

АУБАКИРОВА К.П.^{1,2}, РЯБУШКИНА Н.А.², ТАЖИБАЕВ Т.С.¹, ГАЛИАКПАРОВ Н.Н.²

1.Казахский национальный аграрный университет, Алматы

2.РГП «Институт биологии и биотехнологии растений», Алматы

ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОРТОВ ВИНОГРАДА КАЗАХСТАНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ И ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ МИКРОКЛОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR И ISSR МАРКЕРОВ

Аннотация

Впервые в Казахстане отработан метод паспортизации сортов винограда на основе SSR-ПЦР. Метод включает протокол выделения ДНК и условия проведения ПЦР реакции. Составлены паспорта 13 сортов винограда, полученных селекционерами Казахстана, с использованием стандартного набора из 6-и SSR маркеров. Установлена степень генетической дифференциации сортов. Из полученных ранее микроклональных растений ряда казахстанских сортов с использованием различных эксплантов: изолированных меристем, спящих почек и апексов побегов – и высаженных в полевые условия выделена ДНК. С использованием 6-и SSR и 9-и ISSR маркеров проведено генотипирование полученных исходных сортов и микроклонов для подтверждения сортовой идентичности или/и выявления возможных сомаклональных вариантов полученных растений. Генотипирование подтвердило идентичность всех полученных микроклонов исходным сортам.

Ключевые слова: виноград, микроклоны, ДНК, SSR, ISSR, ПЦР, паспортизация.

Тірек сөздері: жұзім, микроклон, ДНК, SSR, ISSR, ПЦР, паспортизациялау.

Keywords: grapes, micropagation, DNA, SSR, ISSR, PCR certification.

Введение

Виноград – многолетняя вегетативно размножаемая наиболее возделываемая в мире плодово-ягодная культура. Эффективность оценки и использования генетических ресурсов любой культуры основываются на правильной, точной характеристике сортов. Описание сортов винограда, опирающееся на морфологические (ампелография, характеризующая форму листьев, верхушек побегов, гроздьев и ягоды) и агрономические характеристики, в ряде случаев может быть

неудовлетворительным в силу клonalной вариабельности культуры и влияния условий выращивания. В настоящее время сортовые характеристики включают молекулярно-генетические профили на основе молекулярных маркеров. Молекулярно-генетическая характеристика важна при создании новых сортов, поскольку до стадии плодоношения растения не всегда проявляют типичную выраженную морфологию и отдельных количественных признаков. Более того, на проявление сортовых особенностей взрослых растений в определенной степени могут влиять конкретные условия выращивания [1]. В основе многовекового отбора и сортового разнообразия вегетативно размножаемой культуры винограда лежит клonalная изменчивость. В связи с этим нередки выявления множества синонимов сортов, имеющих первоначально одну генетическую основу. С другой стороны, нередки также случаи одинакового названия неидентичных генотипов (гомонимы). Среди молекулярных маркеров: RAPD, RFLP, AFLP, SSR и их производных микросателлиты до последнего времени являются наиболее широко используемым и информативным классом при генотипировании сортов. Причиной этому их особенности: достаточно произвольное распределение по геному, нейтральность, кодоминантность, локус-специфичность и высокая полиморфность. Все это позволяет выявлять в одном локусе многочисленные аллели и на этой основе идентифицировать и разграничивать сорта, создавать и поддерживать коллекции и контролировать посадочный материал [2].

Соответствие генотипу важно при подборе родительских пар при скрещиваниях, а также при юридической защите вновь созданных сортов, при закладке промышленных виноградников, производстве вина, соответствующего требованиям производителя и потребителя [3,4]. Основным условием при микроклональном размножении уникальных клонов и биотипов является сохранение генетических характеристик. При коммерческом микроклональном размножении из-за наличия клonalных вариаций исходных растений генетическое единство всех микроклонов не может быть гарантировано. Наряду с этим причины вариабельности в самой культуре *in vitro* могут быть обусловлены компонентами среды и проявляться мутациями, изменениями в метилировании ДНК и др. Действие химических компонентов культуральной среды на генетический материал, а также выживание вариантов в неселективной среде увеличивает многократно скорость мутаций по сравнению с растущими в полевых условиях популяциями [5]. Эпигенетические изменения в микроклонально размножаемых растениях, которые лежат в основе феноменов культуры ткани, изучены больше на уровне метилирования ДНК [6]. Установлено, что источник экспланта и метод регенерации микроклона может оказывать существенное влияние на генетическую стабильность использованного вида растения [7,8]. Применение молекулярных маркеров в той или иной степени позволяет подтвердить гомогенность полученного материала или выявить микроклональную изменчивость.

Согласно казахстанским селекционером перспективные сорта отечественной селекции несут в себе такие ценные характеристики как устойчивость к обуславливающим серьезный экономический ущерб грибковым патогенам: оидиуму, милдью, а также морозоустойчивость. Среди них сорта высокоустойчивые Береке, Самал, среднеустойчивые Алмалы, Рахат, относительно высокозимостойкие сорта Айсулу и Кара коз.

Целью нашего исследования являлась молекулярно генетическая дифференциация казахстанских сортов и подтверждение соответствия исходным сортам полученных микроклонов с использованием 6-и SSR маркеров; 9 ISSR маркеров были использованы для выявления возможной сомаклональной внутрисортовой изменчивости.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили 13 отечественных сортов из ампелографической коллекции Института плодоводства и виноградарства (Энбекши Казахский район, Алма-атинская область). Столовые сорта: *Алма-Ата*, *Кызыл тан*, *Айсулу*, *Мускат Казахстанский*, *Ак марал*, *Арман*, *Кара коз*; Технические сорта: *Илийский*, *Самал*, *Береке*, *Алмалы*, *Рахат*, *Тянь Шаньский*.

Выделение ДНК. Для анализа 13 сортов, использованных в дальнейшем в ПЦР со стандартным набором из 6-и микросателлитов, для выделения ДНК с пяти растений брали молодые листья, которые хранили в замороженном состоянии при -80°C или высушивали на силикагеле. В предварительных экспериментах 5 протоколов для выделения ДНК были испытаны на свежих листьях, молодых верхних частях стеблей и высушенных листьях [9]. В результате был выбран протокол [10]. Для ISSR анализа ДНК выделяли из пяти случайно выбранных микроклональных

растений для каждого сорта. Во всех дальнейших экспериментах использовали ДНК с показателями отношения поглощения при длинах волн 260/280 от 1,68 до 1,87 (спектрофотометр Smart SpecPlus, Bio-Rad).

Качество образцов ДНК проверяли также в ПЦР амплификации 18S рибосомальной ДНК, используя следующие праймеры: f 5'-GAGAAACGGCTACCACATCCAAGG-3'; 5'-rCCATGCACCACCCATAGAATC-3'. Ожидаемый размер продукта был 870.

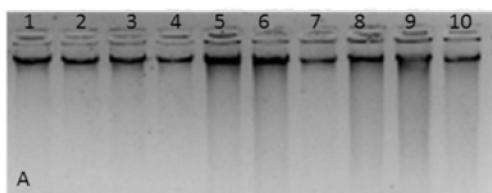
Для идентификации аллелей и соответствующей характеристики сортов винограда в работе был использован стандартный набор микросателлитных маркеров по 6-ти локусам: VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 [11] и 9 ISSRмаркеров: (CA)₆-RY, (CA)₆-RG, (CT)8-RG, (GA)8-H, (CA)8-D,BDB- (CA)7,VHV- (GT)7, DBD-(AC)7, (AG)8-B [12]. Реакционная среда и режим амплификации для SSR маркеров согласно [13].

Реакционная среда для ISSR-амплификации объемом 25 мкл включала 2,5мкл 10xTaq Буфера (750 mM TrisHCl, pH 8.8, 200mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Tween 20), 2,5мкл 25 mM MgCl₂, 0.5мкл 10 mM смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP), 10ММ олигонуклеотидов используемого маркера, 15.4 мкл деонизированной стерильной воды и 1 единицу Taq полимеразы. Концентрация геномной ДНК составляла 40-60 нг/25 мкл. Амплификацию проводили при следующем режиме: начальная денатурация двухцепочечной ДНК – 2 мин. при 94°C; 35 циклов: 94°C – 40 сек., отжиг – 45сек. при 46, 47°C (температура отжига – в зависимости от используемых в анализе ISSR-праймеров), элонгация – 1,5 мин. при 72°C, конечный этап – элонгация 15 мин. при температуре 72°C. Электрофорез продуктов амплификации, полученных в результате ISSR-PCR, проводили в 2%-ном агарозном геле, после окрашивания в этидиум бромиде визуализировали при УФ-свете с использованием гель-документирующей системы BioRad.

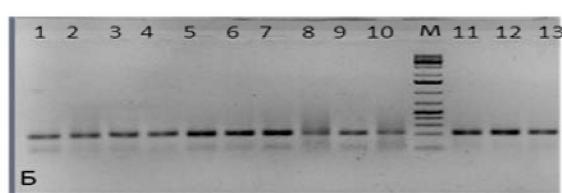
Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР проводили на ДНК анализаторе ABIPrizm 310 (Applied Biosystems). Для обработки электрофореграмм использовали программу CeneMapper 4.0. Статистический анализ и обработку данных проводили вручную.

Результаты и обсуждение

В целях получения нативной ДНК были испытаны пять различных протоколов [9]. По результатам сравнительного анализа их эффективности для листьев винограда оказался оптимальным метод Doyle и Doyle [10]. ДНК различных сортов винограда была выделена из молодых листьев и сохранена при температуре -80°C. На рисунке 1А представлены электрофореграммы в агарозном геле образцов ДНК, выделенных из молодых листьев 10-и анализируемых сортов винограда.



А-1-10 – ДНК различных анализируемых сортов



Б- 1-13 анализируемые сорта, М – ДНК маркер GeneRuler™ 1kb (Fermentas)

А – ДНК; Б – продукты вторичного ПЦР

Рис. 1.Электрофореграмма в 1 % агарозном геле и с использованием праймеров для локуса VVMD27

Полученные продукты амплификации для 6-и микросателлитов (Рис.1Б, продукт амплификации локуса VVMD27) проанализированы с помощью капиллярного электрофореза с определением размеров аллелей. За абсолютные размеры принимали размеры аллелей европейских сортов из SwissVitisMicrosatelliteDatabase и для каждого локуса определялся фактор конверсии по разнице между размерами аллелей, полученными в эксперименте (включая размер адаптера), и размерами аллелей соответствующих локусов в базе данных. В Таблице 1 приведены результаты анализа по 6

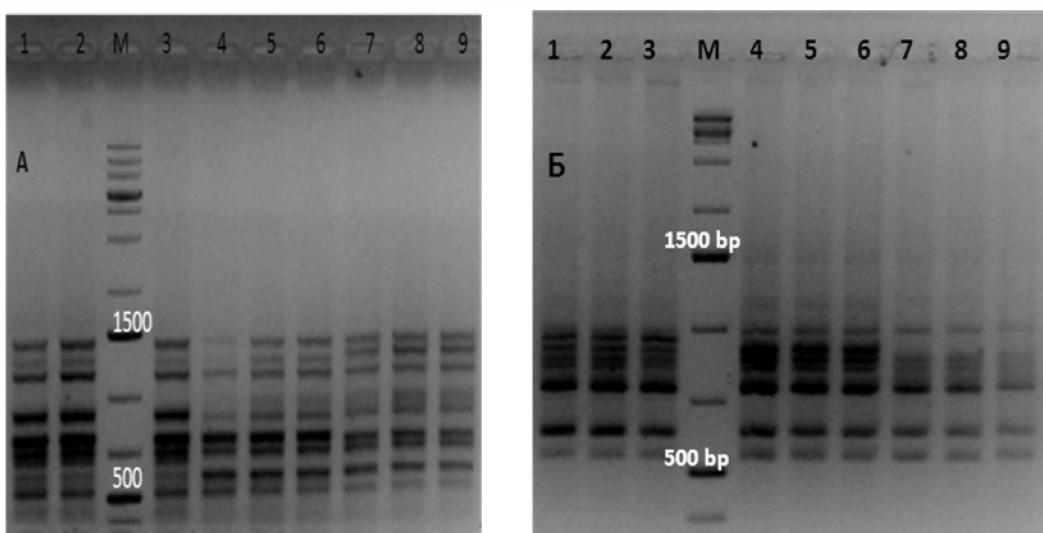
микросателлитным локусам VVS2 ,VVMD5, VVMD7, VVMD 27, VrZAG62 и VrZAG79 – для 13-ти сортов винограда Казахстанской селекции (полужирный шрифт), а также для микроклональных растений, полученных из различных эксплантов данных сортов.

Таблица 1 – Молекулярно-генетическая характеристика Казахстанских сортов винограда с использованием 6 микросателлитных маркеров (размеры ПЦР-фрагментов указаны в парах нуклеотидов ±1)

Сорт (эксплант)		Аллели микросателлитных локусов, размеры в п.н					
		VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VrZAG62	VrZAG79
1	2	3	4	5	6	7	8
Алмалы (меристема, почки)	*	131/145	228/234	239/249	181/195	189/191	253/259
	после <i>in vitro</i>	131/145	228/234	239/249	181/195	189/191	253/259
Акмарал (почки)	*	135/145	236/238	239/247	183/195	189/205	259/259
	после <i>in vitro</i>	135/145	236/238	239/247	183/195	189/205	259/259
Айсулу (апексы)	*	135/137	238/238	243/247	181/197	199/207	249/253
	после <i>in vitro</i>	135/137	238/238	243/247	181/197	199/207	249/253
Алма ата(апексы)	*	155/159	230/242	233/239	181/187	199/207	249/255
	после <i>in vitro</i>	155/159	230/242	233/239	181/187	199/207	249/255
Арман (почки)	*	133/155	234/238	249/253	181/183	187/189	255/259
	после <i>in vitro</i>	133/155	234/238	249/253	181/183	187/189	255/259
Береке (апексы, почки)	*	130/145	228/238	247/257	185/195	197/207	253/259
	после <i>in vitro</i>	130/145	228/238	247/257	185/195	197/207	253/259
Илийский (меристема, почки)	*	145/147	228/242	239/257	191/195	191/197	243/259
	после <i>in vitro</i>	145/147	228/242	239/257	191/195	191/197	243/259
Кара коз (апексы)	*	135/137	228/238	243/247	181/195	189/195	247/257
	после <i>in vitro</i>	135/137	228/238	243/247	181/195	189/195	247/257
Кызыл тан (меристема)	*	153/159	238/242	233/249	181/181	189/191	245/253
	после <i>in vitro</i>	153/159	238/242	233/249	181/181	189/191	245/253
Мускат Каз. (апексы)	*	139/145	230/236	243/247	181/197	191/199	245/255
	после <i>in vitro</i>	139/145	230/236	243/247	181/197	191/199	245/255
Рахат (меристема)	*	135/155	230/236	247/247	187/213	205/205	247/251
	После <i>in vitro</i>	135/155	230/236	247/247	187/213	205/205	247/251
Самал (апексы)	*	137/147	238/242	247/257	185/195	197/207	253/259
	после <i>in vitro</i>	137/147	238/242	247/257	185/195	197/207	253/259
Тянь Шаньский (почки)	*	133/135	228/238	243/247	183/195	189/195	249/259
	после <i>in vitro</i>	133/135	228/238	243/247	183/195	189/195	249/259

*- исходный посадочный материал

Как видно из данных, приведенных в Таблице 1, размеры аллелей по 6-и микросателлитным локусам: VVS2 ,VVMD5, VVMD7,VVMD27,VrZAG62 и VrZAG79 у исследуемых сортов винограда, и полученных микроклонов были абсолютно идентичны. 9 из 19-и ISSR испытанных маркеров продуцировали четкие, воспроизводимые для сравнения бэнды. Эти маркеры были использованы в дальнейших экспериментах. ISSR праймеры продуцировали уникальные наборы продуктов амплификации для индивидуальных сортов и соответствующих им микроклонов в пределах размеров аллелей от 350 до 1850 п.о., от 46 до 65 бэндов в зависимости от индивидуального маркера со средними значениями от 5,1 до 7,2 на маркер. Микроклоны из различных эксплантов, содержащих меристему (изолированные меристемы, покоящиеся почки и апексы побегов), для каждого индивидуального сорта были генетически идентичны исходным материнским сортам по всем использованным ISSR маркерам, подтверждая генетическую стабильность полученных через *in vitro* растений. В качестве примера на электрофорограмме Рисунка 2 представлены результаты амплификации ISSR-ПЦР с использованием праймеров (A)-VHV-(GT)7 и (B)-RY-(CA)₆ для сортов винограда Алмалы, Кызыл тан и Береке.



Продукты амплификации анализируемых образцов сортов винограда: 1-3 – микроклоны сорта Алмалы; 4-6 – микроклоны сорта Кызыл тан; 7-9 – микроклоны сорта Береке; М – ДНК маркер GeneRulerTM 1 kb (Fermentas)

Рисунок 2 – Электрофореграмма в 2% агарозном геле продуктов ПЦР с использованием ISSR маркера (А)-VHV-(GT)7 и (Б)-RY-(CA)6

Заключение

Развитие ДНК технологий, различных типов молекулярных маркеров предоставляет более объективную и надежную идентификацию сортов и микроклонов винограда. В работе впервые в Казахстане применена и оптимизирована для винограда методика генотипирования по 6 микросателлитным маркерам (singleplex) с использованием соответствующих пар немеченых специфических праймеров и трёх универсальных олигонуклеотидов, мечеными различными флуоресцентными красителями согласно [13], для 13-и казахстанских сортов и микроклонов. Анализ, проведенный с использованием для винограда набора из 6-и микросателлитных маркеров: VVS2 ,VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG62 и ssrVrZAG79 и 9-и ISSR маркеров подтвердил для казахстанских сортов генетическую специфичность и идентичность полученных из различных эксплантов микроклонов.

Приложение 1

Ниже приведена краткая характеристика перспективных сортов винограда казахстанской селекции [14].

Алмалы – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т.], (Фиолетовый ранний х Илийский) *Описание:* технический сорт винограда, ранние-среднего срока созревания, листья средней величины, сильно рассеченные, грозди небольшие, ветвистые, ягоды средние, округлые, темно-синие, сок интенсивно окрашен, кожица плотная, мякоть сочная с мускатным ароматом; урожайность 90–110 ц/га;

Устойчивость: Относительно устойчив к оидиуму, милдью и морозу;

Аллели SSR локусов: VVS2-131/145, VVMD5-228/234, VVMD7-239/249, VVMD27-181/195, VrZAG 62- 189/191, VrZAG 79-253/259;

Айсулуу – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т.], (Ягдона белая х Жемчуг саба)

Описание: столовый сорт, среднего срока созревания; грозди крупные, ягоды крупные, белые, овальные, цветок обеополый; урожайность хорошая;

Устойчивость: Зимостойкость относительно высокая. Устойчивость к болезням посредственная;

Аллели SSR локусов: VVS2-135/137, VVMD5-238/238, VVMD7-243/247, VVMD27-181/197, VrZAG 62- 199/207, VrZAG 79-249/253;

Ак марал – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т.], (Мадлен Анжевин х Кипшиш белый)

Описание: столовый сорт, раннего срока созревания, листья средние, грозди крупные, рыхлые или средней плотности, цилиндрической формы, ягоды крупные, удлиненно-овальные, зеленовато – желтые, цветок обеополый; урожайность хорошая;

Устойчивость: Зимостойкость высокая. Слабо повреждается оидиумом и пятнистым некрозом;

Аллели SSR локусов: VVS2-135/145, VVMD5-236/238, VVMD7-239/247, VVMD27-183/195, VrZAG 62- 189/205, VrZAG 79-259/259;

Алма-ата – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Богданова В.С.], (Дружба × Ризамат)

Описание: столовый сорт, средне-ранний срок созревания, грозди очень крупные, ветвистой формы, ягоды очень крупные, продолговатые, черные, цветок обоеполый; урожайность высокая;

Устойчивость: Зимостойкость низкая. Устойчивость к болезням низкая;

Аллели SSR локусов: VVS2-155/159, VVMD5-230/242, VVMD7-233/239, VVMD27-181/187, VrZAG 62- 199/207, VrZAG 79-249/255;

Арман – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства. [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т.], (Жемчуг Саба × Мускат александрийский)

Описание: столовый сорт, раннего срока созревания, лист средний, округлый, пятилопастный, грозди средние, средне плотная, ягоды крупные, округлые, янтарно-желтая, цветок обоеполый; урожайность высокая;

Устойчивость: Устойчивость к грибным болезням и морозу низкая.

Аллели SSR локусов: VVS2-133/155, VVMD5-234/238, VVMD7-249/253, VVMD27-181/183, VrZAG 62- 187/189, VrZAG 79-255/259;

Береке – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства. [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т., Бекетаева Л.К., Карычева Л.А.], (Илийский х Северный)

Описание: технический сорт винограда, ранне-среднего периода созревания, грозди средние, ягоды мелкие, черные, урожайность средняя;

Устойчивость: Высокая устойчивость к оидиуму, милдью и морозу;

Аллели SSR локусов: – VVS2-131/145, VVMD5-228/238, VVMD7-247/257, VVMD27-185/195, VrZAG 62- 197/207, VrZAG 79-253/259;

Илийский – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства. [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т., Бекетаева Л.К., Карычева Л.А.], (Рислинг х Саперави)

Описание: технический сорт винограда, среднего срока созревания, грозди средние, ягоды средние, овальные, темно-синие, урожайность хорошая;

Устойчивость: относительно устойчив к оидиуму, милдью и морозу;

Аллели SSR локусов: VVS2-145/147, VVMD5-228/242, VVMD7-239/257, VVMD27-191/195, VrZAG 62- 191/197, VrZAG 79-243/259;

Каракоз – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т.], (Мадлен Анжевин × Сенсо)

Описание: столовый сорт, раннего периода созревания, лист средний, округлый или немного вытянутый в ширину, гроздья средние, цилиндрическо-конические, ягоды средние, яйцевидные, темно-синие, цветок обоеполый; урожайность хорошая;

Устойчивость: Зимостойкость средняя. Устойчивость к грибным болезням посредственная.

Аллели SSR локусов: VVS2-135/137, VVMD5-228/238, VVMD7-243/247, VVMD27-181/195, VrZAG 62- 189/195, VrZAG 79-247/257;

Кызыл тан – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т.], (Легкий аромат × Ризамат)

Описание: столовый сорт, очень раннего периода созревания, лист средний, слабо рассеченные, нижняя поверхность неопущенная, гроздья очень крупные, рыхлые, ягоды крупные, яйцевидные, красные, цветок обоеполый; урожайность хорошая;

Устойчивость: Устойчивость к болезням слабая. Зимостойкость средняя;

Аллели SSR локусов: VVS2-153/159, VVMD5-238/242, VVMD7-233/249, VVMD27-181/181, VrZAG 62- 189/191, VrZAG 79-245/253;

Мускат Казахстанский – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т.], (Мадлен Анжевин × Мускат александрийский)

Описание: очень раннее созревание, лист средний, слабо рассеченные, нижняя поверхность неопущенная, гроздья очень крупные, рыхлые, ягоды крупные, яйцевидные, красные, цветок обоеполый; урожайность хорошая;

Устойчивость: Устойчивость к болезням слабая. Зимостойкость средняя.

Аллели SSR локусов: VVS2-139/145, VVMD5-230/236, VVMD7-243/247, VVMD27-181/197, VrZAG 62- 191/199, VrZAG 79-245/255;

Рахам – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т., Карычева Л.А.], (№154 х Ранний Кибрайский)

Описание: технический сорт винограда, средне-раннего срока созревания, грозди крупные, ягоды крупные, темно-красные, мякоть мясистая;

Устойчивость: средне устойчив к болезням, зимостойкость средняя;

Аллели SSR локусов: VVS2-135/155, VVMD5-230/236, VVMD7-247/247, VVMD27-187/213, VrZAG 62- 205/205, VrZAG 79-247/251;

Самал – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства. [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т., Бекетаева Л.К., Карычева Л.А.], (Илийский х Северный)

Описание: технический сорт винограда, ранне-среднего периода созревания, грозди средние, плотные, ягоды мелкие, черные, урожайность 120-140 г/га;

Устойчивость: отличается устойчивостью к оидиуму, милдью и морозу;

Аллели SSR локусов: VVS2-137/147, VVMD5-238/242, VVMD7-247/257, VVMD27-185/195, VrZAG 62- 197/207, VrZAG 79-253/259;

Тянь Шаньский – выведен в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства [Пономарчук В.П., Технеряднова Р.Т., Бекетаева Л.К., Хусаинова], (Рислинг х Ркацители + Саперави)

Описание: технический сорт винограда, среднепозднего периода созревания; листья средние, округлые, пятилопастные; цветок обоеполый; грозди средние, ягоды мелкие, белые, урожайность 130-140 г/га;

Устойчивость: Морозустойчивость сорта средняя. Повреждается оидиумом.

Аллели SSR локусов: VVS2-133/135, VVMD5-228/238, VVMD7-243/247, VVMD27-183/195, VrZAG 62- 189/195, VrZAG 79-249/259;

ЛИТЕРАТУРА

- 1 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// TheorAppl Genet. – 2000. – Vol.100. – P. 498-505.
- 2 Lopes M.S., 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 // TheorAppl Genet. – 1999. – Vol.99. – P. 733-739.
- 3 Doulati-Baneha H., Mohammadib S.A., LabradM. Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivarsfrom Iran using SSR markers // Scientia Horticulturae. –2013. – V.160. – P. 29-36.
- 4 Meneghetti S., Costacurta A., Morreale G., Calo A. Study of Intra-Varietal Genetic Variability in Grapevine Cultivars by PCR-Derived Molecular Markers and Correlations with the Geographic Origins // Mol Biotechnol. –2012. – V. 50. – P.72-85.
- 5 Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // Plant Growth Regul. – 2011. – V. 63. – P.147-173
- 6 Smulders M.J.M., de Klerk G.J. Epigenetics implant tissue culture // Plant Growth Regul. – 2011. – V. 63. – P. 137-146
- 7 Chandrika M., Thoyajaksha, RaiV. R., KiniK. R. Assessment of genetics tability of *invitro* grown *Dictyospermum ovalifolium* // Biologia Plantarum. – 2008. – V.52. – P. 735-739;
- 8 BhatiaR., SinghK.P., JhangT., SharmaT.R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerberaplants by ISSR markers Scientia Horticulturae . – 2009. – V.119. – P. 208–211
- 9 AubakirovaK., OmashovaM., RyabushkinaN., Tazhibaev T., Kampitova G., GaliakparovN. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris* // GMR - 13 (1): 1278-1287 (2014).
- 10 Doyle J.J. and Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. –1990.–Vol.12.–P.13-15
- 11 This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl C., Eisenheld F., Ferreira-Monteiro S., Grando J., Ibañez T., Lacombe V., Laucou R., Magalhães 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 // TheorAppl Genet. –2004. –Vol.109. –P.1448-1458 doi: 10.1007/s00122-004-1760-3 PMID: 15565426
- 12 Argade N.C., Tamhankar S.A., Karibasappa G.S., Patil G.S., Rao V.S. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers// J. Plant Biochemistry& Biotechnology.-2009. –Vol. 18(1). –P. 45-51;
- 13 Аубакирова К.П., Омаршева М.Е., Рябушкина Н.А., Береснева Л.В., Галиакпаров Н.Н. Использование универсальных флуоресцентно-меченых праймеров в генотипировании казахстанских сортов винограда по микросателлитным маркерам // Биотехнология. Теория и практика. – 2013.– №2.–С.35-41.
- 14 КазНИИПиВ «Районированные и перспективные сорта плодовых, ягодных культур и винограда для юга и юго-востока Казахстана». Алматы 2008.

REFERENCES

1. 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. TheorAppl Genet. 2000. Vol.100. P. 498-505.
2. Lopes M.S., 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 TheorAppl Genet. 1999. Vol.99. P. 733-739.
3. Doulati-Baneha H., Mohammadib S.A., LabradM. Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivarsfrom Iran using SSR markers. Scientia Horticulturae. 2013. V.160. P. 29-36.
4. Meneghetti S., Costacurta A., Morreale G., Calo A. Study of Intra-Varietal Genetic Variability in Grapevine Cultivars by PCR-Derived Molecular Markers and Correlations with the Geographic Origins. Mol Biotechnol. 2012. V. 50. P.72-85.
5. Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. Somaclonal variationin plants: causesand detection methods. Plant Growth Regul. 2011. V. 63. P.147-173
6. Smulders M.J.M., de Klerk G.J. Epigenetics implant tissue culture. Plant Growth Regul. 2011. V. 63. P. 137-146
7. Chandrika M., Thoyajaksha, Rai V. R., Kini K. R. Assessment of genetics tability of *invitro* grown *Dictyospermum ovalifolium*. Biologia Plantarum. 2008. V.52. P. 735-739;
8. Bhatia R., Singh K.P., Jhang T., Sharma T.R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. Scientia Horticulturae . 2009. V.119. P. 208-211
9. Aubakirova K., Omashova M., Ryabushkina N., Tazhibaev T., Kampitova G., Galiakparov N. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris*. GMR , 13 (1): 1278-1287 (2014).
10. Doyle J.J. and Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 1990. Vol.12. P.13-15

11. This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl . C. Eisenheld F. Ferreira-Monteiro . S. Grando . J. Iba.~ez T. Lacombe . V. Laucou . R. Magalha~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
12. Argade N.C., Tamhankar S.A., Karibasappa G.S., Patil G.S., Rao V.S. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers. J. Plant Biochemistry& Biotechnology. 2009. Vol. 18(1). P. 45-51;
13. Aubakirova K.P., Omasheva M.E., Rjabushkina N.A., Beresneva L.V., Galiakparov N.N. *Biotehnologija. Teoriya i praktika*, 2013, №2. С.35-41 (in Russ.).
14. *KazniiPiV «Rajonirovannye i perspektivnye sorta plodovyh, jagodnyh kul'tur i vinograda dlja juga i jugo-vostoka Kazahstana»*. Almaty 2008 (in Russ.).

АУБАКИРОВА К.П., РЯБУШКИНА Н.А., ТӘЖИБАЕВ Т.С., ГАЛИАКПАРОВ Н.Н.

ҚАЗАҚСТАН СЕЛЕКЦИЯСЫНЫң ЖҰЗІМ СОРТТАРЫН ЖӘНЕ ОЛАРДАН АЛЫНГАН МИКРОКЛОНДАРДЫ SSR ЖӘНЕ ISSR МАКЕРЛЕР АРҚЫЛЫ ПАСПОРТИЗАЦИЯЛАУ

- 1.Казақ Үлттық аграрлық университеті, Алматы
2.PMM «Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты», Алматы

Резюме

Қазақстанда алғашқы рет SSR-ПТР әдісінің негізінде жұзім сорттарын паспортизациялау әдісі қолданылды. Бұл әдіс ДНҚ бөлу протоколынан және ПТР реакциясын жүргізу жағдайынан тұрады. Стандартты 6 SSR маркерлерді қолдана отырып Қазақстан селекционерлерімен алынған 13 жұзім сорттарына паспорт құрылды. Сорттардың генетикалық дифференциациясының деңгей анықталды. Бұрынғы қазақстан сорттарының әр түрлі экспланштарынан алынған микроклонды есімдіктердің ДНҚ-ы болған альпиды. Бастапқы сорттарға және олардан алынған микроклондарға сорттық бірдейлілігін дәлелдеу мақсатымен 6 SSR және 9 ISSR маркерлерді қолдану арқылы генотипирлеу жүргізілді. Генотипирлеу әдісімен барлық алынған микроклондардың бастапқы сорттарымен сәйкес екендігі дәлелденді.

Кітт сөздер: жұзім, микроклон, ДНҚ, SSR, ПТР, паспортизациялау.

K. AUBAKIROVA^{1,2}, N. RYABUSHKINA², T. TAZHIBAEV¹, N. GALIAKPAROV²,

CERTIFICATION KAZAKHSTAN SELECTION OF GRAPE VARIETIES AND DERIVED MICROPORPAGATED PLANTS USING SSR AND ISSR MARKERS

1. Kazakh National Agrarian University, Almaty,
2.Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty,

Summary

First time in Kazakhstan a method of certification grape varieties based on SSR-PCR has been mastered. The method included the protocol of DNA extraction and PCR conditions. Using a standard set of 6 SSR markers the passports for 13 grapevine varieties selected by Kazakhstan breeders has been composed. By 6 SSRand 9 ISSR markers a number of microporpagated plants from different organized meristem-derived explants: isolated meristems, dormant buds and shoots apices of Kazakhstan' varietieshas been genotyped. Genotyping assessed the genetic fidelity of microporpagated plants and corresponding the mother varieties.

Keywords: grapevine, microporpagation, DNA, SSR, ISSR, PCR, certification.

1.Аубакирова Карлыгаш Пазилхаковна, докторантка PhD 3 курс, специальность - 6D080900 «Плодоовоощеводство», факультет - «Технология растениеводства», университет- КазНАУ

2. Рябушкина Наталья Антоновна, к.б.н., ВНС лаборатории молекулярной биологии, институт биологии и биотехнологии растений

3. Тажибаев Толеберген Сагынович, к.с-х.н., доцент кафедры плодоовоощеводство, химии и защиты растений, факультет - «Технология растениеводства», университет- КазНАУ

4. Галиакпаров Нурбол Нурпатаевич, PhD, заведующий лаборатории молекулярной биологии, институт биологии и биотехнологии растений

Поступила 13.03.2014 г.