

УДК 577.2.08:634.8

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ ПРАЙМЕРОВ В ГЕНОТИПИРОВАНИИ КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ ВИНОГРАДА ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ МАРКЕРАМ

К.П. Аубакирова, М.Е. Омашева, Н.А. Рябушкина, Л.В. Береснева,  
Н.Н. Галиакпаров

*РГП «Институт биологии и биотехнологии растений», Министерство образования и науки Республики Казахстан, Комитет науки, г. Алматы  
<natrya7@yahoo.com>*

В настоящей работе впервые применена и оптимизирована для винограда экономически выгодная методика генотипирования по 6 микросателлитным маркерам с использованием соответствующих пар немеченых специфических праймеров и трёх универсальных олигонуклеотидов, меченых различными флуоресцентными красителями. Данная методика использована для генотипирования ряда перспективных казахстанских сортов, родительских форм и нескольких референсных европейских сортов. Для каждого из 6-ти локусов был вычислен фактор конверсии для определения точного размера аллелей со ссылкой на референсные европейские сорта. В результате для всех европейских сортов полученные в эксперименте размеры аллелей при использовании вычисленного фактора конверсии оказались идентичны размерам в Европейской базе данных Swiss Vitis Microsatellite Database – [www1.unine.ch/svmd](http://www1.unine.ch/svmd), что подтверждает адекватность использованного метода. Анализ, проведенный по используемому исследователями винограда набору из 6-ти микросателлитных маркеров: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG62 и ssrVrZAG79 подтвердил для казахстанских сортов отношения «потомок – родитель». Освоенный и оптимизированный метод будет использован для генетической идентификации и паспортизации всего генофонда культуры винограда в Казахстане.

**Ключевые слова:** виноград, генотипирование, SSR маркеры, ДНК, ПЦР.

### ВВЕДЕНИЕ

Виноград – одна из наиболее древних и экономически значимых плодовоягодных культур в мире, используемая для получения вина, свежей и сушеной ягоды, соков, джемов и др. Южная и юго-восточная области Республики Казахстан отличаются благоприятными природно-климатическими условиями, которые позволяют получать высококачественную продукцию данной культуры. Развитие промышленного виноградарства в Казахстане началось в конце 50-х годов прошлого столетия. Урожайность достигала немногим менее 200 тыс. тонн/год. Но с 1985 года производство отрасли неуклонно снижалось в связи с антиалкогольной политикой и усугубилось переходными рыночными отношениями. Согласно Первой национальной сельскохозяйственной переписи 2006–2007 гг., площадь виноградных насаждений составила менее 9,5 тыс. га [1], при этом «Программа восстановления и развития виноградарства в Казахстане», принятая на 2001–2010 гг., предусматривала восстановление площадей под виноградниками до 26 тыс. га. Успех восстановления отрасли в Казахстане зависит от научно-обоснованного введения в культуру сортов с ценными признаками устойчивости к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам аграрно-климатической зоны Казахстана. Для укрепления сырьевой базы осуществляется замена старых виноградников, но упор при этом делается на европейские сорта. При этом самой серьезной проблемой европейских сортов *Vitis vinifera* является неустойчивость к грибковым патогенам и к низким температурам. Селекционеры Казахстана, используя традиционные методы, создали ряд сортов, в которых декларируется та или иная степень устойчивости к грибковым патогенам: оидиуму (ложной мучнистой росе), мильдью (мучнистой росе), а также устойчивость к низким температурам.

В настоящее время эффективность оценки и использования генетических ресурсов любой культуры основывается на правильной, точной характеристике сортов. Описание сортов винограда, наряду с морфологическими (ампелографии, характеризующей листья, верхушки побегов, гроздь и ягоду) и агрономическими характеристиками, включает молекулярно-генетические профили на основе молекулярных маркеров. Молекулярно-генетическая характеристика важна также при создании новых сортов, поскольку на ювенильной стадии развития до начала стадии плодоношения растения не всегда проявляют типичную выраженность

морфологии и количественных признаков. Более того, на проявление морфологии у взрослых растений влияют конкретные условия выращивания. Среди всех молекулярных маркеров микросателлиты являются наиболее информативным классом, так как они достаточно произвольно распределены по геному, нейтральны, кодоминантны, локус-специфичны и высоко полиморфны, что позволяет выявлять в одном локусе многочисленные аллели. Микросателлиты широко используются при создании генетических карт, картировании локусов количественных признаков, сортовой принадлежности, анализе родословной, в селекции, изучении генетического разнообразия и др. [2]. Для культуры винограда одним из важных приложений микросателлитов является идентификация и разграничение сортов для создания и поддержания коллекций и контроля посадочного материала [3]. Это имеет значение, поскольку существует множество синонимов сортов (<http://www.genres.de/idb/vitis/>), а также имеет место определенная степень генетической дифференциации в сортах из различных регионов выращивания [4].

Для упрощения, удешевления и ускорения процедуры генотипирования исследователи попытались определить минимальный набор микросателлитов, позволяющий оптимально разграничить сорта в коллекциях гермоплазмы [5]. Так, для характеристики разнообразия сортов винограда в Испании были использованы 6 микросателлитов VVS2, VVMD5, VVMD7, ssrVrZAG47, ssrVrZAG62 и ssrVrZAG79 [6]. Используя набор из шести маркеров при характеристике сортов винограда, исследователи предложили стратегию сравнения данных, получаемых в различных лабораториях, ссылками на аллели, выявленные в хорошо известных сортах, и декларируемыми как референсные при генотипировании [7]. В проведенных экспериментах генотипирование одинакового набора из 46 сортов в различных лабораториях с использованием различных протоколов и условий дало совпадение в 97% случаев. Соответствующая база данных представлена на <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>. Этот минимальный стандартный набор из 6-и маркеров признан международным сообществом генетиков культуры винограда, и на его основе создана база данных Vitis (SVMD, Swiss Vitis Microsatellite Database– [www1.unine.ch/svmd](http://www1.unine.ch/svmd)).

Steffens с соавторами [8] предложили метод генотипирования с использованием трех праймеров: двух специфических (прямого и обратного), фланкирующих целевую область генома, и третьего неспецифического, меченого флуорофором. Один из специфических праймеров имел на своем 5' конце «хвост» из нуклеотидов, идентичных последовательности меченого флуорофором праймера. Принцип заключается во включении комплементарной последовательности «хвоста» в ПЦР продукты в первых нескольких циклах при  $T^{\circ}$  отжига геном-специфичных олигонуклеотидов. В финальных циклах  $T^{\circ}$  отжига соответствует таковой меченого флуорофором праймера, который гибридизуется с комплементарной областью «хвоста», синтезированного ранее в химерном праймере, и это приводит к амплификации целевой области, меченой флуорофором. Сравнение результатов генотипирования идентичных образцов с использованием микросателлитных маркеров в различных лабораториях выявляет ряд несовпадений, обусловленных выпадением более длинных аллелей, неправильной идентификацией гомозиготы или гетерозиготы, «запинанием» (“stutter”) при реакции амплификации и полным несовпадением аллелей [9]. Использование меченых флуорофорами универсальных праймеров при добавлении их только в финальных циклах ПЦР снижает уровень неспецифических амплификаций [10]. Полученные продукты амплификации могут быть разделены капиллярным электрофорезом, что способствует очень точному дискриминированию аллелей по их размерам. Данный подход может быть использован как в простом, так и в мультиплекс-ПЦР. Так, Missiaggia, Grattapaglia [11] на образцах *Eucalyptus* усовершенствовали метод для его использования в мультиплекс-ПЦР, используя вместо одного универсального праймера с флуоресцентной меткой три универсальных неспецифических праймера с различными флуоресцентными метками. Blacket et al [12] комбинировали высокоразрешающие универсальные праймеры с несколькими флуорофорами в мультиплекс-ПЦР, используя различные организмы, в том числе растительные *Triglochin sp.* и *Grevillea sp.* При генотипировании винограда [13] использовались специфические, меченые флуоресцентными красителями олигонуклеотиды, что является экономически менее выгодным по сравнению с применением универсальных неспецифических меченых праймеров.

Целью настоящей работы являлась оптимизация метода генотипирования винограда на ряде перспективных казахстанских сортов с использованием стандартного набора SSR маркеров [7] и неспецифических универсальных, меченых флуоресцентными красителями олигонуклеотидов, использованных для *Eucalyptus* [11] с целью дальнейшей характеристики всего генофонда культуры винограда в Казахстане: всех возделываемых в республике столовых и винных сортов. Оптимизация SSR-генотипирования винограда заключалась в использовании трех неспецифических универсальных, меченых флуоресцентными красителями, праймеров, вместо нескольких (в нашем случае шести) меченых специфических праймеров. Для генотипирования винограда такой подход применяется впервые.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 8 отечественных и 11 зарубежных сортов из коллекции Института плодородства и виноградарства. Столовые сорта: *Алма-Ата*, *Кызыл тан*, *Айсулу*, *Мускат Казахстанский*; родители: *Жемчуг саба*, *Мускат Узбекистанский*, *Ризамат*. Технические сорта: *Илийский*, *Самал*, *Береке*, *Алмалы*; родители: *Рислинг*, *Фиолетовый ранний*, *Саперави* и в качестве референсов для сравнения размеров аллелей европейские сорта "*Каберне Фран*", "*Пино*", "*Каберне-Совиньон*", "*Оксеруа*" и "*Совиньон Блан*" (рис.1).



Зеленым выделены казахстанские сорта, розовым – родительские сорта, включенные в эксперименты по генотипированию; остальные родительские формы отсутствовали. Синим обозначены референтные сорта.

**Рис. 1.** Схемы скрещивания, в результате которых были получены казахстанские сорта

**Выделение ДНК.** Для выделения использовали по 5 образцов каждого сорта. Геномную ДНК выделяли из молодых листьев с использованием СТАВ [12] с некоторыми модификациями: 100 мг листьев растирали в охлажденной ступке в присутствии 1 мл буфера для экстракции (100 мМ Tris-HCl pH 8,0; 20 мМ EDTA, pH 8,0; 1,4М NaCl, 2% СТАВ, PVP и 2-меркаптоэтанол добавлялись перед использованием до конечной концентрации 2 и 0,2%, соответственно). Полученный гомогенат инкубировали при 60°C в течение 60 минут в водяной бане. К гомогенату добавляли 1 объем хлороформа и центрифугировали 10 минут при 10000 g. К водной фазе добавляли 0,5 объема 5М хлорида натрия и 2 объема этанола, смесь инкубировали при 4°C 15-20 минут, центрифугировали 10 минут при 13000 g. Осадок ДНК промывали 70% этанолом и растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды. Далее проводили инкубацию с RNКазой А 30 мин при 37°C. ДНК переосаждали 96% этанолом и растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды. Оценку качества и количества ДНК осуществляли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в 1x TAE буфере и по поглощению при длинах волн 260, 280 нм на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad). По соотношению поглощения 260/280нм судили о чистоте полученных препаратов ДНК. В экспериментах по генотипированию использовали препараты ДНК с показателями отношения поглощения 260/280 нм от 1,68 и до 1,87.

**Микросателлитные маркеры и условия ПЦР.** Для идентификации аллелей и соответствующей характеристики сортов винограда в работе был использован стандартный набор микросателлитных маркеров по 6-ти локусам: VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 (таблица 1) [7].

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидов, использованных в исследовании

№	Праймер	Последовательность праймера (5' к 3' концу)
1	D8S1132	VIC-ggctaggaaaggtagtgcc
2	D12S1090	NED-accacactaggaacacag
3	DYS437	FAM-gactatggcgtagtgcat
4	VVS2f	aaattcaaaatctaatcaactgg

5	VVS2r	<u>ggctaggaaggttagtgccagcccgtaaatgtatccatc</u>
6	VVMD5f	tataccaaaaatcatattcctaaa
7	VVMD5r	<u>ggctaggaaggttagtgccctagagctacccaatccaa</u>
8	VVMD7f	agagttgctggagaacaggat
9	VVMD7r	<u>gactatggcgtagtgcatcgaaccttcacacgcttgat</u>
10	VVMD27f	gtaccagatctgaatacatccgtaagt
11	VVMD27r	<u>ggctaggaaggttagtgccacgggtatagcaaacgggtg</u>
12	VrZAG62f	ggtgaaatgggcaccgaacacacgc
13	VrZAG62r	<u>accaacctaggaacacagccatgtctctcctcagctctcagc</u>
14	VrZAG79f	agattgtggaggagggaacaaccg
15	VrZAG79r	<u>accaacctaggaacacagtgcccccatttcaaacctcctcc</u>
Примечание - D8S1132, D12S1090, DYS437 – неспецифические микросателлиты, использованные в качестве «хвостов», VIC, NED, FAM – флуоресцентные метки		

ПЦР проводили в два этапа. Первичный ПЦР в объеме 20 мкл содержал 2 мкл 10x Таq Буфера (750 mM Tris HCl, pH 8,8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% Tween 20), 2 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мкл 10 mM смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP), 0,2 mM прямого (f) и обратного (r) олигонуклеотидов используемого маркера (таблица 1), 13,7 мкл деонизированной стерильной воды и 1 единицу Таq полимеразы. Концентрация геномной ДНК составляла 40-60 нг/20 мкл.

Аmplификацию проводили по следующей программе: один цикл 2 мин. при 94°C; 7 циклов, состоящих из следующих ступеней – 1 мин. при 94°C, 2 мин. при 60°C и 2 мин. при 72°C; 20 циклов – 1 мин. при 94°C, 2 мин. при 54°C и 2 мин. при 72°C; и в заключение 1 цикл 10 мин. при 72°C. По завершении программы амплификации, 5 мкл результат каждой ПЦР проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле.

При наличии ожидаемых продуктов, остаток продукта ПЦР реакции разбавляли в 10 раз водой и 1 мкл использовали для вторичного ПЦР. Состав реакции вторичного ПЦР был идентичен первичному за исключением обратных олигонуклеотидов. В качестве обратных для VVS2, VVMD5 и VVMD27 локусов использовались D8S1132, для VrZAG62, для VrZAG79 - D12S1090, и для VVMD7 - DYS437.

Программа амплификации также была идентична первичному ПЦР, за исключением продолжительности последней стадии элонгации, которая была увеличена с 10 до 30 минут. По окончании ПЦР продукты реакции шести маркеров одного образца объединяли и смешивали с формамидом и стандартом размеров, меченных красителем LIZ (Size standard 500 LIZ Applied Biology), общий объем смеси составлял 10 мкл, в котором продукты ПЦР с флуоресцентным красителем VIC были разбавлены в 540 раз; NED – 120 раз и FAM – 360 раз.

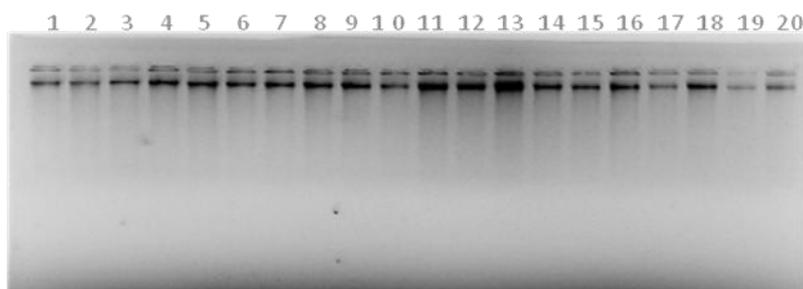
Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР проводили на ДНК анализаторе ABI Prizm 310 (Applied Biosystems). Для обработки электрофореграмм использовали программу Gene Mapper 4.0. Статистический анализ и обработку данных проводили вручную.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения полимеразной цепной реакции необходима ДНК, свободная от примесей, ингибирующих реакцию амплификации и/или снижающих воспроизводимость результатов. Препараты ДНК для ПЦР должны быть свободны от нуклеаз (которые деградируют как матричную, так и амплифицируемую ДНК); эндо- и экзопротеаз (которые способны инактивировать термостабильную ДНК-зависимую ДНК полимеразу); свободны от белков, стабилизирующих двойную хеликс-структуру ДНК, и тем самым предотвращающих «расплетание» ДНК и присоединение праймеров. Следует помнить, что низкое качество или малое количество ДНК образцов (templates) может обуславливать выпадение аллелей, ошибочно интерпретируемое как гомозигота [8].

С целью выявления наиболее оптимального метода выделения ДНК из листьев винограда предварительно были испытаны пять различных протоколов. По результатам сравнительного анализа их эффективности для листьев винограда оказался наиболее предпочтительным метод Doyle and Doyle [14], по которому ДНК различных сортов винограда была выделена и сохранена

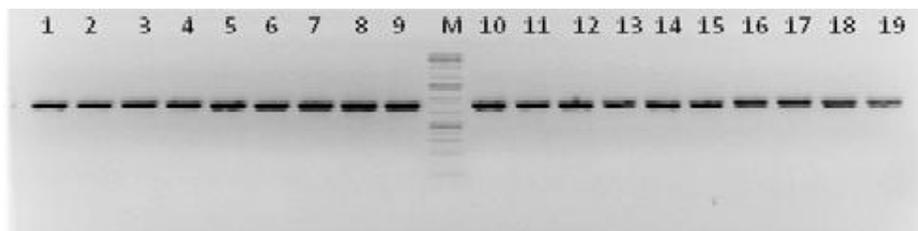
при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . На рисунке 2 представлены электрофореграммы в агарозном геле образцов ДНК, выделенных из молодых листьев винограда.



1-20 – ДНК анализируемых образцов

**Рис. 2.** Электрофорез в агарозном геле ДНК, выделенной из молодых листьев винограда

С целью проверки отсутствия ингибиторов ПЦР в полученных образцах ДНК была проведена пробная амплификация с использованием олигонуклеотидов, специфичных к гену 18S рибосомальной РНК. Представленная на рисунке 3 электрофореграмма продуктов ПЦР подтверждает отсутствие ингибиторов в полученных препаратах ДНК.



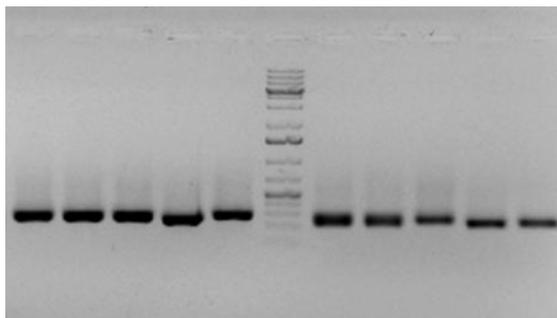
1-19 – продукты ПЦР фрагмента гена 18S анализируемых образцов; M – ДНК маркер GeneRuler™ 1kb (Fermentas)

**Рис. 3.** Амплификация фрагмента гена 18S рибосомальной РНК

Для получения микросателлитных профилей анализируемых сортов был использован набор праймеров, приведенных в таблице 1. С использованием 4-го по 15-й праймеры проводился первичный ПЦР. Обратный праймер (№5, 7, 9, 11, 13 и 15), каждой из шести пар, имел добавочную последовательность на 5'-конце, адаптер, идентичный последовательности одного из меченных флуоресцентным красителем олигонуклеотидов (№1, 2 или 3). Во вторичном ПЦР использовались те же прямые праймеры, а в качестве обратных – меченые флуоресцентными красителями праймеры. На рисунке 4 показан образец электрофореза продуктов вторичного ПЦР десяти образцов. Полученные вторичные ПЦР продукты по шести маркерам одного образца объединялись и разделялись с помощью капиллярного электрофореза на ДНК анализаторе ABI Prizm 310.

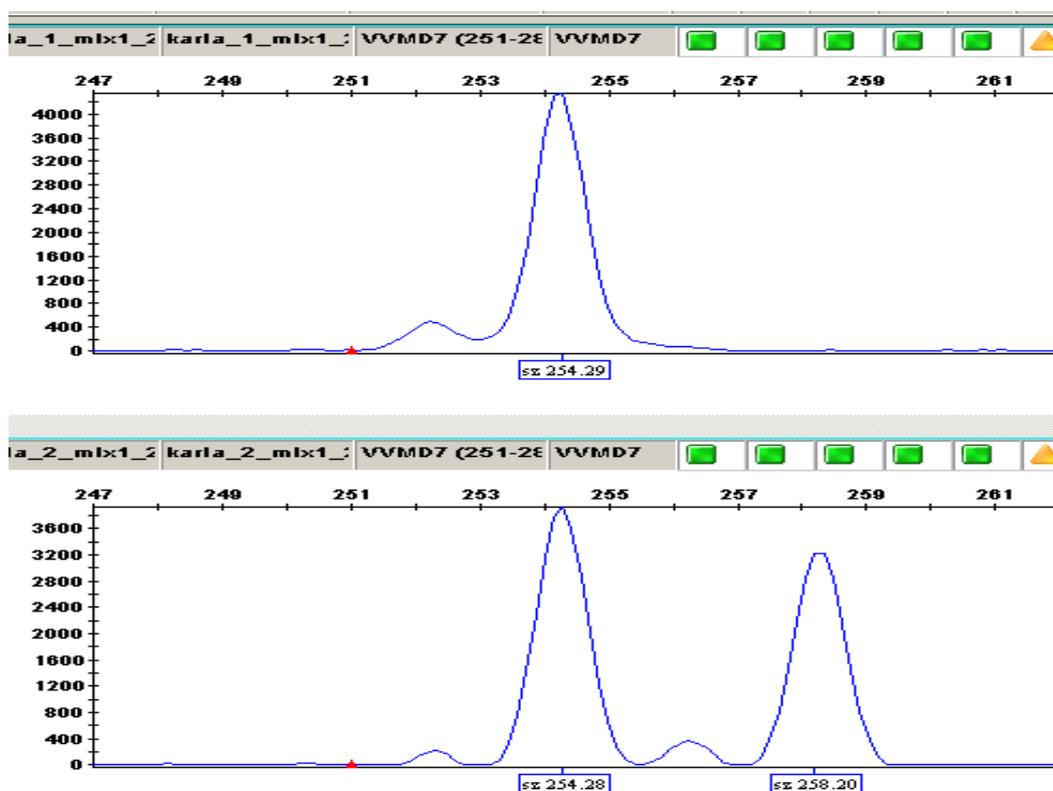
Для обработки полученных первичных данных и определения точного размера каждого продукта использовалась программа GeneMapper 4.0. В качестве примера на рисунке 5 представлено сравнение размеров аллелей двух образцов с использованием маркера VVMD7. На рисунке 6 показана электрофореграмма продуктов ПЦР сорта Совиньон Блан с использованием пяти маркеров и трех флуорофоров.

В ряде работ было установлено, что технические ошибки, такие как использование разных капиллярных систем, флуоресцентных меток, гель-матриц для фрагментного анализа, а также такие распространенные ошибки генотипирования, как присутствие нулевых аллелей, амплификация преимущественно меньшей аллели, высокий “stutter” могут повлиять на правильность определения абсолютного размера аллелей [15]. Систематическая ошибка, обусловленная электрофоретической подвижностью флуоресцентно-меченых фрагментов, может быть скорректирована факторами конверсии, которые должны быть определены для каждого отдельного локуса в каждой электрофоретической системе [8]. Факторы конверсии позволяют привести первоначально полученные размеры каждого набора аллелей к их истинным размерам (определенным с помощью клонирования и анализа нуклеотидных последовательностей и представленным в базах данных).

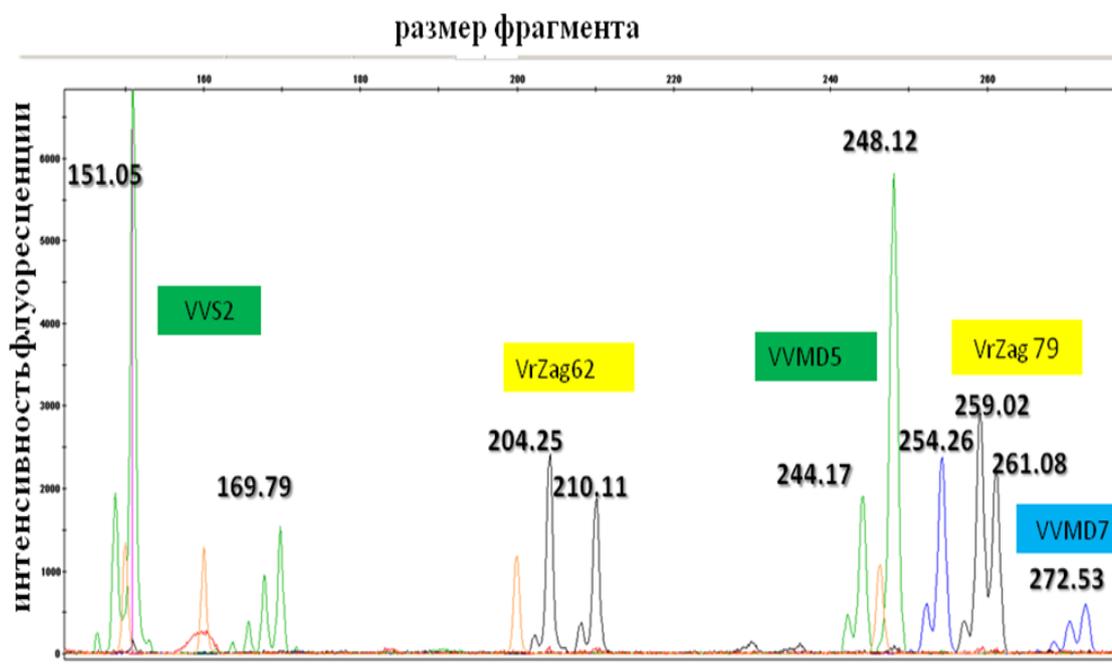


1-10 анализируемые образцы; М – ДНК маркер GeneRuler™ 1kb (Fermentas)

**Рис. 4.** Электрофореграмма в 1% агарозном геле продуктов вторичного ПЦР с использованием праймеров для локуса VVS2



**Рис. 5.** Электрофореграмма продуктов вторичного ПЦР двух образцов с использованием маркера VVMD7 (обработано в программе GeneMapper 4.0)



Оранжевые пики – стандарты размеров 150, 160, 200, 250 п.н. (GeneScan – LIZ Standard). Согласно рекомендации производителя, стандарт 250 п.н не следует учитывать ввиду его чувствительности к незначительным колебаниям температуры

Рис. 6 Электрофореграмма продуктов вторичного ПЦР сорта Совиньон Блан с использованием пяти маркеров винограда и трех флуорофоров (обработано в программе GeneMapper 4.0)

Таблица 2. Фактор конверсии для каждого из локусов на основе данных для референсных сортов Каберне Совиньон и Пино

Локус	Абсолютные размеры аллелей (Swiss Vitis Microsatellite Database)		Размеры аллелей, полученных в эксперименте, включая последовательность «хвоста»		Фактор конверсии
	Каберне Совиньон	Пино	Каберне Совиньон	Пино	
VVS2	151/139	151/137	169/157	169/155	-18
VVMD5	240/232	238/228	256/248	254/244	-16
VVMD7	239/239	243/239	255/255	259/255	-16
VVMD27	189/175	189/185	207/193	207/203	-18
VrZAG62	195/189	195/189	211/205	211/205	-16
VrZAG79	247/247	245/239	261/261	259/253	-14

В настоящей работе за абсолютный размер аллелей принимали размеры аллелей европейских сортов из Swiss Vitis Microsatellite Database, и для каждого локуса определялся фактор конверсии по разнице между размерами аллелей, полученными в эксперименте, включающими размер «хвоста» (таблица 2) и размерами в базе данных.

В качестве соответствующего контроля факторов конверсии в настоящей работе было проведено генотипирование нескольких европейских сортов. В таблице 3 представлены размеры референсных аллелей соответствующих локусов европейских сортов Каберне Фран, Каберне Совиньон, Совиньон Блан, Пино и Оксеруа, полученных в настоящей исследовании и скорректированных с помощью полученных факторов конверсии соответствующих локусов. В результате для всех европейских сортов полученные размеры аллелей оказались идентичны размерам, найденным в базе данных Swiss Vitis Microsatellite Database – www1.unine.ch/svmd (таблица 3). Очевидно, что для сорта Каберне Савиньон набор аллелей для 6-ти маркеров,

использованных в генотипировании, включает соответствующие аллели родителей Каберне Фран и Совиньон Блан.

**Таблица 3.** Молекулярно-генетическая характеристика референсных европейских сортов по 6-ти микросателлитным маркерам

Сорт		Аллели микросателлитных локусов, размеры в п.н.					
		VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VrZAG62	VrZAG79
Каберне	*	147/139	240/226	263/239	189/181	205/195	259/247
Фран	Каз	147/139	240/226	263/239	189/181	205/195	259/247
Совиньон	*	151/133	232/228	257/239	189/175	195/189	247/245
Блан	Каз	151/133	232/228	257/239	189/175	195/189	247/245
Каберне	*	151/139	240/232	239/239	189/175	195/189	247/247
Совиньон	Каз	151/139	240/232	239/239	175/189	195/189	247/247
Пино	*	151/137	238/228	243/239	189/185	195/189	245/239
	Каз	151/137	238/228	243/239	189/185	195/189	245/245
Оксеруа	*	151/133	238/234	243/239	189/181	197/189	245/243
	Каз	151/133	238/234	243/239	189/181	197/189	245/243

\*- Swiss Vitis Microsatellite Database – [www1.unine.ch/svmd](http://www1.unine.ch/svmd)

В таблице 4 приведены результаты анализа по 6 микросателлитным локусам: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 и VrZAG79 сортов винограда Казахстанской селекции и их родителей. Хотя не все родительские формы были доступны, анализ подтвердил отношение родитель – потомок для казахстанских сортов. Так, генотип сорта Илийский несет по 50% общих аллелей с родительскими сортами Саперави и Рислинг. Сорта Алмалы, Береке и Самал имеют в каждом локусе один общий аллель с родительским сортом Илийский. При этом в трех локусах сорта Алмалы и Береке получили аллели через Илийский от сорта Рислинг; аллель локусов VVMD27 и VrZAG79 – во всех трех сортах – от Саперави; аллель VrZAG62 в Алмалы также от Саперави. Для сорта Северный, образцы которого не были доступны на момент исследования, можно косвенно определить размеры большинства аллелей: по локусу VVS2 следующие размеры 129/135; VVMD5 – 236/X; VVMD7 – 247/X; VVMD27 – 179/X; VrZAG62 – 203/X и для VrZAG79 – 253/X, где X – неизвестный размер второго аллеля.

**Таблица 4.** Молекулярно-генетическая характеристика Казахстанских сортов с использованием 6 микросателлитных маркеров (размеры ПЦР-фрагментов указаны в парах нуклеотидов)

Сорт	Аллели микросателлитных локусов, размеры в п.н.					
	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VrZAG62	VrZAG79
<i>Алмалы</i> (Илийский х Фиолетовый ранний)	129/143	226/232	239/249	175/189	183/187	253/259
Илийский	143/147	226/240	239/257	185/189	187/193	243/259
Фиолетовый ранний	129/149	232/236	241/249	175/177	183/185	253/257
<i>Илийский</i> (Саперави х Рислинг)	143/147	226/240	239/257	185/189	187/193	243/259
Рислинг	143/151	226/234	249/257	177/185	193/203	243/245
Саперави	133/147	224/240	239/239	185/189	187/199	243/259
<i>Береке</i> (Илийский х Северный)	129/143	226/236	247/257	179/189	193/203	253/259
Илийский	143/147	226/240	239/257	185/189	187/193	243/259
<i>Самал</i> (Илийский х Северный)	135/147	236/240	247/257	179/189	193/203	253/259

<b>Кызыл тан</b> (Ризамат х Легкий аромат)	151/ <b>157</b>	236/ <b>240</b>	<b>235</b> /249	<b>175</b> / <b>175</b>	185/ <b>187</b>	<b>245</b> /253
<b>Алма–Ата</b> (Ризамат х Дружба)	153/ <b>157</b>	228/ <b>240</b>	<b>235</b> /239	<b>175</b> /181	<b>195</b> /203	249/ <b>255</b>
Ризамат	153/ <b>157</b>	228/ <b>240</b>	<b>235</b> /253	<b>175</b> /191	<b>187</b> / <b>195</b>	<b>245</b> / <b>255</b>
<b>Айсүлу</b> (Жемчуг саба х Ягдона белая)	<b>133</b> /135	<b>236</b> / <b>236</b>	243/ <b>247</b>	<b>175</b> /191	195/ <b>203</b>	249/ <b>253</b>
Жемчуг саба	<b>133</b> /157	<b>236</b> / <b>236</b>	<b>247</b> /251	<b>175</b> /177	183/ <b>203</b>	<b>253</b> /257
<b>Мускат Казахстанский</b> (Мадлен Анже-вин х Мускат Александрийский + Мускат Узбекистанский)	137/145	228/234	243/247	<b>175</b> /191	<b>187</b> /195	<b>245</b> /255
Мускат Узбекистанский	133/157	232/240	251/253	<b>175</b> / <b>175</b>	183/ <b>187</b>	<b>245</b> /253

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характеристика генетических ресурсов с помощью молекулярных маркеров становится все более общепринятой мировой практикой. Сравнение приведенных в данной работе результатов по генотипированию нескольких казахстанских сортов с использованием набора из 6-ти стандартных специфических SSR маркеров в сочетании с неспецифическими универсальными флуоресцентно-мечеными праймерами, с результатами, полученными для ряда широко известных европейских сортов, для которых размеры соответствующих аллелей определены с помощью сиквенс-анализа, позволяет судить об обоснованности планируемого использования данного протокола для генетической сертификации генофонда винограда в Казахстане.

Работа выполнена в рамках Гранта 0048/ГФ по подприоритету: «Исследования в области продовольственной безопасности» Бюджетной программы 055, финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан».

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Итоги Первой национальной сельскохозяйственной переписи 2006-2007 гг. / Сельское хозяйство Казахстана. – Астана, 2008. – Т. 1, Ч. 2. – С. 94.*
2. Zalapa J.E., Cuevas H., Zhu H., Steffan Sh., Senalik D., Zeldin E., Mccown B., Harbut R., and Simon Ph. *Using Next-Generation Sequencing Approaches To Isolate Simple Sequence Repeat (Ssr) Loci In The Plant Sciences // American Journal of Botany. – 2012. – Vol. 99. – P. 193-208.*
3. Sefc K.M., Dias E.E., Steinkellner H., Machado M.L.C., Machado A.C. *The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – Vol. 99. – P. 733-739.*
4. Lopes M.S., Sefc K.M., Lopes M.S., Lefort F., Botta R., Roubelakis-Angelakis K.A., Ibáñez J., Pejić I., Wagner H.W., Glössl J., Steinkellner H. *Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars // Theor Appl Genet. – 2000. – Vol. 100. – P. 498-505.*
5. Martin F. *An application of kernel methods to variety identification based on SSR markers genetic fingerprinting // BMC Bioinformatics. – 2011. - Vol. 12:177.*
6. Martín J.P., Borrego J., Cabello F., Ortiz J.M. *Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers // Genome. – 2003. – Vol. 46. – P. 10-8.*
7. This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl. C. Eisenheld F. Ferreira-Monteiro. S. Grando. J. Iba.ñ ez T. Lacombe. V. Laucou. R. Magalhã es G.S., Meredith C.P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. *Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theor Appl Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 1448-1458.*
8. Steffens D.L., Sutter S.L., Roemer S.C. *An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13 // Biotechniques. – 1993. – Vol. 15. – P. 580–582.*

9. Baric S., Monschein S., Hofer M., Grill D. and Dallavia J. Comparability of genotyping data obtained by different procedures - an inter-laboratory survey // *Journal of Hort. Science and Biotechnology*. – 2008. – №83(2). – P. 183-190.

10. de Arruda M.P., Goncalves E.C., Schneider M.P.C., da Costa da Silva A.L., Morielle-Versute E. An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications // *Mol Biol Rep*. – 2010. – Vol. 37. – P.2031–2036.

11. Missiaggia A., Grattapaglia D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers // *Genetics and Molecular Research*. – 2006. – Vol. 5. – P. 72-78.

12. Blacket M.J., Robin C., Good R.T., Lee S.F., Miller A.D. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence // *Molecular Ecology Resources*. – 2012. – Vol.12. – P.456–463.

13. Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., R. Töpfer. Rpv10: a new locus from the Asian Vitis gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine // *Theor Appl Genet*. – 2012. - Vol.124. – P.163–176.

14. Doyle J.J. and Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. –1990. – Vol. 12. – P.13-15.

15. Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions // *Nature Reviews |Genetics*. – 2005. – Vol. 6. – P. 847-859.

## ТҮЙІН

Бұл жұмыста алғашқы рет жүзім дақылдарына экономикалық тұрғыдан тиімді, генотипирлеу әдісі таңбаланбаған спецификалық тиісті жұп праймерлерді және әр түрлі флуоресцентті бояғыштармен таңбаланған үш әмбебап олигонуклеотидтерді пайдалану арқылы 6 микросателлитті маркерлер қолданылған және оңтайландырылған. Бұл генотипирлеу әдісі бір қатар аса маңызды қазақстандық жүзім сорттарына, олардың аналық түрлеріне және де бірнеше европалық сорттарға жүргізілді. Әр бір 6 локустың аллелдерінің нақты мөлшерін анықтау үшін европалық сорттарға жүгіне отырып, конверсия факторы анықталды. Нәтижесінде, тәжірибеде конверсия факторын қолдану арқылы жүргізілген барлық европалық сорттардың аллелдерінің мөлшері Swiss Vitis Microsatellite Database – [www1.unine.ch/svmd](http://www1.unine.ch/svmd) Европалық база мәліметтеріндегі аллелдердің мөлшерімен тең келді, бұл әдістің дұрыс жасалғанын дәлелдейді. VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG62 және ssrVrZAG79 6 микросателлитті локустармен жүргізілген анализ, қазақстан сорттарының «ұрпақ – ата-ана» байланысын дәлелдеді. Осы игерілген және оңтайландырылған әдіс Қазақстандағы барлық жүзім дақылдарының тектік қорын генетикалық сәйкестендіру және төлқұжаттау үшін қолданылатын болады.

**Кілттік сөздер:** генотипирлеу, ssr маркерлер, жүзім, ДНК, ПТР.

## SUMMARY

Programs and Regulations of Kazakhstan Government are aimed to recover the vineyards area from 9500 to 26 000 ha, productivity up to 220 000 tons. The success of viticulture industry in Kazakhstan depends on selection and introduction of modern commercial grapevine cultivars resistant to biotic and abiotic stresses of the agro-climatic zones of Kazakhstan. Kazakhstan breeders developed traditionally a number of table and wine *V. vinifera* varieties, some of which declared as cold resistant and resistant to the most destructive grapevine pathogens. Modern characteristics of grape varieties, along with morphological and agronomic features include molecular genetic profiles based on molecular markers. Microsatellites are most widely used for the identification and differentiation of grapevine varieties. Researchers have identified a minimal set of microsatellites, allowing optimal differentiation of varieties in germplasm collections.

In this paper, for the first time for grape genotyping the method with loci markers VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG62 and ssrVrZAG79 was combined and optimized using three universal unspecific oligonucleotides with different fluorescent dyes. This technique has been used for genotyping a number of Kazakhstan' varieties, their parents and some European reference varieties. For each of the 6 loci the conversion factor has been calculated to determine the exact size of the alleles. As a result, the sizes of alleles determined in the experiment were adequate to the alleles in the European database Swiss Vitis Microsatellite Database. The analysis confirmed for Kazakhstan's varieties parent-offspring relationship. The method will be used for genetic certification of grapevine varieties in Kazakhstan.

**Keywords:** grape, genotyping, ssr markers, DNA, PCR.