

АНДАТПА

Дәулет Нұржанның 8D08104 - «Өсімдік қорғау және карантин» білім беру бағдарламасы бойынша философия докторы (pHd) дәрежесін алуға ұсынған «Молекулалық маркерлерді қолдана отырып, алманың перспективалы сорттарын *Erwinia amylovora* (бактериялық күйік қоздырғышы) ауруына төзімдігін скринингтен өткізу» тақырыбында орындалған диссертациялық жұмысына

Зерттеу тақырыбының өзектілігі.

Жемістер сапалы, ұтымды тамақтанудың маңызды және ажырамас бөлігі болып табылады, адамның денсаулығы мен ұзақ өмір сүруін қамтамасыз етеді. Қазақстанда, әлемнің көптеген елдеріндегідей, жеміс дақылдарының ішіндегі ең маңыздысы алма ағашы болып табылады. Ол жеміс өндірісін арттыруда көшбасшы.

Қазақстан Республикасы Статистика агенттігінің 2022 жылғы деректері бойынша шекілдеуік және сүйекті жеміс дақылдарының 47,18 мың гектар көлеміндегі бақтарының 35,73 мың гектарын алма бақтары алып жатыр, бұл жалпы көлемнің 76% құрайды (<https://stat.gov.kz/official/industry/14/statistic/7>). Қазақстан Республикасында пайдалануға рұқсат етілген Селекциялық жетістіктердің мемлекеттік тізіліміне 2023 жылға алма ағашының әр түрлі пісетін мерзімдегі 73 сорты енгізілді, оның 29%-ы Қазақ жеміс және жүзім шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтында шығарылған жергілікті селекция сорттары және 38% сорттардың оригинаторы тіркелмеген.

Жеміс дақылдарының аса қауіпті ауруларының бірі бактериялық күйік және Қазақстан үшін ол карантиндік объект болып табылады. Ауру бактериядан туындаған *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al және әдеби дереккөздерге сүйенсек, *Rosaceae* тұқымдасының жеміс және ағаш-бұта түрлерінің 180-нен астам түрлеріне зақым келтіреді. Бактериялық күйік негізінен алма ағашын (*Malus domestica*) және алмұртты (*Pyrus communis*) зақымдайды. Ауру алма ағашының барлық мүшелерін зақымдайды: гүлдер, гүлдейтін бүршіктер, жемістер, жапырақтар, бұтақтар, діңнің қабығы.

Қазақстанда бактериялық күйіктің жеміс ағаштарын алғашқы зақымдауы 2008 жылы байқалды, ал 2010 жылға қарай ол Республиканың алма және алмұрт бақтарына айтарлықтай зиян келтіре бастады. Зияндылық дәрежесі бойынша бактериялық күйік жеміс дақылдарының белгілі аурулары арасында тең емес. Ауру өнімділіктің үлкен шығынын және ағаштардың жойылуын тудырады.

Қалыптасқан жағдайда Қазақстан аумағында бактериялық күйіктің одан әрі таралуын болдырмау үшін ауруға төзімді жеміс ағаштарының сорттарын өсіру өте маңызды болып табылады. Алайда, бүгінгі таңда Қазақстанда өсірілетін отандық және шет елдік алма сорттарының бактериялық күйікке төзімділігі туралы мәліметтер өте үзінді болып табылады, бұл олардың залалдану қаупі жоғары аймақтардағы өнеркәсіптік және жеке бақшаларға қолайлы сорттарды ұсынуға мүмкіндік бермейді.

Қазіргі уақытта ауруға төзімді жеміс дақылдарының сорттарын таңдау ерекше проблема болып табылады. Әлемдік селекцияда жеміс дақылдарының жоғары сапалы патогенге төзімді сорттары мен телітушілерін шығаруға баса назар аударылады. Жеміс дақылдарының сорттарының ауруға төзімділігі олардың құндылығын анықтайтын маңызды көрсеткіш болып табылады. Өсімдіктердің ең зиянды ауруларға төзімді сорттарды таңдау әрқашан басты міндеттерінің бірі болып қала береді. Сондықтан патогендерге генетикалық анықталған төзімділікті бағалаудың оңтайлы әдістері әрдайым сұранысқа ие болады. Селекциялық процесті күшейту қажеттілігіне байланысты генетикалық анықталған төзімділігін бағалаудың оңтайлы әдістері әрдайым сұранысқа ие болады.

Генетикалық-селекциялық зерттеулердің дамуындағы жетістіктер ақпараттық генетикалық маркерлердің болуына байланысты. Осы уақытқа дейін Қазақстанда жеміс өсіру бойынша селекциялық бағдарламаларда генетикалық маркерлер ретінде негізінен морфологиялық (фенотиптік) белгілер пайдаланылады. Алайда, осы типтегі енгізілген маркерлердің саны шектеулі. Сонымен қатар, морфологиялық белгілер мұрагерліктің күрделі сипатына ие болуы мүмкін және көбінесе сыртқы орта жағдайларына байланысты. Бұл алма ағашының өсірілетін және перспективалы сорттары мен телітушілерінің молекулалық-генетикалық әртүрлілігін бағалау, сондай-ақ жаңа гермоплазма ресурстарын іздеу қажеттілігін көрсетеді. Осыған байланысты ДНҚ-маркерлік талдауды қолдана отырып, алма ағашының бактериялық күйік қоздырғышына генетикалық төзімді сорттары мен телітінділерін анықтау және селекциялық процесті жетілдіру, екпелердің өнімділігін арттыру үшін ұсынымдар әзірлеуді талап етеді. Бұл қазақстандық жеміс шаруашылығын қазіргі заманғы деңгейге көшіруге мүмкіндік береді.

Әр түрлі елдерде жүргізілген көптеген зерттеулерге қарамастан, жеміс дақылдарының сорттарының бактериялық күйікке төзімділігінің бірқатар мәселелері жеткілікті зерттелген жоқ. Ауруларға төзімділіктің жоғарылауы ауылшаруашылық өсімдіктерінің, соның ішінде жемістердің қазіргі заманғы алуан түріне қойылатын маңызды талаптардың бірі болып табылады. Сондықтан патогендерге генетикалық анықталған төзімділікті бағалаудың оңтайлы әдістері әрдайым сұранысқа ие болады.

Қазіргі уақытта ең зиянды ауруларға, атап айтқанда бактериялық күйікке генетикалық төзімділігі бар жеміс дақылдарының сорттарын құру басым міндет болып табылады. Мұндай сорттарды өсіру пестицидтік жүктемені, энергия шығынын азайтуға, экологиялық жағдайды жақсартуға және жаңа тұтыну мен тамақ өнімдерін, оның ішінде органикалық өндіріс негізінде экологиялық қауіпсіз өнім алуға мүмкіндік береді.

Зерттелетін мәселені шешу тек Қазақстанда ғана емес, әлемнің бірқатар елдерінде де өзекті болып табылады. Нәтижелер жеміс дақылдарының селекциялық процесін күшейту үшін ДНҚ маркерлеріне негізделген заманауи молекулалық-генетикалық әдістерді пайдалана отырып, алма сорттары мен телітушілерінің бактериялық күйік қоздырғышына төзімділігін кодтайтын гендерді анықтауға мүмкіндік береді.

Диссертациялық зерттеудің мақсаты.

Молекулалық маркерлерін қолдана отырып, алма ағашының зиянды ауруға - бактериялық күйікке генетикалық төзімді сорттары мен телітушілерін анықтау негізінде жемістердің тұрақты өндірісін қамтамасыз ету және селекциялық жұмыстар үшін ұсынымдар әзірлеу.

Зерттеу міндеттері.

1. Бау-бақшаның негізгі өнеркәсіптік аймағында (Қазақстанның оңтүстік және оңтүстік-шығысы) алма ағаштарының отандық және шет елдік сорттарының және телітушілерінің бактериялық күйікке скринингі.

2. Алма ағашының отандық және шет елдік сорттарында микробиологиялық және молекулалық биологиялық әдістермен бактериялық күйіктің қоздырғышын анықтау.

3. Молекулалық маркерлерін қолдана отырып, бактериялық күйік қоздырғышына алма ағашының генетикалық төзімді сорттарын анықтау.

4. Молекулалық маркерлерін қолдана отырып, алма телітушілерінің бактериялық күйік қоздырғышына (*Erwinia amylovora*) генетикалық төзімділігін бағалау.

Зерттеу әдістері.

Бактериялық күйікті уақтылы анықтау үшін жеміс ағаштарының бактериялық күйік қоздырғышын анықтау және сәйкестендіру әдістемесі бойынша вегетациялық кезеңде Қазақстанның оңтүстігі мен оңтүстік-шығысындағы алма ағаштарына тұрақты тексеру жүргізілді.

SNP генотиптеу

Жалпы ДНҚ силикагельді мембрана арқылы оқшауланған және TE буферінде қайта суспензияланған (10 mM Трис; 0,1 mM ЭДТА). Сандық бағалаудан кейін ДНҚ концентрациясы наноспектрофотометрдің көмегімен анықталды. ПТР үшін 20 нг/мкл-де қалыпқа келтірілді. Молекулалық диагностикасы *Erwinia amylovora* тудырған бактериялық күйік токсинге төзімділік гендердің тасымалдаушыларын анықтауға арналған маркерлер әзірленген сандық белгілер локустары (QTLs) 10 молекулалық маркер арқылы анықталды: FBE-1_Y320, FBE-2_Y192, FBE-2_Y495, FBE-2_Y551, FB-MR5-NZsnEH034548_K35, FB-MR5-nzsneh034548_r240, FB-mr5-nzsneh034548_r249, fb-MR5-rp16k15_M106, RLP1a, RLP1B FBE, MR5 және RLP1 гендерінде (Chagné et al). Барлық 10 маркерлер шынайы SNPs болды, олар бұрын тікелей секвенирленген технологиясымен сәтті бағаланды (Jansch et al., Gardiner et al.). Барлық 10 жұп Taqman® d праймерлері мен зондтары Custom Taqman® Assay Design Tool (Chagné et al.)

Нәтижелер Quantstudio® design and Analysis және Taqman® Genotyper (Thermo Fisher Scientific) бағдарламалық жасақтамасының көмегімен талданды. Талдаулар қайта жасалғандықтан, әрбір генотиптеу нәтижесі нақты уақыттағы іздеуді және флуоресценцияның соңғы нүктесін көру арқылы қолмен тексерілді. Қолмен жасалған кез келген өзгерістер Taqman® Genotyper software көмегімен сақталды және әрбір жеке үлгі үшін генотип матрицасы ретінде экспортталды.

SCAR-маркердің амплификациясы

Бұл жұмыста бактериялық күйікке төзімділігімен байланысты AE10-375 және GE-8019 екі маркерлері қолданылды (Khan et al., 2007). Әрбір ДНҚ үлгісі үшін 60 нг күшейтілді, ДНҚ құрамында 25 мкл реакция қоспасында 1× Taq буфер (750 мкм Трис HCl, рН 8,8, 200 мкм (NH₄)₂SO₄, 20-дан 0,1%), 2,5 мкм MgCl₂, 0,2 мкм dNTP, сәйкесінше әрқайсысының 0,2 мкм праймерлер және 1 бірлік Tag (Thermo Scientific, АҚШ) полимеразасы бар. Амплификация нәтижелері TAE буферіндегі 1,5% агарозды гель электрофорезі арқылы талданды.

Қорғауға шығарылған негізгі қағидалар

- Қазақстанның оңтүстігі мен оңтүстік-шығысындағы алма ағаштарының екпелерін мониторингтік тексеру нәтижесінде зерттелген алма сорттары мен телітушілерінде бактериялық күйіктің таралуы мен дамуы анықталды.
- Ғылыми зерттеу барысында микробиологиялық және молекулалық биологиялық әдістерді қолдана отырып, алма ағашының отандық және шет елдік сорттарында бактериялық күйіктің қоздырғышы анықталды.
- Қорғауға жаңа және жаңашылдық элементтері бар алма ағашының сорттары мен телітушілерінің генетикалық шығу тегі мен климаттық жағдайларын ескере отырып, бактериялық күйікке төзімділігі жөніндегі негізгі идеялар шығарылды.

- Селекциялық процесті жетілдіруге және жемістердің өнімділігін арттыруға мүмкіндік беретін практикалық бау-бақша шаруашылығына бактериялық күйікке төзімді алма сорттары мен телітушілерін енгізудің орындылығы анықталды.

Зерттеудің негізгі нәтижелерінің сипаттамасы.

Зерттеу нәтижесінде негізгі өнеркәсіптік бау-бақша аймағының зерттелген алма сорттарында бактериялық күйік қоздырғышы, аурудың таралуы мен дамуы анықталды. Аурудың көрінісінде белгілі бір аймақтық дамуының ерекшелігі байқалды. Жарық микроскопын қолданып, микроскопиялау арқылы таза себіндіден алынған бактериялық колонияның суреттері морфологиясы бойынша *Erwinia amylovora* бактериясына ұқсас екендігі расталды. Кох постулаттарын сақтау және бактериялардың патогенділігін растау үшін алма ағашының піспеген жемістерінде Уайт әдісімен тексеру бактериялық күйіктің қоздырғышы *Erwinia amylovora* бактериясының болуын көрсетеді..

Алма сорттарында геномдық ДНҚ негізіндегі ПТР арқылы бактериялық күйік қоздырғышын молекулалық анықтау нәтижесінде *Erwinia amylovora* фитопатогенді бактериялары анықталды.

10 SNP маркері бойынша 59 алма сортының генотиптеу нәтижелері 10 маркердің 10-ы полиморфты екенін және бактериялық күйікке сезімтал фенотиптерді сәтті ажыратқанын көрсетті.

AE-375 және GE-8019 SCAR маркерлерін қолданып зерттелген 59 алма сорттарының ішінде Самурет, Хани Крисп, Пинова, Ред Топаз алма сорттары бактериялық күйікке төзімді деп танылды және оларды селекциялық бағдарламаларда төзімділік көзі ретінде пайдалануға болады.

Шетелдік және жергілікті телітушілерінің бактериялық күйікке генетикалық төзімділігін бағалау Женева 41, Женева 16 және 62-396 алма телітушілерінің Қазақстанның оңтүстік өңірі жағдайында өсірілген басқа 11 телітушілерінің арасында бактериялық күйікке төзімді екенін көрсетті.

Бактериялық күйікке төзімділігі жоғары алма ағаштарының ең жақсы сорттары мен телітушілері бөлініп, өсіруге ұсынылады. Селекциялық процесті жетілдіру және екпелердің өнімділігін арттыру үшін ұсыныстар әзірленді.

Алынған нәтижелердің жаңалығы мен маңыздылығының негіздемесі.

Қазақстанда алғаш рет ең тиімді SNP-маркерлерді пайдалана отырып, бактериялық күйік қоздырғышына алма ағашының генетикалық тұрғыдан орнықты перспективалы сорттары анықталды. Қазақстанның негізгі жеміс аймақтарында алғаш рет молекулярлық-генетикалық сәйкестендіру нәтижесінде бактериялық күйік қоздырғышына төзімді перспективалы алма телітушілері анықталды.

Талдау нәтижелері бойынша алынған деректер негізінде селекциялық процесті жетілдіру және жоғары сапалы жемістер өндіру үшін бактериялық күйікке төзімді алма сорттары мен телітушілерін қолдану бойынша ұсынымдар әзірленді.

Ғылымның даму бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестілігі.

Диссертациялық жұмыс "Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті" КеАҚ-да 217 "Ғылымды дамыту" бюджеттік бағдарламасы, 102 "Ғылыми зерттеулерді гранттық қаржыландыру" кіші бағдарламасы бойынша, ЖРН АР09259636 "SNP – маркерлерді пайдалана отырып, алма ағашының перспективалы сорттары мен телітінділерінің қауіпті ауруға - бактериялық күйікке генетикалық төзімділігін зерттеу" тақырыбы бойынша орындалды.

Докторанттың әрбір жарияланымды дайындауға қосқан үлесінің сипаттамасы

Ғылыми зерттеу жұмысының қорытынды мәліметтері бойынша барлығы 8 ғылыми еңбек баспада жарияланды, оның ішінде ҚР ҒЖЖБМ білім және ғылым саласындағы бақылау комитеті ұсынған ғылыми журналдарда – 2 мақала; Халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференциялар материалдарында – 2 мақала; Scopus деректер базасына енгізілген процентиль көрсеткіші 74 және 79 болатын журналда – 2 мақала, оның ішінде 2 мақала да Web of Science және Scopus базаларында Q1 квантильіне кіретін журналда; 1 өндіріске ұсыныс жарияланды және «Алма ағашының телітіндесінде бактериялық күйікке қарсы төзімділікпен байланысты SNP маркерлерін анықтауға арналған синтетикалық олигонуклеотидтер жиынтығы» атты пайдалы модельге патент алынды №7973 21.04.2023 ж.

Диссертацияның көлемі мен құрылымы

Диссертацияның жалпы көлемі - 110 бет, кіріспеден, 3 тарауға жіктелген негізгі бөлімнен, қорытындыдан, өндіріске ұсыныстан және қосымшадан тұрады. Онда 13 кесте және 19 сурет бар. Пайдаланылған әдебиеттер тізімі - 247, оның ішінде 232 - шет ел басылымдары.