

Хасейн Алтынның
8D08104 – «Өсімдік қорғау және карантин» білім беру бағдарламасы
бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алуға ұсынған «Жүзім
сорттарын *in vitro* әдістері негізінде сауықтыру және өсіру технологиясы»
тақырыбында орындалған диссертациялық жұмысына

АНДАТПА

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Жүзімнің вирустық инфекциялары жүзім шаруашылығының дамуына кедергі жасайтын негізгі факторлардың бірі болып табылады, себебі олар отырғызылған көшеттердің өнімділігін төмендетіп, жеміс сапасының нашарлауына және өсімдіктердің өмір сүру мерзімінің қысқаруына әкеледі. Вирустық аурулардың ерекше қауіпті болуы жүзімнің негізінен вегетативті жолмен көбеюіне байланысты, бұл жағдайда вирустық патогендер өсімдік материалында сақталып, жиналып тұрады, сондай-ақ залалданған көшеттер мен аналық өсімдіктерді қолданғанда таралады.

Тарихқа көз жүгіртер болсақ, Қазақстан Республикасында жүзім шаруашылығы жақсы дамыған өндірістік базаға ие болған еді. Алайда, кейінгі жылдары жүзім шаруашылығы егістік алқаптарының азаюымен және мамандандырылған питомник жүйесінің әлсіреуімен сипатталады. Қазіргі уақытта жаңа жүзімдіктерді құруға және өнім түрлерін жаңартуға деген қызығушылық қайта жанданды, бұл дегеніміз саланы фитосанитариялық талаптарға сай, жоғары сапалы отырғызу материалымен қамтамасыз етудің тұрақты жүйесін әзірлеуді талап етеді.

Қазақстанда бұл саланың дамуын шектейтін тағы бір фактор жоғары сапалы вирустық жүктемесі төмендетілген көшеттердің жетіспеушілігі, нәтижесінде көшеттер шетелден, негізінен Еуропалық Одақ елдерінен, Ресейден және Қытайдан әкелінеді. Импортталатын азық-түлік өнімдерінің ішінде ең үлкен үлесті жемістер, жүзім және оларды қайта өңдеу өнімдерінің импорты алады, олардың көлемі соңғы бес жылда орта есеппен 900 мың тоннадан асады. Әкелінетін жеміс-жидек дақылдарының сорттары біздің топырақ-климаттық жағдайларға бейімделмеген, сонымен қатар елге әртүрлі аурулармен зақымданған көшеттер де әкелінуде. Қазіргі уақытта фитопатогендік вирустар мен бактериялардың 600-ден астам түрі анықталған, әрі олардың жаңа түрлері пайда болуда. Мәселен, елге көшеттермен бірге бактериалды күйік ауруы әкелінді. Бұл ауру Қазақстанда алғаш тіркелген сәттен бастап 7 жыл ішінде жеміс дақылдарының зақымдану аумағы 40 есеге кеңейді. Мұндай жағдайдың негізгі себебі - елде көшет өсіруге арналған питомниктік шаруашылықтың болмауы.

Өсімдік тіндері мен жасушаларын өсіру әдістеріне негізделген заманауи биотехнологиялық тәсілдер коммерциялық құнды сорттарды сауықтыру және жеделдетіп көбейту үшін тиімді шешімдер ұсынады. Ең тиімді тәсілдерге апикальды меристемалардан регенеранттар алу, *in vitro* термо- және химиотерапияны қолдану, сондай-ақ сауықтырылған өсімдіктерді микроклонды көбейту, содан кейін олардың фитосанитариялық жағдайын серологиялық және молекулалық әдістерді қолдана отырып бақылау жатады. Осындай

технологияларды енгізу стандартталған вируссыз отырғызу материалын алуға мүмкіндік береді және өндірістік масштабта көшеттерді отырғызу кезінде вирус патогендерінің таралу қаупін азайтады.

Осыған байланысты өзекті міндет - өсімдіктердің фитосанитарлық жағдайын молекулалық әдістермен тексеру, табылған вирустардың елімізге ену жолдарын анықтау, *in vitro* әдістерімен сауықтыру, микроклоналды көбею және микроөсімдіктерді *ex vitro* жағдайға бейімдеу бойынша хаттаманы оңтайландыру, бұл тіршілікке қабілетті, вируссыз көшеттерді алуға мүмкіндік береді және отандық жүзім питомниктерін қалпына келтіру мен дамыту үшін негіз құрайды.

Диссертациялық зерттеудің мақсаты – зерттеуге алынған жүзім сорттарының фитосанитарлық жағдайын молекулалық әдістер арқылы бағалау, табылған вирустардың елімізге ену жолдарын анықтау, өсімдіктерді *in vitro* әдістері негізінде сауықтыру, *in vitro* культурасына енгізу, микроклоналды көбейту және микроөсімдіктерді *ex vitro* жағдайына бейімдеу хаттамаларын оңтайландыру арқылы тіршілікке қабілетті, сауықтырылған жүзім көшеттерін алу.

Зерттеудің міндеттері:

- зерттелетін жүзім сорттарының бастапқы өсімдіктерінде вирус инфекцияларының бар-жоғын ИФТ (ELISA) және ПТР әдісімен тексеру.

- Қазақстан аумағына патогендердің ену жолдарын анықтау және генетикалық әртүрлілікті бағалау мақсатында жүзімнің негізгі вирустарына филогенетикалық талдау жүргізу.

- *in vitro* тәсілдеріне негізделген жүзімді вирустардан сауықтыру әдістерінің тиімділігін салыстыру: апикалды меристема культурасы, термотерапия, химиотерапия («Кагоцел» препараты, салицил қышқылы), сонымен қатар олардың комбинацияларын (мына көрсеткіштер бойынша: тірі регенеранттардың шығымы және вируссыз өсімдіктердің үлесі) зерттеу.

- вирустық жүктемесі төмендетілген регенеранттардың фитосанитарлық жағдайын ИФТ және ПТР әдісімен растау және әрі қарай көбейту үшін вирустық жүктемесі төмендетілген материалды жинақтап алу.

- зерттелетін сорттар үшін бастапқы регенеранттарды алу мақсатында *in vitro* жағдайына енгізу хаттамасын оңтайландыру (стерильдеу, инициация, өсіру жағдайлары).

- вирустық жүктемесі төмендетілген өсімдіктердің микроклоналды көбею хаттамаларын фитогормондардың (гиббереллиндер, цитокининдер) түрі мен концентрацияларын тандай отырып оңтайландыру, максималды көбею коэффициентін және қалыпты морфогенезді қамтамасыз ететін режимдерді анықтау.

- жүзім микроөсімдіктерінің *ex vitro* жағдайына бейімделу схемасын бағалау және жабық топырақ жағдайында тіршілікке қабілеті жоғары, физиологиялық тұрғыдан толыққанды жетілген өсімдіктердің өсуін қамтамасыз ететін жағдайларды анықтау.

Зерттеу әдістері. Зерттеу жұмысында жасуша мен тіндерді өсіру әдісі, өсімдіктерді *in vitro* микроклондау және апикальды меристема өсіру

(меристемалық культура), термотерапия, химиотерапия және молекулалық биология әдістері қолданылды.

Қорғауға ұсынылған негізгі ережелер (дәлелденген ғылыми гипотезалар және жаңа білім болып табылатын басқа да тұжырымдар)

Бастапқы жүзім өсімдіктерінің вирустық жүктемесі (залалданғандығы) экономикалық маңызды негізгі вирустарға молекулалық биология әдістерімен бағаланды.

Қазақстан аумағына патогендердің ену жолдарын анықтау және генетикалық әртүрлілікті бағалау мақсатында жүзімнің негізгі вирустарына филогенетикалық талдау жүргізілді.

Жүзімді *in vitro* сауықтырудың кешенді әдістерінің салыстырмалы тиімділігі (апикалды меристемалық культурасы, термотерапия, химиотерапия және олардың комбинациялары) тіршілікке қабілетті регенеранттар алу және вирустық жүктемені азайту көрсеткіштері ИФА және ПТР арқылы расталып, эксперименттік тұрғыда анықталды.

Жүзім өсімдіктерін микроклондық көбейтуге жарамды бастапқы регенеранттарды тұрақты алуға мүмкіндік беретін *in vitro* жағдайына енгізу және регенерациялау хаттамалары оңтайландырылды.

Өсімдіктерді вирустық жүктемесі төмендетілгеннен кейін микроклоналды көбею хаттамалары фитогормондардың (гиббереллиндер, цитокининдер) үйлесімдері мен концентрацияларын таңдау негізінде оңтайландырылды, бұл көбею коэффициентін арттыруға және морфогенездің тұрақтылығын қамтамасыз етуге мүмкіндік береді.

Жабық топырақ жағдайында физиологиялық тұрғыдан толыққанды жетілген және тіршілікке қабілеті жоғары өсімдіктердің өсуіне мүмкіндік беретін жүзімнің микроөсімдіктерін *ex vitro* жағдайына бейімдеу әдістері оңтайландырылды және негізделді.

Зерттеудің негізгі нәтижелерінің сипаттамасы.

Зерттеу барысында әртүрлі өңірлерде өсірілген жүзімнің бастапқы өсімдіктерінің вирустық жүктемесі иммуноферменттік талдау (ИФТ), полимеразды тізбекті реакциясы (ПТР) әдісі арқылы бағаланды. Жүзімнің бастапқы өсімдік материалында вирустық патогендердің бар екені анықталды, бұл дегеніміз фитосанитарлық жағынан қауіпті деген сөз, инфекцияның таралуын болдырмау үшін биотехнологиялық әдістерге негізделген сауықтыру тәсілдерін жетілдіру және вируссыз отырғызу материалын алу қажеттігін дәлелдеді.

Өсімдіктерді вирустық аурулардан сауықтыру мақсатында *in vitro* әдістер кешені оңтайландырылды, оған апикалды меристема культурасы, термотерапия және химиотерапия кірді, сондай-ақ олардың тиімділігі салыстырмалы түрде бағаланды. Сауықтыру шараларынан кейін регенерант өсімдіктер қайтадан ИФТ және ПТР әдісімен тестіленді, нәтижесінде вирустық жүктемесі төмендетілген (сауықтырылған) регенерант өсімдіктер бөлініп алынды.

Жүзімнің 15 сортының *in vitro* жағдайындағы өсімдіктерін алу технологиясы оңтайландырылып, микроклоналды көбеюге жарамды, төмендетілген вирустық жүктемеге ие бастапқы регенерант өсімдіктерді алу

хаттамасы әзірленді. Фитогормондардың (гиббереллиндер, цитокининдер) концентрациялары мен үйлесімдерін таңдау негізінде сауықтырылған регенеранттарды микроклоналды көбейтудің ең тиімді тәсілдері анықталды, бұл көбею коэффициентін арттырады және морфогенез процесінің тұрақтылығын қамтамасыз етеді.

In vitro культурасында алынған жүзім микроөсімдіктерінің жабық топыраққа (*ex vitro*) бейімделуінің тиімді жағдайлары анықталды, бұл жоғары тіршілік ету деңгейін және физиологиялық тұрғыдан толыққанды жетілген өсімдіктердің өсуін қамтамасыз етеді.

Диссертациялық жұмыс жүзім өсімдіктерін (*Vitis vinifera* L.) вирустық инфекциялардан сауықтыруға бағытталған *in vitro* технологияларына негізделген биотехнологиялық тәсілдерді ғылыми тұрғыдан негіздеуге және оңтайландыруға арналған. Зерттеу барысында жүзімнің 15 сортының - Победа, Ризамат, Гузал кара, Әсия, Байқоңыр, Медеу, Айсұлу, Алма-Ата, Қара көз, Қызыл таң, Алиса, Аркадия, Виктория, Багровый және Алёшенькин - бастапқы өсімдік материалының вирустық инфекциямен зақымдануы молекулалық әдіспен тексерілді және табылған вирустарға филогенетикалық талдау жүргізіліп елімізге ену жолдары анықталды. Сауықтыру әдістерінің тиімділігі салыстырмалы түрде анықталып, регенерант өсімдіктерді алу және олардың микроклоналды көбейту хаттамалары оңтайландырылды. Сонымен қатар, сауықтырылған микроөсімдіктердің *ex vitro* (жабық топырақ) жағдайына бейімделуі қарастырылып, келешекте питомниктік шаруашылықта қолдануға жарамды отырғызу материалы алынды.

Алынған нәтижелердің жаңалығы мен маңыздылығының негіздемесі.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы. Қазақстанда алғаш рет жүзім сортынан таңқурайдың бұталы ергежейлілік вирусы (Raspberry bushy dwarf virus, RBDV) анықталып, апикальды меристема культурасын термо- және химиотерапия әдістерімен үйлестіре қолдану негізінде аталған сортты RBDV вирусынан сауықтырудың тиімді режимдері әзірленіп, тәжірибелік тұрғыдан негізделді. Алғаш рет зерттеуге алынған жүзім сорттарының 6-бензиламинопуринге (6-БАП) *in vitro* жағдайындағы генотиптік реакциясының ерекшеліктері анықталып, экспланттардың жоғары регенерациялық қабілетін қамтамасыз ететін және каллусогенез қарқындылығын төмендететін оңтайлы концентрациясы анықталды.

Зерттеудің практикалық маңызы. Алынған нәтижелер мен вируссыз жүзім көшеттерін алу (диагностика, сауықтыру, *in vitro* микроклоналды көбею және *ex vitro* бейімдеу) бойынша жетілдірілген биотехнологиялық схема питомниктер мен арнайы зертханаларда стандартталған сауықтырылған отырғызу материалын алу практикасына енгізілуі мүмкін. Бұл көшеттер питомниктер мен өнеркәсіптік екпелерді құру үшін қолданылады. Биотехнологиялық әдістер арқылы вирустық аурулардан сауықтырылған регенерант көшеттерін пайдалану отырғызу материалының фитосанитарлық сапасын арттыруға, вирустық инфекциялардың таралу қаупін төмендетуге және Қазақстан Республикасында жүзімдіктердің тұрақты дамуына ықпал етуге мүмкіндік береді.

Ғылымның даму бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі. Бұл диссертациялық жұмыс BR21881942 «Ауылшаруашылық дақылдарының өнімділігін арттыру мақсатында фитопатогендерді бақылаудың биотехнологиялық тәсілдерін әзірлеу» тақырыбындағы бағдарламалық-нысаналы қаржыландыру жобасы (2023-2025жж.) аясында орындалды.

Докторанттың ғылыми жарияланымдарға қосқан үлесінің сипаттамасы.

Автор зерттеудің мақсаты мен міндеттерін өз бетінше қойып, тәжірибелер жүргізуге арналған объекті мен әдістемелік тәсілді анықтады. Зерттеуші *in vitro* әдісімен жүзім өсімдіктерін сауықтыру бойынша кешенді зерттеулерді ұйымдастырып, оның ішінде апикальді меристема культурасы, термо- және химиотерапия, сондай-ақ регенеранттардың фитосанитарлық жағдайын ИФТ және ПТР әдісімен бақылау жүргізді. Автор сауықтырылған өсімдіктерді *in vitro* жағдайына енгізу және микроклоналды көбею хаттамаларын оңтайландырды, өсу реттегіштердің үйлесімдері мен концентрацияларына таңдау жүргізді. Сонымен қатар, жүзім микроөсімдіктерін жабық топырақ жағдайына (*ex vitro*) бейімдеудің әдістерін әзірлеп, тәжірибелік түрде тексерді. Алынған нәтижелер өңделіп, статистикалық талдау жүргізіліп, интерпретацияланды, соның негізінде қорытындылар мен практикалық ұсыныстар жасалды. Диссертация мәтінін дайындау, нәтижелерді рәсімдеу және зерттеу тақырыбы бойынша жарияланымдарды әзірлеу жұмыстары автордың өзіне тиесілі.

Диссертация нәтижелерін жариялау. Зерттеу нәтижелері бойынша 6 ғылыми мақала жарияланды, оның ішінде: *Scopus* дерекқорына кіретін журналда квартильді индексі Q3 (37%) 1 мақала, Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым және жоғары білім беру саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған журналдарда 3 мақала және халықаралық ғылыми конференциялар материалдарында 2 жарияланым. Автордың h-индексі 1.

Диссертацияның көлемі және құрылымы. Диссертацияның жалпы көлемі 139 бетті құрайды. Диссертация кіріспеден, 4 бөлімнен, қорытындыдан, өндіріске ұсыныстар және пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады. Жұмыс 14 кестемен, 43 сурет және 6 қосымшамен безендірілген. Пайдаланылған әдебиеттер тізіміне 235 отандық және шетел ғалымдарының еңбектері енгізілді.