

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Andreja FRANCA

**KLONSKA RAZNOLIKOST VINSKE
TRTE (*Vitis vinifera* L.), PRIMER SORTE
'REFOŠK'**

Zaključna naloga študijskega programa Sredozemsko kmetijstvo

Koper, 2012

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	1
KAZALO SLIK.....	2
KAZALO PREGLEDNIC	3
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	4
POVZETEK.....	5
ABSTRACT.....	5
1 UVOD	6
2 PREGLED LITERATURE	7
2.1 Značilnosti sorte 'Refošk' (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Refošk).....	7
2.1.1 Klasifikacija vinske trte	8
2.1.2 Razmnoževanje vinske trte	8
2.1.3 Selekcija in introdukcija vinske trte	8
2.1.4 Vinorodna dežela Primorska.....	9
2.2 Metode za identifikacijo sort vinske trte	10
2.2.1 Molekulski markerji	11
3 MATERIAL IN METODE DELA	15
3.1 MATERIAL.....	15
3.1.1 Izolacija DNA	15
3.1.2 Merjenje DNA koncentracije.....	16
3.1.3 Mikrosatelitski markerji	16
3.2 Molekulski markerji AFLP.....	19
3.2.2 Ponovljivost rezultatov	21
4 REZULTATI Z DISKUSIJO	22
4.1 Analiza mikrosatelitov.....	22
4.2 Analiza markerjev AFLP.....	22
4.3 Diskusija	24
5 ZAKLJUČEK.....	25
6 LITERATURA IN VIRI	26

KAZALO SLIK

Slika 1: 'Refošk' (foto: A. Franca, 2012).....	8
Slika 2: Vinorodne dežele v Sloveniji (Vinorodna Slovenija, 2012)	10
Slika 3: Potek AFLP tehnike: prepoznavno mesto restrikcijskih encimov <i>MseI</i> in <i>PstI</i> , nukleotidno zaporedje adapterjev <i>MseI</i> in <i>PstI</i> , preamplifikacija z <i>PstI</i> in <i>MseI</i> začetnima oligonukleotidoma ter selektivna amplifikacija z dodanimi selektivnimi bazami <i>PstI</i> +AGA, <i>MseI</i> +AG in <i>PstI</i> +AAC, <i>MseI</i> +CTG.....	13
Slika 4: Naprava Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer za kapilarno elektroforezo (foto: A. Franca, 2012)	18
Slika 5: Naprava Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer za kapilarno elektroforezo (foto: A. Franca, 2012)	18
Slika 6: Primerjava med vzorcema 'Refošk' 12 in 'Refošk' 22 pri AFLP kombinaciji VIC- <i>PstI</i> -AAC/ <i>MseI</i> -CTG. Polimorfen AFLP marker dolžine 101 bp je označen s sivo barvo	23
Slika 7: Primerjava med vzorcema 'Refošk' 7 in 'Refošk' 22 pri AFLP kombinaciji 6-FAM- <i>PstI</i> -AGA/ <i>MseI</i> -AG. Polimorfni AFLP markerji dolžin 150 bp, 155 bp in 186 bp so označeni s sivo barvo	23

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Označitev starih trsov sorte 'Refošk'	15
Preglednica 2: Seznam analiziranih mikrosatelitskih markerjev	16
Preglednica 3: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov z dodanim univerzalnim zaporedjem M13(-21) oligonukleotida (F – vodilni začetni oligonukleotid, R – povratni začetni oligonukleotid)	16
Preglednica 4: »Touch down« temperaturni profil verižne reakcije s polimerazo (PCR)	17
Preglednica 5: Temperaturni profil za pripravo adapterjev (Čerenak, 2004)	19
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za preamplifikacijo brez dodanih selektivnih nukleotidov in linkerji za izdelavo adapterjev	20
Preglednica 7: PCR temperaturni profil za preamplifikacijo	20
Preglednica 8: Dobljen genotip na 6 mikrosatelitskih lokusih pri desetih vzorcih sorte 'Refošk'	22
Preglednica 9: Kombinaciji uporabljenih začetnih oligonukleotidov za namnoževanje markerjev AFLP, število namnoženih fragmentov (markerjev AFLP) pri selektivni amplifikaciji ter število in odstotek polimorfnihih fragmentov	22

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
Angl.	Angleško
°C	stopinja Celzija, enota za merjenje temperature
CTAB	heksadeciltrimetil amonijev bromid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (DNK)
dNTP	deoksiribonukleotidtrifosfat
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. Ethylenediaminetetraacetic Acid)
g	oznaka za težni pospešek ali pospešek prostega pada in znaša (na Zemlji) približno 9,81 m/s ² , g je tudi oznaka za gram (10 ⁻³ kg)
kbp	kilo bazni pari (tisoč baznih parov), mera za dolžino nukleotidnega zaporedja
M, mM	molarnost: število molov v 1 litru raztopine, molarnost (M) = mol/l; mM = milimol/l (10 ⁻³ mol/l ali mol/m ³)
mbp	mega bazni pari (milijon baznih parov), mera za dolžino nukleotidnega zaporedja
ng/μl	nanogram na mikroliter
°Oe	Oechslejeve stopinje; enota sladkorne stopnje mošta
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
RAPD	naključno namnožena polimorfna DNA (angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	dolžinski polimorfizem restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNK	ribonukleinska kislina
SCAR	namnoženi fragmenti, določeni z nukleotidnim zaporedjem (angl. Sequence Characterized Amplified Region)
SSR	mikrosatelit, enostavna zaporedja (angl. Simple Sequence Repeat)
Taq polimeraza	termostabilni encim DNA-polimeraza, izoliran iz termofilne bakterije <i>Thermus aquaticus</i> (Taq); uporablja se pri verižni reakciji s polimerazo

POVZETEK

Namen naloge je poglobiti znanje o genetski raznolikosti sorte 'Refošk', pregled razpoložljive literature na tej sorti ter uporabnosti mikrosatelitov in markerjev AFLP za študije diverzitete. V nalogi smo analizirali deset trsov iz klonskega selekcijskega vinograda v Komnu na Krasu. Za oceno genetske variabilosti trsov smo uporabili mikrosatelitske in AFLP markerje. Analiza z mikrosateliti je potrdila, da vsi trsi pripadajo sorti 'Refošk', z markerji AFLP pa je bila ugotovljena nizka genetska variabilnost trsov.

Ključne besede: 'Refošk', mikrosateliti, AFLP, genetska variabilnost

ABSTRACT

The aim of the present study is to deepen the knowledge about the genetic diversity of the variety 'Refošk', to review the available literature on this cultivar, and the usefulness of microsatellites and AFLP markers for diversity studies. In the present work, ten vines from a clonal selection vineyard established in Komen (Carst) have been analysed. - To assess the genetic variability of vines, microsatellites and AFLP markers have been used. Microsatellite analysis confirmed, that all vines belong to the variety 'Refošk', while the AFLP markers showed the low genetic variability.

Key words: 'Refošk', microsatellites, AFLP, genetic variability

1 UVOD

Potrjevanje novih klonov in izbira trsov za pridelavo standardnega cepilnega materiala temelji na selekciji, pri kateri je odbira trsov odvisna od genetske variabilnosti in zdravstvenega stanja. V Sloveniji se za selekcijo vinske trte izvajata osnovna (množična) in nadaljevalna selekcija. Odkrite pozitivne lastnosti morajo biti jasno izražene in se morajo prenašati na potomce. Tako se lahko klonske linije potrdi kot nove klone. Genetsko gledano lahko klonska selekcija zoži genetski material sorte.

V Sloveniji imamo uradno potrjen samo en klon sorte 'Refošk' Si – 35. Glede na to, da je sorta 'Refošk' vodilna sorta v Primorski vinorodni deželi je to vsekakor premalo, zato je za ohranitev genetsko variabilnega materiala in za pestrejšo ponudbo kakovostnega cepilnega materiala nujno potrebno delo nadaljevati v smeri pridobivanja novih klonov. Rezultati genetske analize bodo tako v pomoč žlahtniteljem.

Za analizo variabilnosti je poznanih več metod. Določanje variabilnosti na osnovi morfoloških in biokemijskih lastnosti ima to pomanjkljivost, da se le te razvijejo pod vplivom okolja. Uporaba molekulskih markerjev za oceno variabilnosti na nivoju DNA je zato s tega vidika primernejše, poleg tega pa omogočajo hitrejšo analizo. Najpogosteje uporabljeni molekularni markerji so: RAPD, AFLP, SSR in SCAR markerji.

Cilji zaključne naloge so pregled literature o sorti 'Refošk', o uporabnosti molekulskih markerjev AFLP in mikrosatelitov za določanje genetske variabilnosti ter poglobiti znanje o genetski raznolikosti sorte 'Refošk'. V analizo bo vključenih deset trsov iz klonskega selekcijskega vinograda v Komnu na Krasu. Mikrosatelite bomo uporabili za potrditev identitete sorte vseh analiziranih trsov, z uporabo markerjev AFLP pa nameravamo določiti genetsko variabilnost trsov. Predpostavljamo, da vsi analizirani vzorci niso genetsko identični in da bomo odkrili določeno stopnjo variabilnosti.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Značilnosti sorte 'Refošk' (*Vitis vinifera* L. cv. Refošk)

'Refošk' je rdeča sorta vinske trte s številnimi sinonimi: 'Drobni refošk', 'Teranovka', 'Refošk istarski', 'Teran', 'Terrano d'Istria', 'Refosko del Carso', 'Refosco d'Istria'. Na Krasu iz te sorte pridelujejo teran, v Istri pa refošk (Plahuta in Korošec-Koruza, 2009). Spada v črnomoško ekološko skupino Negr. – Proles pontica in je ena naših najstarejših udomačenih sort (Hrček in Korošec-Koruza, 1996). Sorta je razširjena je v Istri, na Krasu, v severni Italiji, manj pa v severni Dalmaciji in na Kvarnerskih otokih (Vodopivec, 1999).

Odkritih je precej variacij sorte 'Refošk'. Najpomembnejša različka sta 'Refošk' z zeleno pecljevino (zelenopecljati tip) in 'Refošk' z rdečo pecljevino (rdečepecljati tip). Barva pecljevine ni stalna lastnost, odvisna je od stopnje zrelosti in vremenskih razmer. Zelenopecljati 'Refošk' je manj odporen na bolezni. Zori nekoliko pozneje, pridelki so večji, vendar nekoliko slabše kakovosti. Rdečepecljati 'Refošk' zori nekoliko prej, je boljši in daje bolj kakovostne pridelke ter je odpornejši proti boleznim. Pridelki so nekoliko manjši. Grozd je širši, skoraj srčaste oblike, z izrazito rdečo pecljevino (Vodopivec, 1999).

Rozga je svetlo rjava. Vršiček je zelo kosmat in svetlo zelen. List je okrogel, precej velik in običajno tridelen. Zgornja stran lista je zelena, spodnja pa volnata. Robovi lista so ostro nazobčani in rdečkasti. Listne žile na zgornji strani so rdeče, na spodnji rumene. Grozd je velik, širok, srednje nabit in vejnat, težak do 250 g. Jagoda je srednje debela, okrogla in modrikaste barve (Slika 1). Trta je zelo bujna in obilno rodi. Odporna je proti gnilobi in oidiju, občutljiva pa je na pozebo. Ustreza ji latnik in druge visoke ter zračne vzgojne oblike. Zahteva zračna in suha tla ter veliko sonca (Plahuta in Korošec-Koruza, 2009). Kraška ilovnata tla so najustreznejša, bogata z rudninskimi snovmi, na težkih in mokrih tleh ne uspeva dobro. Podlage, na katerih sorta 'Refošk' dobro uspeva so križanci iz skupine *V.berlandieri* x *V.riparia*: Kober 5 BB, 420 A, SO4; *V.riparia* x *V. rupestris*: 3309 Couderc; *V.berlandieri* x *V. rupestris*: Paulsen 1103. Zahteva sorazmerno dolgo rez, od 8 do 12 očes. Glede na dozorevanje grozdja je pozna sorta. Rodnost je obilna in redna (Vodopivec, 1999). Vsebnosti sladkorja v moštu dosegajo 75-80 °Oe, vina so povprečne kakovosti, izjemoma tudi vrhunska. Imajo značilen vonj, ki navadno spominja na maline. Značilna barva vina je temno rdeča z vijoličastimi odtenki (Plahuta in Korošec-Koruza, 2009). Vino ima od 8 do 11 % alkohola in od 8 do 11 g/l skupnih kislin (Vodopivec, 1999).



Slika 1: 'Refošk' (foto: A. Franca, 2012)

2.1.1 Klasifikacija vinske trte

Sorto 'Refošk' uvrščamo v kraljestvo *Plantae* (rastilne), deblo *Magnoliophyta* (kritosemenke), razred *Magnoliopsida* (dvokaličnice) in red *Vitales* (vinikovci). Vinska trta spada v družino *Vitaceae* (vinikovke) in rod *Vitis* (trta), ki se razcepi na dva podroda – *Muscadinia* in *Euvitis*. Vrsta *Vitis vinifera* spada v podrod *Euvitis*.

2.1.2 Razmnoževanje vinske trte

Vinsko trto razmnožujemo vegetativno in generativno s semenom. Generativno razmnožujejo trto le žlahtnitelji. Za sajenje novih vinogradov razmnožujemo trto vegetativno. Najbolj razširjen način vegetativnega razmnoževanja je cepljenje vinske trte na ameriške podlage. Po prenosu trtne uši *Viteus vitifolii* Shimer iz Amerike v Evropo v zadnji četrtini 19. stoletja, se je cepljenje močno razmahnilo. Cilji cepljenja so zamenjava slabo rodnih sort v vinogradu, pospeševanje bujnosti in povečanje dobrega prenašanja apna v tleh (Vršič in Lešnik, 2010).

V vinogradništvu je pomembno doseči čim večji donos in kakovost proizvodov vinske trte, kar lahko dosežemo z žlahtnjenjem vinske trte ter s sodobno tehnologijo pridelovanja, ki vključuje izbiro izrazito vinogradniških leg z ustrezno klimo, vzgojne oblike, podlage, izbiro ustreznih gnojil, kemičnih sredstev itd. Od kakovostnega sadilnega materiala sta v veliki meri odvisna napredek in uspešnost vinogradništva. Za doseganje zelenih ciljev vinogradništva so pomembni cepiči, ki so rezani z zdravih, dobro rodnih in bujnih trsov (Brdnik, 1982).

2.1.3 Selekcija in introdukcija vinske trte

S selekcijo in introdukcijo želimo izboljšati trsni izbor sort glede na tehnološke značilnosti, pomembne za gospodarno in kakovostno pridelavo grozdja in vina. Introdukcija je najhitrejša pot za doseg tega cilja. Vanjo so vključene vinske sorte in podlage. Introdukcija je

nadzorovan prenos tehnološko-pridelovalno zanimivih sort iz drugih vinorodnih dežel v naše ekološke razmere in uvajanje novih, uradno potrjenih domačih klonov vinske trte. Vse nove sorte oziroma klone je potrebno, pred vpisom v trsni izbor, ampelografsko in tehnološko preskusiti v ekoloških razmerah, v katerih bodo pozneje rasli. V redno pridelavo vključimo le tiste sorte, ki so vsaj v eni želeni lastnosti boljše od standarda, na primer odpornost proti pozebi, boleznim itd., ali pa prispevajo k izboljšanju kakovosti vina (Vršič in Lešnik, 2010).

Z uvajanjem novih uvoženih ali domačih klonov že uveljavljenih vinskih sort želimo doseči izenačeno rodnost, boljšo kakovost, zgodnejše dozorevanje in večjo odpornost na bolezni. Z introdukcijo pridemo do lastnega cepilnega materiala za podlage, ki bodo ustrezale evropskim kakovostnim normam. Pomembno je, da so zdravstveno neoporečne, les mora dobro dozorevati, prilagajati se tlem, se skladati s sortami evropske trte, dobro kalusirati in okoreniniti (Vršič in Lešnik, 2010).

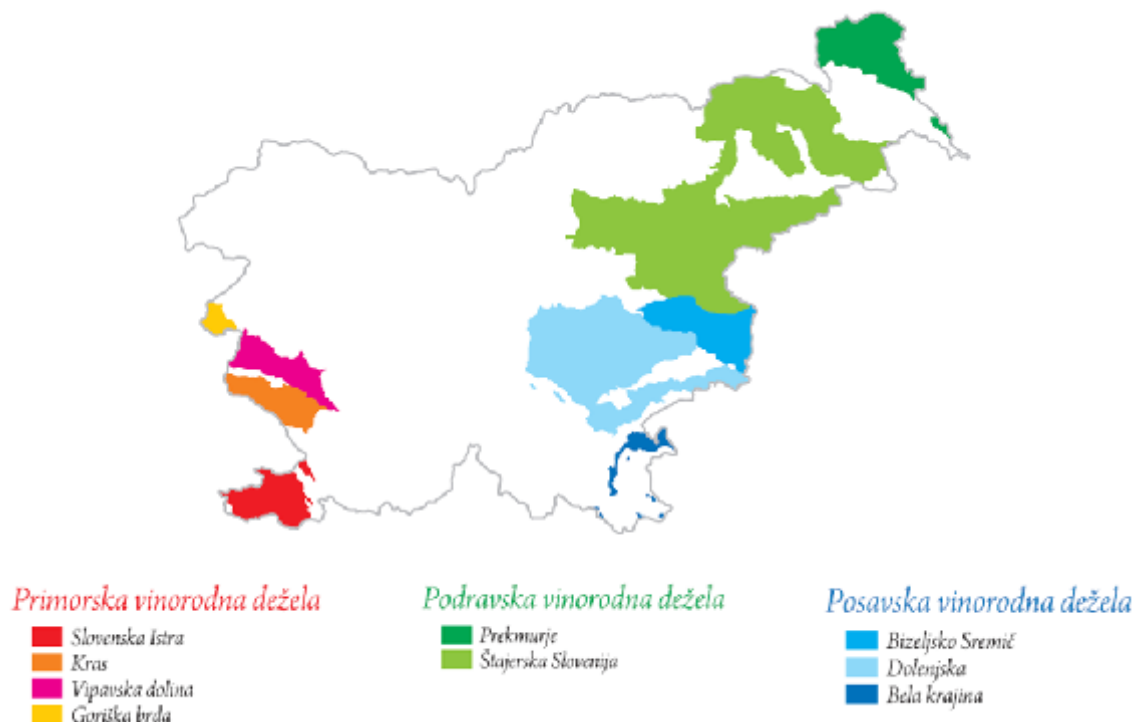
Vinska trta je heterozigotna rastlina, zato jo za pridelovanje grozdja razmnožujemo vegetativno, ki sčasoma vpliva na spremembe znotraj kultivarja. Kot posledica naravnih degenerativnih procesov se pojavlja genska izrojenost in kužna izrojenost, ki je posledica okužb z različnimi virusnimi in njim podobnimi boleznimi. S stalno selekcijo in razmnoževanjem izključno selekcioniranih trsov lahko ohranjamo ustrezno homogenost sorte (Vršič in Lešnik, 2010).

V Sloveniji opravljamo dve stopnji selekcije vinske trte, osnovno in klonsko. Osnovna ali množična selekcija obsega vizualni pregled fenotipa in zdravstvenega stanja. Z osnovno selekcijo dobimo matične trse za pridelavo standardnega cepilnega materiala in odkrivamo nadpovprečne (elitne) trse. Slednje vključujemo v nadaljevalno klonsko selekcijo. Pozitivno množično selekcijo, ki jo izvajamo 3 leta, uporabljamo za odbiranje in potrjevanje trsov v vinogradih, negativno množično selekcijo pa izvajamo eno leto (Vršič in Lešnik, 2010).

Klonska selekcija predstavlja dodatno genetsko in zdravstveno preverjanje odbranih elitnih trsov v obdobju najmanj dveh vegetativno razmnoženih generacij potomcev. V fenotipu klonskih linij se izražajo pozitivne genske spremembe oziroma mutacije. To omogoča tudi njihovo kakovostno in količinsko vrednotenje, skupaj z organoleptično oceno in kemijsko analizo vina. Pozitivne lastnosti določene klonske linije, ki se razlikuje od standarda, morajo biti jasno izražene in se morajo prenašati na vegetativne potomce. Tako odbrane klonske linije dokončno potrdijo kot nove klone (Vršič in Lešnik, 2010).

2.1.4 Vinorodna dežela Primorska

Vinorodna dežela je širše geografsko območje s podobnimi podnebnimi in talnimi razmerami, ki skupaj z agrobiološkimi dejavniki vplivajo na glavne organoleptične lastnosti vina, mošta in drugih proizvodov pridelanih v posamezni vinorodni deželi. Vinogradniško območje Slovenije se deli na pridelovalna območja, ki so vinorodne dežele, okoliše, podokoliše, ožje okoliše ter vinorodne kraje in lege. Vinorodne dežele so Primorska, Podravje in Posavje (Slika 2) (Vršič in Lešnik, 2010). Geografske označbe vinorodnih okolišev na območju vinorodne dežele Primorska so Brda ali Goriška Brda, Vipavska dolina ali Vipava, Kras in Slovenska Istra (Pravilnik o seznamu geografskih označb za vina in trsnem izboru, 2007). V vinorodni deželi Primorska je več kot tretjina vseh slovenskih vinogradov, ki dajejo dobri dve petini slovenskega vina. Povprečna površina na pridelovalca je bila 1,48 ha v letu 2007 (Vršič in Lešnik, 2010).



Slika 2: Vinorodne dežele v Sloveniji (Vinorodna Slovenija, 2012)

2.1.4.1 Trsni sortni izbor za vinorodno deželo Primorsko

Priporočene sorte vinske trte zagotavljajo na določenem pridelovalnem območju pridelavo deželnih in kakovostnih vin ter predstavljajo gospodarsko osnovo za razvoj vinogradništva in vinarstva na določenem pridelovalnem območju. Dovoljene sorte pa so tiste, ki na določenem pridelovalnem območju niso širše uveljavljene kot samostojne sorte. V določenih agroekoloških razmerah lahko izboljšajo ali dopolnijo kakovost vina pridelovalnega območja. Kot dovoljene sorte se štejejo tudi stare lokalne sorte (Vršič in Lešnik, 2010).

V Uradnem listu Republike Slovenije je objavljen seznam sort vinske trte, ki se smejo saditi v posameznih vinorodnih okoliših. 'Refošk' je priporočena sorta v vinorodnem okolišu Slovenska Istra in v vinorodnem podokolišu Kraška planota, ki spada pod vinorodni okoliš Kras. Kot dovoljena sorta pa ga štejemo v vinorodnem podokolišu Vrhe (spada pod vinorodni okoliš Kras), v vinorodnem okolišu Brda ali Goriška Brda in v vinorodnem okolišu Vipavska dolina ali Vipava (Pravilnik o seznamu geografskih označb za vina in trsnem izboru, 2007).

2.2 Metode za identifikacijo sort vinske trte

Identifikacija kultivarjev vinske trte s tradicionalnimi metodami, kot sta ampelografija in ampelometrija, ki temeljita na morfoloških razlikah med sortami, je otežena zaradi vpliva ekoloških dejavnikov, razvojnega stadija rastline, zdravstvenega stanja in načina pridelave. Zato je bilo v preteklosti smiselno poiskati metode, s pomočjo katerih lahko analiziramo razlike med sortami na nivoju genoma. Prednost tovrstne identifikacije je v tem, da je neodvisna od zgoraj naštetih dejavnikov, ki vplivajo na morfologijo rastline (Štajner, 2010).

Kombinacijo SSR in AFLP molekulskih markerjev se uporablja za določitev znotraj sortne variabilnosti in genetske sorodnosti med različnimi sortami vinske trte ter za ugotavljanje homonimov in sinonimov različnih sort vinske trte (Labra in sod., 2001; Fossati in sod., 2001).

2.2.1 Molekulski markerji

Marker je lahko katerokoli zaporedje DNA, ki ga lahko brez večjih težav odkrijemo in spremljamo njegovo dedovanje. Glede na namen preučevanja organizma lahko izbiramo med hibridizacijskimi (markerji RFLP) in PCR tehnikami (mikrosateliti, AFLP in RAPD) (Bandelj Mavsar, 2005).

2.2.1.1 Mikrosateliti

Mikrosateliti so enostavna tandemska ponavljajoča se zaporedja DNA, ki se nahajajo v genomih v skoraj vseh znanih organizmih in organelih (Chambers in MacAvoy, 2000). Pojavljajo se različna poimenovanja mikrosatelitov: VNTR (spremenljivo število tandemskih ponovitev – angl. Variable Number of Tandem Repeats), STR (kratke tandemske ponovitve – angl. Short Tandem Repeats), SSR (enostavna ponovljiva zaporedja – angl. Simple Sequence Repeats) in SSLP (polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij – angl. Simple Sequence Length Polymorphisms).

Tipično mikrosatelitsko zaporedje sestoji iz petih do približno 100 tandemskih ponovitev iz kratkih, preprostih sekvenčnih motivov, ki so sestavljeni iz 1 do 6 nukleotidov (npr. (GA)_n, (GATA)_n). V evkariontih je približno 10⁴ do 10⁵ mikrosatelitskih lokusov, ki so naključno razporejeni po celotnem genomu. Veliko mikrosatelitskih zaporedij v evkariontskih genomih pomeni skoraj neomejen vir polimorfnih mest, ki se jih lahko izkorišča kot genetske markerje (Sefc in sod., 2001).

Mikrosatelite lahko razdelimo, glede na sestavo ponavljajočega se motiva, na:

- popolne mikrosatelite (angl. pure microsatellite), ki so sestavljeni samo iz enega motiva osnovne ponovitve, ki se ponavlja brez prekinitve, npr. (AC)₁₄;
- popolne in prekinjene mikrosatelite (angl. interrupted pure microsatellite), ki vsebujejo insercijo enega nukleotida ali več baznih parov in se ne ujemajo z osnovnim motivom ponovitve, npr. TA(CA)₄TA(CA)₇;
- sestavljene mikrosatelite (angl. compound microsatellite), ki vključujejo dva ali več mikrosatelitov in se med seboj razlikujejo po osnovnem motivu ponovitve, npr. (CT)₂₂(CA)₆;
- sestavljene in prekinjene mikrosatelite (angl. interrupted compound microsatellite), ki vsebujejo vsaj dva različna osnovna motiva in krajšo insercijo baznih parov, ki se ne ujemajo z osnovnimi motivi, npr. (AC)₁₄AGAA(AG)₁₂ (Chambers in MacAvoy, 2000).

Spremembe v številu ponovitev osnovnega motiva mikrosatelita so glavni vzrok polimorfizma med posamezniki (Eisen, 1999). Mikrosatelitski markerji so se izkazali za zelo koristne za natančno identifikacijo kultivarjev, za odkrivanje sinonimov, za določanje genetske sorodnosti in za gensko kartiranje (Sefc in sod., 2001). Uporabljajo se kot visoko dostopni genetski markerji kromosomskih segmentov za identifikacijo posameznikov (Chambers in MacAvoy, 2000).

Prednosti namnoževanja mikrosatelitov v verižni reakciji s polimerazo (PCR) so, da so lokusno specifični in visoko polimorfni. Aleli se glede na dolžino ločijo s pomočjo elektroforeze na gelih visoke ločljivosti. Markerji so kodominantni, kar omogoča razlikovanje med homozigoti in heterozigoti (Sefc in sod., 2001). Genotipizacija z mikrosatelitskimi markerji se uporablja za forenzične, diagnostične in znanstvene raziskave (Schuelke, 2000).

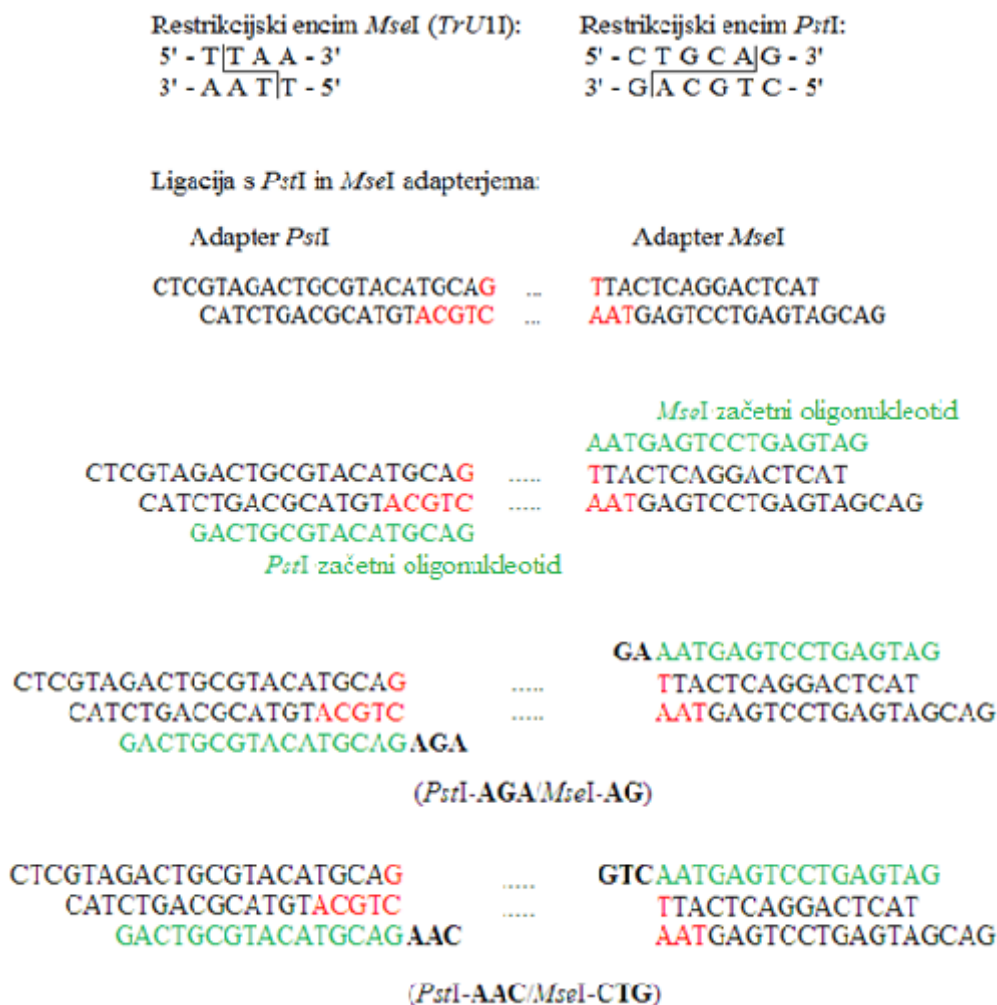
Skupni cilj evropskih projektov, ki se nanašajo na vinsko trto, je postavitev javno dostopne mikrosatelitske podatkovne zbirke, ki bi obsegala genotipe vinske trte iz vseh vinorodnih evropskih držav (Štajner, 2010).

Identifikacija in določitev mikrosatelitskih markerjev v organizmu je drag in zamuden postopek, ki vključuje izdelavo genomskih knjižnic ter razvoj lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov za PCR. Mikrosatelitski začetni oligonukleotidi pridobljeni iz ene vrste se zaradi homologije sekvenc pogosto uporabljajo za raziskovanje genetsko podobnih vrst znotraj istega rodu. Tako je bilo na primer pri večini objavljenih mikrosatelitskih markerjev iz *Vitis vinifera* in *Vitis riparia*, ki namnožujejo DNA iz drugih *Vitis* vrst (Sefc in sod., 2001).

2.2.1.2 AFLP markerji

Tehnika Dolžinskega polimorfizma namnoženih fragmentov (AFLP – angl. Amplified Fragment Length Polymorphism) temelji na selektivnem namnoževanju restrikcijskih fragmentov. Vos in sod. so leta 1995 predstavili tehniko AFLP kot novost namnoževanja DNA s PCR.

Tehnika AFLP vključuje tri korake: razrez DNA, ligacijo dvoverižnih adapterjev ter selektivno namnoževanje množice restrikcijskih fragmentov. Sledi ločevanje namnoženih fragmentov DNA in statistična analiza (Vos in sod., 1995). Slika 3 prikazuje potek AFLP tehnike z uporabo *MseI* in *PstI* restrikcijskih encimov in ligacijskima adapterjema *MseI* in *PstI*, preamplifikacijo s *PstI* in *MseI* začetnima oligonukleotidoma ter selektivno amplifikacijo z dodanimi selektivnimi bazami: *PstI*+AGA, *MseI*+AG in *PstI*+AAC, *MseI*+CTG.



Slika 3: Potek AFLP tehnike: prepoznavno mesto restriksijskih encimov *MseI* in *PstI*, nukleotidno zaporedje adapterjev *MseI* in *PstI*, preamplifikacija z *PstI* in *MseI* začetnima oligonukleotidoma ter selektivna amplifikacija z dodanimi selektivnimi bazami *PstI*+AGA, *MseI*+AG in *PstI*+AAC, *MseI*+CTG.

Za razrez DNA se uporabljata dve restriksijski endonukleazi. Ena reže pogosteje in prepozna zaporedje štirih nukleotidov, druga pa reže redkeje ter prepozna zaporedje šestih ali več nukleotidov. Z razrezom dobimo restriksijske fragmente s kohezivnimi ali enoverižnimi konci. Nanje se vežejo dvoverižni adapterji, komplementarni lepljivim koncem restriksijskih fragmentov. S tem se ustvari matrična DNA za nadaljnje namnoževanje (Vos in sod., 1995).

Selektivno namnoževanje množice restriksijskih fragmentov se deli na dve stopnji – preamplifikacija in selektivna amplifikacija. V preamplifikaciji se v PCR namnožijo fragmenti dobljeni po ligaciji, z uporabo dveh začetnih oligonukleotidov, ki imata poleg osrednje sekvence, komplementarne adapterjem, še zaporedje nukleotidov, ki se ujema z restriksijskim mestom. Na 3' koncu sta običajno podaljšana z eno selektivno bazo, kar omeji namnoževanje fragmentov v PCR. Preamplifikacija je sestavljena iz 20-ih ciklov. Selektivna amplifikacija poteka v prisotnosti začetnih oligonukleotidov, ki vsebujejo do 3 dodane selektivne nukleotide. Sestavljena je iz 36 ciklov PCR (Vos in sod., 1995).

Zadnji korak je elektroforeza in analiza namnoženih fragmentov, ki se izvaja na poliakrilamidnem gelu (Vos in sod., 1995). Novejša metoda za ločevanje molekul DNA je kapilarna elektroforeza, ki je separacijska analizna metoda, kjer se zaradi različne hitrosti potovanja v električnem polju v kapilari komponente vzorca ločijo.

Rezultati DNA so ponavadi nezanesljivi, če je koncentracija pod določeno absolutno koncentracijo (~1 pg), ne glede na kompleksnost DNA. Večina fragmentov AFLP ustreza edinstvenemu položaju na genomu in zato jih je mogoče izkoristiti kot markerje za izdelavo genetskih in fizičnih kart (Vos in sod., 1995).

Markerje AFLP se uporablja za pregled biotske raznovrstnosti vinske trte, za potrditev identitete in odkrivanje posebnih polimorfizmov za razlikovanje med različnimi kloni ter sortami, s pregledom velikega števila neznanih polimorfnih lokusov. Karakterizacija dodatnih sort vinske trte in vzpostavitev baze podatkov lahko zagotovi pomembne informacije za uvrstitev neznanih genotipov k že znanim sortam (Cervera in sod., 1998).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

V poskus smo vključili deset različnih trsov sorte 'Refošk' iz selekcijskega vinograda s Komna na Krasu (Preglednica 1), v katerem so bili v letih od 1989 do 1991 posajeni kloni 78 starih trsov s celotnega Krasa, z namenom izbrati ustrezne elite in ohraniti stare tipe sorte 'Refošk'. Trsi, oblikovani v gojitveno obliko dvokraki guyot, rastejo na podlagi 'SO 4'.

Preglednica 1: Označitev starih trsov sorte 'Refošk'

Vzorec
'Refošk' 1
'Refošk' 7
'Refošk' 12
'Refošk' 21
'Refošk' 22
'Refošk' 24
'Refošk' 31
'Refošk' 39
'Refošk' 41
'Refošk' 67

Analiza je potekala po sledečem vrstnem redu: izolacija DNA iz mladih listov; sortno pristnost analiziranih trsov smo preverili s karakterizacijo 6 mikrosatelitskih lokusov, nato smo z markerji AFLP določili genetsko variabilnost trsov.

3.1.1 Izolacija DNA

DNA smo izolirali iz mladih listov s CTAB metodo po uveljavljenem protokolu (Kump in sod., 1992). V terilnico smo dali približno 1 cm² rastlinskega materiala in ga ob dodatku 1,5 ml CTAB ekstrakcijskega pufra [2% (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2% (v/v) β -merkaptotanol], ki je bil predhodno segret na 68 °C, homogenizirali. Homogenizirane vzorce smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko in jih inkubirali 1,5 ure v vodni kopeli pri 68 °C. Vzorce smo občasno rahlo premešali. Po inkubaciji smo dodali 500 μ l mešanice fenola, kloroforma in izoamilalkohola, v razmerju 25:24:1 in jih dobro premešali. Suspenzijo smo centrifugirali 15 min pri relativni centrifugalni sili 11000 g (centrifuga Eppendorf 5430R) in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in ponovili postopek čiščenja s fenolom, kloroformom in izoamilalkoholom. Supernatant smo odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 50 μ l 3 M Na-acetata (1/10 volumna, pH 5,2, uravnan z očetno kislino) in 500 μ l ledenohladnega izopropanola (1 volumen). Vzorce smo premešali in inkubirali 30 min pri -20 °C. Sledilo je centrifugiranje 15 min pri 11000 g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali, usedlino DNA sprali z 500 μ l 70% etanola ter vzorce posušili pri sobni temperaturi. DNA smo raztopili v 100 μ l TE pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] ter jo shranili na 4 °C do nadaljnjih analiz.

3.1.2 Merjenje DNA koncentracije

DNA smo izmerili z uporabo Qubit Fluorometer (Invitrogen) in s pripadajočim kitom Quant-iT™ dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit. Tehnika temelji na določevanju koncentracije DNA s pomočjo fluorescentnih barvil.

3.1.3 Mikrosatelitski markerji

Mikrosatelitske markerje smo uporabili za identifikacijo ali izbrani trsi pripadajo sorti 'Refošk'. Z metodo PCR smo pomnožili 6 mikrosatelitskih markerjev (Preglednica 2).

Preglednica 2: Seznam analiziranih mikrosatelitskih markerjev

Ime lokusa	Fluorescentno barvilo M13 (-21) začetnega oligonukleotida	Referenca
VVMD 5	NED	Bowers in sod., 1996
VVMD 7	6 – FAM	
VVMD 27	VIC	Bowers in sod., 1999
VVMD 32	VIC	
Vr ZAG 62	6 – FAM	Sefc in sod., 1999
Vr ZAG 79	PET	

Mikrosatelite smo pomnoževali s tako imenovano »ekonomično metodo«, pri kateri je eden od začetnih oligonukleotidov v paru na 5' koncu podaljšan z 18-mi bazami univerzalnega zaporedja M13(-21), ki predstavlja komplementarno mesto za začetni oligonukleotid M13(-21) s fluorescentno oznako, kar omogoča zaznavo pomnoženih fragmentov na kapilarni elektroforezi (Schuelke, 2000). Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov so podana v Preglednici 3.

Preglednica 3: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov z dodanim univerzalnim zaporedjem M13(-21) oligonukleotida (F – vodilni začetni oligonukleotid, R – povratni začetni oligonukleotid)

Mikrosatelitski lokus		Nukleotidno zaporedje 5' - 3'
VVMD 5	F	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> CTA GAG CTA CGC CAA TCC AA
	R	TAT ACC AAA AAT CAT ATT CCT AAA
VVMD 7	F	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT
	R	CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT
VVMD 27	F	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> GTA CCA GAT CTG AAT ACA TCC GTA AGT
	R	ACG GGT ATA GAG CAA ACG GTG T
VVMD 32	F	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> TAT GAT TTT TTA GGG GGG TGA GG
	R	GGA AAG ATG GGA TGA CTC GC
Vr ZAG 62	F	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C
	R	CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C
Vr ZAG 79	F	<u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G
	R	

	R	TGC CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C
Univerzalen M13(-21) začetni oligonukleotid		TGT AAA ACG ACG GCC AGT

Reakcija PCR je potekala v skupnem volumnu 15 μ l. Dodali smo 5 μ l DNA (razredčene na 4 ng/ μ l, skupna količina DNA v reakciji je bila 20 ng), 1,5 μ l 10x koncentriranega PCR pufra, 1,2 μ l 25 mM MgCl₂, 1,2 μ l 10 mM dNTP, 0,3 μ l 10 μ M lokusno specifičnega začetnega in povratnega oligonukleotida, 0,375 μ l 10 μ M univerzalnega M13(-21) začetnega oligonukleotida (seznam kombinacij med mikrosatelitskimi lokusi in univerzalnim oligonukleotidom označenim z določeno barvo se nahaja v Preglednici 3), 0,075 μ l encima Taq polimeraze (5 u/ μ l) in 5,05 μ l H₂O. Vse kemikalije in encime, ki smo jih uporabili smo pridobili od proizvajalca Fermentas.

Reakcija PCR je potekala po »touch down« temperaturnem profilu (Preglednica 4), ki predvideva postopno nižanje temperature prileganja z vsakim naslednjim ciklom.

Preglednica 4: »Touch down« temperaturni profil verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Začetna denaturacija	94 °C	5 min	
5 ciklov	94 °C	30 s	
	55 °C	30 s	(-1 °C / cikel)
	72 °C	1 min 30 s	
30 ciklov	94 °C	30 s	
	50 °C	30 s	
	72 °C	1 min 30 s	
	72 °C	8 min	
Zaključek pomnoževanja	4 °C		

3.1.3.1 Priprava vzorcev za kapilarno elektroforezo

Sekvenator (3130 Genetic Analyser, Applied Biosystems) (Slika 4 in Slika 5) omogoča zaznavo 4 različnih fluorescentnih barvil, kar nam omogoča hkratno analizo 4 lokusov, zato smo s PCR pomnožene mikrosatelitske lokuse pred nanosom na sekvenator združili v dve skupini in sicer: VVMD 5, VVMD 7, VVMD 32 in VrZAG 79 ter VVMD 27 in Vr ZAG 62. Mikrotitersko ploščo smo za nanos na sekvenator pripravili na sledeč način: Iz vsake mešanice smo odvzeli 1 μ l in mu dodali 0,3 μ l internega standarda LIZ 500 in 10,7 μ l formamida (Applied Biosystems). Fragmentna analiza je potekala po privzetih nastavitvah. Dobljene elektroferograme smo obdelali s programom GeneMapper v4.1.



Slika 4: Naprava Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer za kapilarno elektroforezo (foto: A. Franca, 2012)



Slika 5: Naprava Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer za kapilarno elektroforezo (foto: A. Franca, 2012)

3.2 Molekulski markerji AFLP

Analizo markerjev AFLP smo izvedli po postopku, predlaganem v članku avtorjev Vos in sodelavci (1995). Metoda je sestavljena iz restrikcije DNA, ligacije adapterjev, preamplifikacije, selektivne amplifikacije in ločevanja pomnoženih fragmentov z elektroforezo.

3.2.1.1 Restrikcija

Končni volumen restrikcijske mešanice je bil 40 μ l. Za reakcijo smo potrebovali 5 μ l DNA, razredčene na 100 ng/ μ l (skupaj 500 ng DNA). Uporabili smo restrikcijski encim *Tru*II (izoshizomera restrikcijskega encima *Mse*I) in *Pst*I. Vsakega smo v reakcijo dodali po 0,3 μ l (koncentracija encimov 10 u/ μ l), 4 μ l 10X R pufra in 30,4 μ l vode. Restrikcija je potekala 120 min pri temperaturi 37 °C in nato 120 min pri 65 °C. Po končani restrikciji je sledila ligacija.

3.2.1.2 Ligacija

Za pripravo ligacijske mešanice smo uporabili 4,8 μ l vode (H₂O), 1 μ l 10X T4 pufra, 1 μ l *Pst*I adapterja (5 pmol), 1 μ l *Mse*I (50 pmol), 2 μ l 10 mM ATP in 0,2 μ l T4 DNA ligaze (5 u/ μ l). Deset mikrolitrov ligacijske mešanice smo dodali restrikcijski mešanici. To smo inkubirali v termobloku za 60 minut pri temperaturi 22 °C. Na koncu smo temperaturo dvignili na 65 °C za 10 minut in s tem denaturirali T4 ligazo ter zaustavili reakcijo.

Predhodno je bilo potrebno narediti adapterje *Pst*I in *Mse*I, ki vsebujejo komplementarna mesta za prileganje začetnih oligonukleotidov.

Za pripravo 100 μ l 50 μ M *Mse*I adapterja smo uporabili 10 μ l *Mse*I oligonukleotida1 oziroma linker1 (500 μ M), 10 μ l *Mse*I linker2 (500 μ M) in 80 μ l vode.

Za pripravo 100 μ l 5 μ M adapterja *Pst*I pa smo uporabili 1 μ l *Pst*I linker1 (500 μ M), 1 μ l *Pst*I linker2 (500 μ M) ter 98 μ l vode (H₂O). Za uspešno hibridizacijo oligonukleotidov smo mešanico izpostavili temperaturnemu profilu na cikličnem termostatu (2720, Applied Biosystems), kot je prikazano v Preglednici 5.

Preglednica 5: Temperaturni profil za pripravo adapterjev (Čerenak, 2004)

Temperatura (°C)	Čas (min)	Opombe
95 °C	5 min	
70 °C	2 min	25x po 2 min (-2 °C/ponovitev)
20 °C	60 min	
20 °C	3,5 min	(pade za 1 °C 8x do 12 °C)
12 °C		
Ohladimo na 4 °C		

Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov in linkerjev za izdelavo adapterjev so podana v Preglednici 6.

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za preamplifikacijo brez dodanih selektivnih nukleotidov in linkerji za izdelavo adapterjev

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5' – 3'
<i>MseI</i> linker1	GAC GAT GAG TCC TGA G
<i>MseI</i> linker2	TAC TCA GGA CTC AT
<i>MseI</i> adapter	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3' 3'-TA CTC AGG ACT CAT-5'
<i>PstI</i> linker1	CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA
<i>PstI</i> linker2	TGT ACG CAG TCT AC
<i>PstI</i> adapter	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA-3' 3'-CAT CTG ACG CAT GT-5'
<i>MseI</i> začetni oligonukleotid (za preamplifikacijo)	GAT GAG TCC TGA GTA A
<i>PstI</i> začetni oligonukleotid (za preamplifikacijo)	GAC TGC GTA CAT GCA G

3.2.1.3 Preamplifikacija

Volumen reakcije za preamplifikacijo je bil 50 µl. Preamplifikacijska reakcijska mešanica je vsebovala 5 µl restrikcijsko-ligacijske mešanice s 50 ng DNA, 5 µl 10X PCR pufru (z (NH₄)₂SO₄), 4 µl 25 mM MgCl₂, 1µl vsakega od preamplifikacijskih začetnih oligonukleotidov (*PstI* in *MseI*), 0,25 µl encima Taq polimeraze (5 u/µl), 4 µl 10 mM dNTP ter 29,75 µl vode (H₂O). Preamplifikacija je potekala v cikličnem termostatu (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). Preglednica 7 prikazuje PCR temperaturni profil.

Preglednica 7: PCR temperaturni profil za preamplifikacijo

Temperatura (°C)	Čas (min)	Število ciklov
72 °C	2 min	20 ciklov
94 °C	30 s	
56 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	8 min	
4 °C (ohladitev)		

3.2.1.4 Selektivna amplifikacija

Po preamplifikaciji smo PCR reakcijo 10x razredčili in jo nato uporabili za selektivno amplifikacijo. Reakcije za selektivno namnoževanje smo pripravili v končnem volumnu 10 µl. Vsebovale so 2µl 10x redčene preamplificirane DNA, 1 µl 10X PCR pufer (z (NH₄)₂SO₄), 0,05 µl encima Taq polimeraze (5 u/µl), 0,8 µl 10 mM dNTP, 0,8 µl 25 mM MgCl₂, 0,2 µl s fluorescentnimi barvili označenega *PstI* začetnega oligonukleotida s tremi dodanimi selektivnimi nukleotidi in 0,2 µl *MseI* začetnega oligonukleotida s tremi oziroma dvema selektivnima nukleotidoma. V analizi smo pri preučevanju 10 starih trsov sorte 'Refošk' uporabili dve različni kombinaciji začetnih oligonukleotidov: *PstI*-AAC (s fluorescentnim barvilom VIC)/*MseI*-CTG in *PstI*-AGA (s fluorescentnim barvilom 6-FAM)/*MseI*-AG. Selektivna amplifikacija je potekala v cikličnem termostatu (Applied Biosystems 2720

Thermal Cycler) s sledečim temperaturnim profilom: prvih 13 ciklov: 94 °C 30 s, 65 °C – 56 °C (postopno zmanjševanje temperature za 0,7 °C/cikel) 30 s in 72 °C 60 s. Naslednjih 23 ciklov: 94 °C 30 s, 56 °C 30 s in 72 °C 60 s.

Po namnoževanju smo vzorce analizirali s kapilarno elektroforezo. Vzorce smo za nanos na sekvenator (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) pripravili na enak način kot pri mikrosatelitskih lokusih.

Kombinaciji začetnih oligonukleotidov *Pst*I-AAC/*Mse*I-CTG in *Pst*I-AGA/*Mse*I-AG smo po namnoževanju v cikličnem termostatu zmešali skupaj, z mešanice vzeli 1 µl, dodali interni standard GeneScan-500 LIZ in Hi-Di formamid. Dobljene elektroferograme smo obdelali s programom GeneMapper v4.1.

3.2.2 Ponovljivost rezultatov

Analiza AFLP je bila vključno z restrikcijo ponovljena v dveh tehničnih ponovitvah, z namenom, da smo potrdili ponovljivost rezultatov.

4 REZULTATI Z DISKUSIJO

4.1 Analiza mikrosatelitov

Rezultati analize z mikrosatelitskimi markerji so prikazani v Preglednici 8.

Preglednica 8: Dobljen genotip na 6 mikrosatelitskih lokusih pri desetih vzorcih sorte 'Refošk'

Mikrosatelitski lokus	Genotip (bp)
VVMD5	223:225
VVMD7	244:246
VVMD 27	190:190
VVMD 32	248:271
Vr ZAG 62	192:194
Vr ZAG 79	238:250

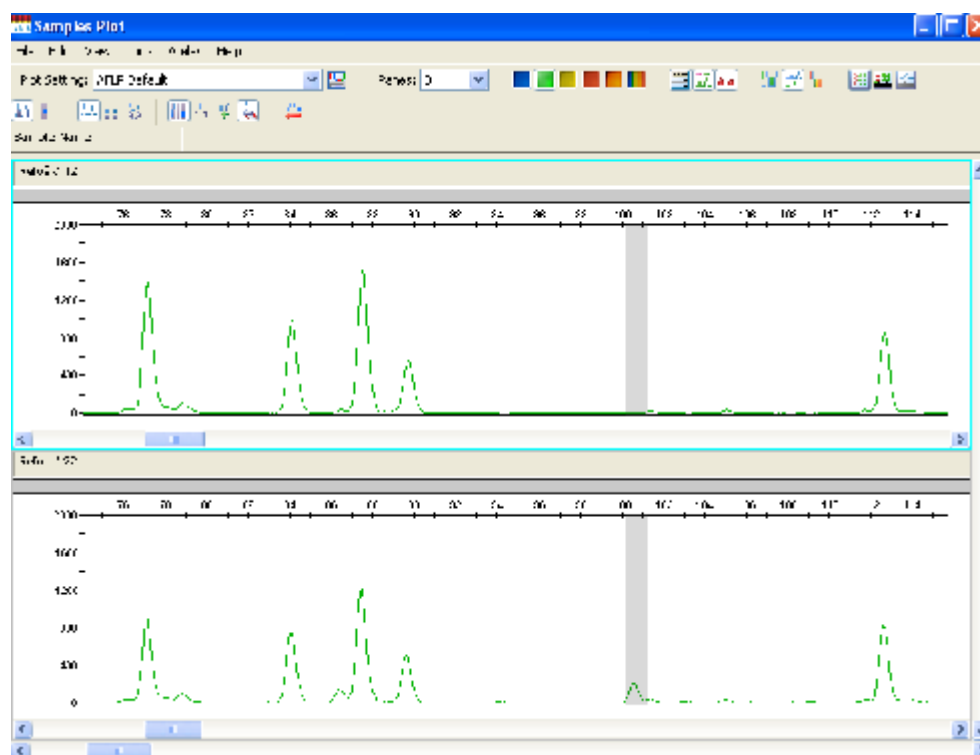
Vseh 10 vzorcev je imelo enak genotip. S tem smo potrdili identiteto vseh desetih trsov.

4.2 Analiza markerjev AFLP

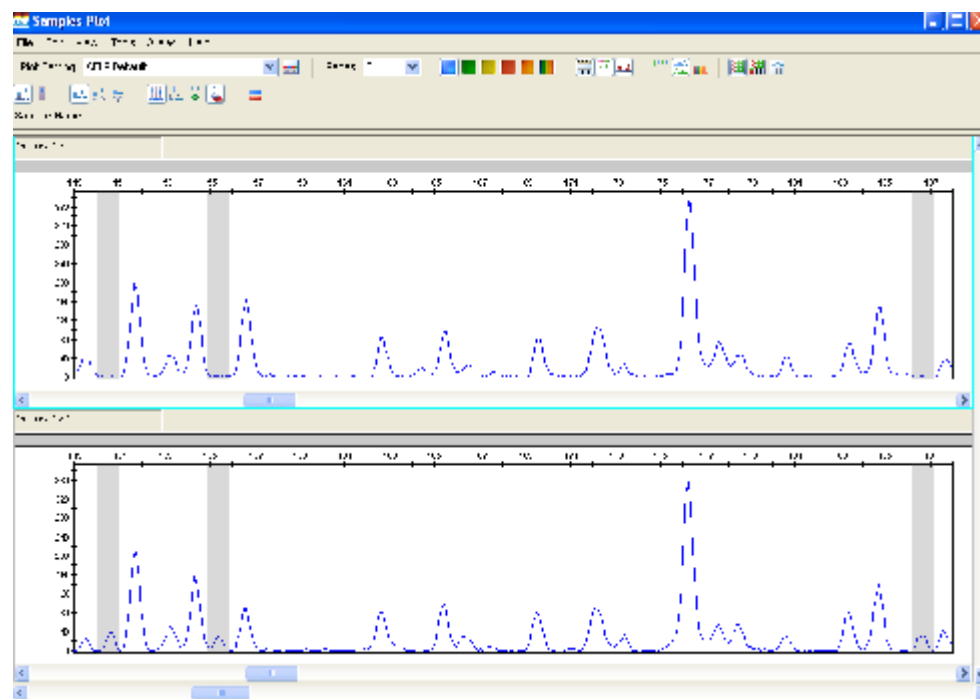
V Preglednici 9 je prikazano število namnoženih markerjev AFLP s kombinacijami začetnih oligonukleotidov *Pst*I-AAC/*Mse*I-CTG in *Pst*I-AGA/*Mse*I-AG, število in odstotek polimorfnihih fragmentov. S kombinacijo *Pst*I-AAC/*Mse*I-CTG se je namnožilo 29 fragmentov, s kombinacijo *Pst*I-AGA/*Mse*I-AG pa 80. Vsi polimorfni (v dolžini od 101 do 300 bp) fragmenti so bili odkriti pri vzorcu 'Refošk' 22 in sicer je imel pri prvi kombinaciji začetnih oligonukleotidov (*Pst*I-AAC/*Mse*I-CTG) 5 polimorfnihih fragmentov pri sledečih dolžinah: 101 bp, 154 bp, 163 bp, 173 bp in 257 bp; pri drugi kombinaciji (*Pst*I-AGA/*Mse*I-AG) pa so polimorfni fragmenti merili v dolžino 150 bp, 155 bp, 186 bp, 208 bp in 300 bp. Na sliki 6 je podan primer polimorfne fragmenta pri vzorcu 'Refošk' 22 v primerjavi z vzorcem 'Refošk' 12. Na sliki 7 pa primer polimorfne fragmenta med vzorcema 'Refošk' 7 in 'Refošk' 22 pri kombinaciji *Pst*I-AGA/*Mse*I-AG.

Preglednica 9: Kombinaciji uporabljenih začetnih oligonukleotidov za namnoževanje markerjev AFLP, število namnoženih fragmentov (markerjev AFLP) pri selektivni amplifikaciji ter število in odstotek polimorfnihih fragmentov

Kombinacija začetnih oligonukleotidov	Namnoženi fragmenti	Število polimorfnihih fragmentov	Odstotek polimorfnihih fragmentov
VIC- <i>Pst</i> I-AAC/ <i>Mse</i> I-CTG	29	5	17,24
6-FAM- <i>Pst</i> I-AGA/ <i>Mse</i> I-AG	80	5	6,25



Slika 6: Primerjava med vzorcema 'Refošk' 12 in 'Refošk' 22 pri AFLP kombinaciji VIC-*Pst*I-AAC/*Mse*I-CTG. Polimorfen AFLP marker dolžine 101 bp je označen s sivo barvo



Slika 7: Primerjava med vzorcema 'Refošk' 7 in 'Refošk' 22 pri AFLP kombinaciji 6-FAM-*Pst*I-AGA/*Mse*I-AG. Polimorfni AFLP markerji dolžin 150 bp, 155 bp in 186 bp so označeni s sivo barvo

4.3 Diskusija

Rezultati so pokazali visoko genetsko podobnost analiziranih trsov in nizko stopnjo variabilnosti znotraj sorte 'Refošk'. Z molekulskimi markerji AFLP smo uspeli ločiti le vzorec 'Refošk' 22.

Visoko genetsko podobnost in nizko stopnjo variabilnosti so dobili tudi Kozjak in sodelavci (2003), ki so pregledali 55 vzorcev sorte 'Refošk' iz selekcijskega vinograda s Komna s 6 mikrosatelitskimi lokusi. Odkrili so dva različna vzorca ('Refošk' 7 in 'Refošk' 50), medtem ko je 53 vzorcev imelo identične alelne profile. V naši analizi pri trsu označenemu s številko 7 razlik nismo odkrili, čeprav je bil proučen na istih lokusih. Razlike med analizama so verjetno posledica tega, da vzorci niso bili nabrani na identičnem trsu, saj je vsak klonski kandidat v kolekciji zastopan v 3 do 35 ponovitvah. Rezultati tako potrjujejo uporabnost mikrosatelitov za razkrivanje napačno identificiranih rastlin v kolekcijah, ki lahko izhajajo iz napak pri sajenju.

5 ZAKLJUČEK

Klon Si – 35 sorte 'Refošk' je edini uradno potrjen v Sloveniji, kar je vsekakor premalo, zato je potrebno delo nadaljevati v smeri pridobivanja novih klonov sorte 'Refošk'. V selekcijskem vinogradu v Komnu na Krasu imajo posajene klone starih trsov oz. klonske kandidate sorte 'Refošk' s Krasa, med katerimi smo desetim trsom analizirali genetsko variabilnost z mikrosatelitskimi in AFLP markerji.

Rezultati so pokazali homogenost analiziranega genetskega materiala sorte 'Refošk' z mikrosatelitskimi markerji. Ker je bilo analiziranih le 10 klonskih kandidatov na šestih lokusih, je na osnovi teh rezultatov težko sklepati, da ta homogenost velja za vse trse, ki so v pridelavi na Slovenskem, zato bi bilo potrebno raziskavo razširiti. Z markerskim sistemom AFLP pa smo odkrili razliko v profilih DNA pri klonskem kandidatu označenemu s številko 22, kar kaže, da določena raznolikost le obstaja. Če primerjamo oba markerska sistema, lahko sklepamo, da je z markerji AFLP možno odkriti večji polimorfizem pri ozko genetskem materialu kot pa z mikrosateliti. Razlika med SSR in AFLP je namreč v tem, da prvi pokrivajo le določeno regijo v genomu, medtem ko so markerji AFLP naključno razporejeni in pokrivajo večji del genoma. Slednje omogoča hitrejše odkrivanje razlik med genotipi.

Nadalje bi bilo smiselno analiziranim trsom oceniti tudi morfološke značilnosti. S fenotipsko primerjavo bi morda lahko pri vzorcu 'Refošk' 22 odkrili odstopanja v določenih lastnostih, ki bi jih morda lahko povezali s polimorfnimi markerji v primeru, če le ti izvirajo iz kodirajočih regij. V kolikor pa so polimorfni markerji iz nekodirajočih regij, se to na fenotipu ne bi odrazilo.

6 LITERATURA IN VIRI

Bandelj Mavsar D. (2005): Analiza genetske variabilnosti oljke (*Olea europaea* L.) z molekulskimi markerji. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 116 str.

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: 628-633.

Bowers J.E., Dangl G.S., Meredith C.P. (1999): Development and Characterization of Additional Microsatellite DNA Markers for Grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50(3): 243-246.

Brdnik M. (1982): Selekcija sorte refošk (*Vitis vinifera* L. cv. 'Refošk') v kraškem vinorodnem okolišu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Oddelek za agronomijo: 54 str.

Cervera M.-T., Cabezas J. A., Sancha J. C., Martinez de Toda F., Martinez-Zapater J. M. (1998): Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources, a case study with accessions from Rioja (Spain). *Theoretical and Applied Genetics* 97: 51-59.

Chambers G.K., MacAvoy E.S. (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 126, 455-576.

Čerenak A. (2004): Kartiranje genoma hmelja (*Humulus lupulus* L.) z AFLP markerji. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 206 str.

Eisen J. A. (1999): Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B., C. Schlötterer (eds.): *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, 34-48.

Fossati T., Labra M., Castiglione S., Failla O., Scienza A., Sala F. (2001): The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: The case of the varietal group known as "Schiave". *Theor. Appl. Genet.* 102, 200-205.

Hrček L., Korošec-Koruza Z. (1996): Sorte in podlage vinske trte : ilustrirani prikaz trsnega izbora za Slovenijo. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 191 str.

Kozjak P., Korošec-Koruza Z., Javornik B. (2003): Characterisation of cv. Refošk (*Vitis vinifera* L.) by SSR markers. *Vitis*, 42, 2: 83-86.

Kump B., Svetek S., Javornik B. (1992): Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete. Univerza v Ljubljani*, 59: 63-66.

Labra M., Winfield M., Ghiani A., Grassi F., Sala F., Scienza A., Failla O. (2001): Genetic studies on Trebbiano and morphologically related varieties by SSR and AFLP markers. *Vitis* 40, 187-190.

Plahuta P., Korošec-Koruza Z. (2009): 2 x sto vinskih trt na Slovenskem. Ljubljana, Prešernova družba: 367 str.

Pravilnik o seznamu geografskih označb za vina in trsnem izboru, Stran 6732. Uradni list RS, št. 49/2007 z dne 4. 6. 2007., <http://www.uradni-list.si/1/content?id=80559> (10. 7. 2012)

Schuelke M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, 18: 233-234.

Sefc K.M., Lefort F., Grando M.S., Scott K., Steinkellner H., Thomas M.R., (2001): Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*, K.A.Roubelakis-Angelakis editor, Kluwer Publishers, Amsterdam. 407-438.

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: 367-373.

Štajner N. (2010): Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo kultivarjev vinske trte (*Vitis vinifera* L.). *Acta agriculturae Slovenica*, 95: 183-192.

Vinorodna Slovenija. 2012. <http://www.slovenskifestivalvin.si/radost/vinokulinarika/vec-o-vinu/vinorodna-slovenija/> (15. jul. 2012)

Vodopivec M. (1999): Kraški teran. Ljubljana, Kmečki glas: 162 str.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Plot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.

Vršič S., Lešnik M. (2010): Vinogradništvo. 2. dopolnjena izdaja. Ljubljana, Kmečki glas. 403 str.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi zaključne naloge se iskreno zahvaljujem asistentu Matjažu Hladniku in mentorici doc. dr. Dunji Bandelj.

Posebej se želim zahvaliti staršem za podporo pri študiju ter sestri Iris za nasvete in pomoč pri pisanju zaključne naloge.