

ОРАЗОВ АЙДЫН ЕРҒАЛИҰЛЫНЫҢ
«6D061300 – Геоботаника» мамандығы бойынша философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін «Шығыс Қазақстан жағдайындағы сирек және эндем Ледебур
бадамы (*Amygdalus ledebouriana* Schlecht.) өсімдік түрінің популяцияларының
жағдайын зерттеу» тақырыбында дайындалған диссертациясының
АҢДАТПАСЫ

Жұмыстың өзектілігі. Қазақстан Республикасының 2030 жылға дейінгі ерекше қорғалатын табиғи аумақтарын дамыту тұжырымдамасына сәйкес эндемдік және сирек кездесетін бұта тектес өсімдік түрлерін сақтаудың ең тиімді шарасы болып ерекше қорғалатын табиғи аумақтар желісін құру болып табылады. Қазақстан Республикасының 2021 жылғы 2 қаңтардағы қабылданған жаңа Экологиялық кодексіне сәйкес эндемдік өсімдіктердің генофондын қорғауға ерекше көңіл бөлінеді.

Дегенмен, эндемдік және сирек болып келетін бұта тектес өсімдік түрлерінің жастық құрамы және генетикалық алуан түрлілігі сияқты популяциялық сипаттамасы бар кешенді зерттеу жұмыстары жүргізілмеген. Қазақстанның Қызыл кітабына және өсімдіктер мен жануарлардың сирек кездесетін және құрып кету қаупі төнген түрлерінің тізбесін бекіту туралы Қазақстан Республикасы Үкіметінің 2006 жылғы 31 қазандағы № 1034 Қаулысына сәйкес Шығыс Қазақстанның сирек және эндем өсімдік түрлерінің бірі *Rosaceae* Juss. тұқымдасына жататын *A. ledebouriana* болып табылады.

Бұл өсімдік түрдің популяцияларын кешенді зерттеу, оның құрылымдық ерекшеліктері мен заманауи молекулалық-генетикалық әдістерді пайдалану арқылы генетикалық алуан түрлілік деңгейін анықтау және биотехнологиялық жолымен сақтау бойынша алынған нәтижелерді талдау жұмыстары Қазақстан Республикасында жүргізілмегендігі зерттеу жұмысының өзектілігін айқындайды.

Зерттеу нысаны – Сирек және эндем Ледебур бадамы - *Amygdalus ledebouriana* Schlecht.

Жұмыстың мақсаты: Шығыс Қазақстан жағдайындағы сирек және эндем *A. ledebouriana* популяцияларының қазіргі құрылымдық жағдайы, морфологиялық айырмашылығы, генетикалық алуан түрлілік параметрлері негізінде зерттеу және биотехнологиялық жолымен сақтау.

Зерттеу міндеттері:

1. Шығыс Қазақстан аумағындағы *A. ledebouriana* популяцияларының сирек және эндем ерекшелігін, өсімдік статусын, таралу аумағын және өсімдік қатысатын қауымдастық салыстырмалы флоралық құрамын анықтау;

2. Шығыс Қазақстан аумағындағы *A. ledebouriana* популяцияларының құрылымдық ерекшеліктерін зерттеу және популяциялар арасындағы бұталардың морфологиялық биіктігінің өзгергіштігін салыстыру;

3. ITS және *matK* ДНҚ-маркерлерінің нуклеотидтік тізбегі негізінде *Prunus* туысы түрлерін талдау және филогенетикалық шежіресіндегі *A. ledebouriana* орнын анықтау;

4. SSR ДНҚ-маркерлері негізінде *Chamaeamygdalus* секциясының өсімдік түрлерінің популяцияларын салыстыру және генетикалық ерекшеліктерін бағалау;

5. *A. ledebouriana* өсімдігін ұлпалық деңгейдегі *in vitro* ортасында биотехнологиялық (*ex situ*) жолымен тұрақты асептикалық каллус клеткаларын алу регламентін жасау;

6. Шығыс Қазақстанның ерекше қорғалатын аумақтарындағы сирек және эндем *A. ledebouriana* түрін сақтау шараларын ұсыну.

Зерттеудің теориялық-әдіснамалық базасы:

A. ledebouriana деп аталатын өсімдікті алғаш рет неміс ботанигі және микологы Диерих Франц Леонхард фон Шлехтендал анықтап, сипаттаған. Бұл түр туралы алғашқы мәліметтер 1854 жылы жарық көрді Diederich Franz Leonhard von Schlechtendal (Schlecht.),

Abhandlungen der naturforschenden gesellschaft, Band 2. Түр КСРО Флорасының 10-томында, Қазақстан флорасының 4-томында және Қазақстан өсімдіктерінің суретті анықтағышының бірінші бөлімінде сипатталған. *A. ledebouriana* сирек кездесетін және жойылып бара жатқан өсімдік түрлері ретінде Қазақстанның Қызыл кітабына енгізілген. Жоғарыда аталған барлық дереккөздерде *A. ledebouriana* эндемдік сипаттары бар жеке өсімдік түрі ретінде анықталған.

Бірақ Кеңестік Социалистік Республикалар Одағының (КСРО) 1941 жылғы және Қазақстанның 1961 жылғы (С.К. Черепанов, С.А. Абдулина) флорасы басылымдарында бадам туысы бөлек тәуелсіз туыс деп анықталған және Ресей Федерациясының танымал «Плантариум» (www.plantarium.ru) өсімдіктер түрлерінің атласы және online анықтағыш жүйесі оны растайды. Бадам туысын басты ажырататын белгісі ретінде құрғақ және сүйекті жемісінің болуы деп анықталады.

Тарбағатай өсімдіктерінің түр алуандығы туралы ең толық мәліметтер Е.Ф. Степанованың «Тарбағатай жотасының флорасы мен өсімдіктері» еңбегі болып табылады.

Көптеген шет ел ғалымдарының зерттеулері Ма Ян және Си Хуа AFLP және SSR молекулалық маркерлерін қолдану арқылы бадамның генетикалық әртүрлілігі бойынша зерттеулер жүргізуге мүмкіндік берді.

A. ledebouriana өсімдігінің өмірлік циклдерін зерттеу Уранов әдістемесі бойынша анықталды. Түрлердің экологиялық және биологиялық ерекшеліктерін зерттеу Голубев пен Молчанов жасаған әдістемелік ұсыныстарға сәйкес жүргізілді. М.Г. Николаеваның, И.В. Лянгузовтың, Л. М. Поздовтың әдістемелік әзірлемелері бойынша экспериментке енгізілген сандық және сапалық тұқымдарды анықтау. Фитоценоздардағы түрлерді сәйкестендіру «Қазақстан флорасы» (1956-1966, 1999-2002), «Сібір флорасы» (1982-1993), «Орта Азия өсімдіктерінің детерминанты» (1968-1994) іргелі мәліметтері негізінде жүзеге асырылады. ШҚО аумағындағы *A. ledebouriana* өсімдігінің мекендейтін жерлердің географиялық таралуын анықтау және картосхемасын жасау ArcGIS жүйесінде жүргізілді. Статистикалық мәліметтерді өңдеу Г.Ф. Лакин және Н. Л. Удольская, Зайцев Г. Н. әдістері бойынша, сондай-ақ Statistica 6.1 және Microsoft Office excel 2007 қолданбалы бағдарламалар пакетін қолдану арқылы жүргізілді.

ITS және *matK* ДНҚ-маркерлері көмегімен генетикалық құрылымын зерттеу әдісі. SSR ДНҚ-маркері көмегімен популяцияларының генетикалық алуан түрлілігін зерттеу әдісі. Геномдық ДНҚ алтын тамыр жапырағынан бөліп алу СТАВ хаттамасымен жасалды (Doyle, 1991). Популяцияның өзгермелілігі GenAlex бағдарламалық құралының 6.5 нұсқасы (Peakall және т.б., 2012), Past 4.03 бағдарламалық құралы, R-studio бағдарламалық құралы (Нұсқа 1.3.1093), ClustVis веб құралы (Metsalu & Vilo, 2015), PopGene нұсқасы 1.32 (Yeh et al.) арқылы зерттелді. ал., 1997), STATISTICA 10.0 бағдарламалары. Кластерлеу өлшенбеген жұптық-топтық орташалау (UPGMA) әдісімен орындалды (2014).

Барлық тәжірибелерде 3-6% сахарозасы бар 0,7% MS агар гелі ортасы қолданылды Мурасиге (1977). Жоғары сатыдағы өсімдіктердің мәдени жасушаларының *in vitro* биологиясы және биотехнологиялар Бутенко Р.Г. (1999) әдістері бойынша жасалды. Каллустың морфологиялық құрылымы Тимофеев пен Румянцеваның (2012) әдісі бойынша сипатталған.

Автордың жұмыстағы жеке үлесі. Диссертациялық жұмыстың авторы зерттеу нысанын және концепциясын таңдауда, жұмыстың мақсатын анықтап, зерттеудің міндетін қоюда, сонымен қатар, тәжірибелердің орындалуына, алынған мәліметтерді жинақтау мен өндеп-талдауға толық өз үлесін қосты.

Диссертациялық жұмыстың ғылыми жаңалығы. Сирек және эндем *A. ledebouriana* популяцияларының ерекшеліктерін кешенді зерттеу негізінде жаңа ақпарат алынды, бұл зерттелген *A. ledebouriana* популяцияларын сақтау бойынша шараларын ұсынуға мүмкіндік береді.

Алтай және Тарбағатай жоталарында орналасқан *A. ledebouriana* популяцияларының генетикалық алуан түрліліктің салыстырмалы жоғары деңгейіне ие.

Популяциялардан жиналған тұқымдары *A. ledebouriana* өсімдік түрінің генофондын ұзақ уақытқа сақтау мақсатымен Ботаника және фитоинтродукция институтының «Қазақстанның табиғи флорасының тұқым банкіне» өткізілді және өткізу туралы акт алынды.

A. ledebouriana биологиялық материалдарынан ITS және *matK* ДНҚ-маркерлері негізінде алынған нуклеотидтік тізбек мәліметі NCBI халықаралық базасына MN335241.1, MN453776.1 және MN453777.1 нөмірі бойынша жүктелді, алынған нәтижелер *Chamaeamygdalus* секциясының молекулалық таксономиясын зерттеуге үлкен үлес қосады.

A. ledebouriana эмбрионалды материалдарынан алынған *in vitro* ортасындағы тұрақты асептикалық каллус клеткаларын алу регламенті мен оңтайлы қоректік ортаның химиялық құрамы, экзогенді фитогормондар концентрациясы болашақта сирек және эндем өсімдік түрлерінің ұлпаларын криосақтау мен микроклондап көбейту үшін қолданысын табады. Алғаш рет сирек және эндем *A. ledebouriana* өсімдігін *in vitro* ортасында тұрақты асептикалық каллус клеткаларын алу үшін ИМҚ 1 мг/л, ГҚ және 6-БАП 0,5 мг/л концентрациясы бар оңтайлы қоректік орта құрамы мен регламенті анықталды. Қоректік ортаның химиялық құрамына пайдалы модельге патент алынды.

Қорғауға ұсынылатын негізгі ережелер:

– Шығыс Қазақстанның таулы аймақтарында окшауланған географиялық орналасуына және антропогендік әсерге байланысты Қызыл кітапқа енген, эндем *A. ledebouriana* түрінің *A. nana* түрімен ауысуына әкеледі, бұл өз кезегінде *A. ledebouriana* өсімдігінің жойылу қаупін тудырады.

– *A. ledebouriana* Шығыс Қазақстан жағдайында Алтай мен Тарбағатайдың таулы жүйелерінде екі үлкен таралу аймағымен ерекшеленеді: ценофлорасы 250 түрі бар екі ценопопуляциядан тұратын Алтай тауларының Нарын жотасы популяциясы; ценофлорасы 153 түрі бар екі ценопопуляциядан тұратын Алтай тауларының Қалба жотасы популяциясы; ценофлорасы 376 түрі бар үш ценопопуляциядан тұратын Тарбағатай тауларының Тарбағатай жотасы популяциясы; ценофлорасы 150 түрден тұратын Алтай тауларының Үлбі жотасының ұсақ шоқылық аймағындағы *A. ledebouriana* өсімдігіне морфологиялық ұқсас *Chamaeamygdalus* секциясы өкілі *A. nana* популяциясы да анықталды.

– *A. ledebouriana* үш таулы популяциясы арасындағы өсімдік биіктігінің статистикалық айырмашылығы теңіз деңгейінен жоғары орналасуымен байланысы анықталды. Өсімдік биіктігі бойынша популяциялар арасындағы статистикалық маңызды айырмашылық расталды (P -мәні = $2.3e-15$). Т-сынағы барлық үш таулы *A. ledebouriana* популяциясы *A. nana* дала популяциясымен салыстырғанда өсімдіктердің биіктігі айтарлықтай жоғары екендігін көрсетті ($P < 0,0001$). Географиялық орналасуына байланысты *Chamaeamygdalus* секциясының морфологиялық жағынан ұқсас таулы *A. ledebouriana* және далалық *A. nana* екі түрдің өкілдері арасындағы өсімдік биіктігі белгісі бойынша айтарлықтай айырмашылық табылды.

– ITS және *matK* ДНҚ-маркерлері негізінде *Prunus* туысының *A. ledebouriana* өсімдік түрінің филогенетикалық орны және *A. ledebouriana* өсімдік түріне генетикалық жағынан *A. nana* жақын екені анықталды.

– SSR ДНҚ-маркерлерінің негізінде географиялық орналасуына байланысты *Chamaeamygdalus* секциясының *A. ledebouriana* және *A. nana* өкілдерінің популяциялары арасындағы генетикалық құрылымдық айырмашылықтар анықталды, *A. ledebouriana* өсімдік түрінің жалпы генетикалық өзгергіштігі популяциялар ішінде 73% және популяциялар арасында 27% екені анықталды.

– Экзогендік фитогормондар қосындысымен каллус түзілу үшін оңтайлы қоректік орта концентрациясы ИМҚ 1 мг/л, ГҚ және 6-БАП 0,5 мг/л. *In vitro* ортасында ұрық тамырсыз жетілмеген эмбрион экспланттарда тұрақты асептикалық каллус жасушаларының түзілу салыстырмалы жиілігі $7,79 \pm 0,46\%$ -ға дейін артады.

Қорытынды:

1. Шығыс Қазақстан жағдайындағы сирек және эндем *A. ledebouriana* өсімдігі популяциялардың қатысатын өсімдік қауымдастықтарының флоралық құрамы анықталды және *A. ledebouriana* өсімдігінің жаңа үш популяциясы анықталды. Популяциялар Алтай мен Тарбағатайдың таулы жүйелерінде екі үлкен таралу аймағымен ерекшеленеді: ценофлорасы құрамында 250 түрі бар екі ценопопуляциядан тұратын Алтай тауларының Нарын жотасы популяциясы (3-КА); ценофлорасы құрамында 153 түрі бар екі ценопопуляциядан тұратын Алтай тауларының Қалба жотасы популяциясы (2-КО); ценофлорасы құрамында 376 түрі бар үш ценопопуляциядан тұратын Тарбағатай тауларының Тарбағатай жотасы популяциясы анықталды.

2. Тарбағатай, Қалба және Нарын жоталары популяцияларда жас генеративті және жетілген генеративті өсімдіктер басым болады, бұл осы популяциялардың жаңаруын көрсетеді. *A. nana* өсімдігінің Үлбі жотасы популяцияда ескі генеративті және субсенильді өсімдіктердің өкілдері кездеседі, бұл Үлбі жотасы популяцияның қартаюының, яғни оның жаңаруының әлсіздігінің белгісі болып табылады. *A. ledebouriana* және *A. nana* зерттелген популяциялары қалыпты, кәрілік даралар барлық популяцияларда басынқы емес. Ең үлкен өсімдік биіктігі 3-КА популяциясы үшін ($2,09 \pm 0,06$ м) тіркелді, бұл теңіз деңгейінен ең биік тау популяциясы болды. Өсімдік биіктігі бойынша популяциялар арасындағы статистикалық маңызды айырмашылықты растады ($P\text{-мәні} = 2.3e-15$) Т-сынағы ($P < 0,0001$). Өсімдіктердегі бұл белгінің көрсеткіші теңіз деңгейінен жоғары биіктікте орналасуына байланысты және *A. ledebouriana* үлгілері үшін ең төменгі биіктік 1,7 м-ден жоғары, ал *A. nana* өсімдік үлгілері үшін ең жоғары биіктігі 1,5 м-ден төмен болды.

3 SSR ДНҚ маркерлері негізінде *Chamaemygdalus* секциясының өсімдік түрлерінің популяцияларын салыстыру және генетикалық ерекшеліктерін бағалау негізінде 19 полиморфты SSR локустарын пайдаланып екі түрдің үлгілерін бағаладық. *A. ledebouriana* (1-UR, 2-КО, 3-КА) 60 үлгісінен *A. nana* (4-UK) 20 үлгісін анық бөлетін UPGMA филогенетикалық ағашы жасалды. Бұл нәтиже PC2 (41,2%) 4-UK үлгілерін 1-UR және 2-КО-дан бөлген, ал PC1 (49,1%) 3-КА-ны қалған үш популяциядан бөлген PCoA сюжеті арқылы да қолдау тапты. Кластерлеу барысында популяциялар арасындағы қоспаның төмен деңгейі бар екенін көрсетеді, бұл «қашықтық бойынша оқшаулау» моделін қолдайды. Гетерозиготалықтың генетикалық индексі (Ней индексі) бағалау көрсеткендей, ең жоғары генетикалық әртүрлілік *A. nana* популяциясында (0,606), ал ең төменгі көрсеткіш 3-КА популяциясында (0,449) тіркелді. Мүмкін жоғары биіктік *A. ledebouriana* генетикалық вариациясына теріс әсер ететін жеткілікті күшті экологиялық фактор болып табылады. Осыған қарамастан, 3-КА-ның 1-UR және 2-КО-дан бөлінуі түр ішіндегі генетикалық вариацияның үлкен деңгейін қолдады. 4-UK популяциясы нақты кластерді құрды және сол популяцияның бір ғана үлгісі (4-UK_07) 3-КА популяциясының үлгілерінің басымдығымен кластерге жақын орналасты. STRUCTURE пакетін қолдану арқылы популяция құрылымын бағалау *A. ledebouriana* мен *A. nana* түрдің популяциялары $K=3$ және $K=4$ кадамдарында бөліне бастады, бұл *A. ledebouriana* мен *A. nana* екі түрлі түр екенін тағы бір айғақтайды. $K=4$ бойынша төрт кластердегі үлгілерді бағалау популяциялар арасында шектеулі гендер ағынымен қашықтық бойынша оқшаулау үлгісін қолдайтын қоспаның аз деңгейін көрсетті. Осылайша, өсімдік биіктігін талдау және SSR маркерлерін қолдану *A. nana* және *A. ledebouriana* дискриминациясында және *A. ledebouriana* эндемикалық түрінің генетикалық әртүрлілігі мен популяциялық құрылымын зерттеу үшін сәтті қолданылды.

4. ITS және *matK* ДНҚ-маркер бойынша филогенетикалық шежіре дендрограммасының топологиясы бойынша III үлкен кластерге бөлінген. I кластер үш шағын субкластерді біріктіреді. Біздің филогенетикалық талдауларымыз негізінен *Chamaemygdalus* секциясына жүргізілген эволюциялық зерттеулермен сәйкес келді. Келтірілген молекулалық және морфологиялық зерттеу нәтижелері негізінде *A. ledebouriana* өсімдік түріне генетикалық жағынан *A. nana* жақын екені анықталды.

5. *A. ledebouriana* өсімдігін ұлпалық деңгейдегі *in vitro* ортасында биотехнологиялық (*ex situ*) жолымен тұрақты асептикалық каллус клеткаларын алу

регламентін жасау барысында Кинетин, Бензиламинопури́н (6-БАП), гиббереллин қышқылы (ГҚ), индоллил-3-майлы қышқылы (ИМК) сияқты фитогормондар қосылған қоректік ортада каллус түзілудің жоғары қарқыны байқалды. Кинетин концентрациясының 0,04 мг/л дейін төмендеуі төмен қарқындылыққа, бірақ түзілу жиілігіне $72,00 \pm 5,66$ % және массаның жоғарылауына әкелді. Кинетин концентрациясының жоғарылауы жасушаның бөліну тиімділігінің төмендеуіне әкелді. Каллус түзілу жиілігі $22,50 \pm 3,54$ % және $31,25 \pm 2,95$ % аралығында өзгерді. ГҚ және 6-БАП сияқты фиторегуляторлардың 0,5 мг/л орташа концентрациясы экспланттардың екі түрі бойынша $65,38 \pm 5,44$ %-дан $72,00 \pm 5,66$ %-ға дейін жоғары жиілікті берді. ИМК концентрациясын 1 мг/л дейін ұлғайту жиілікті $46,00 \pm 2,83$ % -дан $72,00 \pm 5,66$ % дейін арттырды. Бұл қоректік орталарда 15-ші күні аздаған ұлпа некрозымен тұрақты каллус түзілді. Осылайша, *in vitro* жағдайында каллус түзілу жиілігі экспланттың бірінші түрі (тұтас эмбрион) үшін $38,98 \pm 6,01$ % және экспланттың екінші түрі (ұрық тамырсыз эмбрион) үшін $46,78 \pm 6,47$ % құрады. Бұл экспланттың екінші түрі үшін $7,79 \pm 0,46$ % артық. Ұрық тамырын эмбрионнан алып тастау тамырдың және бірінші өркеннің органогенезін тежеп, каллус массасының өсуіне қоректік заттардың жиналуына мүмкіндік береді.

6. Қазақстанның Шығыс аймағындағы эндем, сирек кездесетін және құрып кету қаупі төнген *A. ledebouriana* популяцияларын қорғау және сақтау саласындағы басты мәселелерді шешуде ерекше орынды жан-жақты зерттеулер: таралу аймағы, өсімдіктердің флоралық құрамы, табиғи қорын сақтауға арналған комплексті зерттеулердің маңызы зор.

Жұмыстың апробациясы. Зерттеу нәтижелері мен қорытындылары 11 жұмыста көрсетілген, соның ішінде 5 мақала Қазақстан Республикасы Білім және ғылым саласындағы қадағалау комитеті ұсынған журналдарда, 3 мақала халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференциялардың материалдарында жарық көрді:

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Білім және ғылым саласындағы сапаны қамтамасыз ету Комитеті ұсынған журналдарда:

1. Оразов А.Е., Мырзагалиева А.Б. Новые местообитания *Amygdalus ledebouriana* Schlecht. Во флоре Восточного Казахстана. Вестник государственного университета им Шакарима г Семей. 3 1600, 2018 г., 267-270 с.

2. Оразов А.Е., Мухитдинов Н.М., Мырзагалиева А.Б., Турусбеков Е.К., Шрамко Г., Кубентаев С.А. Распространение и характеристика ценопопуляций *Amygdalus ledebouriana* Schlecht. на территории Нарымского хребта. Вестник КазНУ имени аль-Фараби, №1 (78) Серия Биологическая, 2019 г., 37-45 с.

3. Оразов А.Е., Мухитдинов Н.М., Мырзагалиева А.Б., Шрамко Г., Тустубаева Ш.Т., Каратаева А.С., Турусбеков Е.К. Rosaceae тұқымдасы *Chamaeamygdalus* секциясының екі түрінің Шығыс Қазақстанда таралуы. Вестник КазНУ имени аль-Фараби, №1 (82) Серия Биологическая, 2020 г., 75-86 с.

4. Orazov A.E., Myrzagaliyeva A.B., Zhangozhina G.M., Tustubayeva Sh.T., Karatayeva A.S. Scientific and legal aspects of preservation of rare representatives of dwarf almond section of flora in East Kazakhstan. Bulletin of the Karaganda university, Biology. Medicine. Geography series, № 2 (98), 2020г., 45-52 с.

5. №5684 Способ получения модифицированной питательной среды Мурасиге-Скуга для индукции каллусогенеза из незрелых зародышей миндаля Ледебур (*Amygdalus ledebouriana* Schlecht.).

Scopus және Web of Science деректер базасына кіретін журналдарда:

1. Orazov A. et al. Callus induction with 6-BAP and IBA as a way to preserve *Prunus ledebouriana* (Rosaceae), and endemic plant of Altai and Tarbagatai, East Kazakhstan // Biodiversitas Journal of Biological Diversity. – 2022. – Т. 23. – №. 6. (Q-3, процентиль-44) DOI: 10.13057/biodiv/d230645

2. Orazov A. et al. Flora accompanying *Prunus ledebouriana* (Schltdl.) YY Yao in the Tarbagatai State National Park in Kazakhstan //International Journal of Biology and Chemistry. – 2021. – Т. 14. – №. 1. – С. 21-34. <https://doi.org/10.26577/ijbch.2021.v14.i1.02>