

Vesna MARAŠ*, Jose Miquel MARTÍNEZ-ZAPATER**,
Anita GAZIVODA*, Tatjana POPOVIĆ***, Vladan BOŽOVIĆ§,
Rafael OCETE§§, Enrique GARCÍA-ESCUADERO**, Nataša ŠTAJNER[‡],
Miodrag GRBIĆ^{§§§}, Javier IBÁÑEZ**

GENETIČKI DIVERZITET VINOVE LOZE U CRNOJ GORI

Sažetak: Balkan ima dugu istoriju gajenja vinove loze. Njegov geografski položaj između Bliskog istoka i zapadne Evrope čini ovaj region tranzitnim i kulturnim mostom, što doprinosi obogaćivanju njegovog genetskog diverziteta. Osim toga, nekoliko je studija dokazalo postojanje posebnog genetskog fonda vinove loze u ovom regionu, koji se razlikuje od onog u susjednim regijama.

Sa ciljem istraživanja crnogorskog genetskog nasljeđa vinove loze, Crna Gora i ICVV su osnovali međunarodni konzorcijum koji je sproveo najveće istraživanje starih čokota vinove loze ikada izvršeno u zemlji. Prikupljeno je ukupno 512 uzoraka vinove loze na crnogorskim tradicionalnim vinogradarskim područjima, a posebna pažnja je posvećena gajenim (*sativa*) sortama, ali i uzorcima divlje (*sylvestris*) vinove loze (46 uzoraka), prikupljenim u različitim riječnim basenima. Svi uzorci su genotipizirani sa molekularnim markerima SNP, za nuklearni i hloroplastni genom.

Poređenjem 512 generisanih genotipova identifikovan je 151 jedinstven genotip, od kojih je 43 odgovaralo uzorcima *sylvestris*, a 108 gajenim vrstama, uključujući tri interspecifična hibrida. Među 105 *V. vinifera sativa* genotipovima, 33 je bilo u potpunosti identifikovano, odgovarali su ostalim genotipovima ICVV-SNP baze podataka. Najzanimljivija je bila kratošija, genotip koji se najviše ponavljao prilikom uzorkovanja. Jedan uzorak na svake četiri stare loze, uzorkovane u Crnoj Gori, je odgovarao ovoj

* „13. jul — Plantaže”, Podgorica, Crna Gora

** Institut za istraživanje za vinovu lozu i vino, Logroño, La Rioja, Španija

*** Univerzitet Crne Gore, Biotehnički Fakultet, Podgorica, Crna Gora

‡ Biotehnički fakultet, Agronomski odsjek, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija

§ Fakultet za prehrambenu tehnologiju, bezbjednost hrane i ekologiju, Univerzitet Donja Gorica, Podgorica, Crna Gora

§§ Tirgo, La Rioja, Španija

§§§ Odsjek za biologiju, Univerzitet Zapadni Ontario, London, Ontario, Kanada

sorti. Kao što se i očekivalo i druge tradicionalne crnogorske sorte, kao što su vranac i lisica, pojavile su se mnogo puta (78 i 28 puta). Među 72 nedovoljno identifikovana genotipa *V. vinifera sativa*, 23, iako nijesu dodijeljena određenoj sorti, su odgovarala genotipovima predstavljenim sa više od jednog uzorka u bazama podataka različitog porijekla. Najvjerojatnije odgovaraju potvrđenim sortama. Četrnaest ih je otkriveno samo u crnogorskim uzorcima i mogle bi predstavljati lokalne nepoznate sorte. Preostalih 49 genotipova predstavljeno je jednim uzorkom, zbog čega je njihovo razmatranje, kao realnih sorti, u toku. Mogu odgovarati vinovoj lozi koja potiče od spontano prokljalih sjemenki do pravih, starih sorti koje su blizu nestajanja. Dakle, ukupan broj nepoznatih genotipova, koji su predstavljeni jedino uzorcima iz Crne Gore je 63, a identifikovano je više od 50 posto uzorkovanih genotipova *V. Vinifera* ssp. *sativa*.

Ključne riječi: *sorte vinove loze, SNP markeri, Vitis vinifera sativa, Vitis vinifera sylvestris*

UVOD

Crna Gora je mala zemlja na Balkanskom poluostrvu, sa izlazom na Jadransko more. Vinogradarstvo na ovom području datira još od prije rimskog perioda [6]. Kasnije, u srednjem vijeku, već postoje mnogi pisani dokumenti koji dokazuju važnu tradiciju vinogradarstva. To se ističe u pisanim dokumentima Kotora, kao što su ugovori o mirazima, zakupima, prodajama i testamentima iz 14. vijeka, uključujući vinograde sa područja današnjeg Tivta i okoline Kotora [9]. Kasnije, turski arhivi, bilježeći popise iz 1521. i 1523. godine, spominju prisutnost vinograda u Godinju, Berima, Brajićima i drugim mjestima. Vinogradarstvo i vinarstvo već su u srednjem vijeku dobro razvijeni na obalama Skadarskog jezera i na području Crmnice. Naime, prema podacima kotorskog arhiva, Crmnica je bila glavna regija za proizvodnju grožđa i vina [8].

Danas se vinogradarsko-vinarska proizvodnja u Crnoj Gori uglavnom zasniva na autohtonim sortama vinove loze, kao što su vranac, kratošija, krstač i žižak. Postoje brojne lokalne sorte vinove loze za koje se smatra da su autohtoni genotipovi, ali do sada nijesu identifikovani. S obzirom na važnost autohtonih sorti vinove loze za crnogorski vinogradarsko-vinarski sektor, kompanija „13. jul — Plantaže” započela je istraživanje 2005. godine genetskom identifikacijom crnogorskih sorti vinove loze i određivanjem njihovog porijekla [7]. Ova su istraživanja pokazala identifikaciju genotipa crnogorske sorte kratošija sa zinfadelom, primitivom i crljenkom kaštelanskim, pokazujući da su to sinonimi imena istog genotipa [3]. Rezultati su, takođe, potvrdili da su vranac, krstač i žižak jedinstveni genotipovi [6, 7]. Upoređivanjem njihovih DNK profila otkriven je pretpostavljeni genetski odnos roditelja i potomaka prvog stepena između sorti kratošija i vranac, što upućuje na ulogu pretka za sortu kratošija s obzirom na kasniju pojavu vranca [3, 7].

S obzirom na značaj ovih rezultata, „Plantaže” su 2013. godine pokrenule istraživačku saradnju s ICVV-om (Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, La Rioja, Španija) za proučavanje genetskog diverziteta gajenih i divljih populacija *Vitis vinifera* (L.) u Crnoj Gori i karakterizaciju njihovih genetskih odnosa. Krajnji cilj nije samo rasvijetliti istoriju vinogradarstva u Crnoj Gori, već i razumjeti diverzitet sorti u zemlji, identifikovati druge moguće autohtone genotipove koji bi mogli biti značajni za proizvodnju crnogorskih vina. Ovdje ćemo opisati nastavak ovog istraživanja, kao i neke preliminarne rezultate.

MATERIJALI I METODE

Za ovu studiju u Crnoj Gori sakupljeno je ukupno 512 uzoraka vinove loze. Istraživanje je sprovedeno tokom tri godine (2014, 2016, 2017) na tradicionalnim crnogorskim vinogradarskim područjima, odabirom čokota vinove loze starijih od 50 godina (Foto 1). Među njima je 416 odgovaralo uzorcima gajenih sorti i 46 uzorcima divlje vinove loze. Osim toga, 50 uzoraka iz kolekcije germplazme na Univerzitetu Crne Gore su, takođe, analizirani kao referentni genotipovi koji vjerovatno predstavljaju drevne sorte koje se trenutno ne gaje. U istraživanje su uključeni uzorci sorti iz kolekcija iz različitih balkanskih zemalja, prethodno analiziranih molekularnim markerima (SSR), kao dio saradnje između istraživačkih grupa u različitim zemljama [10].

DNK je ekstrahovan za svaki uzorak od mladog lišća uzorkovanih starih čokota vinove loze [2]. Svaki uzorak DNK genotipiziran je sa skupom od 48 SNP markera, koji odgovaraju i nuklearnim (45) i hloroplastnim (3) polimorfnim položajima prethodno razvijenim na ICVV-u [2, 4]. Dobijeni

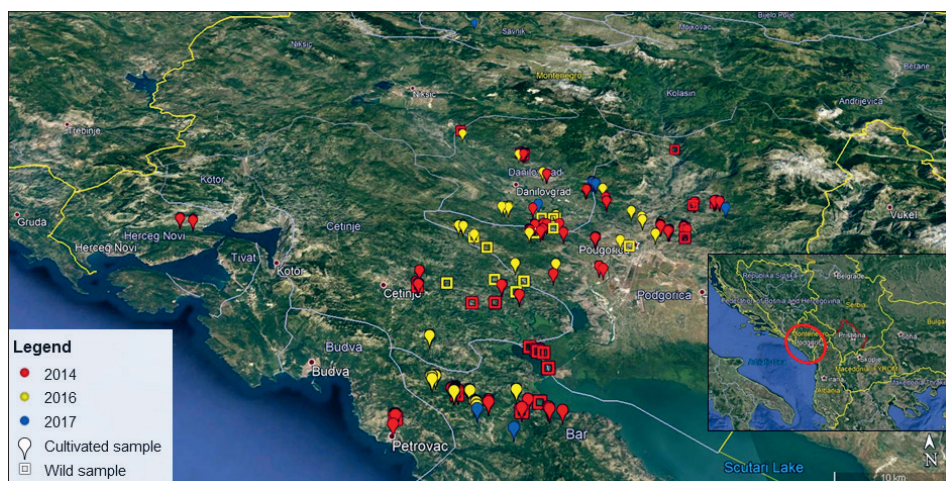


Foto 1. Lokacije uzimanja uzoraka u Crnoj Gori

genotipovi, najprije, su međusobno upoređeni u cilju otkrivanja sinonima i određivanja broja jedinstvenih genotipova; zatim su upoređeni jedinstveni genotipovi sa cjelokupnom ICSVV SNP bazom podataka koja sadrži više od 2800 različitih genotipova iz svih vinogradarskih regija. Ovo upoređivanje omogućilo je identifikaciju onih genotipova koji odgovaraju poznatim genotipovima prisutnim u bazi podataka, a koji se poklapaju sa nepotpuno identifikovanim genotipovima različitog porijekla, kao i onima koji su prvi put otkriveni u crnogorskim uzorcima i koji bi mogli predstavljati lokalne nepoznate sorte. Na osnovu dobijenih informacija za tri SNP markera hloroplasta, mogli smo odrediti i hlorotip svakog uzorka. Jedinstveni genotipovi su dalje analizirani sa 192 dodatna SNP-a, kako bi proširili svoje genotipske podatke do ukupno 240 SNP. Ti su podaci omogućili analizu genetske strukture i identifikaciju pedigrea [5].

REZULTATI

Proučavanjem genetskog diverziteta otpočeo je nepristrasan pristup u cilju karakterizacije gajenih i divljih genotipova vinove loze u Crnoj Gori. Upotreba 48 SNP setova omogućila je detekciju ukupno 151 različitog genotipa među 512 ispitivanih uzoraka (Foto 2). Četrdeset i tri od njih su odgovarala vinovoj lozi koja je uzorkovana kao *sylvestris* i 108 gajenih, što je uključilo i tri međuvrsna (interspecifična) hibrida. Trideset tri od 105 genotipova *Vitis vinifera sativa* mogu se identifikovati sa sigurnošću, budući da su se podudarali sa drugim genotipovima ICSVV-SNP baze podataka i da je Prime Name dodijeljen na osnovu dva ili više nezavisna dokaza. Najviše ponavljani uzorkovani genotipovi u cijelom istraživanju odgovarali su sorti kratošija; pojavljuju se čak 125 puta, što znači da svaki četvrti čokot vinove loze, uzorkovane u Crnoj Gori, odgovara ovoj sorti. Najviše gajena crnogorska sorta, vranac, bila je i druga po učestalosti u uzorkovanju (78), dok je lisica bila treća sa 28 ponovljenih uzoraka. Značajan broj puta (28) pojavila se i turska sorta vinove loze *parmak crven*, poznata i kao razaklija u Crnoj Gori. Druge poznate sorte koje su se pojavile više puta su: bratkovina bijela (10), *chaouch blanc* (4), plavina crna (3), *koenigin der veingaerten* (3), prokupac (3), *lagorthi*, *coarna alba*, *muscat* i *petits grains blanc* i *muscat hamburg*.

Među preostalih 72 nepotpuno identifikovana genotipa *Vitis vinifera sativa* (bez primarnog imena), 23 su pronađena na više od jedne lokacije u Crnoj Gori, a, u nekim slučajevima, i u obližnjim zemljama. Četrnaest ih se pojavilo samo prilikom uzorkovanja u Crnoj Gori i najverovatnije odgovaraju jedinstvenim lokalnim sortama i u mogućoj su opasnosti od nestanka. Njih treba okarakterisati/opisati na svim nivoima (poređenje sa ranije poznatim sortama na području, identifikacija pedigrea i analiza genetskih odnosa, proizvodnja

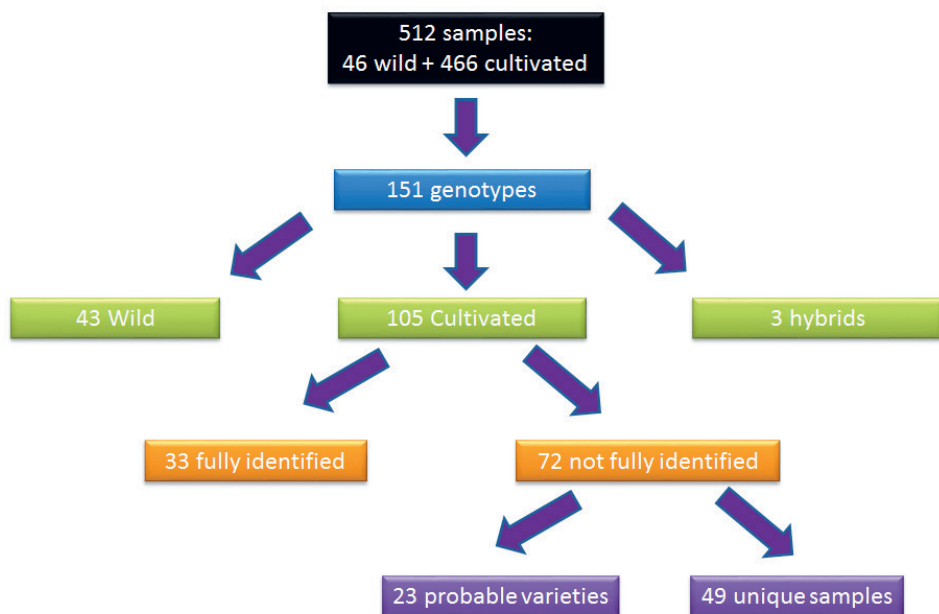


Foto 2. Distribucija genotipiziranih uzoraka na osnovu njihove sličnosti, gajenog ili divljeg porijekla, kao i poklapanja sa drugim genotipovima u bazi SNP

grožđa, proučavanje kvaliteta grožđa i enološkog potencijala) u cilju kreiranja kataloga crnogorskih autohtonih sorti sa informacijama o njihovoj proizvodnji u različitim regionima, kao i o njihovom enološkom potencijalu.

Preostalih 49 genotipova predstavljeno je jednim uzorkom i moglo bi odgovarati minornim sortama koje su u opasnosti od izumiranja ili genotipovima dobijenim iz nezavisne klijavosti sjemenke u vinogradima. Oni, takođe, zaslužuju da budu okarakterisani na svim nivoima jer predstavljaju potencijalne sorte za povećanje diverziteta sorti i vina u Crnoj Gori. Informacije lokalnih ampelografa i poljoprivrednika su veoma relevantne za identifikaciju mogućih imena ovih genotipova. Tako je ukupan broj nepoznatih genotipova, zastupljenih samo u uzorkovanju, u Crnoj Gori bio 63.

Karakterizacijom genotipova SNP hloroplasta omogućeno je određivanje hlorotipa crnogorskih uzoraka vinove loze. Hlorotip A je bio prisutan u većini uzoraka divljih sorti (30) i to odgovara onome što je nađeno u populacijama divljih sorti zapadne Evrope i sjeverne Afrike [1]. Pored toga, hlorotip C je detektovan u šest uzoraka i hlorotip D u sedam. Među kultivisanim sortama, ova raspodjela je obrnuta, sa dominacijom hlorotipa C (43) i D (35) i manjim prisustvom hlorotipa A (16) i B (2).

Proučavanjem genetske strukture jedinstvenih genotipova jasno se dijeli većina uzoraka *sativa* i *sylvestris* u dvije različite grupe (Foto 3). Međutim,



Foto 3. Genetska struktura gajenih i divljih crnogorskih čokota. Svaki čokot je predstavljen vertikalnom prugom. Za svaku od njih, plava i narandžasta frakcija predstavljaju pretka tog genotipa za gajene (plave) i divlje (narandžaste) populacije

otkriveni su i intermedijarni genotipovi koji ukazuju na postojanje genetskog protoka između kultivisanih i divljih uzoraka. Pored toga, otkriveni su na izgled pogrešno klasifikovani divlji i kultivisani uzorci koji ukazuju na postojanje nekoliko kultivisanih formi koje su veoma povezane sa divljom vinovom lozom, kao i divljim formama koje imaju kultivisano porijeklo. Proučavanje njihovih hlorotipova i genetskih odnosa prvog stepena može pružiti odgovore o njihovom porijeklu.

ZAKLJUČAK

Otkriven je veliki genetski diverzitet, mnogo veći od onog koji je trenutno opisan, što dokazuje dugu istoriju vinogradarstva u regionu Balkana i naglašava posebnu važnost crnogorskog vinogradarstva. Otkriće 63 neidentifikovana genotipa u Crnoj Gori ilustruje raznolikost vinove loze u zemlji sa prosječnim promjerom od 150 kilometara. Ovi genotipovi su jedinstvene sorte i potencijalne sorte koje mogu biti autohtone sorte, koje ne postoje na drugim mjestima. Među njima možemo spomenuti imena kao lisičina, čubrica, manita loza/krstač gogolj, crna razaklija, zadrinka, kosoranka, kadarun itd.

Vrlo široko uzorkovanje starih čokota u tradicionalnim vinogradarskim područjima u Crnoj Gori, zajedno sa upotrebom i analizom molekularnih alata (nuklearnih i hloroplastnih SNP), omogućava definisanje postojeće genetske raznolikosti, identifikaciju poznatih i novih sorti, utvrđivanje genetske strukture i roditeljskih odnosa, te odnose između kultivisanih i divljih uzoraka u Crnoj Gori na nepristrastan način.

Efikasno očuvanje i korišćenje crnogorske genetske raznolikosti vinove loze treba da bude podrška produktivnom i održivom razvoju crnogorskog vinogradarstva. Dalja dublja karakterizacija proizvodnih osobina i enološkog potencijala novih genotipova doprinijeće razvoju vinogradarstva u potpunosti zasnovanog na autohtonim sortama. U cilju evaluacije i očuvanja, „Plantaže” su podigle eksperimentalni vinograd (Nacionalna kolekcija) na Ćemovskom polju sa svim potvrđenim genotipovima domaćih i autohtonih sorti.

ZAHVALNOST

Sredstva za ovaj projekat obezbijedili su kompanija „13. jul — Plantaže”, Ministarstvo nauke Crne Gore i Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore.

Zahvaljujemo na tehničkoj pomoći Silviji Hernáiz i Migueli Angula.

LITERATURA

- [1] 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., Primitivos 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Cunha J., Ibáñez J., Teixeira-Santos M., Brazao J., Feveireiro 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.
- [5] Ghaffari S., Hasnaoui N., Zinelabidine L. H., Ferchichi A., Martínez-Zapater J. M., Ibáñez, J. (2014): Genetic diversity and parentage of Tunisian wild and cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Tree Genet. Genomes* 10: 1103–1112.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Pejović Lj. (1987): Karakteristike vina Crne Gore (Characteristics of the wine of Montenegro). *Jugoslovensko vinogradarstvo i vinarstvo*, vol 7–8. Belgrade.
- [9] Vuksanović P. (1977): Rejonizacija vinogradarstva Crne Gore (Viticulture zoning in Montenegro). University “Veljko Vlahović” Agriculture Institute, Titograd.

- [10] Štajner N., Tomić L., Ivanišević D., Korać N., Cvetković-Jovanović T., Beleski K., Angelova E., Maraš V., Javornik B. (2014): Microsatellite inferred genetic diversity and structure of Western Balkan grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Tree Genetics & Genomes*, 10: 1: 127–140. IF: 2.451.

Vesna MARAŠ, Jose Miquel MARTÍNEZ-ZAPATER, Anita GAZIVODA, Tatjana POPOVIĆ, Vladan BOŽOVIĆ, Rafael OCETE, Enrique GARCÍA-ESCUADERO, Nataša ŠTAJNER, Miodrag GRBIĆ, Javier IBÁÑEZ

GRAPEVINE GENETIC DIVERSITY IN MONTENEGRO

Summary

Balkans have a long history of grapevine cultivation. Its geographical position between Near East and Western Europe make of this region a land of passage and a cultural bridge, contributing to the enrichment of grapevine genetic diversity. In addition, several studies have shown the existence of a particular grapevine genetic pool in this region, different from that of neighbor regions.

Aiming to study the Montenegrin grapevine genetic heritage, Montenegro and the ICVV established an international consortium that carried the largest prospection of old vine plants ever done in the country. A total number of 512 grapevine plants were sampled across Montenegrin traditional viticulture regions, mostly corresponding to cultivated (*sativa*) plants, but also including 46 samples of wild (*sylvestris*) grapevines collected in diverse river basins. All samples were genotyped with SNP molecular markers for both nuclear and chloroplast genome polymorphic sites.

Comparisons among the 512 genotypes generated identified 151 different ones, 43 of which corresponded to vines sampled as *sylvestris*, and 108 to cultivated plants, including three interspecific hybrids. Among the 105 *V. vinifera sativa* genotypes, 33 matched with known true genotypes present in the ICVV-SNP database. Interestingly, 125 samples corresponded to Kratosija, which was the most repeated genotype in the sampling. One every four old vines sampled in Montenegro corresponded to this variety. As expected, other traditional Montenegrin varieties such Vranac and Lisica also appeared many times (78 and 28 times, respectively). Regarding the 72 not-fully identified *V. vinifera sativa* genotypes, 23 matched with genotypes represented by more than one sample in the database from different origins, although not assigned to a given variety. They most probably correspond to true varieties. Fourteen of them were only detected in the Montenegrin sampling and could represent local unknown varieties. The remaining 49 genotypes were represented by a single sample, what makes its consideration as real varieties doubtful. They could correspond to grapevines derived from spontaneously germinated seeds or to ancient varieties close to extinction. Thus, the total number of unknown genotypes represented only by samples from Montenegro is 63, more than 50 percent of the *V. vinifera sativa* genotypes identified.

Key words: grapevine varieties, SNP markers, *Vitis vinifera sativa*, *Vitis vinifera sylvestris*