgare* L.) тозандарының андроклинді құрылым түзу жиілігіне әр түрлі коректік орта мен көмірсулардың әсеріне қысқаша шолу.

Арпа-ауданы, өндірісі, әлемдегі маңыздылығы бойынша төртінші дәнді дақыл, сондай-ақ әлемде алғашқы өсірілген дақылдардың бірі. Арпа ауқымды генетикалық ресурстарға, үнемі жетілдіріліп отыратын геномдық ресурстарға және бірқатар тиімді биотехнологиялық құралдарға ие.

Бұл дақылдың үлкен өндірістік процеске қатысуы оны таңдаудың негізгі міндеттерін қалыптастырады, олар әр түрлі топырақ-климаттық аймақтар үшін жоғары өнімді және қолайсыз экологиялық факторларға төзімді күздік және жаздық сорттарды құру болып табылады.

Зерттеу нысаны: Арпа (*Hordeum vulgare* L.)

Түйінді сөздер: арпа (*Hordeum vulgare* L.), гаплоидты технология, андрогенез, *in vitro*.

АННОТАЦИЯ

Тема дипломной работы «Гаплоидная биотехнология ячменя».

Дипломная работа выполнена на бумажном носителе в объёме 34 страниц. Диплом включает введение, 3 раздела, заключение, библиографический список научной и учебной литературы из 42 наименований, 6 таблиц, 7 рисунков.

Целью работы: Исследование факторов, влияющих на частоту протекания процесса андрогенеза в культуре микроспор, выделенных *in vitro* сортов и гибридов ячменя.

Дипломная работа краткий обзор влияния пыльцы ячменя на частоту образования андроклиной структуры различных питательных сред и углеводов с использованием гаплоидной технологии.

Ячмень-четвертая по производству, значимости в мире зерновая культура, а также одна из первых возделываемых культур в мире. Ячмень обладает обширными генетическими ресурсами, постоянно совершенствующимися геномными ресурсами и рядом эффективных биотехнологических инструментов.

Участие этой культуры в крупном производственном процессе формирует основные задачи ее выбора, которые заключаются в создании высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды озимых и яровых сортов для различных почвенно-климатических зон.

Объектами исследования: Ячмень (*Hordeum vulgare* L.)

Ключевые слова: ячмень (*Hordeum vulgare* L.), гаплоидная технология, андрогенез, *in vitro*.

ANNOTATION

Theme of diploma work «Haploid biotechnology of barley»

Diploma work is executed on a paper carrier in the volume of 34 pages.

A diploma includes introduction, 3 divisions, conclusion, bibliographic list of scientific and educational literature from 42 names, 6 tables, 7 pictures.

The aim of the work: Study of factors affecting the frequency of androgenesis in the culture of microspores, isolated in vitro varieties and hybrids of barley.

Thesis a brief review of the effect of barley pollen on the frequency of androcline formation of various nutrient media and carbohydrates using haploid technology.

Barley is the fourth most produced, important cereal crop in the world, and one of the first cultivated crops in the world. Barley has extensive genetic resources, constantly improving genomic resources and a number of effective biotechnological tools.

The participation of this crop in a large-scale production process forms the main tasks of its selection, which are to create high-yielding and resistant to adverse environmental factors winter and spring varieties for different soil and climatic zones.

The objects: Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Key words: Barley (*Hordeum vulgare* L.), haploid technology, androgenesis, in vitro.

МАЗМҰНЫ

	Кіріспе	9
	Негізгі бөлім	10
1	Әдебиеттерге шолу	10
1.1	Арпаның екі еселенген гаплоидты өндірісі және технологиялары	10
1.2	Арпа гаплоидиясы және оларға әсер ететін факторлар	12
1.3	Гаплоидты арпа культурасының алу әдістері және технологиялары	14
1.4	Микроспоралардың <i>in vitro</i> жағдайында дамуы және стресстің рөлі	17
2	Зерттеу материалдары мен әдістері	23
2.1	Стерилизациялық жағдайларды қамтамасыз ету жолдары	23
2.2	Оқшауланған тозаңдарды өсіруге қажетті қоректік орталар	24
3	Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау	27
3.1	Арпаның (<i>Hordeum vulgare</i> L.) тозаңдарының андроклинді құрылым түзу жиілігіне әр түрлі қоректік орта мен көмірсулардың әсері.	30
	ҚОРЫТЫНДЫ	32
	Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	33

КІРІСПЕ

Жұмыстың өзектілігі: арпа Қазақстан аумағы бойынша өсірілуі жағынан екінші орынды алып отыр. Арпаның өнімділігін жоғарлату үшін ыстықа суықа және қолайсыз жағдайларға төзімді өнімді алу қажет және өнімнің өнімділігін артыру үшін жылда жаңа сорттар жасап шығаруды қажет етеді. Карапайым әдісті қолдана отырып жаңа сорттарды алу ұзақ уақыт қажет етеді яғни 15 жылдай уақыт қажет. Ал гаплоидты технологияларды қолдана отырып 1-2 жылда генетикалық тұрақты диплоидты линиялы сорттарды алуға болады.

Арпа-ауданы, өндірісі, әлемдегі маңыздылығы бойынша төртінші дәнді дақыл, сондай-ақ әлемде алғашқы өсірілген дақылдардың бірі. Азық-түлік үшін де, жем үшін де маңызды дақыл болумен қатар, ол сонымен қатар құнды диплоидты модельдік дән болып табылады. Арпа ауқымды генетикалық ресурстарға, үнемі жетілдіріліп отыратын геномдық ресурстарға және бірқатар тиімді биотехнологиялық құралдарға ие.

Сондықтан арпа дақылының гаплоидтық биотехнологиясын дамыту, оқшауланған тозаңқап және микроспора культурасында эмбриоидогенез процесін және өсімдік-регенеранттарының түзілу жиілігін жоғарлатуға бағытталған зерттеулер өте өзекті.

Зерттеу мақсаты: Арпаның *in vitro* жағдайында будан мен сорты оқшауланған микро спораларда андрогенез процесінің жүру әсерін зерттеу.

Зерттеу мақсатына төмендегі талаптар қойылады:

1. Арпа буданы мен сортын егіс алқабында өсіру
2. Арпаның сорттары мен будандарының сұрыптанып алынған донорлық өсімдіктерін төмен температурада өңдеу;
3. Аспетикалық жағдайда арпа буданы мен сортын *in vitro* жағдайында микроспораларын өсіру.

НЕГІЗГІ БӨЛІМ

1.ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ

1.1 Арпаның екі еселенген гаплоидты өндірісі және технологиялары

Арпа-ауданы, өндірісі, әлемдегі маңыздылығы бойынша төртінші дәнді дақыл, сондай-ақ әлемде алғашқы өсірілген дақылдардың бірі. Азық-түлік үшін де, жем үшін де маңызды дақыл болумен қатар, ол сонымен қатар құнды диплоидты модельдік дән болып табылады. Арпа ауқымды генетикалық ресурстарға, үнемі жетілдіріліп отыратын геномдық ресурстарға және бірқатар тиімді биотехнологиялық құралдарға ие [1].

Арпа (*Hordeum vulgare* L.) - I геномдық белгісі бар диплоидты түр ($2n = 2x = 14$), бірақ хромосомалар 1N-ден 7N-ге дейін таңбамен сипатталады. Бұл түр көптеген климаттық жағдайларда өзін-өзі тозаңдандырады, сондықтан сорттар әдетте фенотиптік және генетикалық жағынан біртекті болады. Бұған әдетте ұрпақтар үшін инбридинг және іріктеу арқылы қол жеткізіледі, бірақ гаплоидты жүйелер бір ұрпақта гомозиготалыққа қол жеткізе алады, сондықтан жаңа сорттарды өсіру кезінде бірнеше ұрпаққа уақытты үнемдейді [2]. Генетикалық біртектілік көптеген елдерде жаңа сорттарды тіркеудің міндетті шарты болып табылады, осылайша гаплоидия осы біртектілікке қол жеткізу үшін селекцияның соңғы кезеңдерінде қолданыла алады. Молекулалық картографиялық зерттеулер үшін популяцияның біркелкілігіне байланысты көбінесе екі есе гаплоидтар, әсіресе арпада шығарылады. Екі еселенген гаплоидтан алынған тұқымдарды қатарға отырғызуға болады, бұл өсімдіктердің әртүрлі түрлерін және ауруға төзімділік сызықтарын таңдауды айтарлықтай жеңілдетеді. Гаплоидтар немесе екі еселенген гаплоид сызықтары генетикалық зерттеулер, мутациялар және культуралардағы жеке клеткалар деңгейінде іріктеу және эмбриондардың дамуын зерттеу үшін де құнды [3].

Жетілмеген тозаңнан эмбриондар мен өсімдіктерді алудың алғашқы көрсетілімі. Ол сасық мендуанаға тозаңдақылын қолданды және бұл басқа түрлерге үлкен қызығушылық тудырды. Арпадан алынған алғашқы гаплоидтарды Клепхем (1973), ал Сандерленд (1974) арпадағы гаплоидты өндіру механизмін зерттеудегі алғашқы көшбасшы болды [4]. Арпа алғашқы дақыл болды, онда көптеген генотиптерден гаплоидтардың көп мөлшерін шығаруға болады, Каша мен Као *H. vulgare*-ді *H. bulbosum*-мен будандастырудан гаплоидтар шығарды [5].

Тозаң культурасы және *Hordeum bulbosum* технологиясы оқшауланған микроспор культурасына қарағанда бұрын сипатталған. Технологияның әрқайсысының өзіндік артықшылықтары мен кемшіліктері бар. *H. bulbosum* технологиясы жоғары сапалы жабдыққа салыстырмалы түрде тәуелсіз болғанымен, бұл екі технология да күрделі және тұрақты жылыжай қуатын (салқындату, жарықтандыру), сонымен қатар зертхананың санитарлық жағдайына көбірек назар аударуды қажет етеді [6]. Дегенмен, бүгінгі күні *H.*

bulbosum технологиясы кеңінен қолданылмайды, өйткені оның тиімділігі орнатылған АС және ІМС бағдарламаларына қарағанда айтарлықтай төмен. Хантер (1987) сипаттаған мальтозаны қолдану арқылы серпіліс және көптеген басқа авторлардың одан әрі жетілдіруі бүгінде көптеген зертханаларда қолданылады[7].

Андрогендік екі еселенген гаплоидты технологияларды сәтті қолданудың алғышарты ретінде қолыңызда донор өсімдіктерді өсірудің оңтайлы режимдері болуы керек. Ұнтақты көгеру және жәндіктер (бит, трипс, өрмек кенелер) сияқты аурулардан оңтайлы қорғаныс кезінде оңтайлы абиотикалық жағдайлар қамтамасыз етілуі керек. Жарықтың сапасы мен мөлшері, сумен жабдықтау, тыңайтқыш, өсу субстраттары, ауаның ылғалдылығы және көмірқышқыл газының концентрациясы маңызды аспектілер/факторлар болып табылады[8]. Микроспоралардың дамуының оңтайлы кезеңі (ядросыздардың ортасынан аяғына дейін) АС және ІМС сәттілігі үшін қажет тағы бір шарт болып табылады. Табысты хаттамаларда сипатталған ең көп таралған алдын-ала емдеу-бұл қопсытқыштарды суық өңдеу (суда немесе сулы қағаз сүлгілер мен фольгаға оралған) немесе бірнеше күн бойы 0,3 М маннит ерітіндісінде. Осы және одан да егжей-тегжейлі хаттамалардың кейбіреулері Maluzynski жұмысында жарияланған.

Керекті жақсартулар. Жарияланған жақсартулардың көптігіне қарамастан, селекциялық бағдарламаларда генотипке бірнеше жүз жасыл көшет өсіру тек осы хаттамаларды (көбінесе генотиптердің аз ғана ауқымымен жұмыс істейді) арпа өсіру станцияларындағы нақты жағдайларға бейімдеу арқылы мүмкін болады. Екі еселенген гаплоидты зертханада жылына бірнеше жүздеген будандастыруларда жұмыс істеу кең және сенімді хаттамаларды қажет етеді. Параллель режимде екі еселенген гаплоидтармен жұмыс жасау техникалық жағынан қиын және қымбат. Екі есе гаплоидты өсімдіктердің тұрақты және сенімді саны ДН-ны сәтті таңдаудың қажетті шарты болып табылады. Жоғарыда сипатталған айтарлықтай жақсартуларға қарамастан, АС және ІМС арпасында үш негізгі кедергі бар. Олардың бірі-генотиптің өзі альбиностарға тәуелді пайда болуы, ал екіншісі-оқшауланған микроспор культурасында бактериялар мен саңырауқұлақтардың ластануының техникалық проблемасы. АС-де ластану маңызды мәселе емес, өйткені шығындар қалыпты жағдайда өте күрделі емес. Алайда, бактерияға қарсы және саңырауқұлаққа қарсы заттарды қолдану мүмкін, бірақ бұл мәселенің өте қымбат шешімі болып табылады[9].

Технологияны одан әрі жетілдіру үшін көмірқышқыл тыңайтқышы мен ауа ылғалдылығының арпаның АС және ІМС реакциясына әсерін зерттеу қажет. Осыған байланысты деректердің сапасы мен саны мұндай эксперименттердің шығындарына байланысты өте төмен. Сонымен қатар, физиологиялық жағдайлар, мысалы, сумен және қоректік заттармен

камтамасыз ету және мәдени субстраттың түрі болашақта тестілеу үшін қызықты болуы мүмкін [10].

1.2 Арпа гаплоидиясы және оларға әсер ететін факторлар

Дигаплоидтарды қолдану кезінде генетикалық бөліну қиынемес, бұл салыстырмалы түрде аз популяциялардағы гендердің белгілі бір комбинациясын оқшаулау үшін пайдалануға мүмкіндік береді [13].

Генетикалық біркелкілігіне байланысты екі есе гаплоидтар молекулалық маркерлерді іздеуде кеңінен қолданылады. Мысалы, арпада генетикалық карталардың көпшілігі осы технологияны қолдана отырып салынған. Арпаның (және басқа да қылдардың) гаплоидты және екі еселенген гаплоидты сызықтары және оларды алу әдістері генетикалық зерттеулер, мутагенез, клетка селекциясы, генетикалық трансформация және андроменэмбриогенезді зерттеу үшін кеңінен қолданылады [14].

Бүгінгі таңда әлемде арпаның екі еселенген гаплоидтарының жүздеген, тіпті мыңдаған түрлері тіркелген. Өкінішке орай, олардың толық тізімі әлі жоқ. Алайда, COST 851 сайтында арпаның кейбір көктемгі және қысқы сорттарының тізімі берілген. Жыл сайын жаңа екі еселенген гаплоидтер бүкіл әлемде тіркеледі (көбінесе Еуропада, Канадада, АҚШ-та, Австралияда). Соматональды өзгергіштіктің пайда болуымен, генетикалық әртүрліліктің жоғалуымен және белгілердің тұрақтылығының аздығымен байланысты екі еселенген *in vitro* гаплоидтарына луга дәстүрлік қарсылықтар әлі де кеңінен талқылануда [15]. Алайда, гаплоидияны қолдануға негізделген көбірек селекциялық бағдарламалар бар [16].

Гаплоидтарды қолдану жалпы іріктеу бағдарламасындағы шағын техникалық қадам екенін есте ұстаған жөн. Жаңа сорттарды құруда екі еселенген гаплоидтарды қолданудың сәттілігі зертханада биотехнологиялық жұмысты және далалық селекциялық әдістерді біріктірудің нәтижесі болып табылады. Будандастыруды және жалпы бағдарламаны жоспарлаудағы интеллектуалды шығындар, маркетинг саласындағы білім және далалық тәжірибелердегі жетістік – арпаның да, басқа да экономикалық жағынан құнды да қылдардың жаңа өнімді және зиянкестерге төзімді сорттарын құру бойынша жобалардың сәттілігінің қажетті құрамдас бөлігі болып табылады [17].

Оның сәтті өсірілуіне ықпал еткен факторларға биотикалық стресстерге, жоғары және төмен температураларға, құрғақшылыққа, минералды жетіспеушілік пен ұйыттылыққа төзімділігі, сондай-ақ оның салыстырмалы түрде қысқа өмірлік циклі жатады.

Бұл факторлар арпаны басқа да қылдарға жарамсыз жағдайда өсіруге мүмкіндік береді. Негізгі егін жинау өнімі – бұл жануарларды тамақтандыру, қайнату, тұздау және адамдар үшін тамақ ретінде қолданылатын астық. Сонымен қатар, сабан мен жапырақтар жануарлардың маңызды көзі болып табылады.

Культивиралық арпа, *Hordeum vulgare* L., *Hordeum* тұқымдасының 30-ға жуық түрін қамтитын жалғыз өсірілетін түрі [18].

Тұқым басқа маңызды сәкденді қылдардан тұратын *Triticeae* субтүрлерін ыңбір бөлігін құрайды: бидай, макарон, қара бидай және тритикале. *Triticeae*, өз кезегінде, шөпті, *Poaceae* тұқымдасының бөлігі. Арпада қыл ретінде *H. Spontaneum* С. Коч жабайы түрін 10 000 жыл бұрын құнарлы жарты айда өсіру нәтижесінде пайдаланды. Фертильдігибридтер *Hordeum vulgare* мен оның ұрпағы *H.*

Spontaneum арасында оңайшығарылады және рекомбинацияға әшқандай кедергі жоқ. Бұл кейбір таксономистерді *H. Vulgare* және *H. Spontaneum*-ді біртүрге біріктіруге әкелді. Бүлекі түр дақылдың генетикалық жақсарту үшін бас тапқы генофондты құрайды. Кейдегибридтер түзетін және *H. vulgare*-мен ортақ геном (НН) бар *Hordeum bulbosum* екінші генофондты құрайды. *Hordeum*-дің басқатүрлері үшінші генофондты құрайды. Культивиралық арпа-бұл инбридер,

сондықтан өнімді жақсарту бағдарламалары гомозиготалы және нәтижесінде шынайы селекция болып табылатын сызықтарды алуға бағытталған.

Дәстүр бойынша, бұл *H. vulgare*-дің екі немесе одан да көп қосымша генотиптерінің аяқастыру арқылы, содан кейін селфинг циклі және қажетті белгілерді таңдау арқылы жүзеге асырылады. Кейде селекционерлер арпаны жақсарту үшін жана гендердің көзі ретінде *H. spontaneum* қолданды, мысалы, ұнтақты көгеруге төзімділік [19]. Мұндай жағдайларда жабайы түрлерден мұраға қалған ара мшөптердің белгілері нжою үшін дақылдардың түрлерімен қайта-қайта аяқастыру қажет. Кеңінен будандастыру қиын болғандықтан, ол будандастыру қолданылған жоқ. Алынған будандар көбінесе стерильді немесе өміршенемесе аяқастыру гаплоидтардың пайдаланылуына әкеледі. Бұл соңғы құбылыс *H. vulgare* және *H. bulbosum* аяқастыру кезінде жоғары жиілікте байқалды, ол әдістің әлеуетін тез түсінді.

1.3 Гаплоидты арпа культурасының алу әдістері немесе технологиялары

Тозаңдық дақылда гаплоидты арпа өсімдіктерін алу әдісі. Оқшауланған микроспора культурасының әдістері және тозаң культурасы-қазіргі уақытта өсімдіктерде гаплоидтарды алу үшін кеңінен қолданылатын жүйелер. Тозаңдық микроспоралардың көп мөлшері және масақтағы тозаңның бір масақтан көптеген гаплоидтарды алуға мүмкіндік береді. [20].

Арпаның гаплоидты өсімдіктері алғаш рет 1973 жылы алынды. Содан кейін әзірленген хаттамалар жетілдірілуде және қазір әдістің мәні келесідей:

бақыланатын температура мен жарық жағдайларында өсірілген арпа өсімдіктерінен тозаң шығарылады. Микроспоралардың (тозаңдар ішінде) гаметофиттен спорофиттік даму жолына ауысуы *in vitro* тозаңына немесе тозаңдар бөлінгенге дейін өсімдіктерге стресстік әсер етеді [21]. Стресс ретінде, әдетте, төмен температуралы шок және көмірсулардың ашығуы қолданылады. Стрессті емдеуден кейін тозаңдар жасанды сұйық қоректік ортаға ауысады және эмбриондар пайда болғанға дейін өсіріледі, олар өз кезегінде құрамы генотиптерге немесе эксперимент мақсаттарына байланысты өзгертін регенерация үшін қатты ортаға ауысады [22].

In vitro оқшауланған тозаңдақылындағы өсімдіктердің дамуы екі жолмен жүруі мүмкін: эмбрионның тікелей регенерациясы (эмбриоидогенез) және каллусогенез арқылы. Бірінші жағдайда микроспоралардың ішінде эмбрионалды құрылымдар пайда болады, олар белгілі бір өсіру жағдайларында эмбриондарға (эмбрион тәрізді құрылымдар) дамып, гаплоидты өсімдіктерді тудырады. Эмбриондардың пайда болу тиімділігі генотипті тәуелді процесс болып табылады және айтарлықтай өзгеруі мүмкін (0-ден 95% - ға дейін). Екіншісінде-микроспора бөлінеді, бірақ бөліну нәтижесінде пайда болған клеткалар тез ұлғаяды және тозаң дәнінің қабығын жыртып, каллус түзеді. Одан әрі морфогенез нәтижесінде осы каллус клеткаларынан өсімдіктер қалпына келеді. Бұл жағдайда өсімдіктер плоидтың әртүрлі деңгейіне ие болуы мүмкін-ди, поли-, анеуплоидты және гаплоидты. Соңғылары көбінесе стерильді, бірақ өсімдіктерді колхицинмен емдегеннен кейін хромосомалардың саны екі есе артады, нәтижесінде құнарлы гомозиготалар пайда болады [23].

Бұл әдістің үлкен артықшылығы-регенерантты өсімдіктер арасында спонтанды дигаплоидтардың пайда болуының жоғары пайызы-60-80%, бұл өсімдіктер мен адамдарға улы болып табылатын хромосомаларды екі есе көбейту үшін химиялық заттарды пайдаланбауға мүмкіндік береді [24].

Бұл технология әртүрлі мақсаттарда кеңінен таралған және қолданылады, бірақ соған қарамастан, қалпына келтіретін өсімдіктер арасында альбиностардың үлкен пайызын құрайтын айтарлықтай кемшілік бар.

Оқшауланған микроспор культурасында гаплоидты өсімдіктерді алу әдісі.

Культура *in vitro* микроспорасы-бұл тозаңның соматикалық тіндерінен босатылған генеративті клеткалардың сұйық қоректік ортасында өсіру процесі. Бұл әдіс тозаң мәдениетінен технологиялық жағынан ерекшеленеді.

Оқшауланған микроспор культурасы мен тозаң культурасының басты айырмашылығы-тозаңнан микроспордың бөліну кезеңі. Микроспорлар тозаңнан кеш бір ядролы (митоздық бөлінуден бұрын) немесе дамудың ерте екі ядролы (бөлінуден кейін бірден) сатысында алынады. Микроспораларды оқшаулау және өсіру бойынша эксперименттің негізгі схемасы келесідей: Тоzaңдармасақ фрагменттерінен алынады, 0,3 м маннитол ерітіндісінде бірнеше секунд ішінде блендермен сындырылады. Алынған пульпа 100 мкм

сүзгі арқылы сүзіліп, жұмсақ жағдайда (50-100 г) бірнеше минут (3-5 минут) центрифугаланады. Центрифугалау аяқталғаннан кейін микроспорлардан тұнба 0,3 М маннитол ерітіндісінде араластырылады. Содан кейін центрифугалау циклі бірнеше рет қайталанады, бұл микроспор клеткаларын тиімді жуу үшін қажет. Микроспораларды одан әрі өсіру сұйық қоректік ортада жүзеге асырылады, олардың құрамы генотиптерге немесе эксперимент мақсаттарына байланысты өзгереді және әдетте мальтозадан (көмірсулар көзі ретінде) және кейде өсу стимуляторларынан тұрады.

Гаплоидты өсімдіктерді тозаң мәдениеті мен микроспор мәдениеті арқылы алу әдістерінің тиімділігін талдауға бағытталған зерттеулер микроспор мәдениеті тиімдірек екенін көрсетті. Қазіргі уақытта микроспор мәдениеті әдісі әсіресе қысқы және аз дәрежеде көктемгі арпа үшін заманауи селекциялық бағдарламаларда кеңінен қолданылады [25].

Микроспор мәдениеті қолданбалы зерттеулер үшін де кеңінен қолданылады. Сонымен, арпа микроспор мәдениетінде стресс факторларының (аштық, суық) гаметофиттен эмбриогенезге дейінгі клеткалық даму жолын қайта бағдарламалауға әсері көрсетілді және каспаза-3, ROS және NO стресс-индукцияланған апоптозға қатысуы зерттелді. Микроспор культурасында микрочиптерді қолдану микроспор эмбриогенезінің экспрессиялық профилін зерттеуге мүмкіндік берді.

Жақында арпа гаплоидтарының екі еселенген технологиясын маркерсіз трансгенді өсімдіктерді алу үшін және экономикалық құнды белгілерді белгілеу үшін қолдануға болатындығы көрсетілді [26].

Арпа гаплоидтарын өндірудің басқа әдістері

Арпа гаплоидтары сонымен қатар, ұрық өсіндісімен және гаплоидты инициация геннің (hap) көмегімен алынды. Алайда, осы тәсілдерге байланысты қиындықтар оларды кеңінен қолдануға мүмкіндік бермеді. Ұрықтық мәдениет әдісі жақсарды, бірақ өміршең ұрпақтардың пайызы төмен болды (0.2-1.4%), ал процедураның өзі көп уақытты қажет етеді, бұл оған қолданбалы мақсаттар үшін кеңінен қолдануға мүмкіндік бермеді. Нар гені ұрықклеткасының ұрықтануын бұғаттауға жауап береді, алайда полярлық ядро ұрықтандырылады және эндосперма қалыпты дамиды. Ұрық клеткасы гаплоидты эмбрионға айналады. Осылайша, гаплоидты және диплоидты тұқым сыртқы жағынан ерекшеленбейді. Нар гендік жүйесін одан әрі зерттеу қажет, сондықтан ол тозаң мәдениеті немесе оқшауланған микроспор әдісімен бәсекелесе алады [27].

Гаплоидизацияны генетикалық бақылау

Гаплоидтарды қалыптастыруға қатысатын гендерді анықтау гаплоидтардың ашылуынан бері зерттеушілердің мақсаты болды, бірақ қазір ғана молекулалық зерттеулердегі прогресс гаплоидияның индукциясына жауап беретін жүздеген гендерді анықтауға мүмкіндік берді. Гаплоидияны қоздыратын арпа hap гені-бұл партеногенезді ынталандыратын басым мутация бар аллель. Бұл мутацияның басым сипаты селекционерлерге

белгілі бір проблемалар туғызады, өйткені һәр аллелін нарыққа кіретін тұқымдардан алып тастау керек.

Хромосомаларды жою әдісі *H. vulgare*-ді *H. bulbosum*-мен қашықтықтан будандастырғаннан кейін белгілі бір геномдық тепе-теңдіктің болуына негізделген. Бірақ Kasha (1975) бұл тепе-теңдікті басқаратын генетикалық факторлар 2 хромосоманың екі иығында және арпа 3 хромосомасының қысқа иығында локализацияланғанын көрсетті. Pickering (1985) 5 хромосомасында арпа мен *H. bulbosum* арасындағы сәйкессіздікке жауап беретін генді тапты. Хромосомаларды жою құбылысы жүгері мен тары арқылы өткен кезде бидай мен сұлы үшін де белгілі. Өсімдіктерді кесіп өту кезінде қолданылатын генотиптер жою тиімділігіне де әсер етеді.

Әр түрлі белгілермен ерекшеленетін генотиптерді айқастыру және картаға түсіру үшін молекулалық маркерлерді құру сандық белгілерге жауап беретін гендерді анықтауға мүмкіндік береді - QTL (Quantitative Trait Loci). Ziyu (1992) және Devaux (1994) бірлескен авторлармен эмбрионның дамуына және өсімдіктің қалпына келуіне байланысты төрт локусты анықтады. Chen (2007) бірлескен авторлармен бірге ұқсас 3 локусты тапты[28].

Молекулалық карта жасау, маркер арқылы іріктеу және генетикалық әртүрлілікті зерттеу үшін әр түрлі маркерлер қолданылады: AFLP, RAPD, SSR, EST, SNP және т.б. Varshney бірлескен авторлармен (2007) 775 SSR маркерлері бар арпаның хромосомалық карталарын жасады, олардың орташа қашықтығы 1.38 сМ.

Гендерді анықтау және окшаулау үшін EST (expressed sequence tags) мәліметтер базасы қолданылады. Арпаға ұқсас база 2005 жылы жасалған. Осындай кітапханалардың көмегімен транскриптомды скрининг үшін микрочиптер құруға және эмбриогенез кезінде ген экспрессиясына әртүрлі жағдайлардың әсерін байқауға болады.

Андрогенез процесіне қатысатын гендерді сәйкестендірумен қатар, бұл процесс цитологиялық тұрғыдан да зерттеледі. Эмбриогенезге көшу кезінде клетка ядросының диплоидизациясы бірқатар жұмыстарға арналған.

1.4 Микроспоралардың *in vitro* жағдайында дамуы және стресстің рөлі

Аталық мен аналықтардың генеративті құрылымдарының *in vitro* мәдениетінде гаплоидты өсімдіктерді алу – қазіргі биотехнологияның сұранысқа ие бағыттарының бірі.

Гаплоидты хромосомалар санының одан әрі екі еселенуі гомозиготалы ДН сызықтарының пайда болуына әкеледі. Олардың басты артықшылығы-гибридті генотипті тұрақтандыру үшін қажет жеті-сегіз жыныстық ұрпақты азайту үшін селекцияда қолдану. Бидай, арпа, тритикале, күріш, рапс[29]. Олардың көмегімен экономикалық маңызы бар дақылдардың 300-ге жуық сорттары жасалды, олардың 150-і *Poaceae* тұқымдасының өкілдеріне

жатады. Гаплоидты биотехнологияларды қолдану арқылы өсірілетін сорттардың саны үнемі өсіп келеді. Әлемнің бірқатар аймақтарында ДН сорттары басым болады. Мысалы, Еуропада арпаның өсірілетін сорттарының 50%–ы гаплоидты биотехнологияларды тарту арқылы алынады, ал Канадада ең үлкен аудандары бар бидайдың бес сортының үшеуі-ДН сорттары.

Гаплоидты өсімдіктерді өндірудің әртүрлі әдістерінің ішінде тозаң мәдениеті және оның әртүрлілігі – оқшауланған микроспор мәдениеті практикалық қолданылады. Гаметофиттен айырмашылығы спорофиттік даму жолы микроспоралардан эмбрион тәрізді құрылымдардың (псевдо-эмбриондардың) пайда болуымен сипатталады, бұл гаплоидты өсімдіктердің пайда болуына әкеледі. *In vitro* андрогенезі (гаплоидты эмбриогенез, микроспоральды эмбриогенез, андроклиния) деп аталатын бұл құбылыс дамудың белгілі бір кезеңінде оқшауланған өсімдіктердің тозаңы салыстырмалы түрде қарапайым ортада гормоналды қоспалары бар немесе онсыз өсірілген кезде пайда болады [30].

Микроспор немесе тозаң эмбриогенезі-өсімдік клеткаларының тотипотенттілігінің ең жарқын мысалдарының бірі. Микроспоралардың спорофиттік дамуының индукциясы туралы алғашқы есептер ХХ ғасырдың екінші жартысында пайда болды.

Микроспор эмбриогенезінің сәтті индукциясы 250-ден астам өсімдік түрлерінде кездеседі. Дегенмен, гаплоидты биотехнологияларды кеңінен қолдануды тежейтін шектеуші факторлар әлі де бар. Олардың негізгілері-генотиптік тәуелділік және өсімдіктерді қалпына келтірудің төмен жиілігі. Дәнді дақылдардың көптеген түрлері үшін альбино регенеранттарының жоғары үлесі *in vitro* тозаңдар мәдениетіндегі гаплопродукцияның маңызды мәселесі болып қала береді [31]. Бұл проблемалар дәстүрлі селекциямен салыстырғанда сорттарды құру уақыты мен шығындарын қысқартатын гаплоидты өсімдіктер мен екі еселенген гаплоидтарды өндірудің тиімді хаттамаларының дамуын тежейді.

Әр түрлі түрлер үшін *in vitro* тозаңдар (микроспор) мәдениетінде гаплоидты өсімдіктерді алудың әмбебап технологиялары жоқ, бірақ олардың негізгі кезеңдері өзгеріссіз қалады. Оларға мыналар жатады: донорлық өсімдіктерді өсіру және іріктеу, әр түрлі стресстік факторлары бар гүлшоғырларды немесе тозаңқаптарды алдын-ала өңдеу, тозаңды оқшаулау (микроспор) және оларды *in vitro* жағдайында өсіру, эмбриогенезді индукциялау, өсімдіктерді қалпына келтіру, регенерант өсімдіктерінің хромосомаларының санын екі есе көбейту. *In vitro* арқылы өсіру кезінде тозаңқаптардың реакциясына көптеген эндогендік және экзогендік факторлар әсер етеді: донорлық өсімдіктерді өсіру шарттары, генотип, гүлшоғырларды немесе тозаңқаптарды алдын-ала өңдеу әдістері мен ұзақтығы, тозаңқаптардың даму кезеңі, коректік орталардың құрамы [31].

Өсірілетін тозаңқаптардың эмбриогендік (эмбриоидогендік, сәйкес тиімділігін арттырудағы маңызды қадам-*in vitro* микроспораларының

спорофиттік дамуының индукция механизмдерін түсіну. Стресс-бұл микроспордың генетикалық даму бағдарламасының өзгеруіне және олардың спорофиттік даму жолына ауысуына жауап беретін жалпы сигнал, микроспор эмбриогенез индукциясының моделін біріктіруге және гаплоидты өсімдіктерді өндірудің көптеген технологияларын оңтайландыруға мүмкіндік берді. Стресспен салыстырғанда, *in vitro* микроспораларының спорофиттік дамуы үшін гормондарды қолдану тіпті аз сыни болуы мүмкін, бұл гормондардың эндогендік балансы *in vitro* микроспор эмбриогенезінің қажетті шарты болып табылатындығын растайды [32].

Спорофиттік дамудың инициалды клеткалары ретінде микроспораларға сипаттама

In vitro микроспор эмбриогенезінің сәтті индукциясы донорлық өсімдіктің аталық гаметофитінің даму жағдайын дұрыс бағалауға байланысты. Микроспоралардың морфогенетикалық құзыреттілігі олардың дамуының белгілі бір кезеңінде ғана көрінеді. Көптеген түрлер үшін даму бағдарламасын гаметофиттен спорофитке ауыстыру үшін оңтайлы бірінші тозаң митозына жақын кезең көрсетілген.

Спорофиттік жол бойынша *in vitro* морфогенез индукциясы үшін тозаңқаптың дамуының критикалық кезеңі вакуольденген микроспораның сатысы болып саналады немесе жоғары вакуумдалған микроспора. А. Touraev пікірі бойынша. (1996а), "эмбриогендік терезенің" ұзақтығы кеңірек болуы мүмкін: ол микроспораның G1 фазасынан басталып, екі клеткалытозаң дәнінің G1 фазасына дейін жалғасады. Микроспораның құзыреттілігінің"терезесі" донорлық өсімдіктің түріне және генотипіне байланысты [33].

Іріктеу кезеңіндегі микроспораның динамикасы оның спорофиттік даму бағдарламасына ауысу қабілетін анықтайды. Спорофитке тән гендік өнімдердің көпшілігі мейоздың басында жойылады, ал гаметаға тән гендер алғашқы тозаң митозынан кейін ғана транскрипцияланады, бұл осы кезеңдегі микроспораның тұрақсыз күйін көрсетеді. Алғашқы тозаң митозынан кейін гаметофиттік бағдарлама қайтымсыз болады – тозаң дәнінің пайда болуы жүреді [34]. *In situ* өсімдіктерінің кейбір түрлерінде кішкентай мөлшерімен және ацетокарминнің әлсіз боялуымен сипатталатын тозаң түйірлерінің фракциясы табылды. Мұндай тозаң дәндері (P-pollen) *in vivo*-да қосымша бөлінуге ұшырауы мүмкін және олардың кейінгі гаметофиттік дамуы тежеледі. Бұл құбылыс тозаң диморфизмі деп аталады, ол темекі, арпа, бидай, қара бидайдан зерттелген. *In situ*-да пайда болған тозаң дәндері *in vitro* эмбриогенезіне қабілетті және олардың жиілігі генотипке және өсімдік өсіру жағдайларына байланысты [35].

Даму бағдарламасын ауыстыру мүмкіндігі жоғары вакуольденген микроспораның құрылымдық ұйымының ерекшелігімен, ең алдымен оның айқын полярлығымен анықталады. Айқын полярлық тек ішкі ғана емес, сонымен қатар сыртқы құрылымда да көрінеді: вакуольдің белгілі бір

позициясы (тапетумға қарама-қарсы сыртқы полюсте) және ядро (ішкі полюсте, өну уақытына қарама-қарсы). Полярлық сонымен қатар цитоплазманың, оның органеллалары мен қосындыларының табиғи таралуында көрінеді және факторлардың барлық жиынтығына, ең алдымен тозаң қабырғасының тіндеріне қатысты микроспораның орналасуына және олардың қоректік заттардың градиентін құруына байланысты.

Бірқатар белгілерге сәйкес (үлкен ядроның болуы, жақсы дамыған орталық вакуоль және клетканың апикальды-базальды ұйымы), қаттывакуолданған микроспора жыныстық көбею кезінде зиготикалық эмбрионды, сондай-ақ апомиксис кезінде эмбрионды құрайтын ұрық қапшығының, тұқымбүршіктің және интегументтердің клеткаларын тудыратын жұмыртқаға ұқсас. Бұл жаңа индивидтің барлық бастапқы клеткаларының құрылымы табиғи жағдайда және *in vitro* мәдениетінде көбеюдің әртүрлі тәсілдерінде эмбебап болып табылады деп болжауға негіз береді [36].

In vitro андрогенезінің бастапқы клеткасы дамудың сыни сатысында спорогенді клетка ретінде қарастырылуы керек. Спорогендік клеткалар дамуындағы критикалық кезеңнің басты критерийі оның морфогенезге көшуді анықтайтын экстремалды факторлардың әсеріне сезімталдығы болып табылады. Бұл жағдайда бастапқы клетка меристематикалық клетканың барлық сипаттамаларына ие болуы керек [37].

Жоғары вакуолданған микроспораның гаметофиттен спорофиттік даму жолына ауысу қабілеті оны бағаналы клетка ретінде қарастыруға мүмкіндік береді. Эмбриогендік (морфогендік – термин дөңгелек және т.б. ұсынылған (2005)) микроспора сонымен қатар бағаналы клетканың тотипотентті және плюрипотенттілік сияқты қасиеттеріне ие, ұлпалар мен мүшелердің әртүрлі түрлерін, сондай - ақ *in vitro* морфогенезінің әртүрлі жолдары негізінде жаңа ағзаны қалыптастыру мүмкіндігі.

Стресс термині (ағылшын тілінен. stress-кернеу) 1936 жылы канадалық физиолог Ганс Селье дененің кез-келген күшті жағымсыз әсерлерге реакциясын сипаттау үшін ұсынған. Сәйкесінше F. Bonet біргебасқадаавторлар. (1998), микроспоральды эмбриогенез өсімдіктердің маңызды бейімделу механизмі болып табылады, ол стресс әсерінен белгілі бір жағдайларда ғана анықталадыдептұжырымдады.

Микроспораларды гаметофиттен спорофиттік даму жолына ауыстыру *in vivo* және *in vitro* . Қолданылатын стресске қарамастан, эмбриогендік микроспоралардың қалыптасуы мынадай жалпы оқиғалармен қатар жүреді: 1) микроспор көлемінің ұлғаюы; 2) клеткалық циклдің кідірісімен ДНҚ репликациясы арқылы өту; 3) цитоплазманың аутофагиясы; 4) ядроның шеткеріден орталық жағдайға ауысуына әкелетін цитоқаңқаның өзгеруі; 5) жаңа клетка қабырғасының қалыптасуы; 6) хроматинді ықшамдау; 7) гендер экспрессиясының өзгеруі.

Ген экспрессиясындағы өзгерістерді үш негізгі топқа бөлуге болады: стресске клеткалық жауаптылық; гаметофиттік бағдарламаның супрессиясы

және спорофиттік дамудың көрінісі. Гендердің, ақуыздардың және метаболиттердің көп саны осы сатылардың әрқайсысында тікелей немесе жанама триггерлер ретінде анықталады. Спорофит жолымен дамиды микроспоралардағы морфологиялық, физиологиялық және молекулалық өзгерістер стресс кезінде барлық эукариоттық клеткаларға тән. Бұл өсімдіктердің стресстерге жауап беруінде жалпы реакциялардың болуын болжауға негіз береді [37].

Микроспордың спорофиттік дамуын индукциялаудың алғашқы құрылымдық сигналы-цитоплазманың дифференциациясы. Бұл процесс органеллалардың, май денелерінің, крахмал дәндерінің және рибосомалардың санын азайтуды қамтиды. Ядро перифериядан микроспораның ортасына ауысады. Сонымен қатар, вакуол цитоплазмалық сәулелермен бөлінеді. Аз тығыз цитоплазма, пісетін генеративті клеткаға тән крахмал дәндерінің жиналмауы байқалады. Нәтижесінде цитоплазманың перинуклеарлы және субкортикалық аймағын байланыстыратын цитоплазмалық жолақтардан тұратын жұлдыз тәрізді құрылым пайда болады.

Ұқсас морфология тритикале микроспораларын өсірудің алғашқы кезеңдерінде байқалды, күріш, бидай және басқа да өсімдік түрлерінің эмбриогендік дамуының бастапқы сатысы ретінде қарастырылады. Осылайша, қатты вакуолдалған және полярланған микроспора депполяризацияланған және дедифференцияланған клеткаға айналады. Дамудың балама жолына көшу қайтымсыз болады [24,25].

Бөлінетін микроспораның симметриясының өзгеруін болжайтын ең алғашқы құрылымдық маркер-микротұтқырлардың (РРВ) алдын-ала таспасының пайда болуы. РРВ-стресс әсерін қолданғаннан кейін бірнеше сағаттан кейін микроспораның медиальды аймағында пайда болатын микротұтқырлардың кортикальды сақинасы. Тозаңның қалыпты дамуымен РРВ пайда болмайды. РРВ болашақ бөлінудің жазықтығын белгілейтіндіктен және жасуша қабырғасын тұрақтандыруға қатысатындықтан, микротұтқырларды қайта құру микроспораны дамыту бағдарламасын өзгертудегі маңызды оқиға деп болжанады. *Brassica napus* тозаң колхицині бар қоректік ортада өсіру авторлардың пікірінше, микроспорларда тең бөліністердің көбеюіне әкелді [38], олардың спорофиттік дамуындағы цитоскелеттің рөлін растайды. Микроспораның симметриялы бөлінуі оның эмбриогендік дамуының белгісі болып табылады. Тозаңның жетілу белгісі ретінде крахмал синтезін блоктау және крахмал резервтерін жою-бұл микроспораның спорофиттік дамуының сенімді белгісі ретінде қызмет ететін маңызды оқиға.

Осылайша, стресс гаметофиттік микроспор даму бағдарламасын қалпына келтіріп қана қоймайды, сонымен қатар олардың дамуын спорофиттік жолға ауыстырады. Стресс микроспоралардың спорофиттік дамуының жалпы сигналы ретінде қызмет ететіндігінің ашылуы микроспор

эмбриогенез индукциясының эмбебап моделін жасауға мүмкіндік берді [25], үш негізгі кезеңнен тұрады:

- стресстік әсерлерді қолдану кезінде гаметофиттік даму бағдарламасын қайтымсыз блоктау.

Бұл эмбриоидтардың кейінгі дамуы үшін қажетті, бірақ жалғыз шарт емес;

- молекулярлық деңгейдегі өзгерістер есебінен эмбриогендік микроспоралар популяциясының қалыптасуы;

- құрамында көмірсулар (сахароза) бар қоректік ортада спорофиттік даму бағдарламасын жүзеге асыру.

Қолданылатын стресс әсерлері

Спорофиттік және гаметофиттік детерминацияны өзгерту үшін донорлық өсімдіктерге стресс әсер етуі мүмкін *in vivo*, ал әсер ету уақыты әртүрлі болуы мүмкін: қысқа мерзімді (өсімдік дамуының бір кезеңінде) немесе ұзақ. Бұл көбінесе әсер ету факторына, сондай-ақ өсімдік түріне байланысты. Сондай-ақ, оқшауланған спорофит кешеніне тозандар немесе гүлденуге жергілікті *in vitro* әсері қолданылады. Әсер ету әдісіне қарамастан, бұл микроспорогенездің қалыпты бағытын және тозаң дәнінің дамуын анықтайды [30] стресс үш санатқа бөлінеді: кеңінен қолданылатын, елеусіз және жаңа. Кеңінен қолданылатын стресстерге температура соққысы, көмірсулардың ашығуы және колхициннің әсері жатады.

Жоғары температуралы стресс in vitro. Микроспорды спорофиттік даму жолына ауыстырудың тиімді қоздырғышы-жылусоққысы. Арпатозаны өсіру температурасының жоғарылауы (төрткүнішінде 32-34 °C дейін) микроспор эмбриогенез өнімділігінің артуына әкеледі. Жоғары температуралы стресстің қысқа мерзімді әсері *Brassica L.* тұқымындағы микроспор эмбриогенез индукциясының тиімді әдісі болып табылады.

Жоғары температураны қолданудың оң рөлі басқа стресстік факторлармен, мысалы, аштықпен [24-26].

Жылусоққысы клеткадағы әртүрлі өзгерістерді тудырады, атап айтқанда тозаңды саралау бағдарламасын блоктайтын жылу шок ақуыздарының синтезін (HSPs), әсіресе HSP70 индукциясын тудырады. Донорлық өсімдіктерді *in vivo* өсіру жағдайлары мен *in vitro* өсіру жағдайлары арасындағы температуралық айырмашылықтар неғұрлым көп болса, HSP сигналы соғұрлым "қатал" болады. 25 °C – тан төмен температурада HSP пайда болмайды – стресске жауап беру үшін температура тым төмен. Осылайша, HSP синтезі микроспордың стресске реакциясы мен олардың *in vitro* андрогенезін бастау қабілетінің молекулалық белгісі бола алады [39].

2 Зерттеу материалдары мен әдістері

Донорлық өсімдіктерді өсіру бойынша ғылыми зерттеу тәжірибие жұмыстары Алматы қаласы, Қарасай ауданы, Алмалыбақ ауылында орналасқан АҚ «КазАгроИнновация» қарасты ЖШС «Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми зерттеу институты» тәжірибелік егіс алқабында жүргізілді. Зертханалық жұмыстар Алматы қаласы, Сәтпаев университеті технопарк корпусының Биотехнология зертханасында жүргізілді. Жұмыстың мақсаты – арпаның (*Hordeum vulgare* L.) сорттары мен будандарының *in vitro* оқшауланған микроспора культурасында андрогенез процессінің жүру жиілігіне әсер ететін факторларды зерттеу.

Осы мақсатқа жету үшін келесі міндеттер қойылды:

1. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) сорттары мен будандарының донорлық өсімдіктерін егіс алқабында өсіру;

2. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) сорттары мен будандарының сұрыптанып алынған донорлық өсімдіктерін төмен температурада өңдеу;

3. Аспетикалық жағдайда арпаның (*Hordeum vulgare* L.) сорттары мен будандарының микроспораларын *in vitro* жағдайында өсіру;



1-сурет. Ламинарлы бокста зерттеу жұмыстары.

2.1 Стерилизациялық жағдайларды қамтамасыз ету жолдары

Ламиналы – бокс стерилизациясы. Оқшауланған микроспоралады және тозаңдарды жақсы өсуі үшін негізгі шарттардың бірі стерилдікті сақтау. Жасанды қоректік ортада зиянды микроорганизімдер жақсы дамиды. Микроорганизімдер тіршілік ету нәтижесінде қоректік орта құрамы

өзгеруі мүмкін және оқшауланған тін мен жасушалар ,тозандар микроорганизмдерден тез зақымданады,яғни соған байланысты барлық тәжірбиелік жұмыстар стерилді жағдайда жүргізіледі. Ламинарлы боксты – ыдыстарды ,құрал жабдықтарды, өсімдік материалдарын және тағы басқа қажетті заттарды стерилдеу қажет. Ламинарлы боксты стерилде яғни өзінде орналасқан ауа айдайтын сүзгі арқылы жүзеге асады.жұмыс бастар алдында ламинарлы боксты ультракүлгін шамын жағу қажет.Ламинарлы бокстың ішін және спирт шамды ,лупаны ішінде қоректік орта бар пробиркаларды 70% спиртпен жақсылап сүрту керек. Ламинарлы бокста жұмыс бастар алдында спиртпен қолды сүрту қажет.

*Зерттеу объектісін стерилизациялау.*Өңдеу шартары қолданылатын объектілергі байланысты болып келеді .сабақтардың тамырлардың фрагменттерін ағынды суда шайылуы қажет. Екі пробирка қажет болады ,ең алдымен спиртке салып залалсыздандырамыз 70% спирт құйылған пробиркамен 1минқа қойып ластану дәрежесіне қарай . Спиртке салынғанан киін стерилденген сумен шайыу қажет. Біздің зерттеу объектіміз арпа микроспоралары мен тозандары болғандықтан стерилдеу жұмысы масақтарына жүргізіледі.Арпа масақтарын ламинарлы бокста спиртпен сүрту арқылы жүргізіледі [40].

Құрал жабдықтарды стерилизациялау.

Құрал жабдықтарға пинцеттерді инелерді скальпельдерді және тағы басқа құрал жабдықтарды стерилдеу .Стерилдеу жұмысы құрғақ кептіру шкафында жүргізіледі 140 температурада 2 саған қыздыр жүргізіледі. Металлд құрал жабдықтарды автоклавпен булау арқылы жүргізуге болмайды будың әсерінен металдар тот басады және өткір заттар өтікірлгін жоғалтады. Жұмыс жасау алдында ламинарлы бокста құрал жабдықтарды ілмектер скальпел пинцеттер және т.б құрал жабдықтарды 96% спирті стаканға салып спиртті шаммен қыздырып стерилдеу жүргізіледі. Стерилді құрал бір реттік манипуляция ғана қолданады . Өте жұқа құралдар күйдіру кезінде өз қасиетін жоғалтпайды, сондықтан оларды спиртке салып күйдіруге болады[41].

Қоректік ортаны стерилизациялау Пробиркаға құйылған қоректік ортаны жапқышпен жауып , 120 температурада және 1 атм қысым 20 мин автоклавқа салады[42].

2.2Оқшауланған тозандарды өсіруге қажетті қоректік орталар

Арпаның *Hordeum vulgare* L оқшауланған тозаңқаптары және микроспораларын *in vitro* өсіріп зерттеп зерттеу нысаны ретінде будандар мен сорттары қолданылған .

Кесте1. Арпаның *Hordeum vulgare* L оқшауланған тозаңқаптары мен микроспораларын *in vitro* өсіру үшін зерттеу нысаны ретінде қолданылғансорттары мен будандары

№	Генотип
	Сорттар
1	Сәуле
2	Арна
	Будандар
1	Гибрид 46/05 F ₃
2	Гибрид 20/05 F ₃
3	Гибрид 37/05F ₃
4	Гибрид 22/05F ₃
5	Гибрид 8/05 F ₃

Арпаның (*Hordeum vulgare L*) клетка ұлпасын және органдарында өсіруге әр түрлі гормоналды құрамы бар қоректік орталар қолданады. Оқшауланған жасуша мен ұлпаны өсіруге арнайы жасалған қоректік орта өсімдіктерге қажетті барлық макроэлементтерді, витаминдер және көмірсуларды, фитогормондарды қамтуы керек.

Сұйық қоректік орта дайындау жолдары:

1. 1 л қоректік ортаны дайындау 1 л дистильденген суды құйып, содан кейін 30 г сахарозаны салу керек.

2. Сахарозаны ерітіп, өзімізге қажетті көлемінде сұйықтықты ертінділерге (макротұздар, микро-тұздар, фитогормондарға витаминдер,) қосамыз. Ерітінді рН көрсеткішін 5,8-6,0- ге дейін көтереміз.

3. Тағыда бөлек, дистильденген суды 950 мл-ге жеткенше құйамыз.

4. Соңында дайын болған қоректік ортамызды 1 л колбаға немесе өлшеуіші бар цилиндрлі ыдысқа құйамыз.

5. Құйылған қоректік орта ауызын арнайы жапқышпен жауып, суығанан кейін автоклавқа саламыз.

Оқшауланған жасушаларды және ұлпалар өсіру кезінде қоректік ортаға көмірсулар қажетті компоненттердің бірі болып келеді. Өйткені олар автотрофты қоректендіруге қаблетсіз болып келеді. Біздің тәжірибемізде көмірсу көзі ретінде мальтоза мен сахароза әр түрлі концентрацияларда қолданады. Тозаң *in vitro* микроспора културасы үшін модификацияланған гамборга В5, МС, N6 негізгі қоректік орталарды пайдаланады.



2-сурет. Жаздық арпа үлгілері себілген егістік жер



3-сурет. Арамшөптерден тазартылған жаздық арпа егістік алқабы

Кесте2. Жұмыста қолданылған қоректік орталар құрамы

Компонентер	Құрамы мг/л	Қоректік орталар				
		MS	MSR	N6	N6+A.6+A.y	N6+A.
Макро элементтер	KNO_3	1900	1900	2830	2830	2830
	NH_4NO_3	1650	1650	-----	-----	-----
	$(NH_4)_2SO_4$	-----	-----	463	463	463
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	370	185	185	185
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	440	166	166	166
	KH_2PO_4	170	170	400	400	400

	MnSO ₄ H ₂ O	22,3	22,3	-----	-----	-----
Микро Элементтер	MnSO ₄ 4HO	-----	-----	4,4	4,4	4,4
	KJ	0,83	0,83	0,80	0,80	0,80
	H ₃ BO ₃	6,20	6,20	1,60	1,60	1,60
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,60	8,60	1,50	1,50	1,50
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,025	-----	-----	-----
	Na ₂ MoO ₄	0,25	0,25			
	FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
	2H ₂ O					
Fe-хелат	NaEDTA2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
Дәрумендер	Тиамин HCL	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
	Пиридоксин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Никотин қышқылы	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Аскорбин қышқылы	-----	-----	1,0	1,0	1,0
	Глицин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Амин қышқылдары	Гистидин	-----	-----	20,0	20,0	20,0
	Глутамин	-----	-----	200	200	200
	2,4Д	2,0	-----	2,0	2,0	2,0
Гормондар	ИУК	-----	0,5	-----	-----	-----
	Сахароза	2%	2%	9%	9%	9%
	мезоинозит	100	100	200	200	200
	агар	7000	7000	7000	7000	7000
pH 5.8-6.0						

3 Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

3.1 Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) тозаңдарының андроклинді құрылым түзу жиілігіне әр түрлі қоректік орта мен көмірсулардың әсері

Кесте3. Арпаның (*Hordeum vulgare* L) тозаңдардың андроклинді құрылым түзу жиілігіне Мурасиге –Скуг қоректік отасы

№	Генотип	Мурасиге –Скуг	
		сахароза	Мальтоза
1	Сәуле	2,61	7,22
2	Арна	2,87	5,55
3	Гибрид 46/05 F3	4,86	1,27
4	Гибрид 20/05 F3	3,86	2,94
5	Гибрид 37/05 F3	1,66	3,33

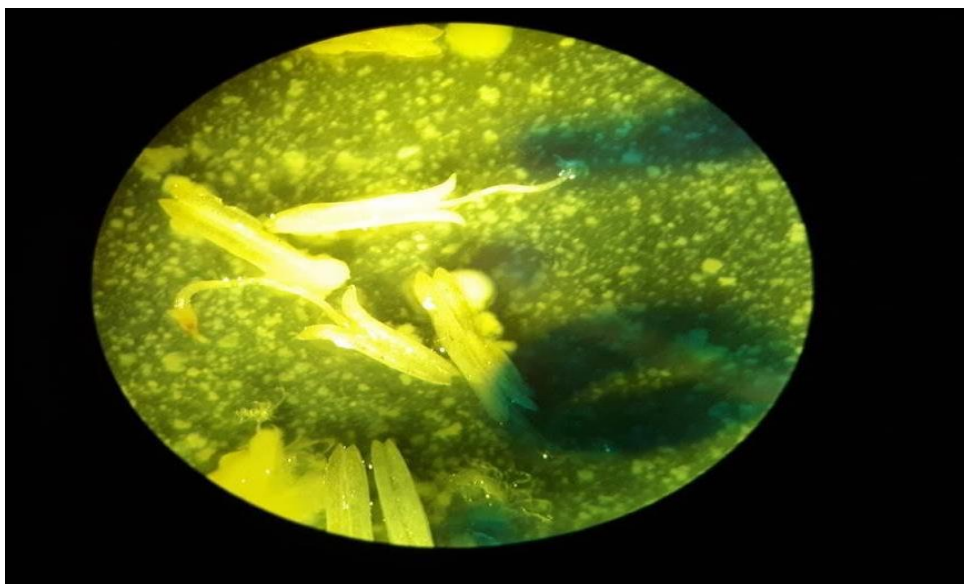
Сахароза қосылған Мурасиге –Скуг қоректік ортасында андроклиндік құрылым түзілу жиілігін гибрид 46/05 F3 және гибрид 20/05 F3 будандарында байқалды, және бұл көрсеткіш 4,86 және 3,86 пайызды құрады. Осы аталған будандарда андроклиндік құрылым түзілу жиілігі МС қоректік ортасында мальтоза қосылған кезде андроклиндік құрылымдардың көп мөлшерде түзілуі сәуле және арна сорттарында байқалған, және бұл көрсеткіш 7,22 және 5,55 пайызды құраған. Арна мен сәуле сорттарында андроклиндік құрылымдар түзу жиілігі МС қоректік ортасына сахароза қосылған кезде 2,87 және 2,61 пайызды құраған.

Кесте 4. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) тозаңдарының андроклинді құрылым түзу жиілігіне N6 қоректік ортасы мен көмірсулардың әсері

№	Генотип	N6	
		Сахароза	Мальтоза
1	Арна	4,54	5,55
2	Сәуле	3,05	2,22
3	Гибрид 46,05F3	5,41	3,33
4	Гибрид 20,05F3	0,27	0,27
5	Гибрид 37,05F3	1,66	1,66

N6 қоректік ортасында сахароза қосылғанда андроклиндік құрылымдардың түзілу жиілігі Гибрид 46/05 F3 буданы мен Арна сорттарында байқалып 5,41 және 4,54 пайыз құраған. N6 қоректік ортаға мальтоза қосқан кезде Арна сортының андроклиндік құрылым түзу жиілігі

біршама жоғары болып 5,55 пайызды құрады. Осы қоректік ортада Гибрид 46/05 F₃ буданының андроклиндік құрылым түзу жиілігі төмендеп 3,33 пайызды құрады .



4-сурет. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) тозаңдарын in vitro арқылы қоректік ортада андроклинді құрылым (глобулулар, эмбриондтар, морфогенді каллустар) түзуі.

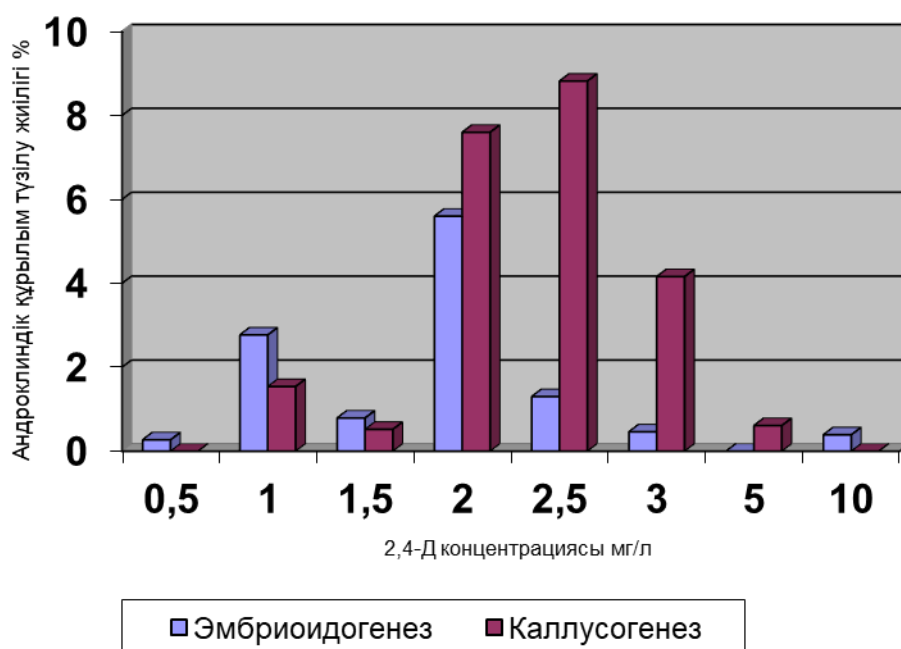
Кесте5. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) тозаңдарының андроклинді құрылым түзу жиілігіне Гамборг B₅ қоректік ортасы мен көмірсулардың әсері

№	Генотип	Гамборг	
		Сахароза	Мальтоза
1	Арна	2,96	3,33
2	Сәуле	0,55	1,94
3	Гибрид 46/05F ₃	1,38	0,55
4	Гибрид 20/05F ₃	2,77	3,61
5	Гибрид 37/05F ₃	2,22	3,41

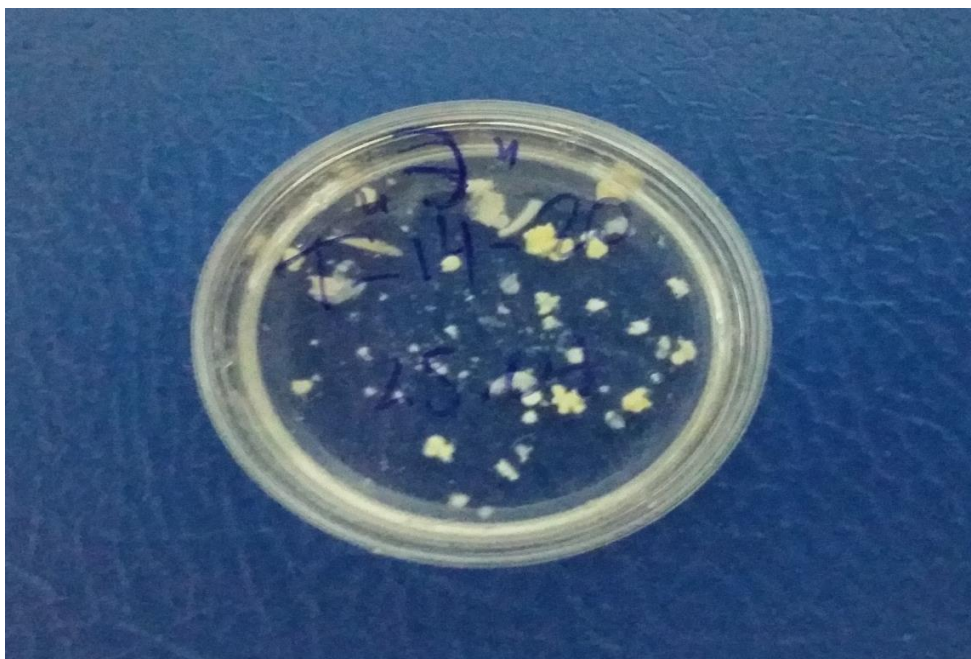
Гамборг B₅ қоректік ортаға сахароза қосқан кезде андроклинді құрылымдар түзілуі жоғары көрсеткіші Арна сорты мен Гибрид 20/05 F₃ буданында байқалып 2,96 және 2,77 пайыз құрады. Мальтоза қосылған Гамборг B₅ қоректік орталарында андроклиндік құрылым түзілуінің жоғары көрсеткіші Гибрид 20/05 F₃ және Гибрид 37/05 F₃ будандарында анықталып, 3,61 және 3,41 пайыз құрады.

Алынған нәтижелерді қорыта келе, МС, N6 және Гамборг B₅ қоректік ортасында көмірсулар көзі ретінде сахароза және мальтозаны қолданып

арпаның (*Hordeum vulgare* L.) сорттары мен будандарының in vitro оқшауланған тозаңқап және микроспора культурасында андроклинді құрылым түзілу жиілігін жоғарлатуға болатыны анықталды.



5-сурет. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) оқшауланған тозаңқап пен микроспора культурасында андроклинді құрылым түзу жиілігіне 2,4-Д концентрациясының әсері (Арна сорты).



6-сурет. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) оқшауланған тозаңқап және микрспора культурасында андроклиндік құрылым түзу жиілігіне 2,4-Д концентрациясының әсері (2 мг/л 2,4-Д).

Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) оқшауланған тозаңқап және микрспоракультурасында андроклиндік құрылым түзу жиілігіне 2,4-Д концентрациясының әсері (2 мг/л 2,4-эмбриодттар және морфогенді каллустар түзілу жиілігіне әсер ететіні байқалды. 2,4-Д концентрациясының әсері эмбриодттардың түзілу жиілігіне 2 мг/л болғанда 5,67 пайыз құрады. 2,4-Д фитогормонының концентрациясы жоғарлаған кезде эмбриодогенез процессінің тежеліп, керісінше каллусогенез процессінің жүруіне оңтайлы жағдай ұнайтыны байқалды. 2,4-Д концентрациясы 2,5 мг/л болған кезде каллустардың түзілу жиілігі 8,79 пайызды құрады.



7-сурет. Арпа *Hordeum vulgare* L. сорттары мен будандарының донорлық өсімдіктерінің микрспораларын in vitro жағдайында өсіру

Кесте 6. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) оқшауланған микрспора культурасында эмбриодогенез процессінің жиілігіне төмен температурамен (4-7 С) өңдеу ұзақтығының әсері

№	Генотип	Тозаңқаптар саны	Түзілген <<Э>> саны	%	4-7С Өңдеу ұзақтығы	Қоректік орта
1	Сәуле	176	4	2,27	1	N6
2	Сәуле	126	29	23,01	2	N6
3	Сәуле	126	42	33,3	3	N6
4	Сәуле	88	28	31,8	4	N6
5	Сәуле	88	1	1,13	5	N6
6	Гибрид 20/05F3	88	23	26,13	1	N6
7	Гибрид	234	8	3,41	2	N6

	20/05F3					
8	Гибрид 20/05F3	342	5	1,46	3	N6
9	Гибрид20/05F3	288	6	2,08	4	N6
10	Гибрид20/05F3	319	4	1,25	5	N6
11	Арна	234	7	2,99	1	N6
12	Арна	180	2	1,11	2	N6
13	Арна	66	1	0,66	3	N6
14	Арна	162	5	3,08	4	N6
15	Арна	198	0	0	5	N6

Донорлық өсімдік төменгі температурада әсер ететіні арпаның Гибрид 20/05 F₃ буданының микрспораларын *in vitro* жағдайында өсірген кезде де байқалды. Бұл будан эмбриондтары түзілу жиілігінің жоғары көрсеткіші донорлық өсімдіктерді бір күн өңдеген кездің өзінде байқалып 26,13 пайызды құрады. Бірақ бұл будан донорлық өсімді 5 күн ішінде төмен температурамен өңдеген кезінде төмен болатыны анықталды яғни бұл көрсеткіш 1,25 пайызды құраған. Арна сортының донорлық өсімдіктерін төмен температурамен өңдеген кезінде ең жоғары көрсеткіш 4 күндік тәжірбеде байқалып 3,08 пайызды құраған болатын. Сонымен қатар, төмен температурамен бір күн өңделген донорлық өсімдіктен алынған микрспоралардан түзілен эмбриондтар саны жоғары болып 2,99 пайызды болды.

ҚОРЫТЫНДЫ

Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) *in vitro* оқшауланған тозаңқап және микроспора культурасында МС, N6 және Гамбург В₅ қоректік ортасында көмірсулар көзі ретінде сахароза және мальтозаны қолданып андроклинді құрылым түзілу жиілігін жоғарлатуға болады. Арпаның (*Hordeum vulgare* L.) *in vitro* оқшауланған тозаңқап және микроспора культурасында андроклиндік құрылымдар түзілу жиілігіне 2,4-Д концентрациясы маңызды түрде әсер етеді. Каллусогенез процессінің жиілігі үшін 2,5 мг/л 2,4-Д концентрациясы қолайлы болып табылды. Эмбриодогенез процессінің жиілігінің жоғары көрсеткіші 2,4-Д концентрациясы 2 мг/л болған кезде байқалды. Зерттеу барысында, 2,4-Д концентрациясын өзгерте отырып андроклиндік құрылымдарының түзілу жиілігін, сонымен қатар морфогенез процессін эмбриодогенез және каллусогенез жолына ауысуын реттеуге жол ашатыны анықталды. Жүргізілген зерттеулер барысында, арпаның оқшауланған микроспора культурасында эмбриодттардың түзілу жиілігіне донорлық өсімдікті төмен температурамен (4-7 С) өңдеуді оң әсері бар екені анықталды. Сонымен қатар, донорлық өсімдікті төмен температурада өңдеген кезде эмбриодттардың түзілу жиілігіне төмен температурамен өңдеу ұзақтығы және донорлық өсімдіктің генотипінің әсері бар екені анықталды.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Ayliffe MA, Pallotta M, Langridge P, Pryor AJ (2007) A barley activation tagging system. *Plant Mol Biol* 64:329–347
- 2 Boutilier K, Fiers A, Liu C-M, van der Geest AHM (2005) Biochemical and molecular aspects of haploid embryogenesis. In: Palmer D, Keller W, Kasha KJ (eds) *Haploids in crop improvement II*. Springer, Heidelberg, pp 73–95
- 3 Castillo AM, Vallés MP, Cistué L (2000) Comparison of anther and isolated microspore culture in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* 113:1–8
- 4 Caredda S, Devaux P, Sangwan RS, Prout I, Clément C (2004) Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76:35–43
- 5 Carlson AR, Letarte J, Chen J, Kasha KJ (2001) Visual screening of microspore-derived trans-genic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green fluorescent protein (GFP). *Plant Cell Rep* 20:331–337
- 6 Chase SS (1969) Monoploid and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Bot Rev* 35:117–167
- 7 Wang M., Hoeekstra S., Bergen S., Lamers G.E.M., Oppedijk B.J., de Preister W., Schilperoori R.A. Apoptosis in developing anthers and role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol. Biol.* 1999;39:489-501.
- 8 Cheng M, Lowe BA, Spencer TM, Ye X, Armstrong CL (2004) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:31–45 [CrossRefGoogle Scholar](#)
- 9 Coe EH (1959) A maize line with high haploidy frequency. *Amer Nat* 93:381–382
- 10 Choo TM, Reinbergs E, Kasha KJ (1985) Use of haploids in barley breeding. *Plant Breed Rev* 3:219–252
- 11 Мишуткина Я.В., Нескородов Я.Б., Новокрещенова М.Г., Малахо С.Г., Тураев А.М. Удвоенные гаплоиды ячменя и их использование в генетико-селекционных исследованиях // *Современные проблемы науки и образования*. – 2013. – № 5.;
- 12 Weyen J. Barley and Wheat Doubled Haploids in Breeding. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Science + Business Media, 2009; 179-187.
- 13 Xie J.H., Gao M.W., Liang Z.O., Shu O.Y., Cheng X.Y. The effect of cool pretreatment on the isolated microspore culture and free amino acid change of anthers in Japonica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 1997;151:79-82. DOI 10.1016/S0176-1617(97)80040-5
- 14 Aionesei T., Touraev A., Heberle-Bors E. Pathways to Microspore Embryogenesis. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). *Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry)*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:11-34.

- 15 Arzany A., Darvey N.L. The effect of colchicine on triticale anther-derived plants: microspore pretreatment and haploid plant treatment using a hydroponic recovery system. *Euphytica*. 2001;122:235-241.
- 16 Babbar S.B., Kumari N., Mishra J.K. In vitro Androgenesis: Events Preceding its Cytological Manifestation. In: Shrivastava P.S., Narula A., Shrivastava Sh. (Eds.). *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. New Dehli, India: Anamya Publishers, 2004;1-17.
- 17 Barceló P., Cabrera A., Hagel C., Lörz H. Production of doubled haploid plants from tritordeum anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 1994;87:741-745.
- 18 Barnabás B., Pfahler P.L., Kovács G. Direct effect of colchicine on microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1991;81:675-678.
- 19 Pauls K.P., Chan J., Woronuk G., Schulze D., Brazolot J. When microspores decide to become embryos – cellular and molecular changes. *Can. J. Bot.* 2006;84:668-678.
- 20 Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod.* 2013; 26:181-196. DOI 10.1007/s00497-013-0226-7.
- 21 Sunderland N., Hu Z.H. Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.* 1982;136:1086-1095.
- 22 Telmer C.A., Newcomb W., Simmonds D.H. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division in vivo and in vitro. *Protoplasma*. 1993;172:154-165.
- 23 Tian Q.Q., Lu C.M., Li X., Fang X.W. Low temperature treatments of rice (*Oryza sativa* L.) anthers changes polysaccharide and protein composition of the anther walls and increases pollen fertility and callus induction. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015;120:89-98. DOI 10.1007/s11240-014-0582-5.
- 24 Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O., Heberle-Bors E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. *Sex Plant Rep.* 1996b; 9:209-215.
- 25 Touraev A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress a major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*. 1996a;200:144-153.
- 26 Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.* 1999;2(8):297-302.
- 27 Varnier A.L., Jacquard C., Clement C. Programmed Cell Death and Microspore Embryogenesis. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Science + Business Media, 2009;147-153.
- 28 Chen X-W, Cistue L, Muñoz-Amatriain M, Sanz M, Romagosa I, Castillo A-M Vallés M-P (2007) Genetic markers for doubled haploid response in barley. *Euphytica* 158:287–294

- 29 Wang M., Van Bergen S., Van Duijn B. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *PlantPhysiol.* 2000;124: 523-530.
- 30 Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Морфогенная микроспора как инициальная клетка андрогенеза *in vitro*: обзор проблемы. Научный результат. Физиология. 2017;3(1): 3-7. DOI 10.18413/2409-0298-2017-3-1-3-7.
- 31 Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica L.* Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014.
- 32 Aionesei T., Touraev A., Heberle-Bors E. Pathways to Microspore Embryogenesis. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). *Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry)*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:11-34.
- 33 Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O., Heberle-Bors E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum L.*) induced by starvation at high temperatures. *Sex Plant Rep.* 1996b; 9:209-215.
- 34 Scott R., Dagless E., Hodge R., Wyatt P., Soutlemi I., Draper J. Patterns of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 1991;17:195-207.
- 35 Heberle-Bors E., Reinert J. Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum L.* *Protoplasma.* 1981;109:249-255
- 36 Batygina T.B. Stem cells and morphogenetic developmental programs in plants. *Stem Cell. Res. J.* 2011;3(1-2):45-120.
- 37 Зоринянц С.В., Ташпулатов А., Heberle-Bors E., Touraev A. The Role of Stress in the Induction of Haploid Microspore Embryogenesis. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). *Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry)*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:35-51.
- 38 Zhao J.-P., Simmonds D.H., Newscomb W. Induction of embryogenesis with colchicines instead of heat in microspores of *Brassica napus L. cv. Topas*. *Planta.* 1996;198:433-439
- 39 Smykal P., Pechan P.M. Stress as assessed by the appearance of smHSPs transcripts, is required but not sufficient to initiate androgenesis. *Physiol. Plant.* 2000;110:135-143.
- 40 ВВ Анапийаев, КМ Исканова, ЕВ Бейсенбек, АВ Акхметова. Haploid biotechnology in the selection of *Triticum aestivum L.* *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019)*
- 41 АА Амандибаева, АК Даниярова, РА Алчимбаева, ВВ Анапийаев. Оценка коллекционных образцов сои по анатомо-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам засухоустойчивости. *Вестник КазНУ. Серия биологическая* 78 (1), 88-98
- 42 ВВ Анапийаев, ЕВ Бейсенбек. HAPLOID BIOTECHNOLOGY OF WHEAT: PRACTICAL RESULTS. Novosibirsk, Russia June 17-21, 2015

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы

«5B070100 – Биотехнология» мамандығы

4-курс студенті Хасен Қажымұханның тақырыбындағы дипломдық жұмысына

ШКІР

Дипломдық жұмыста :Арпаның гаплоидтық биотехнология тақырыбында зерттеу жүргізілген.

Студент Хасен Қажымұхан арпаның сорттары мен будандарының микроспораларын *in vitro* оқшауланған микроспора културасында андрогенез процесінің жүру жиілігіне әсер ететін факторларды зерттеу жұмыстарын жүргізе отырып әдістерді толық менгерді.

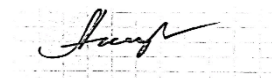
Дипломдық жұмыста бүкіл мәселелер қарастырылған және , жұмыс толық деп есептеймін.

Жұмыстың айрықша оң аспектілері: Студент өзіне берілген тақырыбына сәйкес көптеген теориялық мәліметтерді ізденіп, тауып, оларды жүйелі түрде дипломдық жұмысқа еңгізген. Ол өзінің негізгі бағыттарын дұрыс көрсетті.

Жұмысты нормабақылау қағидаларын сақтай отырып, логикалық тұрғыдан дұрыс жасады.

Ғылыми –зерттеу нәтижесінде барлық міндеттер орындалып мақсаттарға қол жеткізілді .Студент қорғауға жіберіледі және жоғары деген бағаға лайықты.

Ғылыми жетекші б.ғ.д. профессор
Анапияев



Б.Б.

«30» мамыр 2021 жыл



Metadata

Title

Арпаның гаплоидтық биотехнологиясы

Author(s)

Хасен Қожымұхан Қамарұлы

Principle

Бақытжан Анапияев

Organizational unit

ИХИБТ

List of possible text manipulation attempts

In this section, you can find information regarding text modifications that may aim at temper with the analysis results. Invisible to the person evaluating the content of the document on a printout or in a file, they influence the phrases compared during text analysis (by causing intended misspellings) to conceal borrowings as well as to falsify values in the Similarity Report. It should be assessed whether the modifications are intentional or not.

Characters from another alphabet		8
Spreads		0
Micro spaces		4
White characters		0
Paraphrases (SmartMarks)		6

Record of similarities

Please note that high coefficient values do not automatically mean plagiarism. The report must be analyzed by an authorized person.

**25**

The phrase length for the SC 2

**12887**

Length in words

**62379**

Length in characters

Active lists of similarities

Scroll the list and analyze especially the fragments that exceed the SC 2 (marked in bold). Use the link "Mark fragment" and see if they are short phrases scattered in the document (coincidental similarities), numerous short phrases near each other (mosaic plagiarism) or extensive fragments without indicating the source (direct plagiarism).

The 10 longest fragments

Color of the text

NO	TITLE OR SOURCE URL (DATABASE)	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
1	Оқшауланған арпа микроспора культурасы (Hordeum Vulgare L) Анарбек Нағима Жүрсінқызы 4(22)2019 Satbayev University (ИХИБТ)	12	0.09 %
2	Оқшауланған арпа микроспора культурасы (Hordeum Vulgare L) Анарбек Нағима Жүрсінқызы 4(22)2019 Satbayev University (ИХИБТ)	11	0.09 %
3	Оқшауланған арпа микроспора культурасы (Hordeum Vulgare L) Анарбек Нағима Жүрсінқызы 4(22)2019 Satbayev University (ИХИБТ)	11	0.09 %

4	Оқшауланған арпа микроспора культурасы (<i>Hordeum Vulgare</i> L.) Анарбаев Нағима Жүрсінқызы 4/22/2019 Saiyayev University (ИХИБТ)	11	0.09 %
5	Бұдайдың галлоидты биотехнологиясы Бекпегенова Р.Ж 5/3/2018 Saiyayev University (ИХИБТ)	9	0.07 %
6	« <i>Hordeum vulgare</i> L. дақылның галлоидты биотехнологиясы» Әміре Асқат Болағұлы 6/22/2020 Kazakh National Agrarian University (KazNAU)	9	0.07 %
7	Бұдайдың галлоидты биотехнологиясы Бекпегенова Р.Ж 5/3/2018 Saiyayev University (ИХИБТ)	6	0.05 %
8	« <i>Hordeum vulgare</i> L. дақылның галлоидты биотехнологиясы» Әміре Асқат Болағұлы 6/22/2020 Kazakh National Agrarian University (KazNAU)	5	0.04 %

from RefBooks database (0.00 %)

NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
----	-------	---------------------------------------	--

from the home database (0.47 %)

NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
1	Оқшауланған арпа микроспора культурасы (<i>Hordeum Vulgare</i> L.) Анарбаев Нағима Жүрсінқызы 4/22/2019 Saiyayev University (ИХИБТ)	45 (4)	0.35 %
2	Бұдайдың галлоидты биотехнологиясы Бекпегенова Р.Ж 5/3/2018 Saiyayev University (ИХИБТ)	15 (2)	0.12 %

from the Database Exchange Program (0.11 %)

NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
1	« <i>Hordeum vulgare</i> L. дақылның галлоидты биотехнологиясы» Әміре Асқат Болағұлы 6/22/2020 Kazakh National Agrarian University (KazNAU)	14 (2)	0.11 %

from the Internet (0.00 %)

NO	SOURCE URL	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
----	------------	---------------------------------------	--

List of accepted fragments (no accepted fragments)

NO	CONTENTS	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)	
----	----------	---------------------------------------	--