

## Сравнително ампелографско описание на клонове от сорт Мискет врачански

**Илиян Симеонов**

Институт по лозарство и винарство – Плевен

E-mail: [iliannsimeonov@gmail.com](mailto:iliannsimeonov@gmail.com)

### Резюме

Извършено е сравнително ампелографско описание на отбрани клонове и популацията на лозовия сорт Мискет врачански чрез методиката на OIV. От направеното изследване е установено, че изследваните клонове и популация на сорта, по ботаническото описание на леторасъл, лист, грозд, зърно и семе са типични представители на Източна еколого-географска група (*Convarietas orientalis* Negr.). При отчитане на различните показатели, характеризиращи коронката, младия леторасъл, растежната сила на лозите, мустаците, цвета, развития лист, грозда, зърното и техните механични свойства и технологични качества, между отделните варианти се наблюдават някои значителни разлики в характеристиките на отделния признак. В почти всички групи показатели има различни ампелографски признаци, свойства или качества, по които отбраните клонове се различават по между си и спрямо популацията на сорт Мискет врачански. Микросателитният анализ чрез използването на стандартните 9 микросателитни маркери не показва наличие на полиморфизъм при клоновете и сорт Мискет врачански на ДНК ниво. За откриване на различия в генетичните им профили е необходимо да бъдат анализирани по-голям брой микросателитни локуси, използвани в аналогични изследвания.

**Ключови думи:** лоза; сорт; клон; ампелографско описание; ДНК анализ

## Comperative ampelographic description of clones of Misket vrachanski variety

**Iliyan Simeonov**

Institute of Viticulture and Enology – Pleven, Bulgaria

E-mail: [iliannsimeonov@gmail.com](mailto:iliannsimeonov@gmail.com)

### Citation

Simeonov, I. (2019). Comperative ampelographic description of clones of Misket vrachanski variety, *Rastenievadni nauki*, 57(1) 91-100 (Bg)

### Abstract

A comparatively ampelographic description of selected clones and the Misket Vrachanski vine variety was performed using the OIV methodology. From the research it was found that the studied clones and the population of the variety, in the botanical description of shoot, leaf, cluster, berry and seed, are typical representatives of the Eastern ecological-geographic group (*Convarietas orientalis* Negr.). Taking into account the different features characterizing the shoot tip, the young shoot, the growth force of the vines, the tendrils, the inflorescences, the mature leaf, the cluster, the berry and their mechanical properties and technological qualities, there are some significant differences in the characteristics of the separate sign. In almost all groups of indicators, there are different ampelographic features, properties or qualities in which the selected clones differ between themselves and the Misket vrachanski variety. Microsatellite analysis using the standard 9 microsatellite markers did not reveal polymorphism in the clones and Misket vrachanski variety at the DNA level. To detect differences in their genetic profiles, it is necessary to analyze a larger number of microsatellite loci used in similar studies.

**Key words:** vine; variety; clon; ampelographic characteristic; DNA analysis

В резултат на многогодишните изследвания в областта на селекцията на лозата, всяка страна формира свой набор от местни и интродуцирани сортове, клонове, хибриди и подложки. С навлизането на високотехнологичните процеси става възможно изграждането на единна база с данни за генетичните ресурси при лозата, разпространени по света (Maul et al., 2008). Поради многото и различни наименования и синоними на отделните сортове в различните страни, райони и микрорайони, много често един и същ сорт се среща по няколко пъти в дадена колекция или насаждение (McGovern, 2003). За преодоляване на този проблем организациите International Organization of Vine and Wine (OIV), International Union for the Protection of New Varieties of Plant (UPOV) и International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) създават единна методика за описание и идентифициране на видове и сортове лози. Тя се състои от общо 179 дескриптора (показателя), които определят три вида маркери: 1. Морфологични – основаващи се на фенотипните признаци, свойства и качества; 2. Биохимични – дължащи се на вариации в белтъчната молекула; 3. ДНК маркери – базиращи се на различия в структурата и дължината на ДНК молекулата.

1. Морфологични маркери – основават се на морфологичните белези и са класически методи за идентификация на видовете, сортовете и клоновете лози. От всички показатели 128 са ампелографски и се използват за определянето на морфологични, агробиологични и технологични признаци на лозови сортове. В тази група има и 43 показателя, определящи *резистентността* на сорта към различни абиотични и биотични стресови фактори.

2. Биохимичните (изоензимни) маркери се базират на вариациите в белтъчната молекулата и са използвани за характеризиране на лозови сортове (Schaeffer, 1971; Stavrakakis & Loukas 1983; Benin et al., 1988; Eiras-Dias et al., 1989; Calo et al., 1989). Основен недостатък на тези маркери е, че експресията на ензимите зависи от стадия на развитие на растението или от условията на околната среда и винаги изискват свежа тъкан в съответния стадий на развитие (Sefc et al., 2001). В методиката показателите са 2.

3. ДНК маркерите отчитат полиморфизми между сортовете, дължащи се на вариации в

структурата и дължината на ДНК молекулата. Тъй като ДНК е еднаква във всички клетки и не се променя в зависимост от стадия на развитие, здравният статус на растението и от условията на околната среда, тези маркери имат предимството пред белтъчните и морфологичните маркери, поради това че анализът може да бъде направен във всеки стадий на развитие на растението, а ДНК може да се изолира от всички тъкани и органи (дървесина, листа, плодове). В методиката тези маркери са 6.

Микросателитните маркери (SSR, Simple Sequence Repeat) в момента са най-достоверните маркери за ДНК идентификация на видове, сортове и клонове при лозата. Те са подходяща система за подпомагане на управлението на колекции от сортове и клонове, за установяване на различията между тях при интродукция и поддържане, избягване на повторения, установяване погрешно етикетирани, подпомагане на селекцията на клонове. Тъй като са кодоминантни, с тях може да бъде установен периклинален химеризъм получен в резултат на соматична мутация, т.е. наличието на три, вместо два алела в даден клон. Така с помощта на микросателитните маркери е установен химеризъм водещ до ясни фенотипни изменения (Boss & Thomas, 2002; Franks et al., 2002; Bertsch et al., 2005; Walker et al., 2006). През последното десетилетие микросателитните маркери успешно се прилагат за идентифициране и разграничаване на клоновете на редица сортове лози. Тъй като нивото на полиморфизъм между клоновете е твърде ниско, за успешното им разграничаване е наложително да се използват повече маркери от минимално необходимите за идентификация на сортове.

*Целта на изследването* е да се направи сравнително ампелографско описание на новоселекционирани клонове и популацията от белия местен винен сорт Мискет врачански, чрез методиката на OIV.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експерименталната работа е проведена в Експерименталната база и лабораториите на Институт по Лозарство и Винарство – Плевен, отдел "Селекция, винарство и химия" и АгробиоИн-

ститут – София. За сравнителните ампелографски изследвания са използвани популацията на местния сорт за бели вина Мискет врачански, от който са отбрани кандидат клоновете 9/5, 32/1, 32/12, 34/24 и 52/8. Те са присадени на подложка Шасла х Берландиери 41 Б и се отглеждат на формировка Мозер, при разстояние на засаждане 3,00/1,30 m. Ежегодното натоварване при рецитбата на зряло е 32 зимни очи на лоза (8 чепа по 2 очи и 2 плодни пръчки с по 8 очи).

Сравнителното ампелографско описание на клоновете чрез методиката на OIV, UPOV и IPGRI (Bioversity International) е извършено съгласно утвърдените списъци с морфологични, агробиологични, технологични и ДНК дескриптори (Maul & This, 2008; <http://www.vivc.de/index.php?r=deskriptoren%2Findex&DeskriptorenSearch%5Bkategorie%5D=ab2004>).

Описанието на клоновете от сорт Мискет врачански е извършено чрез 121 ампелографски и ампелометрични дескриптора (показателя) и 9 ДНК маркера.

**Морфологичните характеристики** на отделните признаци и белези на опитните варианти са отчетени през отделните фенофази от развитието на лозата и върху сухи, хербаризирани листа и могат да се систематизират по следния начин:

1. Млад леторасъл – описва се коронката на леторасъла с 5 показателя. Наблюдението и отчитането им се извършва по време на цъфтежа (А).

2. Зелен леторасъл – включва описанието на зелен леторасъл и мустаци. Показателите са 14 и характеризират признаците на зеления леторасъл и мустаците. Наблюдението и отчитането им се извършва по време на цъфтежа (А).

3. Млад лист – 6 показателя описват признаци на младите листа (1-4 лист). Наблюдението и отчитането им се извършва по време на цъфтежа (А).

4. Лист – дескрипторите описващи листа като ампелографски признак са 20 на брой. Наблюдението и отчитането се извършва от момента на залагането на зърната до началото на узряването на гроздето (В).

5. Зрял леторасъл – ботаническите признаци са описани от 4 показателя. Наблюдението и отчитането се извършва след листопада (F).

6. Цвят – показателя е 1. Наблюдението и се извършва по време на цъфтежа (А).

7. Съцветие – показателите са 2 и се отчитат по време на цъфтежа (А).

8. Грозд – показателите, които характеризират грозда са 8 на брой. Наблюдението и отчитането се извършва по време на узряването на гроздето (D).

9. Зърно – дескрипторите, описващи този признак са 20. Наблюдението и отчитането се извършва по-време на узряването на гроздето (D).

10. Фенологични наблюдения – показателите, определящи сроковете на протичането на отделните фази от развитието на клоновете са 6 и се отчитат през различни периоди на вегетацията (А, В, D и E).

11. Растеж и растежна сила – растежните прояви на клоновете са описани от 4 показателя, чието определяне се извършва през вегетационния период (А, В и D).

12. Показатели, определящи биотичната резистентност - показателите са 11 и определят степента на устойчивост на клоновете към мана, оидиум, сиво гниене и листна филоксера. Наблюдението и отчитането се извършва 3 седмици след цъфтежа при полски и лабораторни условия (G).

13. Добив и качество на гроздето – определят се чрез 4 показателя. Наблюдението и отчитането се извършва по време на узряване на гроздето (D).

14. Ампелометрични показатели на лист – определят се от 16 показателя. Отчитането се извършва върху сухи, хербаризирани листа (С).

От изброените дескриптора, 101 са ампелографски, описващи дадения признак, свойство или качество, а 20 са ампелометрични - свързани с различни измервания.

**SSR маркери** - определянето на генетичната идентичност чрез ДНК анализ е извършена чрез 9 дескриптора (6 стандартни и 3 допълнителни SSR маркера). Определянето на генетичния профил на изследваните клонове и популацията от сорт Мискет врачански е извършено в лабораториите на АгробиоИнститут – София.

### Събиране на растителен материал

Събирането на растителния материал за провеждането на молекулярните анализи е извършено през месец май на 2012 и 2013 г. За целта в епендорфки са събрани коронки, млади листа

и мустаци от отделни лози от всички варианти. Така подготвените проби са замразени в съд с течен азот. В анализа са включени и 2 космополитни сорта (Каберне Совиньон и Шардоне), които са използвани като референтни сортове за стандартизиране на алелните дължини.

### **Изолиране на геномна ДНК**

Измерват се по 100 mg от събраният листен материал от анализиранияте проби лоза (*Vitis* sp.) и се стриват на фин прах с помощта на течен азот. Стритият материал се съхранява при температура  $-70^{\circ}\text{C}$  до началото на изолиране на ДНК. Екстракцията на геномна ДНК се извършва по протокола на Murray & Thompson (1980).

### **Определяне качеството и количеството на изолираната ДНК**

Качеството и концентрацията на изолираната геномна ДНК се определя чрез гел – електрофореза в 0,8% агарозен гел, съдържащ 0,5% етидиев бромид. Като стандарт се използва ДНК от  $\lambda$ -фаг с концентрация 50 ng/ $\mu\text{l}$ .

### **Микросателитен анализ**

PCR (Полимеразна верижна реакция)

За характеризирането на генетичните ресурси на лозата са използвани 9 (стандартния сет) ядрени микросателитни маркера - VVS2 (Thomas & Scott 1993), VVMD5, VVMD7, VVMD25, VMD27, VVMD28, VVMD32 (Bowers et al., 1996, 1999), *ssrVrZAG62* и *ssrVrZAG79* (Sefc et al., 1999). Фрагментният анализ е извършен на секвенатор ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). За вътрешен стандарт е използвана стълбца LIZ 500 (Applied Biosystems). За определяне размера на фрагментите е използван софтуер GeneMapper 4,0 (A. Biosystems).

## **РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

Ботаническото описание на клоновете и популацията на сорт Мискет врачански, чрез единната методика, разработена от трите европейски организации OIV, UPOV и IPGRI (Bioversity) е извършено през периода 2008-2016 г. и обхваща различни показатели, разделени в седем групи, съобразно фенофазата, в която е извършено отчитането (Таблица 1).

**Първа група** съдържа 2 показателя, чрез които се отчита времето на напъпването. При клоновете и популацията на сорт Мискет врачански, тази част от вегетацията на лозата протича в рамките на 4-5 дни при всичките варианти и варира слабо през отделните години в зависимост от конкретните климатични условия.

**Втора група** включва 18 показателя, които описват коронка, млад леторасъл, неговото пространствено разположение и сила на растеж, мустациите и характеристиката на цвета. Тук, между изследваните варианти различия се наблюдават при следните показатели:

- Дескриптор /показател/ с код 003 – Интензивност на антоциановото оцветяване на младия леторасъл. Всички изследвани клонове и популацията се характеризират със зелен цвят на леторасъла с надлъжни виненочервени ивици (индекс 5), с изключение на клонове 32/1 и 34/24, при които интензивността на червеното оцветяване е значително по-малка (индекс 4).

- Дескриптори с кодове 007 и 008 – Цвят на дорсалната и вентралната страна на младия леторасъл. Всички изследвани клонове и популацията се характеризират със зелен цвят на леторасъла с надлъжни виненочервени ивици (индекс на показателя 2), с изключение на клонове 32/1 и 34/24, при които интензивността на червеното оцветяване е значително по-малка, вследствие на което може да се нотира с индекс 1,5.

- Дескриптор с код 351 – Растежна сила на летораслите. На базата на общата дължина на летораслите, лозите на популацията на сорт Мискет врачански и клонове 32/1 и 52/8 се характеризират със среден до силен растеж (индекс 6), а тези на 9/5 и 32/12 и 34/24 - със среден до слаб растеж (индекс 5).

**Трета група** дескриптори – представляват 18 показатели характеризиращи листната петура. Тук различия между изследваните варианти се наблюдават при следните показатели:

- Дескриптор с код 070 – Разпространение на антоциановото оцветяване на нерватурата от горната страна на листа. При всички варианти се наблюдава характерното за Мискет врачански червено оцветяване на нерватурата да първото разклонение (индекс 3), с изключение на 52/8, при който с голяма честота се наблюдава оцветяване само в мястото на листната дръж-

ка и може да се нотира с междинна стойност на дескриптора-индекс 2/3.

- Дескриптор с код 079 – Степен на отвореност (препокриване) на опасния връз. При сорт Мискет врачански и клонове 32/12, 34/24 и 52/8 опасния връз се характеризира като отворен (индекс 3). При клон 9/5 опасният връз е понякога (8 %) затворен (индекс с междинна стойност на определяне, между показатели 3 и 4). Клон 32/1 често има отворен опасен връз, но с голяма честота на повторяемост (20 %) се наблюдава и затворен опасен връз с малко припокриване на дяловете (индекс 4).

- Дескриптор с код 079-1 – Отвореност (припокриване) на опасния връз. Индексите на този показател са в зависимост от стойностите на дескриптор 079 и определят степента на отвореност или припокриване на дяловете на опасния връз. При контролата и клонове 32/12, 34/24 и 52/8, при които опасният връз е отворен се отчита индекс 3, а при клоновете 9/5 и 32/1, където с различна честота на повторяемост се наблюдава затворен опасен връз - индекс с междинна стойност, между показатели 3 и 5.

- Дескриптор с код 083-2 – Наличие на зъби в горните странични връзове.

При популацията и клонове 9/5, 32/1, 32/12 и 34/24 не се отчита наличие на зъби в горните странични връзове – индекс 1. При клон 52/8 с голяма честота се наблюдава наличие на малък зъб в основата на горните връзове – индекс на определяне 9.

**Четвърта група** – показатели, описващи ампелографските характеристики на развит лист и определянето им се извършва върху сухи, хербаризирани листа. При отчитане на ампелометричните показатели при клонове и популация на сорт Мискет врачански се наблюдават следните различия:

- Дескриптор с код 601 – Дължина на главния нерв (N1). При всички варианти дължината на главния нерв се определя като средна (индекс 5). Изключение прави само клон 32/12, който с голяма честота се характеризира с по-голяма обща дължина на главния нерв (индекс 6)

- Дескриптор с код 606 – Дължина от опасния връз до основата на долния връз. При популацията и клонове 9/5, 32/1, 32/12 и 52/8, долните връзове са плитки до едва забележими и стойността на този показател се определя като сред-

на (индекс 5). При клон 34/24 долните връзове са най-често едва забележими и стойността на този показател е по-голяма (индекс 6).

- Дескриптор с код 610 – Ъгъл между нерв N3 и допирателната от мястото на листната дръжка и върха на нерв N5. Стойността на този показател зависи от степента на отвореност/затвореност на опасния връз. При контролата и клонове 9/5, 32/12, 34/24 и 52/8 опасният връз се характеризира като отворен, поради което ъгълът е средно голям (индекс 5). При клон 32/1 опасният връз е отворен, но често бива и затворен, при което полученият ъгъл е среден до средно голям (индекс с междинна стойност, между показатели 5 и 7).

- Дескриптор с код 618 – Ампелометрично изчисляване на отвореността (препокриване) на опасния връз. Този показател е в корелация с показател 079. При контролата и клоновете 32/12, 34/24 и 52/8, опасният връз се характеризира като отворен (индекс 3). При клон 9/5 опасният връз е понякога (8 %) затворен (индекс с междинна стойност на определяне, между показатели 3 и 4). Клон 32/1 често има отворен опасен връз, но с голяма честота на повторяемост (20 %) се наблюдава и затворен опасен връз с малко припокриване на дяловете (индекс 4).

**Пета група** съдържа 35 дескриптора, които описват ампелографските особености, механични свойства и технологични качества на грозд и зърно. Наблюдението и отчитането им се извършва по време на узряването на гроздето.

- Дескриптор с код 202 – Дължина на грозд. През периода на изследване популацията на сорта и клоновете 9/5, 32/1, 32/12 се характеризират със средно големи гроздове, на които стойностите на дължината се определя с индекс с междинна стойност между показатели 4 и 5. Клонове 34/24 и 52/8 се характеризират с малко по-дълги гроздове (индекс 5).

- Дескриптор с код 209 – Брой на крилата на грозда. При този показател се наблюдава в различна степен вариране, като гроздовете на популацията и клонове 9/5, 32/1, 32/12 и 34/24 се характеризират с едно малко или добре оформено крило (индекс 2), а при клон 52/8 - с много висок процент на повторяемост се отчитат гроздове без крила (индекс 1).

- Дескриптори с кодове 503, 504, 505 и 506 – показатели, определящи механичните свойства

**Таблица 1.** Ампелографско описание на клонове и популация на сорт Мискет врачански чрез методиката на OIV, UPOV и IPGRI (Bioversity International)

**Table 1.** Amphographic description of clones and population of Mischet vrachanski variety by the methodology of of the OIV, UPOV and IPGRI (Bioversity International)

Дескриптор/ Показател/ Descriptor/ Indicator/	Фаза на отчитане/ Reporting phase	Популация/ Population	Клон/ Clon 9/5	Клон/ Clon 32/1	Клон/ Clon 32/12	Клон/ Clon 34/24	Клон/ Clon 52/8
001	A	5	5	5	5	5	5
002	A	2	2	2	2	2	2
003	A	5	5	4	5	4	5
004	A	5	5	5	5	5	5
005	A	5	5	5	5	5	5
006	A	3	3	3	3	3	3
007	A	2	2	1,5	2	1,5	2
008	A	2	2	1,5	2	1,5	2
009	A	2	2	2	2	2	2
010	A	2	2	2	2	2	2
011	A	3	3	3	3	3	3
012	A	3	3	3	3	3	3
013	A	3	3	3	3	3	3
014	A	3	3	3	3	3	3
015-1	A	1	1	1	1	1	1
015-2	A	1	1	1	1	1	1
016	A	1	1	1	1	1	1
017	A	7	7	7	7	7	7
051	A	4	4	4	4	4	4
053	A	5	5	5	5	5	5
054	A	5	5	5	5	5	5
055	A	3	3	3	3	3	3
056	A	3	3	3	3	3	3
065	B	5	5	5	5	5	5
067	B	4	4	4	4	4	4
068	B	3	3	3	3	3	3
069	B	5	5	5	5	5	5
070	B	3	3	3	3	3	2/3
072	B	7	7	7	7	7	7
074	B	5	5	5	5	5	5
075	B	5	5	5	5	5	5
076	B	2	2	2	2	2	2
079	B	3	3/4	4	3	3	3
079-1	B	3	3/5	3/5	3	3	3
080	B	3	3	3	3	3	3
081-1	B	1	1	1	1	1	1
081-2	B	1	1	1	1	1	1
082	B	1	1	1	1	1	1
083-1	B	3	3	3	3	3	3
083-2	B	1	1	1	1	1	9
084	C	1	1	1	1	1	1
087	C	3	3	3	3	3	3
093	C	3	3	3	3	3	3
094	C	3	3	3	3	3	3
101	F	2	2	2	2	2	2
102	F	2	2	2	2	2	2
103	F	2	2	2	2	2	2
104	F	1	1	1	1	1	1
151	A	3	3	3	3	3	3
152	A	2	2	2	2	2	2
153	A	3	3	3	3	3	3
155	B	3	3	3	3	3	3
202	D	4/5	4/5	4/5	4/5	5	5
203	D	5	5	5	5	5	5
204	D	6	6	6	6	6	6
206	D	1	1	1	1	1	1

207	D	1	1	1	1	1	1
208	D	2	2	2	2	2	2
209	D	2	2	2	2	2	1
220	D	4	4	4	4	4	4
221	D	4	4	4	4	4	4
223	D	1	1	1	1	1	1
225	D	1	1	1	1	1	1
226	D	2	2	2	2	2	2
227	D	5	5	5	5	5	5
228	D	7	7	7	7	7	7
229	D	2	2	2	2	2	2
231	D	1	1	1	1	1	1
232	D	2	2	2	2	2	2
233	D	7	7	7	7	7	7
235	D	1	1	1	1	1	1
236	D	2	2	2	2	2	2
238	D	1	1	1	1	1	1
240	D	2	2	2	2	2	2
241	D	3	3	3	3	3	3
242	D	5	5	5	5	5	5
243	D	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5
301	E	5	5	5	5	5	5
302	E	5	5	5	5	5	5
303	D	5	5	5	5	5	5
304	D	5	5	5	5	5	5
305	D	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7
306	D	1	1	1	1	1	1
351	A	6	5	6	5	5	6
352	D	3	3	3	3	3	3
353	F	3	3	3	3	3	3
354	F	3	3	3	3	3	3
452	G	5	5	5	5	5	5
452-1	G	5	5	5	5	5	5
452/453	G	5	5	5	5	5	5
453	G	5	5	5	5	5	5
455	G	5	5	5	5	5	5
455-1	G	5	5	5	5	5	5
455/456	G	5	5	5	5	5	5
456	G	5	5	5	5	5	5
458	G	5	5	5	5	5	5
459	G	5	5	5	5	5	5
461	G	5	5	5	5	5	5
502	D	2	2	2	2	2	2
503	D	2/3	2/3	2/3	2/3	3	2/3
504	D	5	7	6	7	7	6
505	D	6	7	6	6	6	6
506	D	4	5	4	4	4	4
508	D	3	3	3	3	3	3
601	D	5	5	5	6	5	5
602	C	4	4	4	4	4	4
603	C	5	5	5	5	5	5
604	C	3	3	3	3	3	3
605	C	3	3	3	3	3	3
606	C	5	5	5	5	6	5
607	C	5	5	5	5	5	5
608	C	5	5	5	5	5	5
609	C	5	5	5	5	5	5
610	C	5	5	5/7	5	5	5
612	C	3	3	3	3	3	3
613	C	3	3	3	3	3	3
614	C	2	2	2	2	2	2
615	C	2	2	2	2	2	2
616	C	5	5	5	5	5	5
617	C	5	5	5	5	5	5
618	C	3	3/4	4	3	3	3

и технологичните качества на гроздето (маса на зърно, добив от ha, захари, титруеми киселини и рН на мъстта). По отношение едрината на зърната, с най-едро зърно се характеризира клон 34/24 (индекс 3). Всички останали изследвани варианти се определят с по-дребни зърна (индекс 2/3). Според добивите на клоновете и популацията се установи, че всички клонове в различна степен превъзхождат контролата по този показател. Клонове 9/5, 32/12 и 34/24 са високо добивни (индекс 7), клонове 32/1 и 52/8 - средно до високо добивни (индекс 6), а популацията като средно добивна (индекс 5). От опитните варианти с най-добри захаронатрупващи възможности през периода на изследване се отличава клон 9/5 (индекс 7). Всички останали варианти натрупват по-малко захари в гроздето (индекс 6), но винаги с предимство спрямо популацията. Със сравнително по-високи титруеми киселини се отличава клон 9/5 (индекс 5). Всички останали клонове и популацията на сорт Мискет врачански се характеризират с ниски до средни титруеми киселини в мъстта (индекс 4).

**Шеста група** обхваща 11 показатели касаещи резистентността на клоновете и популацията на сорта към икономически най-важните гъбни болести. От наблюденията, извършени при полски и лабораторни условия се установи, че

между изследваните клонове и популацията на сорта липсва различна чувствителност/устойчивост към гъбните болести и техните прояви са в типичните за сорт Мискет врачански граници.

**Седма група** включва 5 показатели, определящи растежа, растежната сила и характеристиката на зрелия леторасъл на описваните сортове и клонове. Наблюдението се извършва след есенното опадване на листата или по време на покоя на лозите. При тази група показатели, между контролата и изследваните клонове на сорт Мискет врачански не са отчетени съществени разлики.

#### **Сравнителен анализ на клонове и популация от сорт Мискет врачански с DNA анализ, чрез използването на SSR маркери.**

Генетичният профил на сорт Мискет врачански и изследваните клонове е анализиран с 9 микросателитни маркера, приети като стандартни за ДНК идентификация на сортове лоза. В резултат на ДНК анализа е установено, че микросателитните профили на клоновете са напълно идентични с този на популацията на сорт Мискет врачански. Микросателитният профил на изследваните варианти от сорт Мискет врачански, включващ размера на алелните дължини за всеки от изследваните локуси е показан

**Таблица 2.** Микросателитен профил на клонове и популация от сорт Мискет врачански и референтните сортове Каберне Совиньон и Шардоне

**Table 2.** Microsatellite profile of clones and population of Mischet vrachanski variety and reference varieties Cabernet Sauvignon and Chardonnay

Клон/Сорт Clon/Variety Микросателитен локус Microsatellite locus	Клонове на сорт Мискет врачански/ Clones of Misket vrachanski variety	Каберне Совиньон Контрола/ Cabernet Sauvignon controla	Шардоне Контрола/ Chardonnay controla
VVS2	131-131	137-149	137-149
ssrVrZAG62	186-188	188-194	194-194
VVMD7	239-249	239-239	239-244
VVMD5	238-249	229-238	223-234
VVMD25	238-240	238-248	238-248
VVMD27	176-176	172-186	186-188
VVMD28	233-265	233-235	227-233
VVMD32	263-270	239-239	239-239
ssrVrZAG79	252-256	248-248	260-260

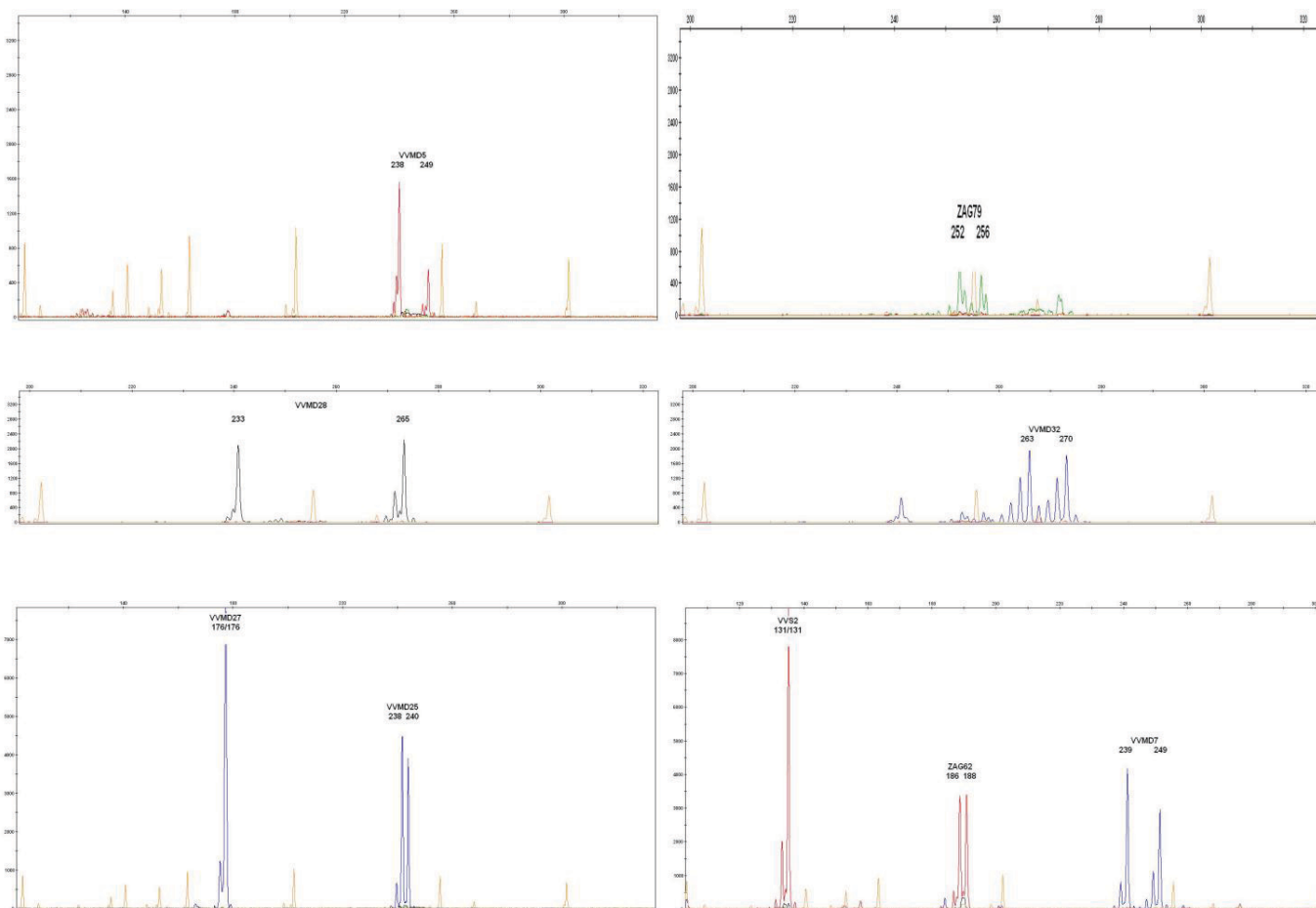


в Таблица 2 и Фигура 1. Размерите на алелите на всеки микросателитен локус са представени в базови двойки и са стандартизирани в съответствие с размера на съответните локуси на референтните сортове Каберне Совиньон и Шардоне.

Използваните 9 микросателитни маркера не показват наличие на полиморфизъм между клоновете и сорт Мискет врачански на ДНК ниво. За откриване на различия в генетичните профили на клоновете и популацията от сорт Мискет врачански, е необходимо да бъдат анализирани допълнително с по-голям брой микросателитни локуси, използвани в аналогични изследвания за разкриване на полиморфизъм както между клоновете и изходния сорт така и между отделните клонове.

## ИЗВОДИ

Изследваните клонове и популация на сорт Мискет врачански, по ботаническото описание на леторасъл, лист, грозд, зърно и семе са типични представители на Източна еколого-географска група (*Convarietas orientalis* Negr.). Напъването при клоновете и популацията на сорт Мискет врачански протича за 4-5 дни и варира слабо по години. Всички се характеризират със зелен цвят на леторасъла и с надлъжни винено-червени ивици, с изключение на клоновете 32/1 и 34/24, при които интензивността на червеното оцветяването е по-слаба. Лозите на популацията и клоновете 32/1 и 52/8 се характеризират със среден до силен растеж, а 9/5, 32/12 и 34/24 - със среден до слаб растеж на летораслите.



**Фигура 1.** Размер на алелните дължини за микросателитни локуси на маркерите VVS2, ZAG62, ZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28 и VVMD32 при клонове и популация на сорт Мискет врачански

**Figure 1.** Size of allele lengths for microsatellite loci of markers VVS2, ZAG62, ZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28 and VVMD32 in clones and population of Misket vrachanski variety

При всички варианти на изследване, нервите на листната петура от горната страна до първото разклонение са червено оцветени, с изключение на клон 52/8, при който много често оцветяването е само в мястото на листната дръжка. Опашният връз е отворен при Мискет врачански и клоновете 32/12, 34/24 и 52/8, понякога отворен - 9/5 и отворен и затворен - 32/1. Главният нерв е със средна дължина при всички варианти, с изключение на 32/12, при който тя е по-голяма. Горните връзове при всички варианти са плитки до средно дълбоки, отворени, във вид на цепнатина или остър ъгъл. Наличието на малък зъб в горните странични връзове е отбелязано с голяма честота само при 52/8. Долните странични връзове при популацията и клоновете 9/5, 32/1, 32/12 и 52/8 са плитки до едва забележими, а при 34/24 - най-често едва забележими. Ъгълът между нерв N3 и допирателната от мястото на листната дръжка и върха на нерв N5 при популацията и 9/5, 32/12, 34/24 и 52/8 е средно голям, а при затворен опашен връз на 32/1 - среден до средно голям.

Популацията на сорт Мискет врачански и клоновете 9/5, 32/1 и 32/12 са със средно големи гроздове, а 34/24 и 52/8 се характеризират с малко подълги гроздове. Клоновете 9/5, 32/1, 32/12 и 34/24 имат едно малко или слабо оформено крило, а на 52/8 - гроздовете най-често са без крила. С по-едри зърна от всички останали е клон 34/24. Всички клонове в различна степен превъзхождат популацията по добив от грозде, като най-високодобивни са 9/5, 32/12 и 34/24, а 52/8 - средно до високо добивен. С най-високи възможности за натрупване на захари и киселини в периода на изследване е клон 9/5. Устойчивостта на гъбните болести при клоновете е в границите на популацията.

Микросателитният анализ, чрез използването на стандартните 9 микросателитни маркери не показва наличие на полиморфизъм при клоновете и сорт Мискет врачански на ДНК ниво. За откриване на различия в генетичните им профили е необходимо да бъдат анализирани по-голям брой микросателитни локуси, използвани в аналогични изследвания.

## ЛИТЕРАТУРА

Benin, M., Gasquez, J., Mahfoudi, A., & Bessis, R. (1988). Characterisation biochimique des variétés. *Vitis*, 27(3), 157-172.

Bertsch, C., Kieffer, F., Maillot, P., Farine, S., Butterlin, G., Merdinoglu, D., & Walter, B. (2005). Genetic chi-

merism of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis. *BMC Plant Biology*, 5(1), 20.

- Boss, P. K., & Thomas, M. R. (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature*, 416(6883), 847-850.
- Bowers, J. E., Dangl, G. S., Vignani, R., & Meredith, C. P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39(4), 628-633.
- Bowers, J., Boursiquot, J. M., This, P., Chu, K., Johanson, H., & Meredith, C. (1999). Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. *Science*, 285(5433), 1562-1565.
- Calo, A., Costacurta, A., Paludetti, G., Calo, G., Arulsekar, S., & Parfitt, D. (1989). The use of isozyme markers to characterize grape cultivars. *Riv. Vitic. Enol*, 1, 15-22.
- Eiras-Dias, J., Sousa, S., Cabral, F., & Carralho, I. (1989). Isoenzymatic characterization of Portuguese vine varieties of *V. vinifera* L. *Rivista Vitic. Enol.*, 42(1), 23-26.
- Franks, T., Botta, R., Thomas, M. R., & Franks, J. (2002). Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2-3), 192-199.
- Maul, E., & This, P. (2008). GENRES 081-a basis for the preservation and utilization of *Vitis* genetic resources. In *Report of a working group on Vitis, first meeting, Palić, Serbia and Montenegro, 12-14 June, 2003* (pp. 13-22). Bioversity International.
- Maul, E., Topfer, R., & Eibach, R. (2008). *Vitis* international variety catalogue. <http://www.vivc.bafz.de>.
- McGovern, P. (2003). *Ancient Wine: the Search for the Origins of Viniculture*. Princeton University Press, pp.400.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19), 4321-4326.
- Schaefer, H. (1971). Enzym polymorphism in rebenblättern. *Phytochemistry*, 10(11), 2601-2607.
- Sefc, K. M., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J., & Steinkellner, H. (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, 42(3), 367-373.
- Sefc, K. M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H., & Thomas, M. R. (2001). Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine* (pp. 433-463). Springer, Dordrecht.
- Stavrakakis, M., & Loukas, M. (1983). The between- and within-grape-cultivars genetic variation. *Scientia Horticulturae*, 19(3-4), 321-334.
- Thomas, M. R., & Scott, N. S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics*, 86(8), 985-990.
- Walker, A. R., Lee, E., & Robinson, S. P. (2006). 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*, 62(4-5), 623-635.