

Javier IBÁÑEZ<sup>\*</sup>, Vesna MARAŠ<sup>\*\*</sup>, Milena MUGOŠA<sup>\*\*</sup>,  
Mirko PERIŠIĆ<sup>\*\*</sup>, Jovana RAIČEVIĆ<sup>\*\*</sup>, Enrique GARCÍA-  
ESCUADERO<sup>\*</sup>, Nataša ŠTAJNER<sup>\*\*\*</sup>, Miodrag GRBIĆ<sup>§</sup>,  
Jose Miguel MARTÍNEZ-ZAPATER<sup>\*</sup>

## GENETSKO PORIJEKLO I GENOMSKI DIVERZITET SORTE VRANAC

**Sažetak:** Vranac je jedna od najvažnijih sorti vinove loze crnogorskog sortimenta i privredno je najznačajnija sorta u vinogradarstvu i vinarstvu u Crnoj Gori.

Najobuhvatnija istraživanja, rađena u Crnoj Gori na proučavanju genetskog diverziteta vinove loze u ovoj zemlji, pokazala su da je sorta vranac druga po zastupljenosti, odnosno broju uzorkovanja najstarijih čokota vinove loze. Poznato je da je sorta vranac u odnosu roditelj — potomak sa sortom kratošija, a u ovom istraživanju pronađen je kompatibilan pedigree sorte vranac u kojem je sorta kratošija muški roditelj — otac i sorta duljenga ženski roditelj — majka.

Unutarsortni genetski diverzitet vranca analiziran je kroz resekvencioniranje i poređenje sekvenci genoma na tri selekcionisana klona sorte vranac (klon 1, klon 2 i klon 5), pri čemu je kod klonova uočena velika sličnost. Nijedna razlika, na nivou nukleotida (SNV), između klonova nije mogla biti potvrđena, što je i očekivano s obzirom na to da su se ovi klonovi izdvojili tokom posljednjih decenija. Međutim, detaljnim ispitivanjem identifikovane su dvije strukturne razlike (SV) koje se javljaju kod klona 1 i kod klona 2, dok kod klona 5, koji je najvišeg kvaliteta, nijesu uočene i odsustvo ovih razlika može poslužiti za izdvajanje ovog klona od drugih.

**Ključne riječi:** *vranac, diverzitet, porijeklo, roditelji, sorta, klon, sekvenciranje genoma*

---

<sup>\*</sup> Institut za vinovu lozu i vino, Logroño, La Rioja, Španija

<sup>\*\*</sup> „13. jul — Plantaže”, Podgorica, Crna Gora

<sup>\*\*\*</sup> Biotehnički fakultet, Agronomski odsjek, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija

<sup>§</sup> Departman za biologiju, Univerzitet Zapadni Ontario, London, Ontario, Kanada

## UVOD

Vranac pripada ekološko-geografskoj grupi sorti *proles pontica* (*convarietas pontica*). Vranac je visokoprinosna sorta. Čokot sorte vranac je bujan, cvijet hermafroditan, bobica je srednje velika, plave boje sa tankom pokožicom. Grozd je srednje velik, cilindričan, srednje zbijen. Vino proizvedeno od grožđa ove sorte je prijatno, harmonično, specifičnog sortnog mirisa i ukusa. Prepoznatljivo je i po intenzivnoj boji i udjelom alkohola od 11 do 14% i 5–6 g/l kisjelina. Zbog svojih kvalitetnih osobina i enološkog potencijala idealno je i za kupažu sa vinima drugih sorti, pri čemu se kreira više profila i stilova vina vranac koja osvajaju najveće nagrade na prestižnim evropskim i svjetskim vinskim ocjenjivanjima.

Rane bibliografske navode o sorti vranac dao je Plamenac [1] ističući da se sorta vranac vjekovima koristila u Crnoj Gori za proizvodnju crvenog vina. Prvi značajniji opis ove sorte objavljen je u „Ampelografiji” Viala i Vermorela [2]. Brojni autori iz bivše Jugoslavije [2–16] (Stojanović 1929, Bulić 1949, Ulićević 1959, 1966, Nastev 1967, Četković 1978, Zirojević 1979, Avramov 1988, Pejović 1988, Burić 1995, Božinović 1996, Milosavljević 1998, Maraš 2000, Maraš i sar. 2004) navode vranac kao crnogorsku autohtonu sortu vinove loze. Za sortu vranac Ulićević [6] navodi sinonime: vranac krstač, crmnička loza, vranac crmnički i ističe da je do I svjetskog rata vranac bio zastupljen samo u Crmnici. U nekim krajevima van Crmnice (Crna Gora), ova sorta se jednostavno zvala crmnička loza. Vranac se gajio na veoma uskom prostoru, tako da njegov areal gajenja početkom 20. vijeka nije bio širi od 30 km. Kasnije se širio na sve vinogradarske terene Crne Gore i prostore bivše Jugoslavije. Nastev [7] ističe da je vranac crnogorska autohtona sorta vinove loze koja se uglavnom gaji u regiji Skadarskog jezera (Crmnica), ali i na crnogorskoj obali i da je iz Crne Gore prenesena u Makedoniju 1950. godine. Danas je vranac glavna sorta za proizvodnju crvenih vina u Crnoj Gori, a uspješno se gaji u Dalmaciji, Hercegovini, Metohiji, Makedoniji i Srbiji [17].

Rad na genetskoj identifikaciji i klonskoj selekciji ove privredno najznačajnije sorte vinove loze u Crnoj Gori je započet 2004. godine. Karakterizaciju mikrosatelitima genotipa vranca objavili su Calò i sar. [18] i Maraš i sar. [19, 20]. Poređenjem genotipa sorte vranac sa drugim crnogorskim sortama pokazano je da je vranac u bliskoj vezi sa sortom kratošija [18, 21] i da se vjerovatno radi o prvom stepenu srodstva roditelj — potomak. U istom radu [18] je potvrđeno da kratošija ima identični genetski profil kao zinfandel iz Kalifornije, primitivo iz Italije i crljenak kaštelanski iz Hrvatske.

Kao rezultat višegodišnjeg rada na klonskoj selekciji sorte vranac, selekcionisano je i 2014. godine priznato 7 klonova autohtone sorte vranac (klon vranac

1, klon vranac 2, klon vranac 3, klon vranac 4, klon vranac 5, klon vranac 6 i vranac klon 7) koji su svojim osobinama nadmašili populaciju sorte [22].

U saradnji sa Institutom za vinovu lozu i vino iz La Rioje nastavljene su aktivnosti u cilju genetičkog diverziteta i pedigre analize, pronalazeći roditelje sorte vranac. Pored toga, sekvenca genoma od 3 odabrana klona sorte vranac analizirana je da bi se opisalo postojanje intrasortnih somatskih varijacija i da bi se proučio razvoj specifičnih molekularnih markera klonova.

## MATERIJAL I METODE

Istraživanje je obuhvatilo ukupno 512 uzoraka vinove loze prikupljenih u Crnoj Gori, uključujući kultivisane sorte i divlje forme. Takođe, analizirani su i uzorci koji se trenutno čuvaju u kolekciji vinove loze na Biotehničkom fakultetu, kao referentni genotipovi i potencijalni predstavnici starih sorti koje se više ne gaje.

U metodologiji koja je korišćena u ovom istraživanju upotrijebljene su različite metode za proučavanje varijacija između sorti ili varijacija unutar sorti. Sve metode se zasnivaju na detekciji i kvantifikaciji varijacija DNK sekvenci na različitim nivoima, ili na specifičnim lokusima, pomoću SNP molekularnih markera, ili dobijanjem i upoređivanjem sekvence nuklearnog i hloroplastnog genoma. Za intersortnu varijaciju svi uzorci su genotipizovani za SNP molekularne markere. DNK je izolovana iz mladog lišća svakog uzorkovanog čokota vinove loze [23]. Svaki DNK uzorak je genotipizovan za skup od 48 SNP markera, koji odgovaraju i nuklearnim (45) i hloroplastnim (3) polimorfnim mjestima, koji su prethodno razvijeni na ICVV [23, 24]. Nakon što su identifikovani ne-redundantni genotipovi vinove loze, oni su dalje genotipizovani sa 192 dodatna polimorfna mjesta SNP-a kako bi se izvršile pedigre analize koje pomažu da se identifikuju odnosi roditelja i potomaka među sortama, kao i roditelji za datu sortu. Za proučavanje varijacija unutar sorti, izvršili smo masovno re-sekvenciranje tri klona vranca kao pristup za identifikaciju mogućih fenotipskih varijacija koje su uočene među njima i za generisanje molekularnih markera za njihovu karakterizaciju i praćenje. Za njihovo sekvencioniranje koristili smo Illumina platformu (HiSeq 2000) u režimu čitanja sa uparenim krajem i prosječnom pokrivenošću preko 30Ks u svim slučajevima [25].

## REZULTATI

Među 512 uzoraka rezultati istraživanja potvrdili su identifikaciju 151 jedinstvenog genotipa. Od analiziranih uzoraka, 105 je odgovaralo kultivisanim formama (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*), 43 je odgovaralo formi *Vitis vinifera*

ssp. *sylvestris*, a 3 su odgovarala međuvrtnim hibridima. Upoređivanjem 105 različitih jedinstvenih genotipova *Vitis vinifera* sa bazom podataka, koja broji više od 2600 genotipova vinove loze, sa više od 100 balkanskih sorti, bila je moguća identifikacija — dodijeliti glavno ime za 33 genotipa.

Svih 148 jedinstvenih genotipova *Vitis vinifera* analizirani su sa 192 dodatna SNP-a. Za većinu dobijenih genotipova obavezno je bilo odraditi pedigree analizu u cilju identifikacije odnosa roditelj — potomak među sortama, kao i identifikaciju roditelja određenih sorti. Pedigree analizom određeno je 28 triosa (otac — majka — potomak), uključujući 2 kompatibilna roditelja za određeno potomstvo sa 2 ili manje nepodudarnosti i sa LOD vrijednošću iznad 62. Samo dva od ovih triosa ranije su pominjani u literaturi, a u 24 sva tri uključena genotipa su uzorkovana u Crnoj Gori. Sorte razaklija i kratošija uključene su u 15 i 12 triosa respektivno, od kojih su 6 zajednički triosi. Zanimljivo je to što je kod dva, od ovih šest triosa, potomak divlja forma.

Dobijeni rezultati pedigree analize ukazuju da je crnogorsko vinogradarstvo zasnovano na porodici genetički povezanih sorti. Ova porodica u Crnoj Gori uglavnom je formirana od dvije sorte: kratošije (primitivo), vinska sorta koja je pretpostavljeni predak za 18 analiziranih genotipova (>33%) i razaklija (parmak crveni), stona sorta koja je mogući predak 20 analiziranih genotipova (20%). Roditeljske veze, koje su otkrivene među sortama vinove loze u Crnoj Gori, često su zapažene u drugim tradicionalnim vinogradarskim područjima.

Ovo istraživanje je omogućilo utvrđivanje pedigreea, odnosno roditelja sorti vranac. Potvrđeno je da je kratošija muški roditelj, a da je, manje poznata sorta iz kolekcije, duljenga ženski roditelj. Ovaj pedigree dodatno je potvrđen pomoću 25 mikrosatelitskih markera. Duljenga je sorta koja se čuva samo u kolekciji i koja se ne podudara ni s jednom sortom u katalogu sorte Vitis International. Istočnoevropsko porijeklo vranca je, takođe, potvrđeno njegovim hlorotipom D [26]. Hlorotip je omogućio identifikaciju majke u pedigreeu sorte vranac, budući da je hlorotip majčinski naslijeđen, a vranac i duljenga dijele isti hlorotip (D).

Genetski diverzitet između tri odabrana klona vranca analiziran je ponovnim sekvenciranjem i detaljnim upoređivanjem njihovih sekvenci. Rezultati su pokazali da je genom sorte vranac u cjelini bio divergentniji od referentnog genoma PN40024 rekvenciranih genoma drugih zapadnih sorti kao što je *tempranillo*, što je i očekivano od vranca i njegovih predaka koji su istočnog porijekla. Nije otkrivena nijedna razlika nukleotida među klonovima, što je i očekivano imajući u vidu da su klonovi izdvojeni tokom posljednjih decenija. Međutim, detaljno ispitivanje identifikovalo je dvije strukturne razlike koje su bile prisutne u vrancu 1 i vrancu 2, a nijesu bile prisutne u vrancu 5. Vranac 5 je najkvalitetniji klon i zbog toga se odsustvo ovih strukturnih

varijacija može koristiti u njegovoj identifikaciji. Moguće je izvršiti daljnje analize kako bi se razumio fenotipski efekat ove strukturne varijacije koji je vjerovatno nastao zbog procesa rekombinacije genoma.

## ZAKLJUČAK

Pedigre analiza uzoraka genotipova *Vitis vinifera* u Crnoj Gori, pomoću baze podataka koja sadrži preko 1400 genotipova vinove loze, identifikovala je kratošiju i razakliju kao najrelevantnije sorte među genotipovima vinove loze u Crnoj Gori. Ove sorte su mogući preci aktuelnih sorti na ovom području.

Ovi rezultati ukazuju na značaj kratošije i razaklije u drevnom crnogorskom vinogradarstvu, kao i na dugu istoriju gajenja vinove loze u Crnoj Gori. Vranac, sorta sa visoko dokazanim enološkim potencijalom, se može smatrati crnogorskom autohtonom sortom na osnovu istorijskih i genetičkih podataka. Genetska studija identifikovala je oba roditelja ove sorte, koja je vjerovatno nastala u subregionu Crmnice. Njegov muški roditelj je kratošija, kako je i ranije pretpostavljeno, dok je ženski roditelj sorta duljenga koja se nalazi samo u kolekciji sorata na Biotehničkom fakultetu.

Eksperimenti ponovnog sekvenciranja identifikovali su jedan od visoko-kvalitetnih klonova vranca na osnovu prisustva/odsustva strukturnih varijanti. Ove razlike u sekvenci mogu se koristiti za razvoj specifičnih molekularnih markera koji se mogu koristiti za genetsku identifikaciju.

## LITERATURA

- [1] Plamenac M. (1891): Grlica. Državna štamparija, Cetinje.
- [2] Viala P. and Vermorel V. Ampélographie I–IV. Massonet Cie, Paris. 1901–1910.
- [3] Stojanović M. (1929): Novo vinogradarstvo. „Sv. Sava” M. Sladekovića, Belgrade, 462.
- [4] Bulić S. (1949): Dalmatinska Ampelografija. Poljoprivredni Nakladni Zavod, Tisak Nakladnog Hrvatskog Zavoda, Zagreb, 359.
- [5] Ulićević M. (1959): Prilog rejonizaciji vinogradarstva u Crnoj Gori. Naša poljoprivreda i šumarstvo, num. 2/V, Titograd.
- [6] Ulićević M. (1966): Prilog proučavanju osobina najvažnijih sorata vinove loze gajenih u SR Crnoj Gori. Archive of Agricultural Sciences, year X, sv. 23, 1–100.
- [7] Nastev D. (1967): Specijalno Lozarstvo. Izdanie na Universitetot vo Skopje, Skopje.
- [8] Četković V. (1978): Uticaj đubrenja i navodnjavanja na biološke osobine i prinos grožđa sorte kratošija u ekološkim uslovima Titograda. Doktorska disertacija, Sarajevo.
- [9] Zirojević D. (1979): Poznavanje sorata vinove loze. Nolit, Beograd, 432.

- [10] Avramov L. (1988): *Savremeno gajenje vinove loze*. Nolit, Beograd, 640.
- [11] Pejović Lj. (1988): *Ampelografska proučavanja varijeteta kratošije*. Jugoslovensko vinogradarstvo i vinarstvo. N. 3–4, Beograd.
- [12] Burić D. (1995): *Savremeno vinogradarstvo*. Nolit, Beograd, 522.
- [13] Božinovik Z. (1966): *Ampelografija*. Agencija „Akademik”, Skopje.
- [14] Milosavljević M. (1998): *Biotehnika vinove loze*, Institut za istraživanja u poljoprivredi Srbija, Beograd, „Draganić”, Zemun, 566.
- [15] Maraš V. (2000): *Ampelografske karakteristike varijeteta sorte vinove loze*. Poljoprivredni fakultet. Doktorska disertacija, Zemun — Beograd, 155.
- [16] Maraš V., Milutinović M. and Pejović Lj. (2004): Variability in the autochthonous vine variety Kratošija. *Acta Hort.* 640, 237–241. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.640, 26.
- [17] Milosavljević, M. (2008): *Biotehnika vinove loze*. Institut za istraživanja u poljoprivredi Srbija, Beograd, „Draganić”, Zemun.
- [18] Calò A., Costacurta A., Maraš V., Meneghetti S. and Crespan M. (2008): Molecular Correlation of Zinfandel (Primitivo) with Austrian, Croatian, and Hungarian Cultivars and Kratošija, an Additional Synonym. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 205–209.
- [19] Maraš V., Tomić M., Kodžulović V., Šućur S., Raičević J., Raičević D., Čizmović M. (2012): Research of origin and work on clonal selection of Montenegrin grapevine varieties Cv. Vranac and Cv. Kratosija. I International symposium and XVII scientific conference of agronomists of republic of Srpska. ISBN 978–99938–93–20–2. COBISS. BH-ID 2630424. Trebinje, Bosna i Hercegovina.
- [20] Maraš V., Božović V., Giannetto S., Crespan M. (2014): SSR molecular marker analysis of the grapevine germplasm of Montenegro. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 48, 87–97.
- [21] Maraš V., Popović T., Gazivoda A., Raičević J., Kodžulović V., Mugoša M., Šućur S. (2015): Origin and characterization of Montenegrin grapevine varieties. *Vitis* 54, 135–137.
- [22] Maraš V., Kodžulović V., Mugoša M., Raičević J., Gazivoda A., Šućur S., Perišić M. (2017): Clonal selection of autochthonous grape variety Vranac in Montenegro. In: A. Badnjević (Ed) *CMBEBIH 2017. IFMBE Proceedings*, vol 62. Springer, Singapore, 787–790. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4166-2\\_118](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4166-2_118).
- [23] Cabezas J. A., Ibáñez J., Lijavetzky D., Vélez M. D., Bravo G., Rodríguez V., Carreño I., Jermakow A. M., Carreño J., Ruiz-García L., Thoma M. R., Martínez-Zapater J. M. (2011): A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biol.* 11, 12.
- [24] Cunha J., Ibáñez J., Teixeira-Santos M., Brazao J., Fevereiro P., Martinez-Zapater J. M., Eiras-Dias J. E. (2016): Characterisation of the Portuguese grapevine germplasm with 48 single-nucleotide polymorphisms. *Aust. J. Grape Wine Res.* 22, 504–516.
- [25] Carbonell-Bejerano P., Royo C., Torres-Pérez R., Grimplet J., Fernandez L., Franco-Zorrilla J. M., Lijavetzky D., Baroja E., Martínez J., García-Escudero E., Ibáñez J., Martínez-Zapater J. M. (2017): Catastrophic unbalanced genome rearrangements cause somatic loss of berry color in grapevine. *Plant Physiol.* 175, 786–801.

- [26] Arroyo-Garcia R., Ruiz-Garcia L., Bolling L., Ocete R., Lopez M. A., Arnold C., Ergul A., Soylemezoglu G., Uzun H. I., Cabello F., Ibanez J., Aradhya M. K., Atanassov A., Atanassov I., Balint S., Cenis J. L., Costantini L., Goris-Lavets S., Grando M. S., Klein B. Y., McGovern P. E., Merdinoglu D., Pejic I., Pelsy F., Primikirios N., Risovannaya V., Roubelakis-Angelakis K. A., Snoussi H., Sotiri P., Tamhankar S., This P., Troshin L., Malpica J. M., Lefort F. and Martinez-Zapater J. M. (2006): Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Mol. Ecol.* 15, 3707–3714.

Javier IBÁÑEZ, Vesna MARAŠ, Milena MUGOŠA, Mirko PERIŠIĆ,  
Jovana RAIČEVIĆ, Enrique GARCÍA-ESCUADERO, Nataša ŠTAJNER,  
Miodrag GRBIĆ, Jose Miguel MARTÍNEZ-ZAPATER

## GENETIC ORIGIN AND GENOMIC DIVERSITY OF CULTIVAR VRANAC

### *Summary*

Vranac is a very important grapevine cultivar within Montenegrin autochthonous varieties and the most economically relevant regarding Montenegrin viticulture and winemaking. In a recent comprehensive characterization of grapevine genetic diversity present in Montenegro, Vranac was the second most represented cultivar detected among the oldest Montenegrin vines. This variety was previously known to share a parent-offspring relationship with Kratosija and in this work we have found a compatible pedigree for Vranac, placing Kratosija as the male progenitor and an unknown Montenegrin accession mentioned as Duljenga as the female parent.

A study of Vranac intra-cultivar genetic diversity through re-sequencing and comparison of genome sequences of three selected clones (1, 2 and 5) showed that they were all highly similar. No single nucleotide variation (SNV) could be confirmed among the clones, what can be considered normal since these clones only diverged in the last few decades. However, detailed examination of the reads identified two structural variations (SV) present in Vranac 1 and Vranac 2 and absent in Vranac 5. Since Vranac 5 is the highest quality selected clone, the absence of this SV could be used for its distinction from the other clones.

*Key words:* Vranac, genetic diversity, origin, pedigree analyses, SNP markers, clone diversity