

Бейшов Рустем Салтановичтің
6D060700 – «Биология» мамандығы бойынша философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін ұсынылған «Солтүстік Қазақстан өсімдіктерінің
сирек түрлерінің популяцияларын ДНҚ полиморфизмінің
микросателлитаралық талдауын пайдалана отырып молекулалы-
генетикалық зерттеу» тақырыбындағы диссертациялық жұмысына
АНДАТПА

Жұмыстың жалпы сипаттамасы.

Диссертациялық жұмыс Солтүстік Қазақстан өсімдіктерінің сирек түрлерінің популяцияларын ДНҚ полиморфизмінің микросателлитаралық талдауын пайдалана отырып молекулалы-генетикалық зерттеуге арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі.

Өсімдіктер және жануарлар әлемінің биологиялық алуантүрлілігін сақтау, олардың генетикалық потенциалын үнемді пайдалану әлемдік кеңістікте басым болып саналады.

Табиғи экожүйелерді қалпына келтіру тұрақтылығы олардың генетикалық потенциалының қоршаған ортаның өзгермелі жағдайына адаптациясына тікелей тәуелді екенін ескерсек, биосфера үшін түр және генетикалық алуантүрліліктің азаюы шынайы қауіп тудырады.

Қазіргі таңда өсімдіктердің биоэртүрлілігін сақтау мәселелеріне ерекше назар аударылады, бірақ сонымен қатар көптеген түрлердің күйі мен құрылымы туралы ақпарат жоқ немесе жеткіліксіз. Солтүстік Қазақстанның табиғатын игеру мен зерттеудің ұзақ тарихына қарамастан, бұл аумақта соңғы уақытқа дейін сирек кездесетін өсімдіктердің флорасын анықтауға және далдауға арналған жұмыстар болған жоқ.

Флоралық зерттеулер өсімдік әлемін қорғау жөніндегі ұсынымдарды әзірлеу үшін, сирек кездесетін өсімдіктердің тізімін құрастыру үшін қажет негіз болып табылады. Үстіміздегі жүзжылдықтың ортасында жойылу қаупі төніп тұрған өсімдіктер түрлерінің санын 7 мыңнан 60 мыңға дейін ұлғайту болжанады. Түр әртүрлілігі мен генетикалық әртүрлілікті төмендету биосфераға шынайы қауіп төндіреді, себебі табиғи экожүйелерді жаңғырту төзімділігі олардың өзгермелі қоршаған орта жағдайларына бейімделу әлеуетімен жаңғыртуға төзімділігімен тікелей байланысты. Биоэртүрлілікті кешенді бағалаған кезде генетикалық әртүрлілік, яғни генотиптік гетерозиготтылықты, полиморфизмді және басқа генотиптік өзгергіштікті қолдау үлкен рөл атқарады, ол табиғи популяцияларда бейімделу қажеттілігінен туындады.

Бүгінгі таңда сирек кездесетін өсімдіктердің генофондын сақтау үшін зерттеудің дәстүрлі тәсілдерімен қатар, қазіргі заманғы молекулалы-генетикалық әдістерді қолдану қажет. Қазіргі уақытта бағалы, сирек кездесетін өсімдіктер түрлерінің ДНҚ-банктері құрылған, қорғалатын объектілердің түрішілік өзгергіштігін зерттеу, олардың жүйелілігі мен жіктелуінде туындаған даулы мәселелерді нақтылау, популяцияның молекулалы-генетикалық идентификациялау мен паспорттау әдістемесін құрастыру және

сақталатын *in situ* таксондарының генетикалық тұрақтылығын зерттеу бойынша зерттеулер жүргізілуде.

Сонымен қатар, генофондтарды зерттеу үшін дәстүрлі молекулалы-генетикалық маркерлердің (құрлымдық гендер, мини- және микросателлиттік локустар) пайдалану тиімділігі даралардың біртектілік генотиптеуге жарамды локустар санының шектеулігі себебінен әлі күнге дейін жеткіліксіз болып келеді. Сол себептен бұл жағдай әрбір жеке индивидуумның «геном портретін» жасауға мүмкіндік бере алатын көптеген геном бөліктерінің біртектілік молекулалық маркирлеуінің жаңа жолдарын іздестіруді талап етеді. Нәтижесінде популяциялар генофондтарының ерекшелігін объективті түрде бағалауға мүмкіндік пайда болады. Жаңа әдістерді құрастыру популяциялардың типтік өкілдерін іріктеп алуда және оларды сақтау бойынша генетикалық негізделген бағдарламаларды жасауда, сонымен қатар түрішілік генетикалық алуантүрлілікті анықтауда, гетерезиготтықты бағалауда, түрлер арасында филогенетикалық өзара қатынастарды және популяциялар аралық кеңістіктік өзара байланыстарды қайта жасауда - биоалуантүрлікті сақтаудың басты мәселесін шешуінде аса маңызды орын алады.

Көптеген ботаниктер аумақтағы флористикалық ерекшеліктерді байқаған. Бұл аумақ далалы аймаққа жатқызылады, алайда Батыс-Сібір жазықтығының ормандалалы аймағына жақындығы, флорасы мен өсімдіктеріне қолтаңба қалдырады. Е.И. Рачковская, З.В. Карамышева осы жерде аласа таулардағы ормандаланың оқшауланған жері құрылған деп санайды.

Солтүстік Қазақстан флора мен өсімдіктер алуантүрлілігімен ғана емес, сонымен қатар оның сирек өсімдіктер түрлерінің концентрациясының жоғары болуына байланысты ерекше.

Кез-келген аумақтағы флораны анықтау мен зерттеу, қазіргі қоршаған ортада күшейе бара жатқан қолайсыз факторлардың, ең алдымен адам іс-әрекетінің әсерінен пайда болып жататын өзгерістерге байланысты маңызды орын алады.

Алайда осы орта, антропогендік факторлардың әсерінен айтарлықтай өзгереді, ол тек локальды популяциялардың ғана емес, бүтін түрлердің жойылуына әкеп соқтырады.

Зерттеу жұмыстың мақсаты: Солтүстік Қазақстанның сирек кездесетін өсімдіктер түрлерінің биологиялық ерекшеліктерін зерттеу, олардың геномдарын молекулалық таңбалау негізінде молекулалық-генетикалық сәйкестендіру және төлқұжаттандыру технологиясын пайдалану арқылы олардың күйін бағалау және олардың гендік қорларын сақтау үшін тәсілдемелерді әзірлеу.

Мақсатқа жету үшін мынадай негізгі **міндеттер** қойылды:

1. Әртүрлі экотоптарды қамту арқылы далалық жұмыстардың көлемін, экспедициялардың бағыттарын анықтау;

2. Мекен орталарының географиялық, экологиялық және фитоценоздық ерекшеліктерін, дарактардың популяциялық сипаттамалары мен ерекшеліктерін зерттеу; биологиялық материалды іріктеу;

3. Популяциялардың тиімді өлшемінің жас құрамын анықтау. Популяциялардың жалпы және тиімді санын есептеу;

4. Биологиялық материалдан ДНҚ бөліп алу;

5. Өсімдіктерді полилокусты маркерлеу үшін праймерлерді іріктеу, сынамау және тиімділігін анықтау;

6. Полилокусты маркерлеу деректерінің негізінде өсімдіктердің сирек кездесетін түрлерінің популяцияларының генетикалық әртүрлілігін зерттеу;

7. Полилокусты маркерлеу негізінде зерттелген популяциялардың гендік қорының күйін анықтау;

8. Сәйкестендіргіш молекулалық маркерлерді анықтау және популяцияларды сәйкестендіру;

9. Полилокусты маркерлеу негізінде сирек кездесетін өсімдік түрлерінің гендік қорларының күйінің параметрлері мен шкалаларын анықтау;

10. Солтүстік Қазақстанның сирек кездесетін өсімдіктерін сақтау жөніндегі ұсынымдарды дайындау.

Зерттеу объектісі: зерттеудің негізгі нысандары ретінде Қазақстанда сирек кездесетін өсімдіктердің 4 түрі іріктелініп алынды: *Adonis vernalis* L., *Adonis wolgensis* Stev., *Pulsatilla patens* (L.) Mill., *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz.

Зерттеу әдістері. Далалық зерттеулер өсімдіктердің гүлдену мен жеміс беру мерзімі кезеңінде жүргізілді. Зерттеулер нақтылы-бағдарлық әдісімен жүргізілді. Диссертацияны орындау кезінде өсімдік үлгілерінен ДНҚ бөлініп алынды, полимеразды тізбекті реакцияны (ПТР) қолдана отырып, ISSR-әдісімен ДНҚ полиморфизмі анықталды.

Зерттеу орны. Диссертация бойынша ғылыми-зерттеу жұмыстары мен тәжірибелер А. Байтұрсынов атындағы Қостанай өңірлік университетінің Қолданбалы биотехнологиялар ғылыми-зерттеу институтының молекулярлы-генетикалық зерттеулер зертханасы мен Пермь қаласындағы «Пермь мемлекеттік ұлттық зерттеу университеті» зертханаларында жүргізілді.

Қорғауға шығарылатын негізгі ұсынымдар:

1. Солтүстік Қазақстандағы *Adonis wolgensis* Stev., *A. vernalis* L., *Pulsatilla multifida* (Pritz.) Juz., *P. uralensis* (Zam.) Tzvel. ценопопуляцияларының күйі қанағаттанарлық екені анықталды.

2. Зерттелген популяциялардың күрделі морфологиялық және генетикалық түрішілік құрылымы анықталды.

3. *Adonis wolgensis*, *A. vernalis*, *Pulsatilla multifida*, *P. uralensis* ценопопуляцияларын сақтауға аталмыш түрлер жаппай өсетін жерлерде антропогендік жүктемені төмендетуге ықпал ететіні анықталды.

Зерттеу жаңалығы:

Зерттеу барысында Солтүстік Қазақстан облыстарында өсетін *Adonis vernalis* L., *Adonis wolgensis* Stev., *Pulsatilla patens* (L.) Mill., *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz. дарақтардың мекен орталары, популяциялық сипаттамалары мен параметрлері зерттелінді. Популяциялардың жас құрамы, популяциялардың тиімді өлшемі анықталып, популяциялардың саны

есептелінді. 600-ден астам ботаникалық материал гербарийлік жапырақтар қоры жиналды. Зерттелген ценопопуляциялардың алғашқы рет генетикалық әртүрлілігі мен генетикалық құрылымы зерттелді. Оларға алғашқы рет геномдық таңбалау жүргізіліп, гендік қордың күйі бағаланды, зерттелетін ценопопуляциялар үшін молекулалық-генетикалық формулалар, сызықша кодтар мен төлқұжаттар жасалынды.

Алынған нәтижелердің практикалық маңыздылығы. Биологиялық әртүрлілікті сақтау қазіргі әлемнің маңызды мәселелерінің бірі болып табылады. Сирек кездесетін түрлердің генетикалық әртүрлілігін (популяция аралық, популяция ішіндегі полиморфизм, популяцияның генетикалық дифференциациясы) зерттеу, олардың биологиясы мен систематикасын зерттеумен, популяцияны геоботаникалық сипаттаумен және олардың жас спектрінің ерекшеліктерін және шектеуші факторларды анықтаумен қатар, сирек кездесетін түрлердің табиғаты мен ерекшеліктерін неғұрлым толық түсінуге және соңында сақтау механизмін дұрыс таңдауға мүмкіндік береді. Көптеген генетикалық жағынан ерекшеленетін жергілікті популяцияларды сақтау – бұл түрдің жойылып кетуіне жол бермеу және оның эволюциялық әлеуетін сақтаудың басты міндеті болып табылады. Алайда, барлық қолданыстағы популяцияны сақтау әрдайым мүмкін емес. Көбінесе сақтау үшін белгілі бір популяцияны бөліп алу керек немесе оларды жасанды жағдайда және/немесе генетикалық банкаларда сақтау үшін үлгілерді таңдау қажет.

Қазіргі заманғы молекулалық-генетикалық әдістер популяциялардағы және олардың арасындағы генетикалық әртүрлілік деңгейін анықтауға, түрдің популяциялық-генетикалық құрылымын анықтауға мүмкіндік береді, сондықтан оларды қолдану өсімдіктердің сирек кездесетін түрлерін сақтау стратегиясын таңдауда өте маңызды.

Басқа ғылыми-зерттеу жұмыстарымен байланысы. Диссертация жұмысы ҚР БЖҒМ-нің 2018-2020 жж. арналған ғылыми жобаларды гранттық қаржыландыру бойынша «AP05132458 Солтүстік Қазақстандағы сирек кездесетін өсімдіктер түрлерінің популяциясының генофондын молекулалық-генетикалық талдау» атты ғылыми жоба барысында орындалды (мемл.нөмірі 0118РК00404). Диссертацияны дайындау барысында 2018, 2019, 2020 жылғы аралық есептердің материалдары мен қорытынды есеп пайдаланылды.

Диссертация нәтижелерін апробациялау.

Диссертацияның негізгі қағидалары Қостанай өңірлік университетінің В. Двуреченский атындағы ауылшаруашылық институтының ғылыми-техникалық кеңестерінде, биология және экология кафедрасының кеңейтілген отырысында қаралып, талқыланды. Тақырып бойынша диссертацияның негізгі нәтижелері халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференцияларда жарияланды: «Қазіргі ғылымдағы инновациялық тәсілдер» ХХХ халықаралық ғылыми-практикалық конференция (Мәскеу, 2018 ж.), «Методология, қазіргі биологияның теориясы мен практикасы» халықаралық ғылыми-практикалық конференция, (Қостанай, 2019 ж.), Симбиоз-Ресей 2019: Халықаралық жас ғалым-биологтардың қатысуымен ХІ Бүкілресейлік Конгр. (Пермь қ., 2019

ж.), «Ұлы даланың көп қырлылығы: рухани жаңғыру, білім және инновация» халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференциясы (Қостанай қ., 2019 ж.).

Диссертацияның ғылыми-зерттеу жұмыстарының нәтижелері АР05132458 жобасы бойынша аралық және қорытынды есебіне енгізілген (2018-2020 жж.).

Жариялымдар. Диссертациялық жұмыс тақырыбы бойынша 14 ғылыми мақала жарияланды, оның ішінде 4 мақала ҚР БҒМ Білім және ғылым саласындағы бақылау комитеті ұсынған басылымдарда, 2 мақала *Scopus* мәліметтер базасына кіретін басылымдарда, 1 пайдалы модельге патент алынды (11.03.2020 ж. № 5485 Патент) (Қосымша В), 6 мақала халықаралық конференциялар жинақтарында, 2 мақала электрондық журналында шығарылды. «Солтүстік Қазақстан өсімдіктерінің сирек түрлері» монографиясы, сондай-ақ Солтүстік Қазақстан өсімдіктерінің сирек түрлерін сақтау бойынша ұсынымдар шығарылды.

Ғылыми тағылымдама. Ғылыми тағылымдама Кемерово қаласындағы Кузбасс ботаникалық бағының базасында Ресей ғылым академиясының Сібір бөлімшесінде «Көмір және көмір химиясын федералдық зерттеу орталығы» ФМБҒМ-де өтілді.

Ізденушінің жеке үлесі. Автормен нысандарды іріктеу, биологиялық үлгілерді алу, гербарийлік кеппе шөптерді дайындау жұмыстары, эксперименттерді қою мен диссертациялық жұмыстың құрылымы және жоспарлау ғылыми кеңесшілермен бірге жүргізілді. Автордың жеке өзі зерттеу әдістерін іріктеп, Солтүстік Қазақстан өлкесінің сирек кездесетін өсімдік түрлерінің 20 ценопопуляциясын далалық және зертханалық зерттеулерді, кейіннен өңдеуді, талдауды, соның ішінде бірқатар компьютерлік бағдарламаларды пайдалана отырып, жалпылау және интерпретациялауды жүзеге асырды. Алынған нәтижелер бірлескен авторлармен бірге 16 басылымда жарияланды.

Зерттеу нәтижелері: Диссертация барысында жүргізілген зерттеулердің нәтижелері бойынша мынадай қорытынды шығарылды:

1. Зерттеулердің нәтижесінде сирек кездесетін өсімдіктердің 4 түрінің популяцияларының түрлік әртүрлілігі туралы деректер алынды және жүйелендірілді. Өсімдіктер гүлденген кезде барлығы 20 ценопопуляция зерттелді.

2. Солтүстік Қазақстанда *Pulsatilla patens* (L.) Mill. s.l. ценофлорасы зерттелді, оған 42 тұқымдасқа және 141 тұқымға тиесілі 168 түр жатады. *Adonis wolgensis* ценофлорасына 28 тұқымдасқа және 75 тұқымға тиесілі 119 түр жатады. *Adonis vernalis* ценофлорасына 24 тұқымдасқа тиесілі 77 түр жатады. 595 дана өсімдіктен 6 мыңнан астам жапырақ жиналды.

3. *Pulsatilla* s.p. ценопопуляцияларының (ЦП) тиімділік индексі жоғары және 0.73-0.88 тар интервалында орналасқан. Түрлер мен аралық нысандар арасында айырмашылықтар анықталған жоқ. *Adonis wolgensis* Stev. популяциясының тиімділік индексі 0.59-0.86 шектерінде, *Adonis vernalis* популяциясының тиімділік индексі 0.70-0.84 шектерінде болады.

4. Диссертациялық жұмысты орындаған кезде Қазақстан Республикасының Ақмола, Қостанай және Павлодар облыстарының аумағында өсетін сирек кездесетін 300 өсімдіктердің жапырағынан алынған үлгілерден жоғары сапалы ДНҚ бөлініп алынды.

5. Микросателлитаралық әдісті пайдалану арқылы молекулалық-генетикалық талдау үшін ДНҚ полиморфизмін анықтау тиімділігі бойынша *ISSR*-праймерлері іріктеп алынды.

6. Зерттеулер көрсеткендей, *Pulsatilla* Mill. тегінің зерттелген түрлері генетикалық әртүрліліктің айтарлықтай жоғары деңгейімен сипатталады, P_{95} - 0,728-ден 0,904 дейін; H_E – 0,131-ден 0,245 дейін ауытқиды. Күтілетін гетерозиготтылықтың көрсеткіштерін ескермегенде, *P. flavescens* (P_{95} – 0,904, H_E – 0,204, I –0,307) ценопопуляцияларына қарағанда, зерттелген *P. patens* (P_{95} – 0,965, H_E – 162, I –0,373) ценопопуляцияларында генетикалық әртүрлілік көрсеткіштері жоғары. Бұл ретте *P. flavescens* (G_{ST} =0,256) және *P. patens* (G_{ST} =0,300) ценопопуляцияларының популяцияаралық дифференциациясының деңгейін салыстыруға болады.

Сондай-ақ *Adonis* L. тегінің зерттелген түрлері генетикалық әртүрліліктің жоғары деңгейімен сипатталады, P_{95} - 0,424-тен 0,888 дейін; H_E – 0,171-ден 0,300 дейін. *A. vernalis* ЦП-мен салыстырғанда *A. wolgensis* ЦП-ң генетикалық әртүрлілік көрсеткіштері жоғары. Бұл ретте *A. wolgensis* (G_{ST} =0,131) салыстырғанда *A. vernalis* (G_{ST} =0,348) популяцияаралық дифференциациясының деңгейі жоғары.

7. Генетикалық әртүрлілік параметрлерін талдау негізінде белгілі болғандай, Солтүстік Қазақстанның Қостанай облысындағы Pf1 және Pf2 *P. flavescens* ценопопуляцияларына гендік қорлардың типтік сипаттамалары тән, ал Ақмола облысындағы Pf3, Pf4 және Pf5 ценопопуляцияларына айрықша гендік қорлар тән. Зерттелген барлық 5 *P. flavescens* ценопопуляцияларының гендік қорларының күйі қанағаттанарлық. *P. patens* ценопопуляцияларының арасында типтік гендік қорлармен бірінші және төртінші ценопопуляциялар (Pr1 және Pr4) сипатталады, ал екінші, үшінші және бесінші ценопопуляциялар – айрықша (Pr2, Pr3, Pr5). Павлодар облысындағы *P. patens* бірінші ценопопуляциясында гендік қордың азаюы байқалады, осы түрдегі қалған зерттелген ценопопуляциялардың гендік қоры қанағаттанарлық күйде. *A. wolgensis* ценопопуляцияларының арасында Aw3 және Aw5 ценопопуляциялары негізгі сипатқа тән, ал Aw1, Aw2 және Aw4 ценопопуляциялары айрықша сипатқа тән. Барлық 5 *A. wolgensis* ценопопуляцияларының күйі қанағаттанарлық. *A. vernalis* ценопопуляцияларының арасында типтік гендік қорлар бірінші және үшінші ценопопуляцияларды (Av1, Av3) иеленеді, екінші, төртінші және бесінші ценопопуляциялар – айрықша (Av2, Av4, Av5). Ақмола облысында *A. vernalis* төртінші ценопопуляциясында гендік қордың азаюы байқалады, осы түрдің қалған ценопопуляцияларының гендік қоры қанағаттанарлық күйде.

8. Зерттелген 20 ценопопуляцияның гендік қоры олардың геномдарының жекелеген локустарындағы аллельдердің құрамын бейнелейтін формулалар мен сызықша кодтар түрінде құжаттандырылды. Бұл ретте

өсімдіктердің геномдарының көп бөлігін қамтитын және өсімдіктерді генетикалық төлқұжаттандыру үшін жарамды ДНҚ полиморфизмін ISSR-әдісімен талдауды пайдалану арқылы ДНҚ сәйкестендіргіш маркерлерін анықтауға негізделген молекулалық-генетикалық формула мен сызықша кодты құрастыру және жазу қағидасы пайдаланылды.

9. Гендік әртүрліліктің негізгі көрсеткіштерінің кешенін талдау негізінде зерттелген 20 ценопопуляцияның 18-нің гендік қорларының күйі қанағаттанарлық болып бағаланды, оның себептері ретінде түрлер ареалы гүлденген және фрагменттелген кезде тозаңдырғыш жәндіктер деп аталады. Гендік қордың азаюы Павлодар облысының Баянауыл ауылының жанында жайғасқан ашылған кестежусанның популяцияларында және Ақмола облысындағы Мирное орман шаруашылығының көктемгі жанаргүл популяциясында байқалды.

10. Солтүстік Қазақстанның сирек кездесетін өсімдіктерінің 4 түрін сақтау бойынша ұсынымдар әзірленді: *Adonis vernalis* L., *Adonis wolgensis* Stev., *Pulsatilla patens* (L.) Mill., *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz.

Диссертацияның құрылымы мен көлемі. Диссертациялық жұмыс кіріспеден, екі бөлімнен, қорытындыдан, пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады. Жұмыс компьютер жиынтығының 235 бетте баяндалған, 29 сурет пен 29 кестені қамтиды. Пайдаланылған әдебиеттер тізімі 167 атаудан тұрады.

Диссертациялық жұмыстың метрологиялық қамтамасыз етілуі туралы ақпарат. Зерттеу жұмыстары жүргізілген А. Байтұрсынов атындағы Қостанай өңірлік университетінің Қолданбалы биотехнологиялар ғылыми-зерттеу институтының молекулярлы-генетикалық зерттеулер зертханасы МЕМСТ ИСО/МЭК 17025-2009 "Сынау және калибрлеу зертханаларының құзыреттілігіне қойылатын жалпы талаптар" Қазақстан Республикасының №КЗ.Т.11.1949 2020 жылғы 21 тамыздағы аккредиттеу жүйесінде аккредиттелген және зертханалық зерттеу кезінде ғылыми-зерттеу жұмыстарында пайдаланылған құрылғылар мен зертханалық жабдықтар Ұлттық сараптау және сертификаттау орталығымен тексерілген.