

# Исследование аллельного разнообразия VvMybA1 клоновых популяций распространенных винных сортов

Александр Валериевич Милованов<sup>1</sup>, канд. биол. наук, старший преподаватель;

Елена Тарасовна Ильницкая<sup>2</sup>, канд. биол. наук, заведующая лабораторией сортоизучения и селекции винограда;

Андрей Сергеевич Звягин<sup>1</sup>, канд. биол. наук, науч. сотр.;

Виталий Владиславович Радченко<sup>1</sup>, канд. биол. наук, науч. сотр.;

Андрей Георгиевич Кощаев<sup>1</sup>, д-р биол. наук, профессор;

Леонид Петрович Трошин<sup>1</sup>, д-р биол. наук, профессор

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, 350044, ул. Калинина 13

<sup>2</sup>ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», г. Краснодар, 350901, ул. 40 лет Победы

Изучение агробιοлогических свойств сортов в привязке к их генетике имеет важное значение как для прикладных, так и для фундаментальных исследований. Одним из наиболее ярко выраженных признаков у виноградного растения является наличие или отсутствие антоциановой окраски ягод, которая, в свою очередь, контролируется кластером генов MYB, расположенных во второй хромосоме кариотипа. Особенный интерес для научного сообщества представляют клоны сортов, являющихся референсными при сравнении для изучения генетического разнообразия рода *Vitaceae*. Таким образом, в статье представлены результаты изучения строения аллелей гена VvMybA1 у 32 клонов известных распространенных сортов винограда: Мерло, Каберне-Совиньон, Рислинг, Алиготе, Пино белый и Совиньон блан. В результате, у всех клонов были выявлены аллели гена VvMybA1, характерные для окрашенных и неокрашенных сортов. Это же подтверждается результатом сравнения секвенированных последовательностей с базой данных NCBI, при помощи сервиса NCBI BLAST. Для всех клонов неокрашенных сортов было установлено наличие аллели с ретроинтерпоновой вставкой, блокирующей нормальную экспрессию гена и, следовательно, детерминирующего отсутствие антоцианинов в ягодах. Также были обнаружены одно- и динуклеотидные замены, являющиеся общими для групп и некоторых отдельных клонов и в целом характерные для белоягодных и краснаягодных сортов. Помимо этого, были выявлены мутационные различия, характерные для конкретных клонов, которые, в свою очередь, выражены в двоении нуклеотидных пиков при секвенировании и объясняются гетерогенностью изученных генотипов, то есть их происхождением. Таким образом, при изучении клонов шести сортов было подтверждено наличие в них характерных аллелей, выявлены уникальные для окрашенных и неокрашенных сортов изменения, а также созданы референсные последовательности генов сортов, содержащихся на ампелографическом участке Анапской зональной опытной станции, которые могут использоваться в дальнейшей работе по изучению данного признака.

**Ключевые слова:** *Vitis vinifera* L.; виноград, винные сорта, VvMybA1, ген, аллель, клон, гетерогенность

## ORIGINAL RESEARCH

### A study of VvMybA1 allele diversity in populations of clones of popular wine grape varieties

Aleksandr Valerievich Milovanov<sup>1</sup>, Elena Tarasovna Ilnitskaia<sup>2</sup>, Andrei Sergeevich Zviagin<sup>1</sup>, Vitalii Vladislavovich Radchenko<sup>1</sup>, Andrei Georgievich Koshchaev<sup>1</sup>, Leonid Petrovich Troshin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education FSBEI HE "Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin", 13 Kalinina Str., 350044, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup>Federal State Budget Scientific Institution North-Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, 39,40-letiya Pobedy Str., 350901, Krasnodar, Russia

Research into agrobιοlogical characteristics of grape varieties in connection with their genetics is important both for applied and fundametal studies. The presence or absence of anthocyanin color of the berries is one of the best expressed traits of grape plant. This trait is controled by the cluster of MYB genes located in the second chromosome of the caryotype. Some grape varieties serve as references in comparative studies aimed to investigate the Vitaceae genetic diversity, and clones of such varieties are of special interest. The paper reports findings regarding the structure of alleles of VvMybA1 gene in 32 clones of popular grape varieties: 'Merlot', 'Aligoté', 'Cabernet Sauvignon', 'Pinot blanc', 'Riesling' and 'Sauvignon blanc'. Alleles of VvMybA1 gene that are typical of varieties with colored or noncolored berries were detected in all study clones, and this was confirmed by comparing the sequenated sequences to the NCBI database with the aid of the NCBI BLAST service. It was established that all study clones of varieties with noncolored berries had an allele with a retrotransposon insertion blocking normal expression of the gene which, therefore, determines the absence of anthocyanins in the berries. One- and di-nucleotide replacements common to groups of the study clones and to some individual study clones were also detected. These replacements are, on the whole, typical of white-and red-berried grape vartieties. In addition, mutation-related differences typical of definite clones were revealed. These differences manifest themselves by double nucleotide peaks in sequencing and can be ascribed to heterogeneity of the study genotypes, i. e. their origin. Thus, the presence of typical alleles in the study clones of six grape varieties was confirmed, changes unique to varieties with colored and noncolored berries were revealed, and reference sequences of genes maintained in the collection plot of the Anapa Zonal Experiment Station were developed, for further research into the trait of interest.

**Key words:** *Vitis vinifera* L.; grapevine; wine varieties; VvMybA1; gene; allele; clone; heterogeneity.

#### Как цитировать эту статью:

Милованов А.В., Ильницкая Е.Т., Звягин А.С., Радченко В.В., Кощаев А.Г., Трошин Л.П. Исследование аллельного разнообразия VvMybA1 клоновых популяций распространенных винных сортов. «Магарач». Виноградарство и виноделие, 2019; 21(4); С. 294-298. DOI 10.35547/IM.2019.21.4.003

#### How to cite this article:

Milovanov A.V., Ilnitskaia E.T., Zviagin A.S., Radchenko V.V., Koshchaev A.G., Troshin L.P. A study of VvMybA1 allele diversity in populations of clones of popular wine grape varieties. Magarach. Viticulture and Winemaking, 2019; 21(4): 294-298. DOI 10.35547/IM.2019.21.4.003 (in Russian)

УДК 577.21

Поступила 03.09.2019

Принята к публикации 18.11.2019

© Авторы, 2019

#### Введение.

*Vitis vinifera* L. – одна из наиболее древних и распространенных растительных культур, издавна выращиваемых человеком. Как известно, чаще всего данная культура используется для дальнейшей переработки урожая в вино. А хорошее вино – это продукт, обладающий балансом множества различных характеристик, например, кислотность, сахаристость, наличие различных аминокислот и т.д. В свою очередь, такие общие показатели как качество и количество вина зависят от еще большего числа факторов, таких как почвенно-климатические условия, наличие полива и наличие вредителей [1, 2]. Тем более, установлено, что цены на вино,

произведенное на одной и той же территории, могут варьировать различное количество раз из года в год только из-за годовых погодных условий [1]. С другой стороны, стоимость вина, произведенного в один год, может варьировать из-за области, где оно произведено [1, 3].

Помимо этого, климат и агротехнология выращивания в совокупности с внутренними факторами сильно влияют на продолжительность жизни вина, и после откупоривания бутылки со временем его вкус и качество могут сильно изменяться, поэтому возможность сохранения продукта создает еще более высокий и желанный для потребителя класс вин [13, 14, 21, 26].

Очевидным фактом является то, что цвет играет важную роль в представлении потребителем возможного вкуса выбранного вина и других его достоинств [18, 24, 29]. Наличие пигментных компонентов влияет на состав вина, например, наличие антиоксидантов в красных винах [25, 32]. В частности, в молодых красных винах окраска усиливается также за счет содержания полифенольных соединений, присутствующих в кожице ягод, наиболее распространенными из которых являются антоцианины [5].

Как было установлено, антоциановая окраска ягод винограда контролируется кластером генов, расположенных в хромосоме 2 [4, 15, 22]. Этот локус близкородственен к R2R3-MYB генам и псевдогенам, среди которых функциональны MYBA1 и MYBA2, являющиеся двумя смежными транскрипционными факторами, регулирующими окраску ягод. Помимо них существуют MYBA3 и MYBA4, при этом они не показали наличие значительного (MYBA3) или какого-либо (MYBA4) влияния на синтез антоцианинов [10, 31]. Таким образом, в настоящее время научным сообществом в основном изучаются строение и экспрессия именно двух генов VvMybA1 и VvMybA2, у которых было открыто наличие аллелей, различных по своему строению, детерминированию признака и экспрессии, в том числе и возникающих при соматических мутациях [10, 11, 19].

На данный момент описаны различные варианты строения аллелей данных генов как для окрашенных сортов, так и для неокрашенных [17, 19]. При этом важно отметить, что была выявлена не только потеря окраски у мутантных форм [31], но и ее восстановление [4], что, конечно же, является интересным для конечного потребителя. Поэтому в нашем исследовании мы поставили целью изучение строения аллелей гена VvMybA1 у ранее отобранных клоновых форм для сравнения с результатами, полученными ранее, и накопление данных о референсных сортах для их последующего использования в исследованиях.

#### Материалы и методы.

В качестве растительного материала для изучения были взяты 32 клоновые формы различных близкородственных западно-европейских сортов: Мерло, Каберне-Совиньон, Рислинг, Алиготе, Пино белый и Совиньон блан (табл.).

Выделение ДНК из свежих листьев, отобранных на ампелографическом участке Анапской зональной опытной станции, проводили модифицированным ЦТАБ-методом с добавлением меркаптоэтанола [20] для выделения ДНК из высушенных растительных тканей – набором QIAGEN [9]. Для амплификации специфических областей из изученных геномов применяли праймеры и параметры ПЦР, описанные Azuma и др. [4]. Разделение продуктов амплификации проводилось в 2%-ном агарозном геле, после чего фрагменты вырезались и очищались при помощи набора Cleanup Standart компании ЗАО «Евроген Ру» (<http://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC022.pdf>). Секвенирование проводилось по методу Сенгера компанией ЗАО «Евроген Ру» с использованием прямого и обратного праймеров (<http://evrogen.ru/services/>

**Таблица.** Список клонов, использованных в работе

**Table.** List of clones used in the study

№	Название
1	Каберне-Совиньон 15 КМ
2	Каберне-Совиньон 15 КМ 2
3	Совиньон блан 2
4	Рислинг 3-14-9-9-1
5	Рислинг 3-14-11-11-1
6	Мерло 14МГ
7	Пино белый 31
8	Рислинг 2-19-6-1
9	Пино белый 6
10	Совиньон блан
11	Рислинг 7-15-107-7р
12	Каберне-Совиньон 337
13	Рислинг 7-12-201-15-1
14	Рислинг 3-14-4-11-1
15	Совиньон блан 3
16	Алиготе
17	Каберне-Совиньон 169
18	Каберне-Совиньон 5А
19	Каберне-Совиньон 217
20	Рислинг Алькадар 34а
21	Рислинг 9-9-1
22	Рислинг 7-11-18-9-1
23	Совиньон блан 3
24	Рислинг К-830
25	Совиньон блан 4
26	Пино белый 32
27	Пино белый 46
28	Рислинг
29	Мерло клон Громатенко
30	Рислинг 9-6-4
31	Рислинг 3-14-20-9-2
32	Рислинг 34г

[sequencing/service-sequencing.shtml](http://sequencing/service-sequencing.shtml)).

Обзор сиквенсов производился с помощью программы Unipro UGENE [23]. Сходство выявленных последовательностей с ранее изученными проводили с использованием базы данных NCBI, используя BLAST, blastx и CD-search [16]. Выравнивание последовательностей проводилось при помощи ClustalO [28]. Анализ на наличие мутационных изменений выполняли при помощи интерфейса MView [8].

#### Результаты.

В результате работы было изучено строение последовательностей аллелей гена VvMybA1 у 32 клонов, принадлежащих к 6 распространенным сортам винограда. Для определения принадлежности аллелей и установления особенности их строения, в сравнении с уже известными генотипами, мы провели поиск данных сиквенсов в базе данных NCBI. В результате анализа было выявлено, что сорта имеют аллели, характерные для краснойгодных и белаягодных генотипов. В

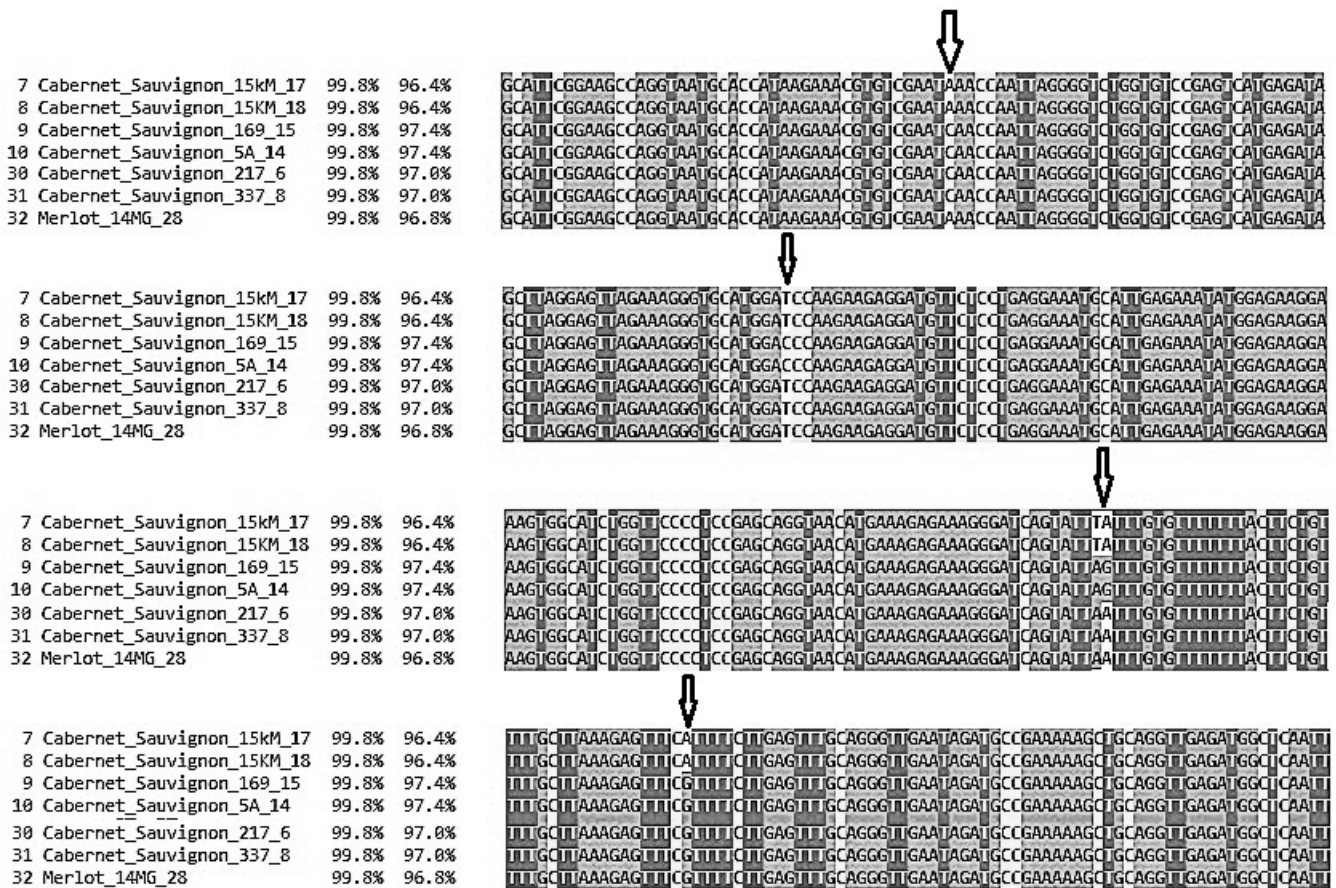


Рис. 1. Сравнение последовательностей изученных генотипов с выявленными различиями в программе ClustalO  
 Figure 1. Comparison of sequences of the study genotypes with the differences revealed using the program ClustalO

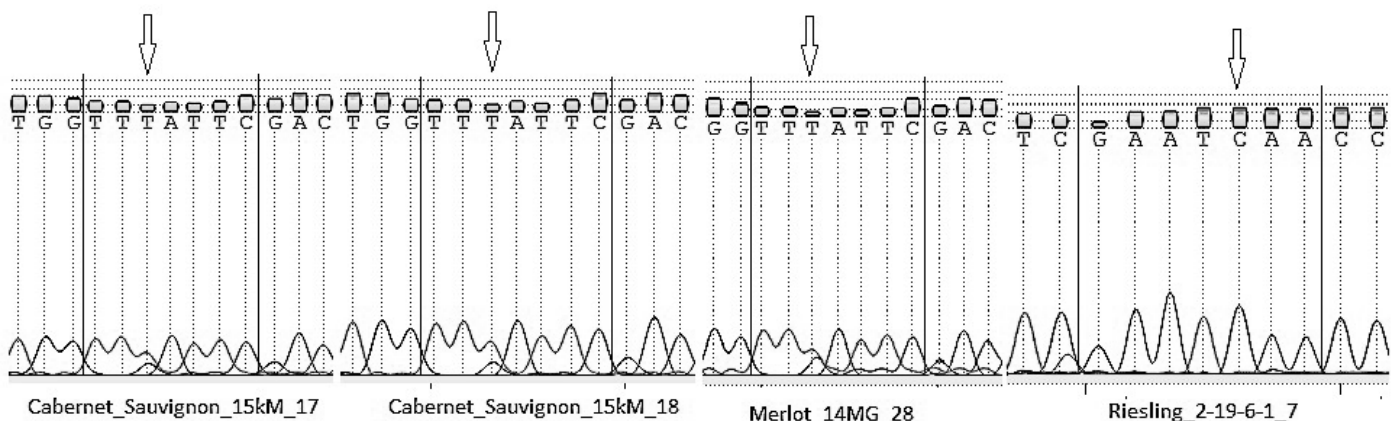


Рис. 2. Сравнение последовательностей окрашенных и неокрашенных генотипов  
 Figure 2. Comparison of sequences of the study genotypes with colored and non-colored berries

целом и общем, для клоновых генотипов, относящихся к сортам Рислинг, Пино белый, Совиньон белый и Алиготе, не было обнаружено изменений или гетерогенности в строении их аллелей, а строение их было характерным для белоягодных сортов [27, 33]. В это же время в последовательностях клонов сортов Каберне-Совиньон и Мерло были выявлены как изменения, так и гетерогенность, что само по себе интересно.

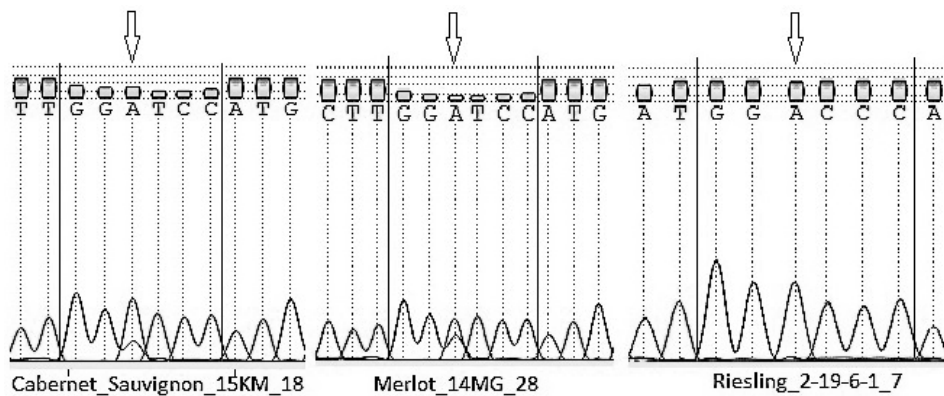
Таким образом, мы можем увидеть, что у некоторых генотипов имеются отличия, выраженные в моно- и динуклеотидных заменах. При этом отличия показали парные клоны, например, Каберне-Совиньон 15KM, что повышает вероятность достоверности. Интересно также отметить, что клон Мерло 14МГ также показал отличия, схожие с другими краснаягодными

генотипами, имеющими такие же мутации. Несмотря на это, мы провели поиск данных мест в сиквенсах при помощи программы Unipro UGENE.

Изученные окрашенные генотипы имеют отличия в строении последовательности их аллелей (рис. 2). Основное отличие заключается в раздвоении «пиков» при секвенировании, что говорит о наличии сразу двух аллелей, характерных для окрашенных и неокрашенных сортов. Данный вывод можно сделать при поиске того же участка у сорта Рислинг, где аденин заменен на цитозин, в то время как окрашенные сорта имеют обе аллели, что выражается в «двоении» нуклеотидов.

Было выявлено еще один сайт двоения последовательности при секвенировании, что отмечено стрел-





**Рис. 3.** Нуклеотидные замены, выявленные между окрашенными и неокрашенными сортами

**Figure 3.** Nucleotide replacements revealed in the study genotypes with colored and noncolored berries

кой на рисунке. Интересным является то, что имеется замена последующего нуклеотида: у окрашенных сортов – тимин, в то время как у неокрашенных – цитозин. Следует отметить, что такие же различия были выявлены и в 298, 299 и 398 нуклеотидах, где обнаружено раздвоение сиквенса. Тем не менее, у клонов Каберне-Совиньон было выявлено наличие аллели, имеющей ретроинверсионную вставку, характерную для сорта Совиньон блан и ответственную за отсутствие окраски. Очевидно, что она могла быть получена им от одного из предков и также была обнаружена посредством секвенирования, которое показало раздвоение некоторых нуклеотидов [7, 30]. Для клонов сорта Мерло установлено, что он является непосредственным родственником сорта Каберне-Совиньон, так как одним из его предполагаемых родителей является Каберне фран [6].

#### Выводы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что изученные генотипы имеют аллели, характерные для групп сортов, обладающих и не обладающих окраской ягод. В то же время исследованные сорта имеют отличия, которые характерны для разных агробиологических групп. Например, для всех белоягодных сортов выявлена схожесть с сортами и клонами, изученными ранее, что говорит о возможности их использования в дальнейшей сравнительной геномике. То же можно сказать об окрашенных сортах, так как у них было подтверждено наличие искомым аллелей, позволяющих экспрессировать антоциановую окраску. Тем не менее, для поиска различий между клонами рекомендуется использовать более переменные участки. Если говорить о генах, контролирующих антоциановую окраску, то наиболее вероятным представляется промотерная последовательность гена VvMybA2, в котором было выявлено наличие 19 полиморфных сайтов [15]. Можно сделать вывод о том, что, хотя клоны не имеют между собой отличия в изученных генах, но обладают аллелями, характерными для сортов, имеющих и не имеющих окраску. Это позволяет их использовать в дальнейших исследованиях как референсные сорта.

#### Источник финансирования

Работа поддержана грантом РФФИ и Админи-

страции Краснодарского края № 19-44-233003.

#### Financing source

The research was supported by a grant of the RFBR and the Administration of the Krasnodar region (N 19-44-233003).

#### Конфликт интересов

Не заявлен.

#### Conflict of interests

Not declared.

#### Список литературы/References

1. Ashenfelter O. Predicting the prices and quality of Bordeaux wines . The Economic Journal. 2008. №. 529. pp. 174-184.
2. Ashenfelter O., Storchmann K. The economics of wine, weather, and climate change . Review of Environmental Economics and Policy. 2016. №. 1. pp. 25-46.
3. Ashenfelter O., Storchmann K. Using a hedonic model of solar radiation to assess the economic effect of climate change: the case of Mosel Valley vineyards . National Bureau of Economic Research. 2006. №. 12. pp. 122-130.
4. Azuma A., Kobayashi S., Goto-Yamamoto N. et al. Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) 'Benitaka', a bud sport of 'Italia', is caused by a novel allele at the VvmybA1 locus . Plant Science. 2009. №. 4. pp. 470-478.
5. Boulton R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review . American journal of enology and viticulture. 2001. №. 2. pp. 67-87.
6. Boursiquot J. M., Lacombe T., Laucou V. et al. Parentage of Merlot and related winegrape cultivars of southwestern France: discovery of the missing link . Australian Journal of Grape and Wine Research. 2009. №. 2. pp. 144-155.
7. Bowers J. E., Meredith C. P. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon . Nature genetics. 1997. №. 1. pp. 84.
8. Brown N. P., Leroy C., Sander C. MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer . Bioinformatics (Oxford, England). 1998. №. 4. pp. 380-381.
9. Drábková L., Kirschner J. A. N., Vlček Ć. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae . Plant Molecular Biology Reporter. 2002. №. 2. pp. 161-175.
10. Ferreira V., Castro I., Carrasco D. et al. Molecular characterization of berry skin color reversion on grape somatic variants . Journal of Berry Research. 2018. №. 3. pp. 147-162.
11. Ferreira V., Fernandes F., Carrasco D. et al. Spontaneous variation regarding grape berry skin color: A comprehensive study of berry development by means of biochemical and molecular markers . Food research international. 2017. pp. 149-161.
12. Ferreira V., Pinto-Carnide O., Arroyo-García R. et al. Berry color variation in grapevine as a source of diversity . Plant Physiology and Biochemistry. 2018. №. 4. pp. 240-251.
13. Fogarty J. J. Wine investment and portfolio diversification gains . Journal of Wine Economics. 2010. №. 1. pp. 119-131.
14. Fogarty J. J., Sadler R. To save or savor: A review of approaches for measuring wine as an investment . Journal of Wine Economics. 2014. №. 3. pp. 225-248.
15. Fournier-Level A., Le Cunff L., Gomez C. et al. Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera*

- L. ssp. *sativa*) berry: a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study . *Genetics*. 2009. №. 3. pp. 1127-1139.
16. Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y. et al. NCBI BLAST: a better web interface . *Nucleic acids research*. 2008. №. 2. pp. W5-W9.
17. Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. Association of VvmybA1 gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants . *Japanese Society of Horticultural Science*. 2005. №. 74. pp. 196-203.
18. Lawless H. T., Heymann H. Sensory evaluation of food: principles and practices. Springer Science & Business Media, 2010.
19. Lijavetzky D., Ruiz-García L., Cabezas J. A. et al. Molecular genetics of berry colour variation in table grape . *Molecular Genetics and Genomics*. 2006. №. 5. pp. 427-435.
20. Lodhi M. A., Ye G. N., Weeden N. F. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species . *Plant Molecular Biology Reporter*. 1994. №. 1. pp. 6-13.
21. Masset P., Henderson C. Wine as an alternative asset class . *Journal of Wine Economics*. 2010. №. 1. pp. 87-118.
22. Matus J. T., Aquea F., Arce-Johnson P. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes . *BMC plant biology*. 2008. №. 1. p. 83.
23. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit . *Bioinformatics*. 2012. №. 8. pp. 1166-1167.
24. Parr W. V., Geoffrey White K., Heatherbell D. A. The nose knows: Influence of colour on perception of wine aroma . *Journal of Wine Research*. 2003. №. 2-3. pp. 79-101.
25. Pellegrini N., Simonetti P., Gardana C. et al. Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines) . *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000. №. 3. pp. 732-735.
26. Sanning L. W., Shaffer S., Sharratt J. M. Bordeaux wine as a financial investment . *Journal of Wine Economics*. 2008. №. 1. pp. 51-71.
27. Shimazaki M., Fujita K., Kobayashi H. et al. Pink-colored grape berry is the result of short insertion in intron of color regulatory gene . *PLoS One*. 2011. №. 6. C. e21308.
28. Sievers F., Higgins D. G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences . *Multiple sequence alignment methods*. Humana Press. Totowa. 2014. №. 6. pp. 105-116.
29. Singleton V. L., Noble A. C. Wine flavor and phenolic substances . Phenolic, sulfur, and nitrogen compounds in food flavors. №. 2. 1976. pp. 47-70.
30. Walker A. R., Lee E., Robinson S. P. Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus . *Plant molecular biology*. 2006. №. 5. pp. 623-635.
31. Walker A. R., Lee E., Bogs J. et al. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes . *The Plant Journal*. 2007. №. 5. pp. 772-785.
32. Waterhouse A. L. The phenolic wine antioxidants . *Handbook of Antioxidants*. 2001. №. 3. pp. 401-416.
33. Yakushiji H., Kobayashi S., Goto-Yamamoto N. et al. A skin color mutation of grapevine, from black-skinned Pinot Noir to white-skinned Pinot Blanc, is caused by deletion of the functional VvmybA1 allele . *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2006. №. 6. pp. 1506-1508.

ORCID ID:

Александр Валериевич Милованов – 0000-0002-6312-1147  
Елена Тарасовна Ильницкая – 0000-0002-2446-0971  
Андрей Сергеевич Звягин – 0000-0002-2684-5875  
Виталий Владиславович Радченко – 0000-0002-4449-3105  
Андрей Георгиевич Кошаев – 0000-0002-3904-2860  
Леонид Петрович Трошин – 0000-0001-5177-352X