

**Өсімдіктер
биоинженериясы****Биоинженерия
растений****Bioengineering
of Plants**

ӘОЖ 577.2.08:634.8

^{1,2}Қ.П. Аубакирова*, ¹М.Е. Омашева, ¹Н.А. Рябушкина, ²Т.С. Тәжібаев,
¹Г.М. Сүйінбаева, ¹Н.Н. Галиакпаров

¹Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Алматы қ., Қазақстан,
²Қазақ Ұлттық Аграрлық университеті, Алматы қ., Қазақстан,
*e-mail: karla_78@mail.ru

**Қазақстанның перспективті жүзім сорттарына
SSR микросателлитті маркерлері арқылы жүргізілген
молекулалық-генетикалық мінездеме**

Бұл жұмыста қазақстанның перспективті жүзім сорттарына 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. VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG62 және ssrVrZAG79 6 микросателлитті локустармен жүргізілген сараптама, 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.

Түйін сөздер: жүзім, генотипирлеу, ssr маркерлер, ДНК, ПТР.

Қ.П. Аубакирова, М.Е. Омашева, Н.А. Рябушкина, Т.С. Тәжібаев,
Г.М. Суюнбаева, Н.Н. Галиакпаров

**Молекулярно-генетическая характеристика перспективных казахстанских сортов винограда
по SSR микросателлитным маркерам**

В настоящей работе применена 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 и их родительских форм. Анализ, проведенный по используемому исследователями винограда набору из 6-и 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, ПТР.

K.P. Aubakirova, M.E. Omasheva, N.A. Ryabushkina, T.S. Tazhibayev,
G.M. Suyunbaeva, N.N. Galiakparov

Genotyping of perspective in Kazakhstan grape varieties by SSR microsatellite markers

In this paper, applied to grapes cost-effective method of genotyping 6 microsatellite markers using the corresponding pairs of unlabeled specific primers and three universal oligonucleotides labeled with different fluorescent dyes. This

technique is used for genotyping of several promising Kazakhstan varieties and their parental forms . Analysis conducted by researchers grapes used set of 6 markers and mikrosattelite: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG62 and ssrVrZAG79 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.

Жүзім – бұл дүниежүзіндегі ең ежелгі және экономикалық тұрғыдан өте тиімді жеміс-жидек дақылдарының бірі болып есептеледі, себебі жүзімнен шарап, шырын, қою тосаптар дайындалады және де жемістің жаңа піскен кезі де, кептірілген түрі де тағамға пайдаланылады.

Әр түрлі молекулалық маркерлерді пайдалана отырып ДНҚ полиморфизмін талдау негізінде қазіргі заманның биологиясының ілгерілігі дамуда. Молекулалық маркерлер қазіргі кезде түр арасындағы генетикалық туыстық/әртүрлілікті бағалау мақсатымен генотипирлеуде, генетикалық карта құруда, селекция барысында (MAS, markerassistedselection), популяциялық генетикада, филогенетикалық зерттеулерде, биотехнологияда және де т.б. қолданылуда [1-3]. Әсіресе ақпараттық маркерлердің бірі ол микросателлиттер болып табылады (SSR) – моно-, ди-, три-, тетра-, немесе пента – нуклеотидтер қайталамалар бірліктерінен тұратын ДНҚ аудандары [4]. Қазіргі кезде, кез келген дақылдардың генетикалық ресурстарын қолдану және бағалау эффективтілігі ол сорттардың мінездемесінің дұрыстығы және нақтылығымен негізделеді. Жүзім сорттарын морфологиялық (ампелографиясы, жапырақтар сипаттамалары, өркендердің ұшы, жүзімнің шашақты бір шоғы және жидегі) және агрономиялық тұрғыда сипаттаумен қатар молекулалық маркерлер негізінде молекулалық – генетикалық бағытта мінездемелер жүргізілуде. Сонымен қатар молекулалық – генетикалық мінездемелерді жаңа сорттарды құру кезінде де қолдану тиімді, себебі өсімдіктің алғашқы даму кезеңінен бастап жеміс беретін кезеңіне дейінгі морфологиялық және сапалық көрсеткіштері бірден байқалмайды.

Осы жұмыстың мақсаты қазақстанның перспективті жүзім сорттарын стандартты SSR

маркерлерін және спецификалық емес әмбебап, флуоресцентті бояғыштармен таңбаланған олигонуклеотидтерді қолдана отырып генотипирлеу.

Зерттеу материалдары және әдістері

Зерттеу материалы ретінде жүзім және жеміс шаруашылығы институтының топтамасынан қазақстанның перспективті 13 және олардың ата –аналары ретінде 7 жүзім сорттары алынды. Асханалық сорттар: *Арман, Ақ марал, Айсұлу, Алма–Ата, Қызыл таң, Қара көз, Мускат Казахстанский*; ата-аналары: *Жемчуг саба, Мускат Узбекистанский, Мадлен Анжевин, Ризамат*. Техникалық сорттар: *Алмалы, Илийский, Самал, Береке, Рахат, Тань Шаньский*; ата-аналары: *Рислинг, Фиолетовый ранний, Саперави*.

ДНҚ бөліп алу. ДНҚ –ны бөліп алу үшін сорттардың әр қайсысынан 5 үлгіден алынды. Геномдық ДНҚ, жүзімнің жас жапырақтарынан модификацияланған СТАВ әдісі арқылы бөлініп алынды [5-6]. ДНҚ –ның саны мен сапасын 1x TAE буферінде 1%, агарозды гель электрофорезі арқылы тексерілді және Smart Spec Plus (Bio-Rad) спектрофотометрінде 260, 280 нм толқын ұзындығында өлшенді. ДНҚ-ның тазалығын 260/280нм толқынның жұтылуындағы ара қатынасының көрсеткіштері бойынша бағаланды. Осы көрсеткіш бойынша ДНҚ-ның 260/280 нм толқын ұзындығында жұтылуының ара қатынасы 1,68 және 1,87 –ге дейінгі көрсеткіштері болған ДНҚ-ны ары қарай зерттеулерге пайдаланылды.

Микросателлитті маркерлер және ПТР-ның жағдайы. Жүзім сорттарының аллелдерін сәйкестендіру және сипаттау үшін, бұл жұмыста 6 локусы бойынша стандартты микросателлиттер жиынтығы қолданылды: VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 және VrZAG79 (Кесте 1) [7].

Кесте 1 – Зерттеулерде қолданылған олигонуклеотидтердің тізбегі

№	Праймер	Праймердің тізбегі (5'тан 3' дейін)
1	D8S1132	VIC-GGCTAGGAAAGGTTAGTGGC
2	D12S1090	NED-ACCAACCTAGGAAACACAG

3	DYS437	FAM-GACTATGGGCGTGAGTGCAT
4	VVS2f	AAATTCAAAAATTCTAATTCAACTGG
5	VVS2r	GGCTAGGAAAAGGTTAGTGGCCAGCCCCGTAATGTATCCATC
6	VVMD5f	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA
7	VVMD5r	GGCTAGGAAAAGGTTAGTGGCCTAGAGCTACGCCAATCCAA
8	VVMD7f	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT
9	VVMD7r	GACTATGGGCGTGAGTGCATCGAACCTTCACACGCTTGAT
10	VVMD27f	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT
11	VVMD27r	GGCTAGGAAAAGGTTAGTGGCACGGGTATAGAGCAAACGGTGT
12	VrZAG62f	GGTGAATGGGCACCGAACACACGC
13	VrZAG62r	ACCAACCTAGGAAACACAGCCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC
14	VrZAG79f	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG
15	VrZAG79r	ACCAACCTAGGAAACACAGTGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC

Ескерту – D8S1132, D12S1090, DYS437 – спецификалық емес микросателлиттер, VIC, NED, FAM – флуоресцентті таңбалар.

ПТР-ы екі этап бойынша жүргізілді. 20 мкл көлемдегі бірінші ПТР –да 2 мкл 10x Тақ Буфері, 2 мкл 25 mM MgCl₂, 0.4 мкл 10 mM дезоксинуклеотидтрифосфаттар жиынтығы (dNTP), 0,2 mM тура (f) және кері (r) қолданатын маркерге байланысты олигонуклеотидтер (Таблица.1 қара), 13.7 мкл деонизирленген стерильді су және 1 бірлік Тақ полимераза ферменті қосылды. Геномды ДНҚ –ның концентрациясы 40 нг/20 мкл. құрады.

Амплификацияны мынадай бағдарламамен жүргіздік: бір цикл 94°C та 2 мин.; 7 циклден, мынадай сатыдан тұратын – 94°C та 1 мин., 60°C та 2 мин. және 72°C та 2 мин.; 20 циклден – 94°C та 1 мин., 54°C та 2 мин. және 72°C та 2 мин.; және де соңында 1 цикл 72°C та 10 мин. Бағдарлама аяқталғаннан кейін, әр бір ПТР-ның 5 мкл нәтижесін 1% агарозды гелде электрофорез арқылы тексердік.

Күтілген өнімді ары қарай ПТР-ын сумен 10 есе сұйылтылды және осы өнімнен 1 мкл екінші ПТР –на пайдаланылды. Екінші ПТР-ның кері олигонуклеотидтерден басқа құрамы біріншідегідей болды. Кері праймерлері ретінде VVS2, VVMD5 және VVMD27 локустары үшін – D8S1132 қолданылды, ал VrZAG62 және VrZAG79 үшін – D12S1090, ал VVMD7 – үшін DYS437 қолданылды. Амплификация бағдарламасы да бірінші ПТР-мен сәйкес болды, бірақ соңғы элонгация сатысындағы уақыт 10 нан 30 минутқа созылды. ПТР аяқталғаннан кейін, бір үлгінің 6 маркерлері бойынша алынған реакция өнімдері біріктірілді және формаидпен, таңбаланған бояғыш LIZ (Size standard 500 LIZ Applied Biology) стандартты мөлшермен аралас-тырылды, қоспаның жалпы көлемі 10 мкл. құрады. ПТР өнімінің капиллярлы электрофорезін ABI Prizm 310 (Applied Biosystems) ДНҚ анализаторында жүргізілді.

Алынған электрофореграмманы Cene Mapper 4.0. бағдарламасының көмегімен өңделді.

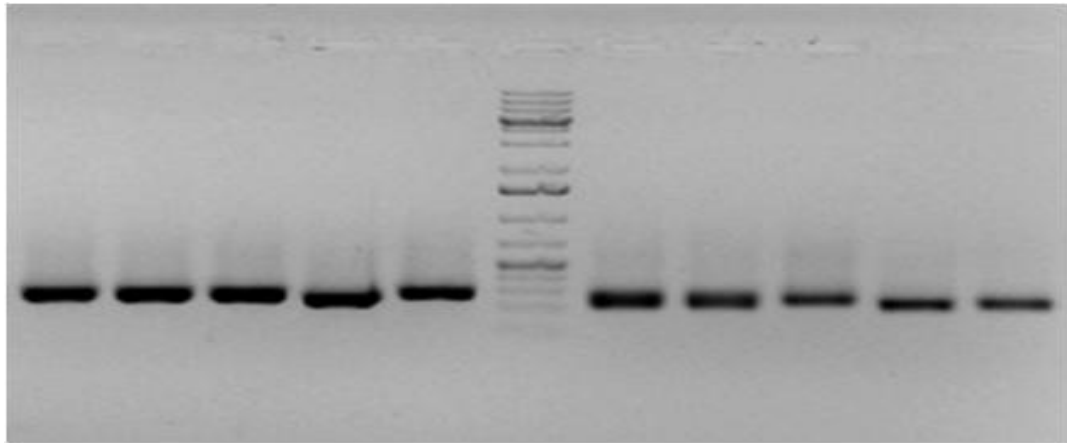
Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Полимеразды тізбекті реакцияны жүргізу үшін ДНҚ таза бөлініп алынуы қажет. Осы мақсатпен жүзім жапырағынан ДНҚ бөліп алудың оптимальды әдісі бес әр түрлі протоколдар сыналды [6]. Зерттеулер нәтижесінде Doyle and Doyle әдісіне тоқталдық [5]. Осы әдіс арқылы бөлінген ДНҚ -80°C тоназытқышта сақталынды. Анализделетін сорттардың микросателлитті көрінісін алу үшін 1 кестеде көрсетілген праймерлер жиынтығы қолданылды. Бірінші ПТР-ге 4-ден 15-і праймерлер қолданылды. Кері праймердің (№ 5, 7, 9, 11, 13 және 15) әр бір алты жұптың 5'-соңында, флуоресцентті таңбаланған олигонуклеотидтерге сәйкес, адаптер, қосымша тізбек болды (№1, 2 немесе 3). Екінші ПТР-да кері праймер ретінде флуоресцентті бояғыштармен таңбаланған праймерлер қолданылды, басқалары біріншідегідей болды. 1 суретте үлгі ретінде 10 сорттың екінші ПТР-ның электрофорезі көрсетілген.

Алынған өнімдер ABI Prizm 310 ДНҚ анализаторда капиллярлы электрофорез арқылы ажыратылды. Ары қарай алынған мәліметтер GeneMapper 4.0 бағдарламасы бойынша сарапталды. Мысал ретінде 2 суретте бір үлгінің VVMD7 маркері бойынша алынған электрофореграммасы көрсетілген. 2 кестеде Қазақстан селекциясының жүзім сорттары мен олардың ата-аналарына VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 және VrZAG79 6 микросателлитті локусы бойынша жүргізілген сараптамалардың нәтижелері көрсетілген. Бірақ кейбір ата-аналардың үлгісі болмады. Әр бір 6 локустың аллелдерінің

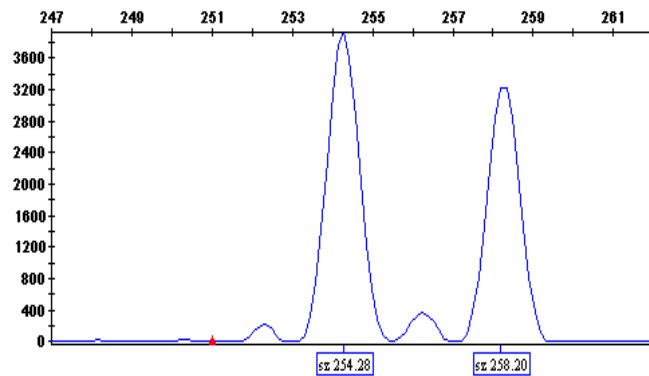
нақты мөлшерін анықтау үшін европалық сорттарға жүгіне отырып, конверсия факторы анықталды, бұл жұмыс мына мақалада жарияланған [8]. Нәтижесінде, тәжірибеде конверсия факторын қолдану арқылы жүргізілген

барлық европалық сорттардың аллелдерінің мөлшері Swiss Vitis Microsatellite Database – www1.unine.ch/svmd Европалық база мәліметтеріндегі аллелдердің мөлшерімен тең келді, бұл әдістің дұрыс жасалғанын дәлелдейді.



1-10 анализделген үлгілер, М – ДНҚ маркері GeneRuler™ 1kb (Fermentas)

Сурет 1 – VVMD7 локусына қолданылған праймердің 1 % агарозды гелдегі екінші ПТР-ң өнімі



Сурет 2 – VVMD7 локусына қолданылған праймердің екінші ПТР-ң өнімі (GeneMapper 4.0 бағдарламасы бойынша сарапталды)

Сараптама қазақстандық сорттардың «ұрпақ – ата-ана» байланысын дәлелдеді. Мысалы Илийский сортында Саперави мен Рислинг ата-аналарынан 50% ұқсас аллелдері бар. Ал Алмалы, Береке және Самал сорттарының әр бір локустарында ата-ана ретінде Илийскийден бір ұқсас аллелдері бар. Сонымен қатар Алмалы мен Береке сорттарының үш локусында Илийскийге ата-анасы Рислингтен келген аллелдері өткен, ал VVMD27 және VrZAG79 аллелдерінің локустары бойынша –

үшеуінде де Саперави сортынан келген. Ал Алма-Ата мен Қызыл таң сорттарында бір ата-анасы Ризаматтан аллелдері ұқсас болды. Тағы да ата-ана ретінде Жемчуг сабаның аллелдері Айсулу сортына өткен.

Генетикалық ресурстарды молекулалық маркерлер арқылы сипаттау, жалпы дүниежүзілік тәжірибеде қалыпты жағдайға айналуға. Осы жұмыста қазақстанның бірнеше перспективті сорттарына 6 стандартты VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62

және VrZAG79 спецификалық SSR маркерлерін спецификалық емес әмбебап флуоресцентті-таңбаланған праймерлермен бірге жүргізілген

генотипирлеудің нәтижелері келтірілді. Алынған нәтижелер қазақстандық сорттардың «ұрпақ – ата-ана» байланысын дәлелдеді.

Кесте 2 – Қазақстанда өсірілетін перспективті жүзім сорттарының 6 микросателлитті маркерлері бойынша жүргізілген молекулалық-генетикалық мінездемесі

Сорттар	Микросателлитті локустардың аллелдері, өлшемдері жұп.нук.					
	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VrZAG62	VrZAG79
Айсұлу	135/137	238/238	243/247	181/197	199/207	249/253
Ақ марал	135/145	236/238	239/247	183/195	189/205	259/259
Алма-Ата	155/159	230/242	233/239	181/187	199/207	249/255
Алмалы	131/145	228/234	239/249	181/195	189/191	253/259
Арман	133/155	234/238	249/253	181/183	187/189	255/259
Береке	131/145	228/238	247/257	185/195	197/207	253/259
Жемчуг саба	135/157	238/238	247/249	181/183	189/207	253/257
Илийский	145/147	228/242	239/257	191/195	191/197	243/259
Қара көз	135/137	228/238	243/247	181/195	189/195	247/257
Қызыл таң	153/159	238/242	233/249	181/181	189/191	245/253
Мускат Казахстанский	139/145	230/236	243/247	181/197	191/199	245/255
Мускат Узбекистанский	135/159	234/242	251/253	181/181	187/191	245/253
Рахат	135/155	230/236	247/247	187/213	205/205	247/251
Ризмат	155/159	230/242	233/253	181/197	191/199	245/255
Рислинг	145/153	228/236	249/257	183/191	197/207	243/245
Самал	137/147	238/242	247/257	185/195	197/207	253/259
Саперави	133/147	226/242	239/239	191/195	191/203	243/259
Тань Шаньский	133/135	228/238	243/247	183/195	189/195	249/259
Фиолетовый ранний	131/151	234/238	241/249	181/183	187/189	253/257
Мадлен Анжевин	135/155	236/240	247/247	181/193	195/205	249/259

Ескерту – ата-аналары қою қарамен белгіленген

Әдебиеттер

- 1 Ganal M.W., Polley A., Graner E.M., Plieske J., Wieseke R., Luerssen H., Durstewitz G. Large SNParrays for genotyping in crop plants // J Biosci. – 2012. –V.37. – P.821-828.
- 2 Miedaner T., Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. Phytopathology. – 2012. –V. 102. – P. 560-566.
- 3 Paux E., Sourdille P., Mackay I., Feuillet C. Sequence-based marker development in wheat: advances and applications to breeding //Biotechnol Adv. – 2012. –V. 30. –P. 1071-1088.
- 4 Powel W., Machray G.C., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats // Trends Plant Sci.–1996. –V. 1.–P. 215-222.
- 5 Doyle J.J. and Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. –1990.–Vol.12.–P.13-15
- 6 AubakirovaK., OmashevaM., RyabushkinaN., Tazhibayev T., Kampitova G., GaliakparovN. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malussieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris* // GMR. –accepted.
- 7 This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl . C. Eisenheld F. Ferreira-Monteiro . S. Grando . J. Ibañ ez T. Lacombe . V. Laucou . R. Magalhaes 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 doi: 10.1007/s00122-004-1760-3 PMID: 15565426
- 8 Аубакирова К.П., Омашева 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.