

УДК 575.22: 634.8.07

**СРАВНЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ФРАГМЕНТА ГЕНА VVDXS
МУСКАТНЫХ СОРТОВ
ВИНОГРАДА**

Ильницкая Елена Тарасовна
канд. биол. наук
зав. лабораторией сортоизучения
и селекции винограда

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук
научный сотрудник
лаборатории генетики
и микробиологии

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия*

В селекции винограда наличие мускатного аромата у ягод является ценным признаком. Существует разнообразие оттенков аромата у мускатных сортов: обыкновенный аромат, пряный, напоминающий запах апельсинового цветка, с оттенком чайной розы и др. Происхождение сортов винограда с мускатным ароматом до сих пор точно не установлено. Отсутствие мускатных форм среди дикорастущего винограда и доминирование этого признака в гибридном потомстве дает основание считать, что этот признак возник в культуре. Мускатный аромат определяется накоплением монотерпеноидов в ягоде. Монотерпеноиды обнаруживают в значительных концентрациях в винограде сортов мускатной группы и в умеренных количествах в некоторых других ароматических сортах. Рядом работ было показано, что с накоплением монотерпеноидов в виноградной ягоде связан ген *VvDXS*. В представленной работе исследован фрагмент последовательности гена *VvDXS* в сортах винограда с наличием

UDC 575.22: 634.8.07

**COMPARISON
OF NUCLEOTIDE SEQUENCE
OF THE GENE VVDXS
FRAGMENT IN MUSKAT
GRAPES VARIETIES**

Ilitskaya Elena
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Cultivar's Study
and Breeding of Grapes

Tokmakov Sergey
Cand. Biol.Sci.
Research Associate
of Laboratory of Genetics
and Microbiology

*Federal State Scientific
Budget Institution
"North-Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Winemaking",
Krasnodar, Russia*

In the breeding of grapes, the presence of muscat aroma in the berries is a valuable feature. The Muscat grapes varieties have different shades of aroma: an ordinary aroma, spicy, the smell of an orange flower, the shade of tea rose and others. The origin of grapes varieties with muscat flavor has not yet been established. The absence of muscat forms among wild grapevines and the dominance of this feature in hybrid progeny allow us to suggest that this sign is originated in the culture. Muscat aroma is characterized by the accumulation of monoterpenoids in the berries. Monoterpenoids are found in significant concentrations in the grapes of Muscat group and in moderate ones in some other aromatic varieties. A number of studies have shown that the accumulation of monoterpenoids in a grape berry is associated with the gene *VvDXS*. In the present paper, we investigate the fragment of the sequence of the gene *VvDXS*

мускатного аромата с целью изучения возможности создания ДНК-маркера для селекции. Основным методом, применяемым в работе – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование продуктов реакции с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. В работе изучали мускатные сорта винограда – Новоукраинский ранний, Фрумоаса Албэ, Бархатный, Астаникский, Иршай Оливер, Литдар, Мускат гамбургский, Алина, Ларни мускатная, и сорт без мускатного аромата – Алиготе. Был выявлен полиморфизм в последовательности изучаемого фрагмента гена *VvDXS* у исследованных генотипов, однако корреляции, сцепленной с изучаемым признаком «мускатный аромат», не выявлено.

Ключевые слова: ВИНОГРАД, МУСКАТНЫЙ АРОМАТ, ДНК-АНАЛИЗ, *VvDXS*

in the grapes varieties with muscatel flavor to study the possibility of creation of DNA marker for breeding. The main method used in the study are the polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of reaction products by using an automated genetic analyzer ABI Prism 3130. Muscat varieties Novoukrainskiy Ranni, Frumoasa Albe, Barkhatnyi, Astanikskiy, Irshai Oliver, Litdar, Muscat Gamburgskiy, Alina, Larni Muskatnaya and the variety without muskat aroma were studied. Polymorphism in the sequence of the studied fragment of the *VvDXS* gene in the studied genotypes have been identified, however, the correlation linked with the studied sign "muscat flavor" is not revealed.

Key words: GRAPEVINE, MUSCAT AROMA, DNA-ANALYSIS, *VvDXS*

Введение. Создание сортов с объединенными признаками высокого качества урожая и устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам – основная цель селекционных программ винограда. Молекулярно-генетические методы всё больше находят своё применение в селекционном процессе, однако, если уже разработан и успешно применяется ряд ДНК-маркеров, сцепленных с генами устойчивости к патогенам, то ДНК-маркеров для раннего отбора высококачественных форм практически нет [1].

Мускатный аромат является ценным востребованным признаком в селекции винограда как столового, так и технического назначения. Если общее число сортов *Vitis vinifera* L. выражается тысячами, то мускатных из них известно немногим более сотни. Мускатные сорта винограда условно делят на три группы: с обыкновенным ароматом, с ароматом, напоминающим запах апельсинового цветка и с пряным ароматом. Однако разнообразие оттенков аромата мускатных сортов этим не исчерпывается. Например, у сорта Мускат венгерский аромат пряный, очень сильный, даже перена-

сыщенный, у сорта Италия – тонкий, устойчивый, с лимонным оттенком. У Муската белого хорошо выражены цитронные тона, у Муската розового сильный аромат с оттенком чайной розы. В аромате сортов Мускат александрийский, Королева виноградников, Жемчуг Саба улавливаются нестойкие пряные тона. Сорт Мускат гамбургский обладает специфическим тонким ароматом с оттенком чайной розы [3].

Происхождение сортов винограда с мускатным ароматом до сих пор точно не установлено. Так А.М. Негруль, изучая проблему возникновения мускатного аромата ягод у винограда, указывал на то, что среди большого сортимента Средней Азии (как культурных, так и дикорастущих) ни одного мускатного сорта не обнаружено; не обнаружено мускатных форм и среди дикорастущих сортов и форм Закавказья. На основании этого А.М. Негруль выдвигал теорию о том, что впервые признак мускатности возник как мутация в Аравии, Египте или где-либо в Средиземноморье. Однако впоследствии он же утверждал, что такие признаки, как мускатный аромат, крупный размер ягод и гроздей свойственны только культурному винограду и возникли в результате искусственного отбора и вегетативного размножения винограда в культуре, что эти формы совершенно отсутствуют или являются редким исключением у диких видов винограда. При гибридизации мускатных сортов с немускатными в первом поколении выщепляется много сеянцев с мускатным ароматом. Это также дает основание предположить, что в культуре мускаты находятся недавно. Если бы эти формы давно существовали, то при доминировании мускатного аромата в скрещиваниях, они были бы известны в настоящее время в большом количестве и среди диких видов, и в культуре. Однако этого не наблюдается. Отсутствие мускатных форм среди дикорастущего винограда и доминирование этого признака в гибридном потомстве дает основание считать, что этот признак возник в культуре. Можно предположить, что впервые мускатные сорта выделились в результате искусственного отбора почко-

вых мутаций и, размножаясь в дальнейшем вегетативно, сохранились до наших дней. Появление сортов с мускатным ароматом в культуре происходило путем постепенного направленного отбора сортов, обладающих всё более и более выраженным ароматом. Новые мускатные сорта могли появляться от свободного опыления древних сортов, а позднее – путем целенаправленной селекции [2].

Мускатный аромат определяется накоплением монотерпеноидов в ягоде. Монотерпеноиды обнаруживаются в значительных концентрациях в винограде сортов мускатной группы и в умеренных количествах в некоторых других ароматических сортах [3, 4]. Рядом работ была показана связь накопления монотерпеноидов в виноградной ягоде с геном *VvDXS* [5, 6]. По последним литературным данным аллельные вариации гена *VvDXS* определяют наличие либо отсутствие этого признака у ягод винограда [7].

Объекты и методы исследований. Селекционно-ценный признак «наличие мускатного аромата» включен нами в изучение на молекулярно-генетическом уровне. Исследована последовательность гена *VvDXS* в сортах винограда с наличием мускатного аромата с целью изучения возможности создания ДНК-маркера, пригодного для маркерного отбора в селекционном процессе. Основным методом, применяемым в работе, – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование продуктов реакции с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130.

В работе использовали мускатные сорта Новоукраинский ранний, Фрумоаса Албэ, Бархатный, Астаникский, Иршаи Оливер, Литдар, Мускат гамбургский, Алина, Ларни мускатная, и сорт без мускатного аромата Алиготе. ДНК выделяли методом ЦТАБ из развивающихся листочков молодых побегов [8].

В результате исследования F. Emmanuelli et al. (2014) были разработаны маркеры, фланкирующие область генома, связанную с мускатным ароматом в изученной авторами виноградной генплазме [7].

Методом ПЦР нами были амплифицированы целевые фрагменты генома исследуемых сортов. Нуклеотидные последовательности праймеров взяты из литературного источника [7]:

DXS7 f - GGTТАСААТСТСАССТТСТСТG

DXS8 r - GCTAGACAGAACAGGTAAGAT

ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем порядка 50 нг геномной ДНК, 1,5 единицы Tag-полимеразы («СибЭнзим», Россия), 1xTag-полимеразного буфера («СибЭнзим»), 2мМ MgCl₂ («СибЭнзим»), 0,2 мМ каждого dNTP («СибЭнзим») и 200 мкМ каждого праймера («Синтол», Россия). Амплификацию осуществляли с использованием прибора Eppendorf Mastercycler gradient (Германия) при следующих условиях: 5 минут при 95 °С, далее 35 циклов: 10 секунд при 95 °С, 30 секунд при 60 °С, 60 секунд при 72 °С; последний цикл синтеза – 5 минут при 72 °С.

Полученный ПЦР-продукт (1,506 bp) с ДНК каждого сорта был вовлечён в дальнейшее исследование. С использованием праймеров DXS8f и DXS8r была секвенирована область амплифицированных фрагментов (800 bp), в которой предполагалось обнаружить snp-полиморфизм [7]. Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК в прямом и обратном направлении проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. Сравнение секвенированных последовательностей осуществляли в онлайн приложении "Clustal Omega" (режим доступа – <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) с использованием генетического анализатора ABI Prism3130.

Обсуждение результатов. Сравнение нуклеотидной последовательности целевых участков генома изучаемых сортов по данным секвенирования амплифицированных продуктов выявило несколько полиморфных точек как в прямой, так и в обратной последовательности, однако взаимосвязи с признаком наличия мускатного аромата не обнаружено (рис.).

Фрумоаса Албэ	TAGGCATGGCAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGCAGCTTTCTCAGCATATGGAT
Бархатный	GGCAATTGGCAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGC GG CTTTCTCAGCATATGGAT
Ларни мускатная	TAGGCATGGCAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGC GG CTTTCTCAGCATATGGAT
Астаникский	TAGGCATGGTAAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGCAGCTTTCTCAGCATATGGAT
Алиготе	TAGGCATGGCAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGCAGCTTTCTCAGCATATGGAT
Алина	TAGGCATGGTAAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGCAGCTTTCTCAGCATATGGAT
Мускат гамбургский	AGGGCATGGGAAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGC GG CTTTCTCAGCATATGGAT
Иршаи оливер	TAGGCATGGCAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGCAGCTTTCTCAGCATATGGAT
Новоукраинский ранний	TAGGCATGGCAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGCAGCTTTCTCAGCATATGGAT
Литдар	GGGGCATGGCAATTTGTTACTTACCATGGTACTTATCTGCAGCTTTCTCAGCATATGGAT

*** *****

Фрумоаса Албэ	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Бархатный	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Ларни мускатная	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Астаникский	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Алиготе	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Алина	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Мускат гамбургский	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Иршаи оливер	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Новоукраинский ранний	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG
Литдар	TGTCAGAATCCAGGTA CC CAGCATTGTTTCATTGCTTCATAAGCTTGCCCTGCAGTCATGG

Фрагменты секвенированного участка гена *VvDXS* с выявленным snp-полиморфизмом

F. Emmanuelli et al. выдвигают предположение, что аллельные модификации гена *VvDXS* могут влиять на выраженность признака, определяя степень насыщенности мускатного аромата, его вариации, оттенки [7]. В нашей работе были задействованы сорта, унаследовавшие признак мускатности от источников: Мускат гамбургский (унаследован признак от Муската александрийского); Шасла мускатная (унаследован признак от неизвестного мускатного сорта); Жемчуг Саба (неизвестного происхождения); Сейв Виллар 20-473 (табл.). Однако, snp-полиморфизм, связанный с источниками признака, также не обнаружен.

Происхождение исследуемых сортов винограда

Сорт	Родительские формы
Новоукраинский ранний	Джура узюм x Жемчуг Саба (неизвестного происхождения)
Фрумоаса Албэ	Гузаль кара x Сейв Виллар 20-473
Бархатный	Кировабадский столовый x Мускат гамбургский (Франкенталь x Мускат александрийский)
Астаникский	Галан x Мускат гамбургский (Франкенталь x Мускат александрийский)
Иршаи Оливер	Братиславский белый x Жемчуг Саба (неизвестного происхождения)
Литдар	Хиндогны x Мускат гамбургский (Франкенталь x Мускат александрийский)
Мускат гамбургский	Франкенталь x Мускат александрийский
Алина	Мадлен Анжевин x Мускат гамбургский (Франкенталь x Мускат александрийский)
Ларни мускатная	Шасла мускатная (Шасла белая x неизвестный мускатный сорт) x Галан
Алиготе (не мускат)	Стародавний французский сорт

Заключение. Проведён анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *VvDXS* девяти сортов, обладающих мускатным ароматом, и сравнение их с последовательностью этого же фрагмента в ДНК сорта без наличия данного признака. Был выявлен полиморфизм в последовательности изучаемого фрагмента гена *VvDXS* у исследованных генотипов, однако корреляции, сцепленной с наличием признака «мускатный аромат», выявлено не было.

Литература

1. Ильницкая, Е.Т. Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда / Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. – № 4. – С. 528-536.
2. Краснохина, С.И. Подбор и селекция сортов винограда с мускатным ароматом для условий Нижнего Придонья: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.07 / Краснохина Светлана Ивановна. – Новочеркасск, 2001. – 15 с.

3. Gunata, Y. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components / Y. Gunata, C. Bayonove, R. Baumes // *J. Chromatogr A.* – 1985. – V. 331. – P. 83-90.
4. Mateo, J.J. Monoterpenes in grape juice and wines / J.J. Mateo, M. Jimenez // *J. Chromatogr A.* – 2000. – V. 881. – P. 557–567.
5. Battilana, J. The 1-deoxy-D:-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grapevine / J. Battilana, L. Costantini, F. Emanuelli, F. Sevini, C. Segala, S. Moser, R. Velasco, G. Versini, M.S. Grando // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – V. 118. – P. 653-669.
6. Duche[^]ne, E. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-d-xylulose synthase gene colocates with a major quantitative trait loci for terpenol content / E. Duche[^]ne, G. Butterlin, P. Claudel, V. Dumas, N. Jaegli, D. Merdinoglu // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – V. 118. – P. 541-552
7. Emanuelli, F. Development of user-friendly functional molecular markers for *VvDXS* gene conferring muscat flavor in grapevine / F. Emanuelli, M. Sordo, S. Lorenzi, J. Battilana, M.S. Grando // *Mol Breeding.* – 2014. – V. 33. – P. 235-241.
8. Rogers, S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // *Plant Molecular Biology.* – 1985. – P.69-76.

References

1. Il'nickaja, E.T. Primenenie DNK-markerov v sovremennyh selekcionno-geneticheskikh issledovanijah vinograda / E.T. Il'nickaja, M.V. Makarkina // *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii.* – 2016. – T. 20. – № 4. – S. 528-536.
2. Krasohina, S.I. Podbor i selekcija sortov vinograda s muskatnym aromatom dlja uslovij Nizhnego Pridon'ja: avtoref. dis. ... kand. s.-h. nauk : 06.01.07 / Krasohina Svetlana Ivanovna. – Novocherkassk, 2001. – 15 s.
3. Gunata, Y. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components / Y. Gunata, C. Bayonove, R. Baumes // *J. Chromatogr A.* – 1985. – V. 331. – P. 83-90.
4. Mateo, J.J. Monoterpenes in grape juice and wines / J.J. Mateo, M. Jimenez // *J. Chromatogr A.* – 2000. – V. 881. – P. 557–567.
5. Battilana, J. The 1-deoxy-D:-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grape-vine / J. Battilana, L. Costantini, F. Emanuelli, F. Sevini, C. Segala, S. Moser, R. Velasco, G. Versini, M.S. Grando // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – V. 118. – P. 653-669.
6. Duche[^]ne, E. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-d-xylulose synthase gene colocates with a major quantitative trait loci for terpenol content / E. Duche[^]ne, G. Butterlin, P. Claudel, V. Dumas, N. Jaegli, D. Merdinoglu // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – V. 118. – P. 541-552
7. Emanuelli, F. Development of user-friendly functional molecular markers for *VvDXS* gene conferring muscat flavor in grapevine / F. Emanuelli, M. Sordo, S. Lorenzi, J. Battilana, M.S. Grando // *Mol Breeding.* – 2014. – V. 33. – P. 235-241.
8. Rogers, S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // *Plant Molecular Biology.* – 1985. – P.69-76.