

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Matjaž HLADNIK

**PROUČEVANJE BOLEZNI RAZBRAZDANJA LESA
VINSKE TRTE (*Vitis* spp.) NA NIVOJU
TRANSKRIPTOMA IN KARAKTERIZACIJA TIPOV
SORTE ŽLAHTNE VINSKE TRTE 'REFOŠK' (*Vitis
vinifera* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Matjaž HLADNIK

**PROUČEVANJE BOLEZNI RAZBRAZDANJA LESA VINSKE TRTE
(*Vitis* spp.) NA NIVOJU TRANSKRIPTOMA IN KARAKTERIZACIJA
TIPOV SORTE ŽLAHTNE VINSKE TRTE 'REFOŠK' (*Vitis vinifera* L.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**EXAMINATION OF GRAPEVINE (*Vitis* spp.) RUGOSE WOOD
DISEASE AT THE TRANSCRIPTOME LEVEL AND TYPE
CHARACTERISATION OF THE 'REFOŠK' GRAPEVINE VARIETY
(*Vitis vinifera* L.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 27. 9. 2010 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja agronomije. Za mentorja je bila imenovana doc. dr. Irma Vuk in za somentorja izr. prof. dr. Jernej Jakše.

Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v:

- Laboratoriju za molekularno ekologijo, Znanstveno-raziskovalno središče, Univerza na Primorskem
- Seleksijsko trsničarskem središču Vrhpolje, Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Nataša ŠTAJNER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Zora KOROŠEC-KORUZA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Stanislav TRDAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 7. 7. 2014

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Matjaž Hladnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 634.8:631.524:577.2(043.3)
KG molekulski markerji/AFLP/znotraj sortna variabilnost/'Refošk'/indeksiranje/
razbrazdanja lesa/izraženost genov/ampelografija/cepljenje/vinska trta
KK AGRIS F30
AV HLADNIK, Matjaž, univ. dipl. inž. agr.
SA VUK, Irma (mentorica)/JAKŠE, Jernej (somentor)
KZ SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in
biotehniških znanosti, področje agronomija
LI 2014
IN PROUČEVANJE BOLEZNI RAZBRAZDANJA LESA VINSKE TRTE (*Vitis* spp.)
NA NIVOJU TRANSKRIPTOMA IN KARAKTERIZACIJA TIPOV SORTE
ŽLAHTNE VINSKE TRTE 'REFOŠK' (*Vitis vinifera* L.)
TD Doktorska disertacija
OP XVI, 95 str., 25 pregl., 9 sl., 139 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V doktorski disertaciji smo v prvem delu raziskovalnega dela opravili karakterizacijo
genetske variabilnosti sorte 'Refošk' z markerji AFLP. Sortno pristnost vzorcev smo
potrdili z mikrosatelitskimi markerji. Z analizo AFLP smo pri 113 vzorcih ugotovili
16 polimorfni markerjev, na podlagi katerih smo analizirane vzorce sorte 'Refošk'
razdelili v homogeno in heterogeno skupino. Pri preučevanju biotipov iz
kolekcijskega vinograda v Komnu z 22 OIV deskriptorji, smo pri večjih lastnostih
ugotovili razlike. Med agronomsko pomembne sodijo lastnosti, kot so zbitost in masa
grozdov ter velikost jagod, vendar povezave med fenotipom in markerji AFLP nismo
ugotovili. Prav tako nismo ugotovili povezave med markerji AFLP in znamenji
bolezní razbrazdanja lesa. V drugem delu raziskav, kjer smo proučevali bolezen
razbrazdanja lesa, sta bila izvedena dva poskusa z indeksiranjem in analiza
diferenčno izraženih transkriptov. Pri indeksiranju smo izvedli cepljenje zeleno na
zeleno, pri čemer smo 6 biotipov sorte 'Refošk' cepili na podlago SO4; drugi način
cepljenja je bil, da smo mladike le prerezali in ponovno spojili. S pojavom znamenj
bolezní razbrazdanja lesa pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik smo izločili
možnost inkompatibilnosti ter predpostavili, da se bolezen lahko pojavi tudi zaradi
fiziološkega odziva rastline na cepljenje. Z analizo diferenčno izraženih transkriptov
pri dveh biotipih sorte 'Refošk' pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik, smo
3, 7 in 14 dni po cepljenju ugotovili več diferenčno izraženih genov, ki sodelujejo pri
odzivu rastline na stres in bi lahko bili potencialni povzročitelji bolezní razbrazdanja
lesa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 634.8:631.524:577.2(043.3)
CX molecular markers/AFLP/intra-varietal variability/'Refošk'/indexing/rugose wood disease/gene expression/ampelography/grafting/grapevine
KK AGRIS F30
AU HLADNIK, Matjaž
AA VUK, Irma (supervisor)/JAKŠE, Jernej (co-supervisor)
PP SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Agronomy
PY 2014
TI EXAMINATION OF GRAPEVINE (*Vitis* spp.) RUGOSE WOOD DISEASE AT THE TRANSCRIPTOME LEVEL AND TYPE CHARACTERISATION OF THE 'REFOŠK' GRAPEVINE VARIETY (*Vitis vinifera* L.)
DT Doctoral Dissertation
NO XVI, 95 p., 25 tab., 9 fig., 139 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the first part of this doctoral thesis, characterization of genetic variation of grapevine variety 'Refošk' was done with AFLP markers. The samples trueness to type was confirmed by microsatellite markers. With AFLP analysis 16 polymorphic markers were produced from a total of 113 samples, which classified samples into homogeneous and heterogeneous groups. Characterization of 22 ampelographic descriptors on 12 biotypes from the collection vineyard in Komen revealed variability on several traits. Some of them, for example bunch density, weight of a single bunch and berry size are agronomically important traits. However, we were not able to associate different phenotypes with AFLP markers. AFLP markers were not associated with symptoms of rugose wood disease complex as well. In the second part of the research, which examined rugose wood disease, two biological indexing and analysis of differentially expressed genes were performed. Indexing was done with the green grafting method. Six 'Refošk' biotypes were grafted on SO4 rootstock and autografts were made as well. Appearance of rugose wood symptoms in autografts allowed us to exclude incompatibility as a possible causal agent and we hypothesised that the disease could be a consequence of physiological responses of the plant to grafting. With analysis of differentially expressed transcripts between two 'Refošk' biotypes at 3, 7 and 14 days after grafting, several differentially expressed genes involved in the response of plants to stress, which could be potential causal agents for rugose wood disease, were identified.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
SLOVARČEK	XVI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN POVOD RAZISKAVE	1
1.2 PRIČAKOVANI REZULTATI IN PRISPEVEK K RAZVOJU ZNANOSTI	2
1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 UMESTITEV SORTE <i>Vitis vinifera</i> 'REFOŠK'	4
2.2 MOLEKULSKA KARAKTERIZACIJA VINSKE TRTE	4
2.2.1 Molekulska karakterizacija sorte 'Refošk'	5
2.3 KOMPLEKS BOLEZNI RAZBRAZDANJA LESA	6
2.3.1 Povezovanje bolezní z virusi	7
2.3.2 Bolezen razbrazdanja lesa na sorti 'Refošk'	7
2.3.2.1 Vpliv bolezní razbrazdanja lesa na agronomske lastnosti sorte 'Refošk'	8
2.4 CEPLJENJE IN VZPOSTAVITEV CEPILNE ZVEZE	9
2.4.1 Procesi pri vzpostavljanju cepilne zveze na molekulskem nivoju	10
2.4.2 Bolezen razbrazdanja lesa vinske trte – posledica odziva rastline na stres ob cepljenju, genetske inkompatibilnosti, okužbe s patogeni ali genetsko pogojene občutljivosti na bolezen	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MOLEKULSKA KARAKTERIZACIJA SORTE 'REFOŠK'	13
3.1.1 Rastlinski material za analizo mikrosatelitskih lokusov in markerjev AFLP	13
3.1.2 Izolacija DNA	13
3.1.3 Določanje koncentracije DNA	14
3.1.4 Namnoževanje in detekcija mikrosatelitskih markerjev	15
3.1.5 Mikrosatelitski profili številnih sort z imenom 'Refošk' iz podatkovnih zbirk	18
3.1.6 Molekulski markerji AFLP	18
3.1.6.1 Restrikcija	18

3.1.6.2	Ligacija	19
3.1.6.3	Namnoževanje z neselektivnimi začetnimi oligonukleotidi ali predamplifikacija	20
3.1.6.4	Namnoževanje s selektivnimi začetnimi oligonukleotidi in detekcija namnoženih fragmentov	20
3.1.6.5	Statistična obdelava podatkov	22
3.1.6.5.1	Povprečna genska raznolikost vseh lokusov	23
3.2	AMPELOGRAFSKO PROUČEVANJE BIOTIPOV PO OIV DESKRIPTORJIH	23
3.2.1	Proučevanje lastnosti grozdov in jagod ter izplena mošta	24
3.2.2	Določevanje vsebnosti sladkorjev, titrabilnih kislin in pH vrednosti	24
3.2.3	Statistična obdelava podatkov	24
3.3	INDEKSIRANJE	25
3.3.1	Rastlinski material za indeksiranje	25
3.3.2	Izvedba indeksiranja	26
3.4	ANALIZA IZRAŽENOSTI GENOV	28
3.4.1	Cepljenje zeleno na zeleno	28
3.4.2	Izolacija RNA	29
3.4.3	Kontrola integritete RNA ter določevanje RNA koncentracije	30
3.4.4	Identifikacija diferenčno izraženih transkriptov	30
3.4.5	Detekcija namnožene DNA ter izolacija diferenčno izraženih transkriptov iz agaroznega gela	31
3.4.6	Kloniranje izoliranih diferenčno prikazanih transkriptov	32
3.4.7	PCR na osnovi bakterijske kolonije (ang. colony PCR)	33
3.4.8	Čiščenje reakcije PCR	34
3.4.9	Sekvenčna reakcija	35
3.4.10	Čiščenje sekvenčne reakcije s precipitacijo z etanolom in EDTA	35
3.4.11	Računalniška obdelava sekvenc	36
3.4.12	Določanje funkcije ugotovljenih zaporedij	36
4	REZULTATI	38
4.1	MOLEKULSKA KARAKTERIZACIJA SORTE 'REFOŠK'	38
4.1.1	Mikrosatelitski markerji	38
4.1.2	Podatki o mikrosatelitskih profilih, pridobljenih iz podatkovnih zbirk	38
4.1.3	Molekulski markerji AFLP	40
4.2	AMPELOGRAFSKO PROUČEVANJE	44
4.3	INDEKSIRANJE	46
4.3.1	Uspešnost cepljenja	46
4.3.2	Pojav znamenj bolezni razbrazdanja lesa na cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 48 in pri cepljenkah na podlago SO4	46
4.3.3	Rezultati cepljenja pri biotipih 'Refošk' 20 in 'Refošk' 51	46

4.4	ANALIZA IZRAŽENOSTI GENOV	49
4.4.1	Integriteta izolirane RNA	49
4.4.2	Identifikacija diferenčno izraženih transkriptov	50
4.4.3	Funkcije diferenčno izraženih zaporedij	53
4.4.3.1	GO kategorija - oksidacijsko redukcijski procesi	53
4.4.3.2	Ostali edinstveno izraženi geni, ki sodelujejo pri odzivu rastline na stres	54
4.4.3.3	Geni, ki so bili izraženi pri obeh biotipih	55
5	RAZPRAVA	67
5.1	GENETSKA RAZNOLIKOST SORTE 'REFOŠK'	67
5.1.1	Analiza mikrosatelitskih lokusov	67
5.1.1.1	Sorta 'Refošk' v primerjavi s sorto 'Refosco peduncolo rosso' ter z nekaterimi lokalnimi evropskimi sortami	68
5.1.2	Analiza markerjev AFLP	69
5.1.3	Analiza ampelografskega preučevanja biotipov in ugotavljanje povezave med ampelografskimi lastnostmi ter znamenji bolezní razbrazdanja z markerji AFLP	70
5.2	KOMPLEKS BOLEZNI RAZBRAZDANJA PRI SORTI 'REFOŠK'	72
5.2.1	Indeksiranje	72
5.2.1.1	Pojav znamenj bolezní razbrazdanja lesa na sorti 'Refošk'	73
5.2.1.2	Odsotnost znamenj bolezní razbrazdanja lesa na podlagi SO4	74
5.2.2	Analiza izraženosti genov	74
5.2.2.1	Ugotovljeni geni pri biotipu 'Refošk' 43	75
5.2.2.2	Ugotovljeni geni pri biotipu 'Refošk' 38	76
6	SKLEPI	79
7	POVZETEK (SUMMARY)	80
7.1	POVZETEK	80
7.2	SUMMARY	83
8	VIRI	86
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Predhodno ugotovljene okužbe z virusi na šestih trtah sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu.	8
Preglednica 2: Seznam vinogradov iz vinorodnih okolišev Kras in Slovenska Istra ter lokacije treh starih trt v Šepuljah, Merčah in Marezigah.	14
Preglednica 3: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za namnoževanje mikrosatelitskih lokusov.	17
Preglednica 4: Mikrosatelitski lokusi s pripadajočimi barvili in kombinacijo, ki je bila uporabljena pri kapilarni elektroforezi.	17
Preglednica 5: Seznam oligonukleotidov za izdelavo adapterjev.	19
Preglednica 6: Seznam kombinacij začetnih oligonukleotidov za selektivno namnoževanje in kombinacije združevanja pred kapilarno elektroforezo.	21
Preglednica 7: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za predamplifikacijo in selektivno amplifikacijo.	21
Preglednica 8: Seznam trt sorte 'Refošk', ki so bili uporabljene za indeksiranje ter ugotovljena prisotnost ali odstotnost znamenj bolezní razbrazdanja lesa v kolekcijskem vinogradu v Komnu.	26
Preglednica 9: Seznam cepilnih kombinacij in število cepljenk po cepljenju.	27
Preglednica 10: Predstavitev identificiranih genotipov, dobljenih z analizo mikrosatelitskih lokusov sorte 'Refošk'.	38
Preglednica 11: Mikrosatelitski profili iz podatkovnih zbirk in iz raziskovalnih člankov prikazani kot razlika med daljšim in krajšim alelom. Več podaktov o omenjenih vzrocih je v prilogi A.	39
Preglednica 12: Število vseh markerjev AFLP, število polimorfni markerjev ter odstotek polimorfizma.	42
Preglednica 13: Seznam in dolžina polimorfni markerjev AFLP.	42

Preglednica 14:	Rezultati karakterizacije 22 OIV deskriptorjev pri 12 biotipih sorte 'Refošk'. Meritve so bile izvedene na 10 mladikah na 3 do 5 trsih na posamezen biotip. Povprečne vrednosti so pretvorjene v kategorije, kot so določene v OIV deskriptorjih.	45
Preglednica 15:	Število vseh cepljenk s spojenimi lastnimi deli mladike, število rastočih cepljenk ob presajanju, ob dveh vmesnih pregledih in ob končnem pregledu.	47
Preglednica 16:	Število vseh cepljenk refoška na podlago SO4, število rastočih cepljenk ob presajanju, ob dveh vmesnih pregledih in ob končnem pregledu.	47
Preglednica 17:	Pojav znamenj razbrazdanja lesa pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik in pri cepljenkah na podlagi SO4.	48
Preglednica 18:	Koncentracija in 260/280 razmerje izolirane RNA. Vzorci, uporabljeni za analizo izraženosti genov so označeni kot prva biološka ponovitev.	50
Preglednica 19:	Rezultati analize diferenčnega prikaza, kloniranja in sekvenciranja. V analizo je bilo vključenih 6 cepljenk s spojenimi lastnimi deli mladik iz trt 'Refošk' 38 VIII/44 in 'Refošk' VIII/113. Od vsakega biotipa smo uporabili 3 cepljenke vzorčene 3, 7 in 14 dni po cepljenju.	52
Preglednica 20:	Število ugotovljenih transkriptov pri posameznem biotipu in pri obeh skupaj ter število zaporedij z določeno funkcijo s pomočjo podatkovnih zbirk 12xV1 (CRIBI) in RefSeq RNA (NCBI).	53
Preglednica 21:	Seznam GO kategorij bioloških procesov, v katere so bili uvrščeni edinstveno izraženi geni pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 43 in GO kategorij bioloških procesov, v katere so uvrščeni geni, izraženi pri obeh biotipih.	56
Preglednica 22:	Diferenčno izraženi geni pri biotipu 'Refošk' 38. Pripadajoče E vrednosti in ostale informacije v zvezi s poravnavo so podane v prilogi C.	58

Preglednica 23:	Diferenčno izraženi geni pri biotipu 'Refošk' 43. Pripadajoče E vrednosti in ostale informacije v zvezi s poravnavo so v prilogi D.	61
Preglednica 24:	Rezultati analize sekvenc z BLAST orodjem po neredundantni nukleotidni podatkovni zbirki (NR/NT) NCBI. Uporabljene so bile samo sekvence, ki jim nismo uspeli določiti funkcije v podatkovni zbirki genov vinske trte 12xV1 (CRIBI) in referenčni RNA podatkovni zbirki (NCBI).	64
Preglednica 25:	Seznam genov, ki so bili ugotovljeni pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik pri obeh biotipih sorte 'Refošk'. Pripadajoče E-vrednosti in ostale informacije v zvezi s poravnavo so podane v prilogi E.	65

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Znamenja razbrazdanja na trtah bitipa 'Refošk' 38.	26
Slika 2: Cepljenke potaknjene v vermikulit (A); cepljenke v kalilniku (B); cepljenke z razvitim koreninskim sistemom 34 dni po cepljenju (C); ter cepljenke na namakalni mizi (D).	28
Slika 3: Dendrogram, izrisan na osnovi Jaccardovega koeficienta podobnosti in metode UPGMA z uporabo podatkov mikrosatelitske analize. Koda države za imenom sorte označuje državo vzorčenja sort.	41
Slika 4: Dendrogram na osnovi analize AFLP. Genetsko podobnost med vzorci sorte 'Refošk' iz heterogene skupine, je bila določena s SM koeficientom in metodo UPGMA (vzorci označeni z Refosk_ in številom so iz kolekcijskega vinograda v Komnu, ostali vzorci so iz vinogradov).	43
Slika 5: Dendrogram na osnovi ampelografskih lastnosti, določenih pri 12 biotipih sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda iz Komna, izrisan s koeficientom povprečne taksonomske razdalje in metodo UPGMA.	44
Slika 6: Znamenja bolezní razbrazdanja lesa na cepiču in podlagi pri cepljenki s spojenimi lastnimi deli mladike pri biotipu 'Refošk' 48 (A); znamenja bolezní razbrazdanja lesa na cepiču pri cepljenki 'Refošk' 38 na podlagi SO4 (B).	48
Slika 7: Kontrola integritete RNA. Vzorci so označeni s številom, ki je navedeno v preglednici 18 v koloni »zaporedno število«. Vrstni red vzorcev je: 10, 2, 3, 4, 5, 15, 7, 8, 9, 1, 11, 12, 13, 14, 6, 16, 17 in 18.	49
Slika 8: Primer diferenčnega prikaza produktov PCR med biotipoma 'Refošk' 38 in 'Refošk' 43 pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli. Profile izraženih transkriptov smo primerjali glede na časovno obdobje po cepljenju (3, 7 in 14 dni). Prikazani produkti PCR so nastali z ACP8 in dt-ACP2 začetnima oligonukleotidoma.	51
Slika 9: Grafični prikaz GO kategorij bioloških procesov, v katerih so bili ugotovljeni diferenčno izraženi geni pri biotipu 'Refošk' 38 (zgoraj) in pri biotipu 'Refošk' 43 (spodaj).	57

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Podatki o številnih sortah z imenom 'Refošk' iz mikrosatelitskih podatkovnih zbirk.
- Priloga B: Rezultati ampelografskega preučevanja.
- Priloga C: Rezultati analize sekvence biotipa 'Refošk' 38 z BLAST orodjem (CRIBI 12xV1 in NCBI RefSeq RNA).
- Priloga D: Rezultati analize sekvenc biotipa 'Refošk' 43 z BLAST orodjem (CRIBI 12xV1 in NCBI RefSeq RNA).
- Priloga E: Rezultati analize sekvenc z BLAST orodjem (CRIBI 12xV1 in NCBI RefSeq RNA), ki so bile ugotovljene pri obeh biotipih; pri biotipu 'Refošk' 38 in 'Refošk' 43.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACP	tehnika z nadzarovanim prileganjem začetnih oligonukleotidov (ang. Annealing Control Primer)
ang.	angleško
AFLP	dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)
ArMV	virus repnjakovega mozaika (ang. <i>Arabid mosaic virus</i>)
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BLAST	lokalni algoritem poravnave BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
CRIBI	Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotechnologie Innovative (ang. CRIBI Biotechnology Center)
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
DIST	koeficient povprečne taksonomske razdalje (ang. average taxonomic distance)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina- dinatrijeva sol
ELISA	encimsko-imunosorpcijski test (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EPPO	Evropska organizacija za varstvo rastlin (ang. European Plant Protection Organization)
F	vodilni začetni oligonukleotid (ang. forward primer)
GfKV	virus marmoriranosti vinske trte (ang. <i>Grapevine fleck virus</i>)
GFLV	virus listne pahljačavosti (ang. <i>Grapevine fanleaf virus</i>)
GLRaV	virusno zvijanje listov vinske trte (ang. Grapevine leafroll-associated viruses)
GO	Genska ontologija (ang. Gene Ontology)
GRSPaV	virus povezan z razbrazdanjem lesa trte iz vrste <i>Vitis rupestris</i> (ang. <i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i>)

GVA	virus A vinske trte (ang. <i>Grapevine virus A</i>)
GVB	virus B vinske trte (ang. <i>Grapevine virus B</i>)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HCl	klorovodikova kislina
IEM	imunska elektronska mikroskopija (ang. immuno-electron microscopy)
IPTG	izopropil tiogalaktozid
ISSR	med-mikrosatelitski PCR (ang. Inter-Simple Sequence Repeat)
LB	Luria-Bertanijev medij
MgCl ₂	magnezijev klorid
M-AFLP	dolžinski polimorfizem namnoženih mikrosatelitskih fragmentov (ang. Microsatellites Amplified Fragment Length Polymorphism)
M-MLV	reverzna transkriptaza M-MLV v Moloneyevem virusu mišje levkemije (ang. Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)
NaAc	natrijev acetat
NaCl	natrijev klorid
NaOH	natrijev hidroksid
(NH ₄) ₂ SO ₄	amonijev sulfat
OIV	Office International de la Vigne et du Vin (Mednarodni urad za vinsko trto in vino)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
R	povratni začetni oligonukleotid (ang. reverse primer)
ROS	reaktivne kisikove spojine (ang. reactive oxygen species)
RSPaV-1	sinonim za GRSPaV virus (ang. <i>Rupestris stem pitting associated virus-1</i>)
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (ang. reverse transcriptaion-polymerase chain reaction)

SAMPL	selektivno pomnoževanje mikrosatelitskih ponovitev (ang. Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Loci)
SM	koeficient enotstavnega ujemanja (ang. Simple Matching coefficient)
S-SAP	polimorfizem lokusno specifičnih namnoženih fragmentov (ang. Specific Sequence Amplified Polymorphism)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-boratni-EDTA elektroforetski pufer
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan
UPGMA	netehtana aritmetična sredina parnih skupin (ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
X-GAL	5-bromo-4-kloro-3-indolil galaktozid

SLOVARČEK

biotip	Vegetativno (nespolno) razmnoženo potomstvo, ki se od drugaga biotipa loči po fenotipu.
cepljenje	Tehnika spajanja rastlinskih delov, ki se jo uporablja za razmnoževanje rastlin, za prilagajanje rastlin različnim biotskim in abiotskim dejavnikom ter načinu oskrbe (spojitev žlahtnega dela ali cepiča s koreninskim sistemom ali podlago). V zdravstveni selekciji rastlinskega materiala se cepljenje uporablja za testiranje na viruse in fitoplazme (glej indeksiranje).
diferenčni prikaz	Tehnika, namenjena ugotavljanju edinstveno izraženih genov s primerjanjem genetskih profilov dveh ali več vzorcev (ang. differential display). Tehnika vključuje dva glavna koraka in sicer prepis informacijske RNA (ang. messenger RNA ali mRNA) v komplementarno DNA in namnoževanje DNA v reakciji PCR. Produkti PCR so z gelsko elektoroforezo ločeni po dolžini, nakar sledi primerjava DNA profilov.
indeksiranje	Uporaba cepljenja za namen ugotavljanja okužb z virusi, pri čemer se spoji rastlinski material, ki ga testiramo, z indikatorsko rastlino. Indikatorska rastlina na okužbo značilno in stalno reagira.
izraženost genov	Izražanje ali ekspresija genov je proces, pri katerem se na podlagi genskega zapisa oz. nukleotidnega zaporedja tvori funkcionalen genski produkt – beljakovina ali RNA molekula (npr. ribosomska RNA (rRNA) ali prenašalna RNA (tRNA)).
molekulski marker	Molekulski marker je lahko katerokoli zaporedje DNA, ki ga lahko brez večjih težav odkrijemo in spremljamo njegovo dedovanje.
transkriptom	Skupek vseh RNA molekul, ki so v danih razmerah proizvedene v celici, populaciji celic ali v celotnem organizmu.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN POVOD RAZISKAVE

Zaradi pojava trtne uši (*Dactulosphaira vitifoliae* Fitch) v Evropi v drugi polovici 19. stoletja je cepljenje evropske žlahtne trte na ameriške podlage postalo edini način gojenja evropskih sort vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Uspeh cepljenja je poleg zdravstvenega stanja cepilnega materiala in tehnologije pridelave trsnih cepljenk odvisen tudi od stopnje kompatibilnosti med podlago in cepičem. Popolna inkompatibilnost, pri kateri ne pride niti do združitve cepljenega dela, se pri vrstah iz rodu *Vitis* pojavlja redkeje kot pri sadnih drevesnih vrstah (Sarooshi in sod., 1982). Bolj problematična je pozna inkompatibilnost, pri kateri se znamenja inkompatibilnosti, kot so jamice, brazde ali druge nepravilnosti na lesu podlage, cepiča ali obojega, pojavijo šele po nekaj letih, pred tem pa trta raste normalno. To pa lahko navsezadnje privede tudi do propada cepljenih rastlin (Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Splošen izraz za nepravilnosti, ki se na trti v bližini cepljenega mesta razvijejo po cepljenju, je kompleks bolezní razbrazdanja lesa. Omenjena bolezen povzroča velike odklone od normalne rasti in zmanjšane pridelke.

Med občutljive sorte na bolezen razbrazdanja lesa pri nas uvrščamo sorto 'Refošk', ki je v Sloveniji najbolj zastopana med rdečimi sortami; v vinorodnih okoliših Slovenska Istra in Kras je vodilna sorta in predstavlja kar 47,3 oziroma 76,3 odstotni delež (Štrukelj in sod., 2012). V osemdesetih letih 20. stoletja je bilo na Krasu ugotovljeno obsežno propadanje trsov, ki so ga povezovali tudi z razbrazdanjem lesa. Znamenja bolezní razbrazdanja lesa so bila ugotovljena tudi v selekcijskih in matičnih vinogradih, zaradi česar se je v letih 1979 in 1980, z namenom, da bi pridobili dovolj zdravega materiala za obsežno obnovo, pričela selekcija tudi pri kooperantih (Korošec-Koruza, 1982). Pri pregledu 134 trsov sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda sorte 'Refošk' v Komnu na Krasu je bil ugotovljen 28 odstotni delež trsov z znamenji razbrazdanja (Tomažič, 1999).

Ker se znamenja bolezní pojavljajo pri trsih, katerih cepilni material je bil odvzet s prizadetih trsov, domnevajo, da bolezen povzroča virus oziroma kombinacija različnih virusnih okužb, vendar resnična povezava bolezní z virusno okužbo še ni bila dokazana. Ker pravi povzročitelj bolezní še ni znan, lahko bolezen določamo le z indeksiranjem. Indeksiranje traja 2 do 3 leta, kar zelo podaljša čas selekcije vinske trte. Poleg tega znamenja razbrazdanja niso zmeraj dobro vidna in je njihov pojav odvisen od vplivov okolja, zato so interpretacije rezultatov včasih subjektivne.

Največ raziskav v povezavi z boleznijo razbrazdanja lesa je opravljenih na virusih. Ker menimo, da je razlog za pojav inkompatibilnosti tudi v odzivnih mehanizmih trte na stres, izzvanega s cepljenjem ali kombinacija stresa in okužbe s patogeni, smo v okviru raziskave bolezen razbrazdanja lesa proučevali na nivoju genoma in transkriptoma.

Za sorto 'Refošk' lahko rečemo, da je lokalno razširjena. Gojijo jo predvsem v Istri na Hrvaškem in v Sloveniji v vinorodnih okoliših Kras in Slovenska Istra (Hrček in Korošec-Koruza, 1996), sicer tudi širše: v Furlaniji in tržaškem Krasu. Lokalne sorte dajejo prepoznavnost regijam in lahko predstavljajo vir dohodka pridelovalcem grozdja in vina. V dolgem času gojenja so se razvili različni biotipi sorte, ki pa se zaradi selekcije iz pridelave izgubljajo, s tem pa prihaja do erozije genskih virov in do izgube genetskega materiala, potencialno zanimivega za pridelavo v različnih mikroklimatskih razmerah. Trenutno je v Sloveniji uradno potrjen samo en klon sorte 'Refošk', zaradi česar menimo, da je potreba po proučevanju genetskega materiala še toliko večja. Za primer navajamo sorto 'Rebula', pri kateri je uradno potrjenih 5 klonov in je bila po podatkih za leto 2010 v Sloveniji zastopana z 2.166.543 trsi, medtem ko je bilo vseh trt sorte 'Refošk' 6.226.886 (Štrukelj in sod., 2012).

V okviru raziskave smo opravili karakterizacijo genetske variabilnosti sorte 'Refošk' markerji AFLP, pri čemer so bili mikrosatelitskimi markerji uporabljeni za potrditev sortne pristnosti vzorcev. S preučevanjem biotipov sorte 'Refošk' z OIV ampelografskimi deskriptorji smo poskusili ugotoviti povezavo med ugotovljenimi lastnostmi in markerji AFLP. Pri identificiranih molekularskih markerjih smo preverili tudi morebitne povezave med variabilnostjo markerjev in trtami z znamenji bolezní razbrazdanja lesa. V sklopu drugega dela naloge, vezanega na proučevanje bolezní razbrazdanja lesa vinske trte na sorti 'Refošk', sta bila izvedena dva poskusa z indeksiranjem in analiza edinstveno izraženih genov. Prvo indeksiranje je bilo izvedeno z namenom potrditve prenosa povzročitelja bolezní razbrazdanja lesa s cepljenjem, medtem ko je drugi poskus z indeksiranjem služil za pridobivanje rastlinskega materiala za analizo izraženosti genov. Z analizo izraženosti genov smo identificirali transkripte oz. genska zaporedja, ki so se specifično izrazili pri biotipu sorte 'Refošk', pri katerem se pojavijo znamenja bolezní in pri biotipu sorte 'Refošk', ki po cepljenju ohrani zdrav videz. Analiza je potekala tako, da smo iz cepljenega mesta izolirali RNA ter nato s tehnikami diferenčnega prikaza, kloniranja diferenčno izraženih transkriptov in sekvenciranja ter z bioinformacijskimi analizami identificirali edinstveno izražene gene.

1.2 PRIČAKOVANI REZULTATI IN PRISPEVEK K RAZVOJU ZNANOSTI

Z raziskovalnim delom v okviru doktorske naloge smo ocenili raznolikost dednine sorte 'Refošk'. Rezultate bodo lahko uporabili selekcionisti in kuratorji genskih bank in tako pripomogli k ohranitvi različnih genotipov sorte 'Refošk'.

Z analizo izraženosti genov smo dobili vpogled v manjši del molekularskih procesov, ki sodelujejo pri odzivu rastline na stres, povzročen s cepljenjem, in pri oblikovanju cepilne zveze. Za analizo smo uporabili rastlinski material dveh trsov, pri čemer smo mladike prerezali in ponovno spojili s tehniko cepljenja zeleno na zeleno. Omenjena trsa sta

pripadala dvema biotipoma sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu: 'Refošk' 38 VII/44, ki je kazal znamenja bolezní razbrazdanja lesa in 'Refošk' 43 VIII/43, ki v vinogradu ni kazal znamenj te bolezní. Z nadaljno analizo edinstveno izraženih genov bomo poizkusili ugotoviti, kateri gen oz. skupina genov, pripomore k razvoju znamenj bolezní razbrazdanja lesa. Rezultate bomo uporabili za razvoj diagnostičnih metod, s katerimi bomo poizkusili identificirati neobčutljive ali manj občutljive biotipe, kar bo pripomoglo k zmanjšanju stroškov, ki jih v največji meri občutijo pridelovalci grozdja in vina nekaj let po sajenju, ko se pokažejo znamenja bolezní in začnejo prizadeti trsi propadati. Pridobljene podatke bodo lahko uporabili tudi raziskovalci, ki se ukvarjajo s cepilno inkompatibilnostjo pri drugih vrstah gojenih ali samoniklih rastlin.

1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Predvidevali smo da:

- bomo z mikrosatelitskimi markerji potrdili sortno pristnost vzorcev,
- bomo z markerji AFLP ocenili genetsko variabilnost biotipov sorte 'Refošk',
- bomo pridobili markerje AFLP, vezane na fenotipske lastnosti biotipov sorte 'Refošk',
- bomo markerje AFLP povezali z boleznijo razbrazdanja lesa,
- bomo ugotovili ali se po cepljenju znamenja bolezní razbrazdanja lesa pojavijo pri istih biotipih sorte 'Refošk' kot v kolekcijskem vinogradu v Komnu in s tem potrdili, da se povzročitelj bolezní razbrazdanja lesa prenaša s cepljenjem,
- bomo pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik občutljivega biotipa sorte 'Refošk' ugotovili znamenja razbrazdanja in s tem predpostavili, da se bolezen razbrazdanja lesa lahko pojavi tudi zaradi odziva cepljenke na stres ali zaradi sinergističnega učinka stresa in okužbe s patogeni,
- bomo po cepljenju dveh biotipov sorte 'Refošk', različno občutljivih na bolezen razbrazdanja lesa, z analizo izraženih genov uspeli identificirati diferenčno izražene gene,
- bomo z molekulskimi markerji in z analizo izraženih genov ugotovili, ali je bolezen razbrazdanja lesa genetsko pogojena ali jo domnevno povzroča patogen.

2 PREGLED OBJAV

2.1 UMESTITEV SORTE *Vitis vinifera* 'REFOŠK'

Sorta 'Refošk' je ena najstarejših lokalnih sort v Sloveniji. Že rimski zgodovinar Plinij je zapisal, da je cesarica Julija, žena cesarja Avgusta, pripisovala svojo visoko starost, dvainosemdeset let, uživanju vina pucino, ki so ga pridelovali na kamnitih gričih nedaleč od izvira reke Timav, to je na kraški planoti (Ripper, 1910). V literaturi za sorto 'Refošk' zasledimo naslednje sinonime: Refosco del Carso, Refosco d'Istria, Terrano d'Istria, refošk istarski in teran. Zaradi svojih številnih različkov ampelografom povzroča precej težav. Najpogosteje se omenjata dva različka, in sicer sorta 'Refošk' s pecljevino zelene barve in rdeče barve. Omenjena lastnost se izraziteje pojavi v lepih in sončnih jesenih. Kakorkoli, stabilnost osnovnih elementov še vedno ni dokončno pojasnjena (Hrček in Korošec-Koruza, 1996). Po navajanju Brdnik (1982) je bilo v zasebnih vinogradih v vinorodnem okolišu Kras precej sorte 'Refošk' z rdečo pecljevino, imenovanega tudi »teranovka«. Le tega naj bi razmnoževali zaradi višje kakovosti in zgodnejšega zorenja, napram zelenopecljatemu tipu. Zeleno pecljati tip in številne sorte z imenom Refošk, ki rastejo na območju Italije, so bili iz selekcije, ki so jo začeli leta 1981 v Križu in Tomaju, izločeni.

2.2 MOLEKULSKA KARAKTERIZACIJA VINSKE TRTE

Markerji AFLP so zagotovo eden od markerskih sistemov, ki so bili uspešno uporabljeni pri določevanju znotraj-sortne in klonske variabilnosti (Cervera in sod., 1998; Fanizza in sod., 2003; Imazio in sod., 2002; Konradi in sod., 2007; Meneghetti in sod., 2012a). Poleg markerjev AFLP so se za dobro ponovljive in informativne pri določanju znotraj sortne variabilnosti izkazali še markerji znotraj-mikrosatelitskih regij (ang. inter simple sequence repeats, ISSR) (Regner in sod., 2000) ter tehnike, ki v osnovi temeljijo na markerjih AFLP, med katere uvrščamo selektivno namnožene polimorfne mikrosatelitske lokuse (ang. selective amplification of microsatellite polymorphic loci) oz. SAMPL (Cretazzo in sod., 2010; Meneghetti in sod., 2012a). Ta tehnika se od AFLP razlikuje v tem, da se selektivno namnoževanje izvede z enim standardnim selektivnim začetnim oligonukleotidom AFLP in z začetnim oligonukleotidom SAMPL, ki je sestavljen iz dveh različnih tandemskih ponovitev (Rakoczy-Trojanowska in Bolibok, 2004). Naslednja tehnika, ki prav tako temelji na AFLP je mikrosatelitski dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov (ang. microsatellite amplified fragment length polymorphism) oz. M-AFLP (Cretazzo in sod., 2010; Meneghetti in sod., 2012a). Omenjena tehnika se od markerjev SAMPL razlikuje v tem, da se namesto začetnega oligonukleotida, ki je sestavljen iz dveh tandemsko ponavljajočih motivov, uporabi tako imenovan »na 5' koncu sidrani začetni oligonukleotid« pri čemer je na 5' koncu začetnega oligonukleotida dodano neponavljajoče zaporedje, zaradi česar je vezava začetnega oligonukleotida bolj specifična (Yang in sod., 2001). Na 5' ali na 3' mestu sidrane začetne oligonukleotide se uporablja tudi pri tehniki

ISSR, s tem da gre tu za pomnoževanje s samo enim začetnim oligonukleotidom (Zietkiewicz in sod., 1994). S-SAP oziroma polimorfizem lokusno specifičnih namnoženih fragmentov (ang. specific sequence amplified polymorphism, S-SAP) se je prav tako pokazala kot tehnika primerna za ločevanje ožje sorodnega genetskega materiala vinske trte (Carrier in sod., 2012; Štajner in sod., 2009). Slednja tehnika se od AFLP razlikuje v tem, da se enega od standardnih AFLP selektivnih začetnih oligonukleotidov, zamenja z začetnim nukleotidom, komplementarnim s transpozonskim zaporedjem (Waugh in sod., 1997).

Vsi omenjeni molekularski markerji omogočajo simultano analizo večjega števila lokusov v eni reakciji in imajo zato večjo moč razločevanja, v primerjavi z mikrosatelitskimi markerji. Mikrosatelitski markerji so pogosto uporabljeni za identifikacijo sort (Cipriani in sod., 2010b; Laucou in sod., 2011; Rusjan in sod., 2012; Sefc in sod., 2000), medtem ko se za določanje znotraj-sortne in klonske variabilnosti niso izkazali za najbolj primerne (Cipriani in sod., 2010b; Imazio in sod., 2002; Laucou in sod., 2011; Sefc in sod., 2000).

2.2.1 Molekularska karakterizacija sorte 'Refošk'

Na območju Italije rastejo številne sorte z imenom 'Refošk', npr. 'Refosco dal peduncolo rosso', 'Refoscone', 'Refosco nostrano', 'Refosco di Rauscedo', 'Refosco di Faedis', vendar naj bi po navajanju Hrčka in Korošec-Koruze (1996) le te ne imele nič skupnega s sorto 'Refošk', ki raste v Sloveniji. Cipriani in sod. (1994) so v analizo z mikrosateliti poleg sort z imenom 'Refošk' iz območja Italije, vključili tudi vzorec sorte 'Refošk', ki raste v Istri (Terrano, Refosco d'Istria) ter ugotovili, da se slednji od sort iz Italije razlikuje tudi na nivoju DNA.

Kozjak in sod. (2003) so s 6 mikrosatelitskimi lokusi analizirali 55 biotipov sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu na Krasu vendar variabilnosti med njimi niso odkrili, razen pri vzorcih 7 in 50, ki pa naj bi bili po mnenju avtorjev posledica napake pri sajenju ali vzorčenju. V drugi del raziskave so vključili 4 vzorce s kolekcijskega vinograda v Komnu, 4 vzorce iz Italije, 5 vzorcev iz starejšega kolekcijskega vinograda iz Kopra ter 'Teran' in 'Sladki teran' iz Hrvaške. Kljub večjemu številu mikrosatelitskih lokusov (23), 4 biotipov iz Komna še vedno niso uspeli ločiti, medtem ko so se nekateri vzorci iz Italije in Kopra ločili. Ugotovljeno genetsko raznolikost so pripisali poliklonski naravi sorte.

Štajner in sod. (2013) so z analizo genetske strukture na podlagi 22 mikrosatelitskih lokusov, v katero so vključili 196 vzorcev različnih lokalnih sort vinske trte iz držav zahodnega območja Balkana (BiH, Makedonija, Črna Gora, Slovenija in Srbija) ugotovili, da se je sorta 'Refošk' uvrstila k zahodno evropskim sortam, kot so 'Merlot', 'Modri Pinot', 'Touriga Nacional', 'Barbera' in 'Cabernet Sauvignon', ki so bile dodane k analizi kot referenčne sorte in so po ekološko-geografski klasifikaciji Negrula uvrščene v zahodno

evropsko skupino (*Proles occidentalis*). Po navajanju Negrulja (1959) sorta 'Refošk' pripada čnomorski ekološki skupini *Proles pontica*. Rusjan in Korošec-Koruza (2006) sta z analizo morfometrijskih in biokemijskih lastnosti grozdov in jagod pri 14 sortah vinske trte iz Ampelografskega vrta Kromberk pri Novi Gorici ugotovila podobnost med sortami 'Refošk', 'Teran Istra' in 'Syrah'.

2.3 KOMPLEKS BOLEZNI RAZBRAZDANJA LESA

Kompleks bolezní razbrazdanja lesa je ena od najpomembnejših bolezní vinske trte, razširjena po vsem svetu. Značilna bolezenska znamenja, ki so karakteristična za cepič, podlago ali za oba dela istočasno, so pojav zadebelitve nad cepljenim mestom, pojav različnih tipov razbrazdanja z jamicami in vdolbinami v bližini cepljenega mesta ter debelitev skorje zaradi česar dobi skorja plutast izgled. Prizadete rastline kažejo odklone od normalne rasti, so manj bujne in propadejo v nekaj letih po sajenju. Brazde, ki so posledica hipertrofije tkiva in ki segajo od skorje do ksilema, nastanejo zaradi nepravilnega delovanja žilnega kambija (Martelli, 1993).

Glede na znamenja, ki se razvijejo na indikatorskih rastlinah po cepljenju ločimo štiri tipe bolezní (Martelli, 1993): razbrazdanje tipa Kober, ki povzroča razbrazdanje lesa na 'Kober 5BB' (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*), vendar ne povzroča znamenj na *V. rupestris* 'St. George' in 'LN33' ('Couderc 1613' x 'Thompson Seedless'); razbrazdanje tipa LN33 povzroča razbrazdanje na indikatorju 'LN33', na *V. rupestris* 'St. George' in 'Kober 5BB' pa ne povzroča vidnih znamenj; razbrazdanje tipa Rupestris, ki povzroča razbrazdanje na indikatorju *V. rupestris* 'St. George' in četrti tip plutavost lubja, ki povzroča razbrazdanje na indikatorju 'LN33' in *V. rupestris* 'St. George', poleg tega povzroča tumorjem podobne tvorbe na indikatorju 'LN33' zaradi pospešene delitve sekundarnega floema.

Bolezen razbrazdanja lesa je bila ugotovljena na mnogih kultivarjih vrste *V. vinifera* ter na drugih vrstah iz rodu *Vitis* (Bonfiglioli in sod., 1998; Credi, 1997a; Nakaune in sod., 2008). Znamenja bolezní razbrazdanja lesa se pojavijo šele nekaj let po cepljenju na ameriške podlage (Goheen, 1989).

Po certifikacijski shemi Evropske in sredozemske organizacije za varstvo rastlin (EPPO) je pri proizvodnji zdravega sadilnega materiala za detekcijo bolezní razbrazdanja lesa obvezna izvedba indeksiranja, saj lahko bolezen identificiramo le z indeksiranjem na različne indikatorske rastline. Za detekcijo virusov GVA (*Grapevine virus A*) in GVB (*Grapevine virus B*), ki ju povezujejo z boleznijo razbrazdanja lesa, je priporočljivo tudi molekulsko testiranje (Pathogen-tested ..., 2008).

Indeksiranje se najpogosteje izvaja z okulacijo, vendar se znamenja pri tovrstnem načinu cepljenja pojavijo šele po 2 oziroma 3 letih (Credi, 1997b; Martelli, 1993). Poleg dolgega

časovnega obdobja, potrebnega za pojav znamenj, je bilo v preteklih testiranjih ugotovljeno, da indeksiranje ni popolnoma zanesljivo, saj naj bi bil pojav bolezenskih znamenj odvisen od več dejavnikov, npr. od latentnosti znamenj in sinergijskih učinkov večih patogenov (Credi, 1997a).

2.3.1 Povezovanje bolezní z virusi

Teza, da bolezen povzročajo virusi temelji predvsem na ugotovitvi, da se znamenja bolezní pojavljajo tudi pri trséh, katerih cepilni material je bil odvzet s prizadetih trsov; povzročitelji naj bi se prenašali tudi s prenašalci (Martelli, 1993), vendar resnični povzročitelj oziroma vzrok bolezní razbrazdanja lesa vse do danes ostaja nepojasnen.

Virus, ki sta ga leta 1998 odkrili dve ločeni raziskovalni skupini in ga poimenovali RSPaV-1 (*Rupestris stem pitting associated virus-1*) (Meng in sod., 1998) oziroma GRSPaV (*Grapevine rupestris stem pitting associated virus*) (Zhang in sod., 1998) povezujejo z najbolj razširjenim tipom bolezní razbrazdanja lesa in sicer z razbrazdanjem tipa *Rupestris* (Meng in sod., 1999; Nakaune in sod., 2008; Zhang in sod., 1998). Genetske raziskave omenjenega virusa so pripeljale do odkritij novih genetsko različnih izolatov na rastlinah z različnimi znamenji in na rastlinah brez znamenj. Na indikatorski rastlini, ki ni kazala znamenj bolzeni, *V. rupestris* 'St. George', je bil odkrit izolat GRSPaV-SG1 (Meng in sod., 2006). Nakaune in sod. (2008) so na zdravih trtah odkrili izolate, genetsko zelo podobne izolatu GRSPaV-SY. Izolat GRSPaV-SY je bil odkrit v trséh sorte 'Syrah' (*Vitis vinifera* L. cv. 'Syrah'), ki so kazali znamenja bolezní propadanja trsov sorte 'Syrah' (ang. Syrah decline) v Kaliforniji (Lima in sod., 2006). Bolezen propadanja trsov sorte 'Syrah', ki ji pripisujejo podobna znamenja kot jih ima bolezen razbrazdanja lesa, prav tako nima določenega povzročitelja (Goszczynski, 2010). Morelli in sod. (2011) so odkrili izolat GRSPaV-MG, izoliran iz sorte 'Moscato giallo', ki prav tako ne povzroča znamenj na indikatorju *V. rupestris* 'St. George'. Ugotovljena je bila tudi povezava med GRSPaV virusom in pojavom nekroze žil na indikatorju 110R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) (Bouyahia in sod., 2005). Vpliv GRSPaV virusa na vinsko trto še ni dokončno pojasnjen.

GVA povezujejo z razbrazdanjem tipa Kober (Garau in sod., 1994; Martelli, 1993). GVB povezujejo z boleznijo plutavosti lubja (Bonavia in sod., 1996). Za omenjena virusa je bilo ugotovljeno, da se prenašata s kaparji (*Phenacoccus aceris*) (Le Maguet in sod., 2012).

2.3.2 Bolezen razbrazdanja lesa na sorti 'Refošk'

Za občutljivo sorto se je izkazala sorta 'Refošk', kjer so v vinogradih z močnejšo okužbo ugotovili tudi do 50 odstotkov propadlih trsov (Korošec-Koruza, 1982). V kolekcijskem vinogradu sorte 'Refošk' v Komnu na Krasu, kjer so trsi cepljeni na podlago 'SO4' (*V. berlandieri* X *V. riparia*), je bil leta 1998 pri pregledu vseh 1680 trt ugotovljen 15 odstotni

delež trt z znamenji bolezní razbrazdanja lesa, bodisi na podlagi ali na žlahtnem delu, 18 odstotkov trt, z znamenji bolezní na podlagi in 8 odstotkov trt z znamenji bolezní na žlahtnem delu pa je v obdobju 8 let po cepljenju propadlo (Tomažič in sod., 2005b).

V prejšnjih letih so bili nekateri trsi sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu že testirani na 11 virusov z encimsko imunskimi testi (ELISA) in sicer: GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), ArMV (*Arabis mosaic virus*), GLRaV-1, 2, 3, 6 in 7 (*Grapevine leafroll associated viruses*), GFkV (*Grapevine fleck virus*), GVA, GVB in GRSPaV (Tomažič, 2002; Tomažič in sod., 2005a). Prisotnost slednjega so ugotavljali tudi z imunsko elektronsko mikroskopijo (IEM) in z metodo RT-PCR, kjer se v prvem koraku virusno RNA z reverzno transkriptazo prepiše v komplementarno DNA, le ta pa se nato z metodo PCR namnoži (Petrovič in sod., 2003; Tomažič, 2002). Povezave med boleznijo razbrazdanja lesa in okužbe s testiranimi virusi niso ugotovili. Prav tako niso ugotovili sinergizma med testiranimi virusi (Tomažič, 2002). Rezultati testiranja trsov sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu so v preglednici 1.

Preglednica 1: Predhodno ugotovljene okužbe z virusi na šestih trtah sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu.

Table 1: Virus status of 'Refošk' vines from the collection vineyard in Komen, as reported in previous studies.

Virus / oznaka trte	20 (IV ^d /110 ^e)	38 (VIII/44)	43 (VIII/113)	48 (IX/43)	51 (IX/69)	61 (XII/68)
ArMV ^a	-	-	-	-	-	-
GFkV ^a	+	-	-	-	-	-
GFLV ^a	-	-	-	-	-	-
GLRaV-1 ^a	-	-	-	-	+	-
GLRaV-2 ^a	-	-	-	-	?	+
GLRaV-3 ^a	-	-	-	-	-	-
GLRaV-6 ^a	+	+	-	-	-	-
GLRaV-7 ^a	-	-	-	-	?	-
GVA ^a	-	-	-	-	-	-
GVB ^a	-	-	-	-	-	-
RSPaV-1 ^{a,b,d,c}	+ ^{a,b,d} / _{-^c}	+ ^{a,b,d,c}	+ ^{a,b,d} / _{-^c}	+ ^{a,b,d} / _{-^c}	+ ^{a,b,d} / _{-^c}	+ ^{a,b,d} / _{-^c}

^a testirano z ELISA testom, ^b testirano z metodo PCR, ^c testirano z ISEM metodo, ^d testirano z "Western blot" metodo, ^e oznaka vrste v kolekcijskem vinogradu, ^e zaporedno število trte v vrsti

? okužbe z ELISA testiranjem ni bilo mogoče potrditi zaradi težko določljive mejne vrednosti

2.3.2.1 Vpliv bolezní razbrazdanja lesa na agronomske lastnosti sorte 'Refošk'

V raziskavi, ki so jo izvedli Tomažič in sod. (2005b), so pri trsih z znamenji razbrazdanja ugotovili statistično značilno manj kislin v grozdih v primerjavi s trsi, ki znamenj bolezní niso kazali. Ugotovitev nakazuje na zgodnejše dozorevanje grozdja pri okuženih trsih. Med povprečnimi vsebnostmi sladkorjev in teži jagod niso ugotovili statistično značilnih razlik. Pri zdravih trsih je bilo ugotovljeno statistično značilno večje število grozdov na trs ter

večja masa grozdov. Pridelek na okuženih trtah je posledično manjši. Med trsi z znamenji razbrazdanja je večji delež propadlih trsov. Ugotovili so, da bi bil pridelek v vinogradih, kjer bi imeli vsi trsi razbrazdanje lesa za 34 odstotkov manjši kot v vinogradu brez razbrazdanja lesa, kar pa naj bi bila večinoma posledica propadlih trsov.

2.4 CEPLJENJE IN VZPOSTAVITEV CEPILNE ZVEZE

Cepljenje je eden od načinov vegetativnega razmnoževanja. Prav tehnika cepljenja je omogočila domestikacijo sadnih vrst, npr. jabolane, hruške in slive, v začetku prvega tisočletja pred našim štetjem. Te sadne vrste se od fige, trte, granatnega jabolka in oljk razlikujejo po tem, da se potaknjenci slabše koreninijo. Cepljenje je zato imelo ključno vlogo pri domestikaciji sadnih vrst zmerno toplega podnebja in je pripomoglo k širjenju le teh iz Osrednje Azije v Evropo (Mudge in sod., 2009).

Pri razmnoževanju s cepljenjem se pri sadnih rastlinah skrajša juvenilno obdobje; s cepljenjem na različne podlage lahko vplivamo na bujnost rasti žlahtnega dela ter prilagodimo rastlino za rast v različnih talnih in podnebnih razmerah. Podlage pa so selekcionirane tudi glede na odpornost na različne virusne, bakterijske in glivične bolezni ter škodljivce (Mudge in sod., 2009). Cepljenje se izvaja tudi pri zelenjadnicah za pridobitev odpornosti na talne bolezni, prilagoditev na abiotске dejavnike, bujnost rasti, itd., vendar se je cepljenje zeleđnjadnic v komercialne namene začelo izvajati šele okoli leta 1950 (Lee in sod., 2010).

Vinsko trto cepimo zaradi trtne uši, ki je bila v 70. letih 19. stoletja, ko so začeli z uvozom ameriških trt, zanesena v južno Francijo iz Amerike. Škodljivec se je zelo hitro razširil po vsej Evropi in povzročil propad mnogih vinogradov. Evropske sorte vinske trte zato cepimo na ameriške trte, ki so na trtno uš odporne ali tolerantne (Valič in Milevoj, 1999).

Za vzpostavitev uspešne cepilne zveze je potreben kompleks biokemijskih, citoloških in histoloških procesov (Pina in Errea, 2005): Prvi odziv rastline pri cepljenju je tvorjenje kalusa. Ko pride do kontakta celic kalusa med podlago in cepičem, se zgodijo ključni procesi, od katerih je odvisna nadaljna vzpostavitev prevodnega sistema. Tvorjenja kalusa je namreč reakcija na ranitev in le ta nastaja tako v kompatibilnih kot pri nekompatibilnih cepilnih zvezah. Pri stiku celic kalusa pride do sprememb v celični steni, pojavijo se odprtine in vzpostavijo se plazmodezme. Tako nastane povezava simplasta in vzpostavi se metabolna interakcija. Vendar je za vzpostavitev primarnih in sekundarnih plazmodezem potrebno vzajemno sodelovanje in interakcija obeh delov, v nasprotnem primeru lahko pride do nastanka neprekrivajočih plazmodezm. Pred tvorjenjem plazmodezm naj bi zato imeli pomembno vlogo signalni mehanizmi na celični steni. V zadnjem koraku je za uspešno oblikovanje cepilne zveze nujna vzpostavitev prevodnega sistema. Slaba

diferenciacija celic ali slabo vzpostavljeno prevodno tkivo, je eden glavnih vzrokov za pojav inkompatibilnosti pri lesnatih rastlinah.

2.4.1 Procesi pri vzpostavljanju cepilne zveze na molekulskem nivoju

Pri oblikovanju cepilne zveze se sprožijo številni biološki procesi, zaradi česar pride do sprememb v izražanju genov, translacije in metabolnih poti, vendar pa so vsi ti biološki procesi trenutno slabo proučeni. Glede na to, da je cepljenje pri lesnatih rastlinah pogosto izvedeno s cepilnim materialom, ki je še v fazi mirovanja, se v takem primeru oblikovanje cepilne zveze in začetek rasti odvijata istočasno (Cookson in sod., 2013). Pri proučevanju transkriptoma z Nimblegen mikromrežami (Roche), osnovanih na zbirki genov vinske trte 12xV1 (CRIBI), 3 in 28 dni po izvedbi cepljenja vinske trte, so Cookson in sod. (2013) ugotovili: povečano izražanje genov, vključenih v signalne poti, ki jih aktivirajo jasmonati in sicer skupina genov za lipoksigenaze in reduktaze 12-okso-dienojske kisline. Prav tako je bilo več genov s povečanim izražanjem povezanih z obrambnimi mehanizmi in odgovorom na ranitev, npr. gen za transkripcijski faktor *MYB-like 102*, regulatorni glikoproteini *GLP*, peroksidaze in hitinaze. Glede na to, da je bil gen *MYB-like 102* izražen po 3 in po 28 dneh, so predpostavili, da bi ta gen lahko bil ključni regulator pri odzivu rastline na ranitev in potencialno na oblikovanje cepilne zveze. Geni, ki naj bi sodelovali pri oblikovanju cepilne zveze so bili vključeni v sledeče GO biološke procese oziroma kategorije (biološki procesi, kot so določeni v genski ontologiji GO, GeneOntology): modifikacija celične stene, hormonsko signaliziranje, sekundarni metabolizem in obrambni mehanizmi kot odgovor na ranitev.

Po cepljenju hikorija (*Carya cathayensis*) so Zheng in sod. (2010) v treh časovnih terminih (3, 7 in 14 dni) ugotavljali izraženost genov. V zgodnjih fazah so odkrili povečano vsebnost avksinov in z metodo diferenčnega prikaza izraženih transkriptov cDNA-AFLP identificirali 2 gena za avksin transportne proteine in s tem podkrepili ugotovitev, da imajo avksini pomembno vlogo pri diferenciaciji prevodnega sistema, ker vplivajo na izdolževanje celic, le to pa je omogočeno zaradi povečanega sprejema vode v vakuole. Pomembna komponenta pri celičnem transportu so akvaporini, ki imajo zmožnost hitrega prenosa vode (Javot in Maurel, 2002). Zheng in sod. (2010) so med drugimi diferenčno izraženimi geni, identificirali tudi gen za akvaporin v plazmalemi. Izmed 49 diferenčno izraženih genov, so skupno identificirali 12 genov, ki sodelujejo pri oblikovanju kambija in pri celični rasti.

Yin in sod. (2012) so izvedli poskus s cepljenjem navadnega repenjakovca (*Arabidopsis thaliana*) in opravili histološko analizo cepilne zveze. Vzpostavitev prevodnega tkiva so opazili tretji dan po cepljenju. Drugi dan po cepljenju so ugotovili povečano vsebnost avksina v bližini cepljenega mesta. Prav tako so drugi dan po cepljenju ugotovili začetek delitve celic in s tem pokazali, da je avksin sprožil delitev celic in diferenciacijo celic v

prevodna tkiva. Predpostavili so, da je bila sprememba koncentracije avksina in lokalna razporeditev, posledica vzpostavljene medcelične komunikacije. Da bi potrdili to domnevo, so izvedli analizo izraženosti genov po cepljenju z uporabo mikromrež in primerjali izražene gene pri cepljenkah, necepljenih cepičih in podlagah ter pri nedotaknjenih sejančkih. Ugotovili so gene s povečanim izražanjem iz GO kategorij: liazna aktivnost, hidrolazna aktivnost in oksidoreduktazna aktivnost; kar nakazuje, da je prišlo do razgradnje ostankov poškodovanih celic. Statistično značilno je bila izražena tudi skupina genov, ki jih povezujejo z odgovorom na stresne dejavnike, kar pomeni, da je prišlo do aktivacije izražanja genov zaradi povzročene poškodbe. Prav tako so ugotovili povečano izražanje genov udeleženih v sintezne poti jasmonske kisline in etilena, dveh značilnih hormonov pri odgovoru rastline na ranitev. Najmanjšo p-vrednost so ugotovili pri skupini genov iz endomembranskih sistemov, kar nakazuje na ključno vlogo le teh pri vzpostavitvi cepilne zveze. Identificirali so pet različnih navzgor reguliranih proteinov kinaz, ki sodelujejo pri sprejemu izvenceličnih signalov. Dve ugotovljeni kinazi *CIPK5* in *CIPK14* pripadata *CIPK* družini kinaz, ki predstavljajo pomemben signalni sistem pri odgovoru rastline na okoljske dejavnike. Dobljeni rezultati so potrdili tezo, da se v začetni fazi istočasno vzpostavi medcelična komunikacija in razgradnja ostankov poškodovanih celic. Oligosaharidi, ki se ob razgradnji celične stene sprostijo, predstavljajo pomembne signalne molekule. Sladkorji se vežejo na transportne proteine, ti pa jih prenesejo do celic podlage, kjer *CIPK14* proteini to zaznajo kot signal in sprožijo nadaljne procese. Oba mehanizma, medcelična komunikacija in razgradnja celičnih ostankov, naj bi se sprožila zaradi aktivacije obrambnega mehanizma. Ko je bila medcelična komunikacija vzpostavljena je prišlo do akumulacije avksina in nazadnje do nastanka prevodnega tkiva.

2.4.2 Bolezen razbrazdanja lesa vinske trte – posledica odziva rastline na stres ob cepljenju, genetske inkompatibilnosti, okužbe s patogeni ali genetsko pogojene občutljivosti na bolezen

Po mnenju May (1994) je cepilna inkompatibilnost pri trti redek pojav, medtem ko je uspeh cepljenja lahko vseeno zelo variabilen. Golino (2007) poroča, da je razvoj znamenj, podobnih kot pri cepilni inkompatibilnosti, zelo verjetno virusnega izvora, predvsem zato, ker do sedaj še ni bilo očitnejših primerov genetske cepilne inkompatibilnosti. Golino (2007) tudi pravi, da je večina komercialnih podlag za vinsko trto bila selekcioniranih za kompatibilnost in so v uporabi že več let, zato je malo verjetno, da bi prišlo do odkritja le te. Pri proučevanju bolezní propadanje trsov sorte 'Syrah', ki ravno tako kot bolezen razbrazdanja lesa povzroča razvoj nepravilnosti v bližini cepljenega mesta, so Renault-Spilmont in sod. (2007) izvedli cepljenje sorte 'Syrah' na različne podlage, različne sorte iz vrste *Vitis vinifera* ter na sorto 'Syrah' vendar bolezní niso uspeli povezati z genetsko cepilno inkompatibilnostjo, medtem ko so pri analizi 100 klonov sorte 'Syrah' z mikrosatelitskimi markerji ugotovili 86 % korelacijo med genetskim profilom pri lokusu VMC5g7 in občutljivimi kloni. Trialelni profil z relativnimi dolžinami alelov 198-216-218

so ugotovili pri 30 občutljivih klonih, medtem ko so dialelni profil ugotovili pri 56 neobčutljivih in pri 14 občutljivih klonih. Na podlagi genoma vinske trte so ugotovili, da se omenjeni lokus nahaja na 2. kromosomu v promotorju transkripcijskega faktorja HSFA1D, ki ga povezujejo z odgovorom rastline na vročinski stres.

Cepilna inkompatibilnost se lahko pojavi zaradi okužbe z virusom. GLRaV-2 (*Grapevine leafroll-associated virus*) je pogosto povezan z inkompatibilnostjo tipa Kober 5BB (Martelli in Boudon-Padieu, 2006). Po trenutnem mišljenju strokovnjakov tudi bolezen razbrazdanja lesa, ki se v vinogradu pojavi šele nekaj let po cepljenju, podobno kot pri pozni inkompatibilnosti, povzročajo virusi (Martelli in Boudon-Padieu, 2006).

Cepilno inkompatibilnost lahko povzroči tudi odziv rastline na stres, ki je izzvan z ranitvijo tkiva. Errea (1998) poroča, da se v stresu, ki ga povzroči cepljenje, poveča koncentracija flavonolov, predvsem katehinov in proantocianidinov. Ker je v stresu celični sistem oslavljen, lahko pride do razgradnje celičnih organelov. V kolikor fenolne spojine iz vakuol preidejo v citoplazmo, jih tu oksidirajo peroksidaze in fenoloksidaze in nastanejo toksični kinoni. Ti se lahko vežejo z nukleofilno skupino drugih proteinov, kar privede do precipitacije proteinov in do propadanja tkiva.

Običajen odziv rastlin na delovanje abiotских (UV sevanje, temperaturni ekstremi, težke kovine, pomanjkanje vode, povečana koncentracija soli, mehanski/fizični stres) in biotskih dejavnikov je zvišanje vsebnosti reaktivnih kisikovih spojin (ROS), predvsem vodikovega peroksida in s tem prehod rastline v oksidativni stres (Scandalios, 2002). Vodikov peroksid, ki nastane v stresnih situacijah, tvori NADPH oksidaza (Laloi in sod., 2004).

Večja akumulacija ROS lahko povzroči poškodbe na RNA, DNA, inhibira in oksidira encime ter povzroči peroksidacijo lipidov, ki med drugim sestavljajo tudi biološke membrane (Imlay, 2003). Za ponovno vzpostavitev redoks homeostaze imajo rastline razvite različne mehanizme. Vodikov peroksid zelo hitro razgradijo katalaze in peroksidaze (Scandalios, 2002).

Vodikov peroksid deluje tudi kot pomembna signalna molekula in pripisujejo ji pleiotropično delovanje, saj povečanje koncentracije sproži različne obrambne mehanizme, ki pripomorejo k večji toleranci rastline na stresne dejavnike (Laloi in sod., 2004). V primeru, da je vsebnost vodikovega peroksida prevelika, pride do celične smrti oz. apoptoze in nadalje do propadanja tkiva ali nekroz (Scandalios, 2002).

Nepravilno rast in razvoj tkiva lahko povzroči tudi mutacija gena. Primer za to podajajo Duan in sod. (2010), ko so pri cepljenju navadnega repenjakovca z divjim genotipom za gen *FERONIA* (*FER*) in z mutiranim genotipom (*fer-4*), pri slednjem ugotovili zakrnele koreninske laske nepravilnih oblik, ki so kmalu propadli, medtem ko so se korenine pri divjem genotipu razvijale nemoteno.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MOLEKULSKA KARAKTERIZACIJA SORTE 'REFOŠK'

3.1.1 Rastlinski material za analizo mikrosatelitskih lokusov in markerjev AFLP

Rastlinski material smo v mesecu juniju 2010 vzorčili v kolekcijskem vinogradu v Komnu na Krasu (koordinate: 45°48.917'N 13°44.692'E), kjer so bili v letih 1989, 1990 in 1991 s cepljenjem na podlago SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*) razmnoženi stari trsi sorte 'Refošk' in posajeni v blokih od 3 do 35 trt na posamezen tip. Kolekcijski vinograd je bil vzpostavljen, da bi izbrali ustrezne elite za klonsko selekcijo, ter da bi se ohranilo stare tipe sorte 'Refošk'. Vinograd je vključen v shemo integrirane pridelave in je v celoti zatravljen. Gojitvena oblika je dvokraki guyot.

Ker z genetsko analizo nismo uspeli ločiti vseh tipov sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu, bomo v nalogi za različne tipe sorte 'Refošk' iz omnenjega vinograda uporabljali izraz »biotip«. Z izrazom »biotip« označimo vegetativno (nespolno) razmnoženo potomstvo, ki se od drugega biotipa loči po fenotipu (Forneck, 2005). V analizo smo iz kolekcijskega vinograda vključili biotipe od 1 do 35, od 37 do 54, 56, od 58 do 67, 69, 70, 73, 74 in 76, skupaj 69 biotipov. Dodaten rastlinski material smo vzorčili v 13-ih naključno izbranih vinogradih iz vinorodnih okolišev Kras in Slovenska Istra. Seznam vinogradov je v preglednici 2. Pri vzorčenju smo vsako trto pregledali za znamenji bolezní razbrazdanja lesa. Trte, pri katerih je bila bolezen ugotovljena so v preglednici 2, glede na to, kje so bila ugotovljena znamenja razbrazdanja, označene s črkami a, b ali c. V analizo smo vključili tudi tri zelo stare trse sorte 'Refošk' iz Merč, Šepulj in Marezig, vendar pri teh razbrazdanja nismo ugotavljali, ker niso bile cepljene in morda zaradi pomlajevanja ni več prisotnega osnovnega debla. Skupaj je bilo v analizi 113 vzorcev.

3.1.2 Izolacija DNA

Celokupno DNA smo izolirali iz mladih listov po CTAB protokolu, kot je opisan v Kump in Javornik (1996) z nekaj spremembami:

- a) približno 1 cm² listne ploskve smo zdrobili v terilnici in dodali 1,5 ml CTAB pufru [2% (m/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2% (v/v) β-merkaptotanol], predhodno segretega na 68 °C,
- b) sledila je inkubacija na 68 °C za 1 uro in pol z občasnim stresanjem,
- c) dodali smo 500 µl topila, fenol-kloroform-izoamilalkohol v razmerju 25:24:1 in dobro premešali, da je nastala suspenzija,
- d) po 15 minutnem centrifugiranju pri 11.000 obratih na minuto (centrifuga je bila vseskozi ohlajena na 4 °C) smo supernatant odpipetirali v novo centrifugirko in ponovili korak c in d,

- e) dodali smo 50 µl 3 M NaAc in 500 µl ledeno hladnega izopropanola ter dobro pretresli,
- f) vzorce smo za 30 minut dali v zamrzovalnik na -20 °C,
- g) vzorce smo nato centrifugirali 15 minut pri 11.000 obratih. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, dodali 500 µl 70 % etanola in rahlo pretresli, da se je DNA odlepila od centrifugirke,
- h) po 5 minutnem centrifugiranju pri 11.000 obratih na minuto, smo previdno odlili etanol in DNA posušili na zraku,
- i) glede na količine izolirane DNA, smo DNA raztopili v 30 do 50 µl TdE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)] pufu.

Preglednica 2: Seznam vinogradov iz vinorodnih okolišev Kras in Slovenska Istra ter lokacije treh starih trt v Šepuljah, Merčah in Marezigah.

Table 2: List of production vineyards from the winegrowing districts Kras and Slovenska Istra where samples were taken and locations of three old vines.

Kraj	Identifikacijska oznaka	Podlaga	Leto sajenja	Koordinate	Vinorodni okoliš
Križ (a)	1s, 3s ^a , 7s ^a , 8s ^b , 10s	420 A	2002	45°44.566'N 13°51.905'E	Kras
Križ (b)	12s ^c , 13s ^c , 17s ^c , 18s, 19s, 20s ^c	420 A	2005	45°44.566'N 13°51.905'E	Kras
Tomaj	21s ^b , 25s ^c , 26s ^c , 28s ^c , 29s, 30s	Kober 5 BB	1970	45°45.220'N 13°51.077'E	Kras
Godnje	37s, 38s, 39s ^c , 40s ^c	420 A	1990	45°45.399'N 13°50.434'E	Kras
Dutovlje (a)	45s, 46s, 47s	420 A	2002	45°45.203'N 13°49.805'E	Kras
Dutovlje (b)	54s, 58s	Kober 5 BB	1958	45°45.204'N 13°49.805'E	Kras
Krajna vas	63s	SO4	1999	45°45.870'N 13°48.119'E	Kras
Šepulje	72s ^d	Trta ni cepljena.	okoli 1780	45°45.080'N 13°52.191'E	Kras
Merče	73s ^d	Trta ni cepljena.	okoli 1700	45°42.071'N 13°54.047'E	Kras
Prade	3k, 5k, 10k ^c	SO4	1998	45°32.903'N 13°46.909'E	Slovenska Istra
Pobegi (a)	11k ^a , 12k, 13k ^a , 15k ^a	Kober 5 BB	1980	45°32.266'N 13°47.156'E	Slovenska Istra
Marezige	18k ^d	Trta ni cepljena.	okoli 1880	45°30.383'N 13°48.143'E	Slovenska Istra
Truške	19k, 20k, 21k, 22k	Paulsen 1103	2000	45°29.674'N 13°48.960'E	Slovenska Istra
Boršt	33k ^c	Kober 5 BB	1980	45°28.647'N 13°46.903'E	Slovenska Istra
Izola	36k	420 A	2001	45°31.745'N 13°40.288'E	Slovenska Istra
Pobegi (b)	41k	SO4	2003	45°32.081'N 13°47.396'E	Slovenska Istra

^a trte z znamenji bolezni razbrazdanja lesa na žlahtnem delu trsa, ^b brazde na podlagi, ^c brazde na žlahtnem delu trsa in na podlagi, ^d trte, ki niso bile pregledane za znamenji razbrazdanja lesa

3.1.3 Določanje koncentracije DNA

Koncentracijo izolirane DNA smo določili s fluorometrom QubitTM (Life Technologies) in s pripadajočim setom reagentov (Qubit® dsDNA BR Assay Kit, Q32853) po navodilih proizvajalca.

Delavno raztopino smo pripravili tako, da smo 200x koncentriran reagent (Qubit®dsDNA BR Reagent) razredčili s pufrom (Qubit® dsDNA BR Buffer) na 1x delovno koncentracijo. Umeritvene raztopine smo pripravili z mešanjem 190 µl delavne raztopine in 10 µl založnih standardnih raztopin 1 in 2 (Quant-iTTM dsDNA BR standard #1 s koncentracijo 0 ng/µl) in #2 s koncentracijo 100 ng/µl). Meritveno raztopino smo pripravili z mešanjem 198 µl delovne raztopine in 2 µl DNA raztopine.

3.1.4 Namnoževanje in detekcija mikrosatelitskih markerjev

Mikrosatelitske markerje smo uporabili za potrditev sortne pristnosti vzorcev, vključenih v analizo.

Analizirali smo sledeče lokuse: VVMD5 in VVMD7 (Bowers in sod., 1996), VVMD27 in VVMD32 (Bowers in sod., 1999) ter VrZAG62 in VrZAG79 (Sefc in sod., 1999). Vsi lokusi, razen VVMD32, so vključeni v standardni set mikrosatelitskih lokusov za identifikacijo sort v Evropski podatkovni zbirki vinske trte (Maul in sod., 2012; OIV ..., 2009; This in sod. 2004).

Mikrosatelitske lokuse smo pomnoževali z ekonomično metodo, pri kateri je v reakciji PCR poleg lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov, od katerih je eden na 5' koncu podaljšan za nukleotidno zaporedje M13(-21) oligonukleotida v dolžini 18 bp, vključen še tretji začetni oligonukleotid, imenovan M13(-21) z nukleotidnim zaporedjem 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3' in je na 5' koncu označen s fluorescentnim barvilom (Schuelke, 2000). Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov je v preglednici 3.

Reakcijo PCR smo izvedli v končnem volumnu 15 µl. Vsebovala je 20 ng DNA, 1X *Taq* pufer z (NH₄)₂SO₄, 0,2 mM koncentracijo vsakega deoksiribonukleotid trifosfata, 2 mM koncentracijo MgCl₂, 0,2 µM koncentracijo vsakega lokusno specifičnega začetnega oligonukleotida (Integrated DNA Technologies), 0,25 µM koncentracijo M13(-21) oligonukleotida (Applied Biosystems) in 0,375 enote *Taq* DNA polimeraze (EP0402). V kolikor ni drugače navedeno so vse kemikalije za PCR in *Taq* polimeraza od proizvajalca Fermentas/Thermo Scientific.

Namnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu AB 2720 (Applied Biosystems), po sledečem dvostopenjskem temperaturnem profilu:

- začetna 5 minutna denaturacija DNA pri 94 °C,
- sledilo je 5 ciklov, pri čemer se je pri vsakem ciklu temperatura prileganja znižala za 1 °C
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 90 sekund pri 60 °C (-1 °C/cikel),
 - c) 90 sekund pri 72 °C,
- sledilo je 30 ciklov s ponavljanjem
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 90 sekund pri 55 °C,
 - c) 90 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 8 minut pri 72 °C.

Namnoženo DNA smo detektirali na kapilarnem sekvenatorju ABI3130 (Applied Biosystems) z nameščenim barvnim filtrom DS-33, ki omogoča detekcijo 5-ih fluorescentnih barvil sočasno. Po končani reakciji PCR smo posamezne pomnožene lokuse z različnimi fluorescentnimi barvili združili v skupno mešanico (1:1:1:1) s po 4 ali 2 lokusoma (preglednica 4). Od nastale mešanice smo 1 µl od vsakega vzorca prenesli na 96 mestno PCR ploščo za ABI sekvenator ter vsakemu vzorcu dodali 10,7 µl formamida (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) in 0,3 µl velikostnega standarda (GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard, Applied Biosystems). Vzorce smo pred nanosom na sekvenator denaturirali, tako da smo jih inkubirali 5 minut pri 95 °C. Na 4 kapilarnem sekvenatorju so bile nameščene kapilare v dolžini 36 cm. Elektroforeza je potekala v polimeru 3130 POP-7™ (Applied Biosystems). Nastavitve modula so bile sledeče: začetna napetost 1,2 kV, začetni čas 16 sekund, delovna napetost 15 kV, dolžina elektroforeze 1200 sekund, temperatura grelca 60 °C. Rezultate smo dobili v obliki kromatografskih datotek s končnico ».fsa«. To je vrsta datotek, v katere shranjuje podatke o fragmentni analizi program Data Collection (Applied Biosystems), ki komunicira s sekvenatorjem. Dolžino namnoženih mikrosatelitov smo določili z algoritmom programskega paketa GeneMapper v4.1.

Preglednica 3: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za namnoževanje mikrosatelitskih lokusov.
Table 3: List of primers, used for microsatellite loci amplification.

Pari začetnih oligonukleotidov	Zaporedje začetnih oligonukleotidov F in R v smeri 5'-3'
lokus VVMD5	
R	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA
F+M13(-21)	TGTAAAACGACGGCCAGTCTAGAGCTACGCCAATCCAA
lokus VVMD7	
R+M13(-21)	TGTAAAACGACGGCCAGTCGAACCTTCACACGCTTGAT
F	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT
lokus VVMD27	
F	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT
R+M13(-21)	TGTAAAACGACGGCCAGTACGGGTATAGAGCAAACGGTGT
lokus VVMD32	
F	TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG
R+M13(-21)	TGTAAAACGACGGCCAGTGGAAGATGGGATGACTCGC
lokus VrZAG62	
F	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC
R+M13(-21)	TGTAAAACGACGGCCAGTCCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC
lokus VrZAG79	
F	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG
R+M13(-21)	TGTAAAACGACGGCCAGTTGCCCCCATTTCAAACCTCCCTTCC

Preglednica 4: Mikrosatelitski lokusi s pripadajočimi barvili in kombinacijo, ki je bila uporabljena pri kapilarni elektroforezi.

Table 4: List of microsatellite loci together with fluorescent dye of M13(-21) primer and combination for capillary electrophoresis.

Lokus	Fluorescentna oznaka M13(-21)	Kombinacije lokusov za kapilarno elektroforezo
VVMD5	NED	A
VVMD7	6-FAM	A
VVMD27	VIC	B
VVMD32	VIC	A
VrZAG62	6-FAM	B
VrZAG79	PET	A

3.1.5 Mikrosatelitski profili številnih sort z imenom 'Refošk' iz podatkovnih zbirk

Za proučitev genetske variabilnosti številnih sort z imenom 'Refošk', gojene na območju Italije, smo iz Evropske podatkovne banke vinske trte (Maul in sod., 2012), iz mednarodnega kataloga sort vinske trte (Vitis ..., 2013), iz italijanske mikrosatelitske podatkovne zbirke vinske trte (Grape ..., 2002) in iz podatkovne zbirke genotipov sort vinske trte iz območja zahodnega balkana Vitis-WBC (Vitis-WBC ..., 2013) z iskalnimi gesli: refošk, refosk, refosco, teran in terrano poiskali vnose. Zaradi različnih tehnik in opreme, ki so jih raziskovalci pri analizi uporabljali, med rezultati različnih laboratorijev so se pojavljale razlike v dolžini enakih alelov. Za lažjo primerjavo med rezultati smo zato mikrosatelitske lokuse izrazili z razliko med daljšim in krajšim alelom.

V raziskavi, ki so jo izvedli Sefc in sod. (2000), je bilo z 9 mikrosatelitskimi lokusi analiziranih 161 lokalnih sort iz Avstrije, Nemčije, Francije, Portugalske, Hrvaške, Grčije, Španije in Italije. V analizo sta bile vključeni tudi sorti 'Teran' iz Hrvaške in 'Refosco peduncolo rosso' iz Italije. Vzorec sorte 'Teran' so pridobili ali iz Inštituta za kmetijstvo in turizem iz Poreča ali iz Fakultete za kmetijstvo iz Zagreba. Ker je bil genotip omenjenega vzorca enak genotipu sorte 'Refošk' na vseh 5 mikrosatelitskih lokusih, analiziranih v okviru naše raziskave (lokus VVMD32 v raziskavi Sefc in sod. (2000) ni bil analiziran), smo njihove rezultate uporabili za izdelavo binarne matrike in s pomočjo programa NTSYS v2.0 (Rohlf, 1998) izrisali dendrogram na osnovi Jaccardovega koeficienta podobnosti in metode UPGMA ter tako pridobili informacijo o uvrščenosti sorte 'Refošk' glede na ostale evropske sorte vinske trte, ki so bile vključene v analizo Sefc in sod. (2000). Podatki iz omenjene študije so na voljo v italijanski podatkovni zbirki (Grape ..., 2002).

3.1.6 Molekulski markerji AFLP

Analizo z markerji AFLP smo izvedli po nekoliko spremenjenem prvotnem postopku, kot so ga določili Vos in sod. (1995). Podroben opis analize sledi v nadaljevanju. Analiza AFLP je sestavljena iz štirih korakov: restrikcija, ligacija, namnoževanje z neselektivnimi začetnimi oligonukleotidi ali predamplifikacija ter selektivna amplifikacija ali namnoževanje s selektivnimi začetnimi oligonukleotidi, ki so običajno podaljšani za 1 do 3 selektivne nukleotide. V kolikor v nadaljevanju ni drugače navedeno, so encimi in kemikalije od proizvajalca Fermentas/Thermo Scientific.

3.1.6.1 Restrikcija

Restriksijska mešanica, v končnem volumnu 40 µl, je vsebovala 500 ng DNA, 3 enote restriksijskega encima *Pst*I (ER0611), 3 enote restriksijskega encima *Tru*1I (ER0981), ki je izošizomera restriksijskega encima *Mse*I, in 1X koncentracijo pufru R (10X Buffer R).

Restrikcija je potekala 120 minut pri 37 °C (optimalna temperatura *Pst*I encima) in 120 minut na 65 °C (optimalna temperatura *Tru*I encima).

3.1.6.2 Ligacija

V tem koraku v restriksijsko mešanico dodamo adapterje. To so dvoverižne DNA molekule, ki se jih pripravi s hibridizacijo dveh komplementarnih oligonukleotidov in predstavljajo mesto prileganja za začetne oligonukleotide. Seznam oligonukleotidov z nukleotidnim zaporedjem je podan v preglednici 5. Adapterje *Pst*I smo pripravili tako, da smo vsakega oligonukleotida z založno koncentracijo 500 mM vzeli po 1 µl, ter raztopino dopolnili do končnega volumna 100 µl. Adapterje *Mse*I smo pripravili tako, da smo vsakega oligonukleotida, prav tako z založno koncentracijo 500 mM, vzeli po 10 µl in raztopino dopolnili do 100 µl. Tako smo dobili adapterje *Pst*I v koncentraciji 5 µM ter adapterje *Mse*I v koncentraciji 50 µM. Tako pripravljeno raztopino smo nato izpostavili sledečemu temperaturnemu profilu:

- začetna 5 minutna denaturacija pri 95 °C,
- sledilo je 25 temperaturnih stopenj, pri čemer se je temperatura od začetnih 70 °C na vsake 2 min znižala za 2 °C,
- 60 min pri 20 °C,
- sledilo je 8 temperaturnih stopenj, pri čemer se je temperatura od začetnih 20 °C na vsake 3,5 min znižala za 1 °C.

Ligacijska mešanica je bila sestavljena iz 50 pmol *Mse*I adapterjev, 5 pmol *Pst*I adapterjev, 1 µl 10x ligaznega pufra (10X T4 DNA ligase buffer), 1 enoto T4 ligaze (EL0014) in ker puffer, ki smo ga uporabili za restrikcijo nima dodanega ATP, smo za 40 µl restriksijske mešanice dodali ATP do končne koncentracije 0,5 mM. Ligacijsko mešanico smo 60 min inkubirali pri 22 °C in reakcijo zaključili z 10 minutno inkubacijo pri 65 °C.

Preglednica 5: Seznam oligonukleotidov za izdelavo adapterjev.

Table 5: List of oligonucleotides for adapters formation.

Oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje oligonukleotidov v smeri 5'-3'
<i>Mse</i> I adapter	
<i>Mse</i> I 1	GAC GAT GAG TCC TGA G
<i>Mse</i> I 2	TAC TCA GGA CTC AT
<i>Pst</i> I adapter	
<i>Pst</i> I 1	CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA
<i>Pst</i> I 2	TGT ACG CAG TCT AC

3.1.6.3 Namnoževanje z neselektivnimi začetnimi oligonukleotidi ali predamplifikacija

Predamplifikacijska mešanica je vsebovala 50 ng DNA (5 µl restrikcijsko-ligacijske mešanice), *Pst*I in *Mse*I neselektivna začetna oligonukleotida (nukleotidno zaporedje je v preglednici 7) v končni koncentraciji 0,2 µM, 0,2 mM koncentracija vsakega deoksiribonukleotid trifosfata, 2 mM MgCl₂, 1X *Taq* pufer z (NH₄)₂SO₂ ter 1,25 enote *Taq* DNA polimeraze (EP0401).

Namnoževanje je potekalo po sledečem temperaturnem profilu:

- 2 minuti pri 72 °C (v tem koraku *Taq* DNA polimeraza vzpostavi fosfodiestrsko vez med 3' koncem tarčne DNA in 5' koncem adapterja. Ligaza namreč te vezi ne popravi, ker so 5' konci sintetiziranih oligonukleotidov brez fosfatne skupine)
- sledi 20 ciklov s ponavljanjem
 - a) 30 sekund pri 94 °C
 - b) 30 sekund pri 56 °C
 - c) 60 sekund pri 72 °C
- končna inkubacija vzorcev 8 minut pri 72 °C.

Predamplifikacijsko mešanico smo 10 krat razredčili z deionizirano vodo.

3.1.6.4 Namnoževanje s selektivnimi začetnimi oligonukleotidi in detekcija namnoženih fragmentov

Reakcijska mešanica za selektivno namnoževanje v končnem volumnu 10 µl je vsebovala 2 µl 10X razredčene predamplifikacijske mešanice, 1X *Taq* pufer z (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM vsakega deoksiribonukleotid trifosfata, 0,2 µM fluorescentno označenega selektivnega *Pst*I začetnega oligonukleotida (Applied Biosystems), 0,2 µM *Mse*I začetnega oligonukleotida in 0,25 enote *Taq* DNA polimeraze (EP0401).

Preden smo analizo AFLP izvedli na vseh vzorcih, smo predhodno na 8 vzorcih testirali 56 kombinacij začetnih oligonukleotidov (*Pst*I s sledečimi selektivnimi nukleotidi: ATA, AAC, AGA in ACA; ter *Mse*I s sledečimi selektivnimi nukleotidi: AG, CG, CA, AC, CC, CTT, CAT, CAA, CAG, CAC, CTG, CTA, CTC in ACC) in se po pregledu elektroferogramov in števila namnoženih fragmentov, odločili za 8 kombinacij (preglednica 6). Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov je v preglednici 7.

Preglednica 6: Seznam kombinacij začetnih oligonukleotidov za selektivno namnoževanje in kombinacije združevanja pred kapilarno elektroforezo.

Table 6: List of primer combinations, which were used for selective amplification and combinations of multiplexing samples prior to capillary electrophoresis.

Kombinacije začetnih oligonukleotidov	Kombinacije združevanja pred kapilarno elektroforezo
6-FAM-P-AGA/M-CTT	A
VIC-P-AAC/M-CTG	A
6-FAM-P-AGA/M-CAT	B
VIC-P-AAC/M-AG	B
PET-P-ATA/M-CAA	B
6-FAM-P-AGA/M-AG	C
VIC-P-AAC/M-CTC	C
PET-P-ATA/M-CTT	A

Preglednica 7: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za predamplifikacijo in selektivno amplifikacijo.

Table 7: List of primers, used in preamplification and selective amplification.

Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov v smeri 5'-3'
Začetni oligonukleotidi za preamplifikacijo	
<i>PstI</i>	GACTGCGTACATGCAG
<i>MseI</i>	GATGAGTCCTGAGTAA
Začetni oligonukleotidi za selektivno amplifikacijo	
<i>PstI</i> +AAC	GACTGCGTACATGCAGAAC
<i>PstI</i> +AGA	GACTGCGTACATGCAGAGA
<i>PstI</i> +ATA	GACTGCGTACATGCAGATA
<i>MseI</i> +AG	GATGAGTCCTGAGTAAAG
<i>MseI</i> +CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA
<i>MseI</i> +CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT
<i>MseI</i> +CTC	GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
<i>MseI</i> +CTG	GAT GAG TCC TGA GTA ACT G
<i>MseI</i> +CTT	GAT GAG TCC TGA GTA ACT T

Namnoževanje s selektivnimi začetnimi oligonukleotidi je potekalo po sledečem temperaturnem profilu:

- začetna 2,5 minutna denaturacija pri 94 °C
- sledilo je 13 ciklov, pri čemer se je po vsakem ciklu temperatura prileganja znižala za 0,7 °C
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 30 sekund pri 65 °C (-0,7 °C/cikel),
 - c) 60 sekund pri 72 °C,
- sledilo je 24 ciklov s ponavljanjem,
 - a) 30 sekund pri 94 °C,

- b) 30 sekund pri 56 °C,
- c) 60 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 10 min pri 72 °C.

Po selektivnem namnoževanju smo posamezne produkte PCR z različnimi fluorescentnimi barvili združili v skupno mešanico (1:1:1:1) (preglednica 6) in vzorce za kapilarno elektroforezo pripravili tako, da smo od vsakega vzorca prenesli 1 µl nastale mešanice na 96 mestno PCR ploščo za ABI sekvenator ter vsakemu vzorcu dodali 10,7 µl formamida (Hi-DiTM Formamide, Applied Biosystems) ter 0,3 µl velikostnega standarda (GeneScanTM 500 LIZTM Size Standard, Applied Biosystems). Vzorce smo pred nanosom na sekvenator denaturirali, tako da smo jih inkubirali 5 minut pri 95 °C. Polimer, kapilare in tehnične nastavitve sekvenatorja so bile enake, kot pri analizi mikrosatelitov. Dolžino namnoženih produktov smo določili z algoritmom programskega paketa GeneMapper v4.1.

3.1.6.5 Statistična obdelava podatkov

Glede na odsotnost ali prisotnost markerja smo rezultate pretvorili v binarno matriko. S programskim paketom NTSYS v2.0 (Rohlf, 1998) smo genetsko podobnost med vzorci določili s koeficientom enostavnega ujemanja (ang. simple matching coefficient) ter z metodo UPGMA vzorce združili v sorodstvene skupine. Pri metodi UPGMA oziroma netehtana aritmetična sredina parnih skupin je razdalja med dvema skupinama izračunana kot povprečje razdalj vseh parov iz dveh različnih skupin (Electronic ..., 2013).

Formula za izračun koeficienta enostavnega ujemanja

$$\frac{a + d}{a + b + c + d} = \frac{a + d}{n}$$

... (1)

Kjer je:

- a – število lokusov prisotnih pri vzorcu i in j
- b – število lokusov prisotnih pri vzorcu j in pri vzorcu i odsotnih
- c – število lokusov prisotnih pri vzorcu i in pri vzorcu j odsotnih
- d – število lokusov odsotnih pri vzorcih i in j
- n – število vseh namnoženih lokusov

Koeficient enostavnega ujemanja upošteva tako markerje, ki so skupni (pri obeh 1) in ki so odsotni pri obeh vzorcih (pri obeh 0) ter na ta način maksimira informacijsko vrednost markerjev AFLP. Jaccardov koeficient upošteva markerje AFLP, ki so prisotni vsaj pri enem od dveh vzorcev ($a/(a+b+c)$), medtem ko Dice-ov koeficient podobnosti v primerjavi z Jaccardovim, da večjo težo markerjem, ki so skupni obema vzorcema ($2a/(2a+b+c)$) (Bonin in sod., 2007).

3.1.6.5.1 Povprečna genska raznolikost vseh lokusov

Povprečna genska raznolikost vseh lokusov (ang. average gene diversity over loci) je bila določena s pomočjo formule po Nei (1987) in izračunana s programom Arlequin (Excoffier in Lischer, 2010).

Povprečna genska raznolikost vseh lokusov (tudi nukleotidna diverziteteta) je izračunana kot možnost, da sta dve naključno izbrani homologni mesti različni. Izračun je enakovreden tudi za gensko raznolikost na nukleotidnem nivoju.

Povprečno število razlik med vsemi pari haplotipov v vzorcu:

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j>i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L} \quad \dots (2)$$

Varianca:

$$V(\hat{\pi}_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \hat{\pi}_n + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} \hat{\pi}_n^2 \quad \dots (3)$$

Standardni odklon:

$$s.d.(\hat{\pi}_n) = \sqrt{V(\hat{\pi}_n)} \quad \dots (4)$$

Kjer je:

p_i - frekvenca haplotipa i

p_j - frekvenca haplotipa j

$\hat{d}_{ij}$ - ocena števila mutacij, ki so se zgodile med divergenco haplotipov i in j

L – število vseh lokusov

k - število haplotipov

n - velikost vzorca.

3.2 AMPELOGRAFSKO PROUČEVANJE BIOTIPOV PO OIV DESKRIPTORJIH

Glede na rezultate analize AFLP smo določili 12 biotipov sorte 'Refošk' posajenih v selekcijskem vinogradu v Komnu in jih v času pred trgatvijo (7. 9. 2011) ovrednotili z 22 OIV deskriptorji agronomsko pomembnih lastnosti, ki se nanašajo na lastnosti jagod in grozdov ter kemijske lastnosti mošta. Namen preučevanja je bil ugotoviti razlike med biotipi ter ugotoviti ali obstaja povezava med izbranimi lastnostmi in markerji AFLP. Opisovanje posameznih lastnosti je potekalo na naključno izbranih 10 mladikah s treh do petih trsov po navodilih Mednarodnega urada za vinsko trto in vino OIV (OIV ..., 2009), razen pri določanju vsebnosti sladkorja, titrabilnih kislin in pH vrednosti, kjer smo namesto

vseh grozdov iz 10 mladik, analizo izvedli le na 100 naključno odbranih jagodah. Podatki so zato uporabni le za primerjavo med biotipi, nikakor pa ne za primerjavo s proizvodnjo te sorte na danem območju.

3.2.1 Proučevanje lastnosti grozdov in jagod ter izplena mošta

Velikost grozda (OIV 202) smo določili tako, da smo izračunali povprečje 10 grozdov, pri čemer smo izbirali največje grozde s posamezne mladike in izmerili razdaljo med najvišjo in najnižjo jagodo. Pri določanju širine grozda (OIV 203) smo izmerili največjo razdaljo med stranskimi jagodami. Masa posameznega grozda (OIV 502) smo določili z izračunano povprečne mase 10 največjih grozdov. Dolžino peclja (OIV 206) smo določili tako, da smo 10 grozdom izmerili razdaljo med vrhom peclja in med prvim pecljem jagod. Zbitost (OIV 204) in obliko grozdov (OIV 208) smo določili s pomočjo podanih opisnih možnosti (1 - zelo rahel, 3 – rahel, itd). Razvejanost grozdov (OIV 209) smo določili s štetjem stranskih vej v 10 največjih grozdih. S pomočjo opisnih možnosti smo določili tudi olesenelost peclja (OIV 207) in sicer na vseh grozdih z 10 mladik.

Velikost (OIV 220), širino (OIV 221) in obliko (OIV 223) jagod smo določili tako, da smo izmerili dolžino, širino ter določili obliko glede na osnovi podanih možnosti tridesetim nedeformiranim jagodam, vzetih iz sredinskega dela 10 grozdov. Izenačenost velikosti jagod (OIV 222) smo opazovali na 10 grozdih in jo določili na podlagi podanih opisnih možnosti. Na enak način izbranim jagodam smo določili barvo kože (OIV 225) s pomočjo podanih opisnih možnosti, izenachenost barve kože (OIV 226), intenzivnost barve mesa (OIV 231), dolžino pecljev posamezne jagode (OIV 238) ter stopnjo ločljivosti peclja oziroma čvrstost spoja med jagodo in pecljem (OIV 240). Težo posamezne jagode (OIV 503) smo določili s tehtanjem 30 značilnih jagod s 5 grozdov. Izplen mošta (OIV 233) smo določili z izračunom razmerja med težo mošta iztisnjenega iz 100 jagod in težo predhodno stehtanih 100 jagod.

3.2.2 Določevanje vsebnosti sladkorjev, titrabilnih kislin in pH vrednosti

Vsebnost sladkorja v moštu (OIV 505) smo določili v moštu iz naključno odbranih 100 jagod z refraktometrom model RHB-32ATC. Vsebnost kislin v moštu (OIV 506) smo določili s titracijo z 0,1 M raztopino NaOH in vsebnost kislin izrazili kot gram vinske kisline na liter. Prav tako smo v moštu iz 100 jagod s pH metrom (Thermo Scientific Orion 3-star benchtop pH meter) določili vrednost pH v moštu.

3.2.3 Statistična obdelava podatkov

Ugotovljene povprečne vrednosti smo pri vsakem deskriptorju pretvorili v ustrezen razred na številčni lestvici po mednarodno dogovorjenih navodilih Mednarodnega urada za vinsko

trto in vino (OIV ..., 2009). Dendrogram na osnovi ampelografskih podatkov smo izdelali z uporabo programa NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1998) in sicer z izračunom koeficienta povprečne taksonomske razdalje (DIST) za intervalne kvantitativne podatke in z metodo UPGMA. Formula za izračun povprečne taksonomske razdalje:

$$E_{ij} = \sqrt{\sum_k \frac{1}{n} (X_{ki} - X_{kj})^2}$$

... (5)

Kjer je:

E_{ij} – povprečna taksonomska razdalja

$\sum_k$ – vsota vrednosti za lastnost k

X_{ki} – vrednost lastnosti k za OTU (operativna taksonomska enota) i

X_{kj} – vrednost lastnosti k za OTU j

n – število lastnosti.

3.3 INDEKSIRANJE

Indeksiranje smo izvedli, da bi ugotovili ali se znamenja bolezní razbrazdanja po cepljenju pojavijo pri istih biotipih sorte 'Refošk' kot v kolekcijskem vinogradu v Komnu. S tem bi potrdili, da se povzročitelj bolezní razbrazdanja lesa prenaša s cepljenjem. Trte se običajno razmnožuje s cepilnim materialom, ki je v mirovanju. Zato nas je zanimalo tudi, če se znamenja bolezní razbrazdanja lesa pojavijo pri cepljenju zeleno na zeleno in v kolikem času po cepljenju lahko pričakujemo pojav znamenj. Drug cilj indeksiranja je bil ugotoviti ali se znamenja razbrazdanja lesa pojavijo tudi pri cepljenkah, pri katerih smo mladiko prerezali in ponovno združili. Slednji poskus bi pokazal ali je razvoj bolezní razbrazdanja lesa posledica inkompatibilnosti ali pa se znamenja morda pojavijo zaradi bioloških procesov, ki jih sproži stres, povzročen pri cepljenju oz. se pojavijo zaradi sinergističnega učinka stresa in okužbe s patogeni.

3.3.1 Rastlinski material za indeksiranje

Cepilni material smo pridobili v kolekcijskem vinogradu v Komnu. Certificirano podlago SO4 smo pridobili v Trsničarski zadrugi Vrhpolje. Seznam trt, ki smo jih uporabili za indeksiranje je v preglednici 8.

Podlaga SO4 se v selekciji vinske trte ne uporablja kot uraden indikator, vendar ker so trte v kolekcijskem vinogradu cepljene na SO4 in le ta kaže znamenja bolezní razbrazdanja lesa, smo hoteli ugotoviti ponovljivost pojava znamenj glede na stanje v vinogradu.

Preglednica 8: Seznam trt sorte 'Refošk', ki so bili uporabljene za indeksiranje ter ugotovljena prisotnost ali odsotnost znamenj bolezní razbrazdanja lesa v kolekcijskem vinogradu v Komnu.

Table 8: List of 'Refošk' vines, which were used for biological indexing and results of a field survey in the collection vineyard in Komen on rugose wood symptoms.

Oznaka trte v kolekcijskem vinogradu	Opažena znamenja	
	sorta 'Refošk' (cepič)	SO4 (podlaga)
'Refošk' 43 VIII/113	- ^a	-
'Refošk' 61 XII/68	-	-
'Refošk' 38 VIII/44	+ ^b	-
'Refošk' 48 IX/43	+	-
'Refošk' 20 IV/110	-	+
'Refošk' 51 IX/69	-	+

^a znamenja bolezní odsotna, ^b znamenja bolezní prisotna

Za indeksiranje smo izbrali trse, ki v vinogradu kažejo znamenja bolezní razbrazdanja lesa na žlahtnem delu, to sta trsa biotipov 'Refošk' 38 in 'Refošk' 48; trsa, ki v vinogradu povzročata znamenja bolezní razbrazdanja lesa na podlagi SO4, to sta trsa biotipov 'Refošk' 20 in 'Refošk' 51 in trsa biotipov 'Refošk' 43 in 'Refošk' 61, ki smo jih izbrali za kontrolo, ker v vinogradu ne kažeta znamenj razbrazdanja (preglednica 8). Slika 1 prikazuje znamenja razbrazdanja na treh trtah biotipa 'Refošk' 38.



Slika 1: Znamenja razbrazdanja na trtah bitipa 'Refošk' 38.

Figure 1: Symptoms of rugose wood symptoms on vines of the 'Refošk' 38 biotype

3.3.2 Izvedba indeksiranja

Indeksiranje smo izvedli 12. junija 2009 v Seleksijsko trsničarskem središču Vrhpolje s tehniko cepljenja zeleno na zeleno in sicer z navadnim spajanjem ali kopulacijo, kot je opisano v Tomažič (2002). Seznam cepilnih kombinacij je v preglednici 9.

Ker smo želeli ugotoviti ali je vzrok za razvoj bolezní inkompatibilnost smo izvedli cepljenje, pri katerem smo mladike iz izbranih trsov (preglednica 8) prerezali in ponovno združili. Pri cepljenkah iz trsov 'Refošk' 38 VIII/44 in 'Refošk' 48 IX/43 smo znamenja pričakovali na cepiču, podlagi ali na obeh delih. Ker na trséh 'Refošk' 20 IV/110 in 'Refošk' 51 IX/69 v vinogradu nismo opazili znamenj, jih tudi pri indeksiranju nismo pričakovali. Prav tako nismo pričakovali znamenj razbrazdanja lesa pri cepljenkah iz kontrolnih trsov 'Refošk' 43 VIII/113 in 'Refošk' 61 XII/68.

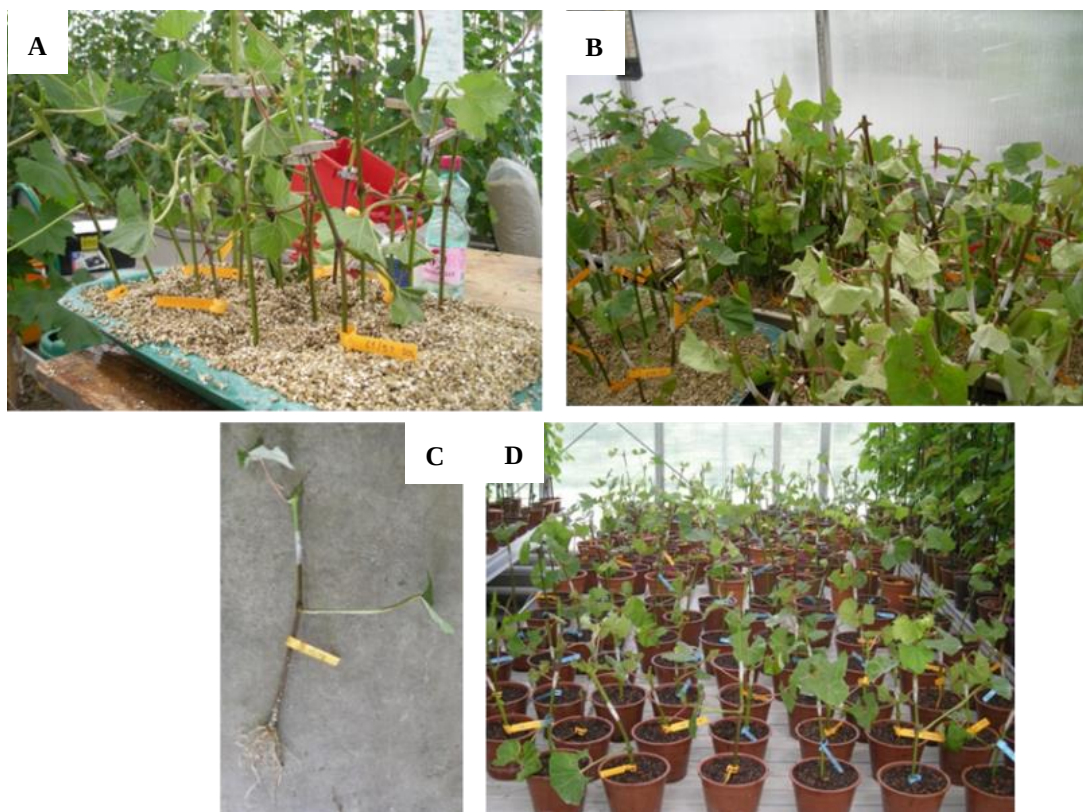
Preglednica 9: Seznam cepilnih kombinacij in število cepljenk po cepljenju.

Table 9: List of combinations for biological indexing and number of grafts.

Cepljenke s spojenimi lastnimi deli	Število cepljenk	Cepljenje na SO4	Število cepljenk
'Refošk' 61/ 'Refošk' 61	10	'Refošk' 61/SO4	10
'Refošk' 43/ 'Refošk' 43	10	'Refošk' 43/SO4	10
'Refošk' 38/ 'Refošk' 38	10	'Refošk' 38/SO4	10
'Refošk' 48/ 'Refošk' 48	10	'Refošk' 48/SO4	8
'Refošk' 20/ 'Refošk' 20	11	'Refošk' 20/SO4	12
'Refošk' 51/ 'Refošk' 51	11	'Refošk' 51/SO4	10
SO4/SO4	10		

Podlago smo pripravili iz mladice, ki smo jo spodaj odrezali tik pod očesom (na peto), zgoraj pa smo nad naslednjim očesom pustili dovolj dolg internodij, da smo lahko nanj cepili cepič. Da bi zmanjšali transpiracijo, smo del lista odrezali. Cepilno zvezo smo učvrstili z manjšimi ščipalkami ali belim trakom za prvo pomoč.

Podlago cepljenke smo tretirali z naftalen očetno kislino (rastlinski rastni hormon avksin) (pripravek: Germon, Bewurzelungspuder – H (E. Gerlach GmbH, Lübecke, Nemčija). Cepljenke smo nato podtaknili v vermikulit in jih postavili v kalilnik z avtomatskim uravnavanjem temperature (28 °C) in relativne zračne vlage (85 %) (slika 2B). Po 34 dneh (17. 6.) smo ukoreninjene cepljenke (slika 2C) presadili v cvetlične lončke z univerzalnim substratom in jih namestili na mizo s potopnim namakalnim sistemom (slika 2D). Cepljenke smo v letu 2009 in 2010 v rastni dobi mesečno pregledovali, medtem ko smo jih v zadnjih dveh letih pregledali samo ob koncu aktivne dobe v začetku septembra. Septembra 2012 smo cepljenke ob zadnjem pregledu avtoklavirali in odstranili lub.



Slika 2: Cepljenke potaknjene v vermikulit (A); cepljenke v kalilniku (B); cepljenke z razvitim koreninskim sistemom 34 dni po cepljenju (C); ter cepljenke na namakalni mizi (D).

Figure 2: Grafts planted in vermiculite (A); grafts in a humid chamber (B); grafts with well developed roots 34 days after grafting (C); and grafts on the controlled water table for constant irrigation (D).

3.4 ANALIZA IZRAŽENOSTI GENOV

3.4.1 Cepljenje zeleno na zeleno

Cepljenje za potrebe analize izraženosti genov smo izvedli 20. avgusta 2010 v Selekcijsko trsničarskem središču Vrhpolje. Cepljenje je bilo izvedeno po enakem postopku kot je opisano v poglavju o indeksiranju. Prav tako so bile narejene enake cepilne kombinacije in pri vsaki cepilni kombinaciji smo naredili po 12 cepljenk (9 smo jih potrebovali, 3 smo naredili za rezervo).

Tkivo za izolacijo RNA smo vzorčili 3, 7 in 14 dni po cepljenju in sicer tako, da smo trem cepljenkam iz vsakega obravnavanja (3 biološke ponovitve) s škarjami za rez sadnih rastlin odrezali 1,5 cm nad in 1,5 cm pod cepljenim mestom (pri cepilni kombinaciji s spojenimi lastnimi deli smo odrezan cepič in podlago shranili v skupni centrifugirki, medtem ko smo pri cepilni kombinaciji 'Refošk' na podlago SO4, cepič in podlago shranili v ločenih

centrifugirkah) ter vzorce takoj zamrznili v tekočem dušiku. Vzorce smo nato do izolacije RNA hranili v zmrzovalni skrinji pri -80 °C.

RNA smo izolirali iz vseh vzorčenih cepljenk, medtem ko smo za analizo izraženosti genov uporabili samo RNA iz 2 cepilnih kombinacij, pri katerih so bili spojeni lastni deli mladik. Za ugotavljanje edinstveno izraženih genov, ki bi lahko bili odgovorni za razvoj bolezní razbrazdanja lesa smo uporabili cepljenke iz rastlinskega materiala vzetega iz trsa 'Refošk' 38 VIII/44. Trs 'Refošk' 38 VIII/44 v kolekcijskem vinogradu kaže znamenja razbrazdanja lesa (preglednica 8). Za kontrolo smo določili cepljenke z rastlinskim materialom iz trsa 'Refošk' 43 VIII/113, ki v kolekcijskem vinogradu v Komnu ne kaže znamenj bolezní razbrazdanja lesa.

3.4.2 Izolacija RNA

RNA smo izolirali s komercialnim kitom Spectrum plant total RNA kit (Sigma Aldrich) po navodilih proizvajalca.

Izolacija je potekala po sledečem protokolu:

- s skalpelom smo v terilnico nastrgali približno 100 mg kambija z zamrznjenega dela cepiča in/ali podlage in s ga s pomočjo tekočega dušika strli,
- material smo prenesli v 2 ml centrifugirko, dodali 500 µl lizneg pufra (liznemu pufu je pred uporabo potrebno dodati 2-merkaptetanol in sicer 10 µl na 1 ml), stresali na vorteksu 30 sekund in inkubirali vzorec za 5 minut pri 56 °C,
- po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 3 minute pri maksimalni hitrosti v centrifugi Eppendorf 5430 R,
- supernatant smo odpipetirali na filtracijsko kolono (ang. filtration column), ki je bila nameščena na novi 2 ml centrifugirki (priložena kompletu) in centrifugirali 1 minuto pri največji hitrosti,
- prefiltrirani lizni raztopini smo dodali 500 µl vezavne raztopine (ang. binding solution) ter dobro premešali,
- 700 µl raztopine smo odpipetirali na vezavno kolono (ang. binding column), ki je bila nameščena na novi 2 ml centrifugirki (priložena kompletu) in centrifugirali 1 minuto pri največji hitrosti,
- tekočino smo po centrifugiranju zavrgli in na vezavno kolono odpipetirali preostalo tekočino iz prešnjega koraka ter postopek ponovili,
- na vezavno kolono smo odpipetirali 500 µl prve raztopine za čiščenje (ang. wash solution 1) ter centrifugirali 1 minuto pri največji hitrosti,
- sledilo je čiščenje z drugo raztopino (ang. wash solution 2), ki ji je bilo potrebno predhodno dodati etanol). 500 µl raztopine za čiščenje smo odpipetirali na kolono in centrifugirali 30 sekund pri največji hitrosti, po tem smo tekočino zavrgli in ponovili čiščenje,

- po čiščenju smo vzorec centrifugirali 1 minuto na največji hitrosti, da so se s kolone odstranili še zadnji ostanki tekočine,
- vezavno kolono smo prenesli na novo 2 ml centrifugirko in nanjo odpipetirali 50 μ l elucijske raztopine (ang. elution solution), počakali 1 minuto ter centrifugirali 1 minuto pri največji hitrosti,
- tako pripravljeno izolirano RNA smo do nadaljnjih analiz shranili na -80 °C.

3.4.3 Kontrola integritete RNA ter določevanje RNA koncentracije

Integriteto izolirane RNA smo preverili na 1,5 % agaroznem gelu. Gel je bil izpostavljen električnemu toku 1,5 ure z napetostjo 4 V/cm razdalje med elektrodama.

Koncentracijo izolirane RNA smo določili s spektrofotometrom Epoch in Take3 ploščo, ki omogoča meritve v volumnu 3 μ l. Odčitali smo absorbanco pri 260 nm in pri 280 nm in poleg koncentracije izračunali tudi A260/A280 razmerje.

3.4.4 Identifikacija diferenčno izraženih transkriptov

Diferenčno izražene transkripte smo ugotavljali med cepljenkami s spojenimi lastnimi deli mladik iz trsov 'Refošk' 38 VIII/44 in 'Refošk' 43 VIII/113. S pomočjo kita za ugotavljanje edinstveno izraženih genov (GeneFishingTM DEG Premix Kit, Seegene) smo produkte PCR na agaroznem gelu primerjali med cepljenkami, vzorčenih v enakih časovnih obdobjih po cepljenju. GeneFishingTM DEG Premix Kit deluje na principu Seegen-ove tehnike z nadzorovanim prileganjem začetnih oligonukleotidov ali tehnike ACP (ang. annealing control primer) (Hwang in sod., 2003). Posebnost tehnike je v tridelni sestavi začetnih oligonukleotidov: tarčno zaporedje na 3' koncu, univerzalno zaporedje na 5' koncu ter regulatorno zaporedje, ki se nahaja v osrednjem delu. Tarčno zaporedje na 3' koncu dt-ACP1 začetnega oligonukleotida pri reakciji RT-PCR prileže na poliadeninski rep mRNA, medtem ko zaporedje na 5' koncu predstavlja priležno mesto za dt-ACP2 začetni oligonukleotid v 2. koraku pri namnoževanju komplementarne DNA v reakciji PCR. V 2. koraku sodeluje še eden od ACP začetnih oligonukleotidov, ki imajo 10 mestno tarčno zaporedje določeno naključno (ang. arbitrary primer). V 1. ciklu reakcije PCR poteka prileganje tarčnega zaporedja ACP začetnega oligonukleotida pri 50 °C, kar je dovolj visoko, da je preprečeno prileganje tarčnega zaporedja dt-ACP2. Temperatura prileganja pri nadaljnjih ciklih je nastavljena na 65 °C. Pri tej temperaturi je omogočeno prileganje le univerzalnih zaporedij ACP in dt-ACP2 začetnih oligonukleotidov. S tem je zagotovljeno, da se v naslednjih ciklih reakcije PCR namnožujejo samo dvoveržni fragmenti, ki so nastali v reakciji RT-PCR in v 1. ciklu reakcije PCR. Laboratorijsko delo je potekalo po navodilih proizvajalca.

Reakcijo za reverzno transkripcijo smo pripravili na sledeč način:

- v centrifugirko smo dali 1,5 µg RNA, 2 µl 10 µM dT-ACP1 začetnega oligonukleotida in z ribonukleazami prosto vodo dopolnili do končnega volumna 9,5 µl,
- centrifugirko smo dobro pretresli in jo na cikličnem termostatu inkubirali 3 minute pri 80 °C. Po pretečenem času smo centrifugirko nemudoma ohladili na ledu za 2 minuti in jo na hitro centrifugirali,
- v ohlajeno centrifugirko smo dodali 10,5 µl pripravljene reakcijske mešanice, ki je vsebovala: 4 µl 5X RT pufra, 5 µl 2 mM deoksiribonukleotid trifosfatov, 0,5 µl (20 enot) inhibitorja ribonukleaz (RNase inhibitor, 40 enot/µl, Promega) ter 1 µl (200 enot) M-MLV reverzne transkriptaze (200 enot/µl),
- centrifugirko smo inkubirali 90 minut na 42 °C in 2 minuti na 94 °C,
- po pretečenem času smo centrifugirko na ledu ohladili, dodali 80 µl z deoksiribonukleazami proste vode ter shranili pri -20 °C.

Reakcijska mešanica za »GeneFishing« PCR v končnem volumnu 20 µl je vsebovala 5 µl razredčene komplementarne DNA (pridobljene po reverzni transkripciji), 0,5 µM selektivnega ACP začetnega nukleotida, 0,5 µM dT-ACP2 začetnega oligonukleotida, 2 µl destilirane vode in 10 µl 2X SeeAmpTM ACPTM Master Mix.

Pripravljene reakcijske posodice smo položili na predhodno ogret ciklični termostat na 94 °C in takoj pričeli PCR po sledečem temperaturnem profilu:

- začetna 5 minutna denaturacija pri 94 °C,
- 3 minute pri 50 °C,
- 1 minuta pri 72 °C,
- sledilo je 40 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 40 sekund pri 94 °C,
 - b) 40 sekund pri 65 °C,
 - c) 40 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 5 minut pri 72 °C.

3.4.5 Detekcija namnožene DNA ter izolacija diferenčno izraženih transkriptov iz agaroznega gela

Po namnoževanju smo DNA detektirali na 2 % agaroznem gelu z etidijevim bromidom. Na agarozni gel, debeline 4 mm smo nanесли 3 µl reakcijske mešanice, 1 µl 6x nanašalnega barvila in izpostavili električnemu toku za 2 uri z napetostjo 5 V/cm razdalje med elektrodama.

Diferenčno prikazane produkte PCR smo s skalpelom pod UV svetlobo izrezali iz agaroznega gela. DNA smo nato očistili s pomočjo kita Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (K0513, Fermentas/Thermo Scientific).

Izolacija DNA iz agaroznega gela je potekala po sledečem protokolu:

- izrezan delček agaroznega gela smo prenesli v predhodno stehtano 1,5 ml centrifugirko in centrifugirko ponovno stehtali ter tako določili maso delčka agaroznega gela (povprečna masa delčkov je bila od 20 do 50 mg),
- v centrifugirko smo dodali TBE conversion buffer v $\frac{1}{2}$ volumnu (volumen:masa) mase agaroznega delčka, ter 4,5 volumne vezavnega pufra (ang. binding buffer),
- v centrifugirko smo dodali 2,5 μ l resuspenziranih delcev silicijevega dioksida (ang. silica powder suspension) in inkubirali 5 minut pri 55 °C z občasnim mešanjem, tako da je bil silicijev prah vedno v suspenziji. V tem času je potekla vezava DNA na delce silicijevega dioksida,
- centrifugirko smo nato na hitro za 5 sekund centrifugirali, da je nastala usedlina in supernatant previdno odpipetirali ter ga zavrgli,
- dodali smo 500 μ l ledeno hladnega pufra za čiščenje (ang. washing buffer), ki smo ga predhodno razredčili z etanolom in delce silicijevega dioksida ponovno resuspenzirali, za 5 sekund centrifugirali, odpipetirali supernatant in ga zavrgli. Slednji postopek smo ponovili še dvakrat,
- po končanem tretjem čiščenju smo centrifugirko pustili odprto za 10 do 15 minut, da je izhlapel preostali etanol,
- usedilno smo ponovno raztopili v 5 μ l deionizirane vode in inkubirali 5 minut pri 55 °C. Po kratkem centrifugiranju smo supernatant z DNA odpipetirali v novo centrifugirko, postopek še enkrat ponovili in DNA do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

3.4.6 Kloniranje izoliranih diferenčno prikazanih transkriptov

Kloniranje s plazmidi poteka v sledečih korakih: vstavljanje DNA v plazmid (ligacija), prenos plazmidov v bakterije (transformacija), prenos bakterij na tekoče gojišče za vzpostavitev odpornosti na antibiotik ter prenos bakterij na trdo gojišče.

a) Ligacija

DNA smo klonirali s plazmidi (pGEM^(R)-T Easy Vector Systems I, A1360, Promega). Ligacijsko mešanico smo pripravili tako, da smo dodali 2,5 μ l ligacijskega pufra (2X Rapid Ligation Buffer), 0,5 μ l plazmida pGEM(R)-T Easy Vector, 0,5 μ l T4 DNA ligase (3 Weiss enote/ μ l) in 2 μ l DNA (izolirane iz agaroznega gela). Ligacija je potekala na 4 °C čez noč.

b) Transformacija

Dva mikrolitra ligacijske mešanice smo odpipetirali v sterilno 1,5 ml centrifugirko na ledu. K temu smo dodali 100 µl na ledu odtaljenih kompetentnih celic *E. coli* genotipa XL-10 Gold, centrifugirke nežno pretresili in jih položili na led za 30 minut. Centrifugirke smo nato za 45 sekund položili v vodno kopel na 42 °C in jih prestavili nazaj na led za 5 minut. S tem smo izvedli toplotni šok, zaradi katerega se poveča prepustnost bakterijskih membran in pride do povečanega sprejema plazmidov.

c) Prenos bakterij na tekoče in trdo gojišče

Po zaključeni transformaciji smo v centrifugirke dodali 900 µl LB gojišča (L1703, Duchefa Biochemie)¹ ogretega na sobno temperaturo in inkubirali s stresanjem (~ 150 obratov na minuto) 45 minut pri 37 °C. V tem koraku bakterije razvijejo odpornost na antibiotik ampicilin, ki je dodan trdemu gojišču.

100 µl gojišča smo nato razmazali na trdo gojišče in plošče inkubirali čez noč na 37 °C.

Trdo gojišče smo pripravili tako da smo v vodi raztopili 35 g LB gojišča z agarjem (LB Agar High Salt² L1706, Duchefa), 10 g agarja (Daishin agar, D1004, Duchefa), dopolnili z vodo do 1 l in avtoklavirali (20 minut pri 120 °C). Ko se je raztopina ohladila na približno 50 °C smo dodali IPTG (Duchefa) [0,2 mM iz založne raztopine s koncentracijo 0,1 M], X-GAL (Duchefa) [40 µg/ml, iz založne raztopine s koncentracijo 20 mg/ml], karbenicilin [150 mg/l, iz založne raztopine 100 mg/ml] ter gojišče vlili v petrijevke.

V kolikor po 24 urah ni prišlo do rasti kolonij, smo tekoče gojišče z bakterijami s prejšnjega dne centrifugirali 10 min na 1000 rcf. Po centrifugiranju smo v centrifugirki pustili približno 100 µl tekočega gojišča, ostalega smo s pipeto odstranili. Preostalo gojišče smo nato nanесли na trdo gojišče in inkubirali na 37 °C 24 ur.

3.4.7 PCR na osnovi bakterijske kolonije (ang. colony PCR)

Iz vsake plošče smo za PCR na osnovi kolonije prenesli do 7 kolonij.

PCR na osnovi bakterijske kolonije se uporablja, da preverimo, v katerih kolonijah se je uspešno namnožil insert ter kakšne dolžine je. Produkt PCR lahko po čiščenju uporabimo neposredno za sekvenčno reakcijo (s tem se izognemo prestavljanju kolonij v tekoče gojišče in izolaciji plazmidov).

¹ Trypton 10 g/l, Natrijev klorid 5 g/l, kvasni ekstrakt 5 g/l

² Trypton 10 g/l, natrijev klorid 10 g/l, kvasni ekstrakt 5 g/l, mikrobiološko testiran agar 10 g/l

V PCR reakcijske posodice smo dali 80 µl TdE pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)]. S konico pipetnega nastavka za pipetiranje volumnov 0,5-10 µl smo prenesli malo izbrane kolonije v TdE pufer in premešali s pipeto. Raztopino smo nato inkubirali 8 minut pri 96 °C. V tem koraku bakterijam popokajo celične stene in se izločijo plazmidi.

Reakcijska mešanica PCR v končnem volumnu 20 µl je vsebovala 5 µl DNA (iz prejšnjega koraka), 2 µl 10X PCR pufer z (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0,8 mM deoksiribonukleotid trifosfatov, 0,5 µM SP6 začetnega oligonukleotida, 0,5 µM T7 začetnega oligonukleotida ter 0,5 enote *Taq* DNA polimeraze (EP0401).

Namnoževanje je potekalo po sledečem temperaturnem profilu:

- začetna 3 minutna denaturacija pri 94 °C
- sledilo je 34 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 30 sekund pri 94 °C,
 - b) 30 sekund pri 55 °C,
 - c) 60 sekund pri 72 °C,
- končna inkubacija vzorcev 8 minut pri 72 °C.

Uspešnost namnoževanja smo preverili na 1,5 % agaroznem gelu pri čemer smo na gel nanesti 5 µl reakcijske mešanice in 1 µl 6X nanašalnega barvila (Fermentas/ThermoScientific). Preostanek reakcijske mešanice z uspešno namnoženim fragmentom smo očistili in uporabili za sekvenčno reakcijo.

3.4.8 Čiščenje reakcije PCR

V tem koraku iz reakcije PCR odstranimo začetne oligonukleotide. Čiščenje produkta PCR poteka v prisotnosti encima alkalna fosfataza, ki katalizira odstranitev fosfatne skupine s 5' konca DNA molekule in s 3' konca, v kolikor je na OH skupini vezana fosfatna skupina odstranjenega nukleotida, in encima eksonukleaza I, ki pri enoverižni DNA odstranjuje nukleotide v smeri 3'-5'.

Reakcija za izvedbo čiščenja v končnem volumnu 7 µl je vsebovala 4 µl reakcije PCR, 2 enoti eksonukleaze I (Exonuclease I 20 U/µl, EN0581, Fermentas/ThermoScientific), 0,5 enote alkalne fosfataze (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1U/µl, EF0654, Fermentas/ThermoScientific) in 1,4 µl 1X PCR pufra (Fermentas/ThermoScientific, 10-krat redčen 10X PCR pufer z (NH₄)₂SO₄).

Reakcijo smo inkubirali 45 minut pri 37 °C in zaključili z inkubacijo 15 minut pri 80 °C.

3.4.9 Sekvenčna reakcija

Sekvenčna reakcija v končnem volumnu 10 μ l je vsebovala 3,5 μ l očiščene DNA, 0,2 μ M T7 ali SP6 začetnega oligonukleotida, 0,5 μ l BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems), 2 μ l 5X pufra za sekvenciranje (5x Sequencing Buffer) in 3,8 μ l vode.

Sekvenčna reakcija je potekala po sledečem temperaturnem profilu:

- začetna 3 minutna denaturacija pri 96 °C,
- sledilo je 50 ciklov s ponavljanjem:
 - a) 10 sekund pri 96 °C,
 - b) 10 sekund pri 50 °C,
 - c) 4 minute pri 60 °C,
- končna 7 minutna inkubacija pri 72 °C.

3.4.10 Čiščenje sekvenčne reakcije s precipitacijo z etanolom in EDTA

V tem koraku se odstrani proste s fluorescentnimi barvili označene dideoksi nukleotide, kar pripomore k bolj čistemu singnalu pri kapilarni elektroforezi. Pred čiščenjem sekvenčne reakcije smo le to iz PCR reakcijskih posodic prenesli na 96 mestno ABI ploščo za sekvenator.

Čiščenje z etanolom in EDTA je potekalo po sledečem postopku:

- po prenosu na ploščo smo za kratek čas ploščo centrifugirali,
- dodali smo 2,5 μ l 125 mM EDTA pH 8,0 ter ponovno za kratek čas centrifugirali,
- dodali smo 30 μ l absolutnega etanola in ploščo prekrili s septo in aluminijasto folijo ter premešali tako, da smo ploščo 5 do 10 krat obrnili,
- ploščo smo inkubirali 15 minut na sobni temperaturi zaščiteno pred svetlobo,
- ploščo smo po konačni inkubaciji centrifugirali 55 minut pri maksimalni hitrosti (centrifuga je bila ohlajena na 4 °C),
- po centrifugiranju smo s hitrim gibom navzdol iz plošče odstranili etanol in EDTA,
- ploščo, obrnjeno navzdol in postavljeno na brisački, smo 2 minuti centrifugirali pri 190 x g,
- ploščo smo nato inkubirali 5 min na sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo ter DNA raztopili v 12 μ l formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems).

Tako pripravljeno ploščo smo nanесли na sekvenator.

3.4.11 Računalniška obdelava sekvenc

Elektroferograme, ki smo jih dobili po zaključeni kapilarni elektorforezi smo obdelali s programom Sequencing analysis v5.4, ki vsebuje programski dodatek KB Basecaller v1.4. Ta glede na intenziteto fluorescentnih signalov določi nukleotidno zaporedje (ang. base calling).

Sekvencam smo nato z uporabo programskega paketa CodonCode Aligner v3.7.1. odstranili nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov, zaporedja plazmida ter poliadeninske repe, jih združili in tako dobili soglasna zaporedja (ang. consensus sequences) ter zaporedja, ki so bila dobljena v samo eni kopiji (ang. singleton). Za združevanje smo uporabili privzete nastavitve (minimalen odstotek identičnosti 70 %, minimalna dolžina prekrivanja 25 bp, minimalno število točk 20, število točk za ujemanje 1, za vsako neujemanje -2 točki, za vrzel -2 točki, za vsako dodatno vrzel -3 točke).

3.4.12 Določanje funkcije ugotovljenih zaporedij

Pridobljenim sekvencam smo z uporabo orodja za poravnavo BLAST (ang. Basic Local Alignment Tool) v podatkovni zbirki genov vinske trte 12xV1 (Forcato, 2010) na strežniku CRIBI (Centro di Ricerca Interdiparimentale per le Biotechnologie Innovative) Biotehnološkega centra določili kateri gen kodirajo (E -vrednost $< 1 \times 10^{-10}$). Geni iz podatkovne zbirke 12xV1 so določeni glede na trenutno verzijo genoma skoraj homozigotnega genotipa 'Pinot Noir' (PN40024) z 12 kratno pokritostjo, ki je nadgradnja genoma z 8 kratno pokritostjo (Jaillon in sod., 2007). Zbirka genov 12xV1 je bila leta 2010 osnovana na 12xV0 verziji, ki je, tako kot genom trte, rezultat dela francosko-italijanskega konzorcija za karakterizacijo genoma vinske trte, ter z raziskovalnim delom Biotehnološkega centra CRIBI, Univerze v Padovi (Forcato, 2010).

V podatkovni zbirki VitisNet (Grimplet in sod., 2009) smo poiskali ime in funkcijo gena s pomočjo identifikacijske oznake, ki smo jo dobili z BLAST analizo v zbirki genov vinske trte 12xV1. VitisNet podatkovna zbirka vključuje tudi razvrstitev genov v biološke poti in temelji na zbirki genov vinske trte 12xV1 (Grimplet in sod., 2012).

Za primerjavo smo sekvencam z BLAST orodjem (Standard ..., 2013) določili funkcijo še v RNA referenčni podatkovni zbirki Nacionalnega centra za biotehnološko informacijo (NCBI RefSeq RNA, 61. izdaja z dne 9. septembra 2013, E -vrednost $< 1 \times 10^{-10}$). Geni vinske trte, vključeni v RefSeq podatkovni zbirki so prav tako določeni na genomu 12X. RefSeq podatkovna zbirka velja za eno najzanesljivejših (Sweetman in sod., 2012).

Ker je bila pri nekaterih genih ugotovljena razlika pri opisu gena, bomo za navajanje genov uporabili identifikacijsko kodo gena iz podatkovne zbirke genov vinske trte 12xV1,

medtem ko bomo za opis gena upoštevali informacije, pridobljene v RNA referenčni podatkovni zbirki.

Z orodjem za določanje bioloških informacij, ki je na voljo na strežniku CRIBI Biotehnološkega centra (Get annotation, 2010) smo identificiranim genom določili kategorije bioloških procesov (določene na osnovi GO ontologije). GO kategorije smo s spletnim programom REVIGO (Supek in sod., 2011) grafično prikazali.

Zaporedja, za katere ni bilo podatkov v omenjenih podatkovnih zbirkah, smo z orodjem BLAST (Standard ..., 2013) preiskali še neredundantno nukleotidno podatkovno zbirko (nr/nt NCBI, E-vrednost $< 1 \times 10^{-10}$).

4 REZULTATI

4.1 MOLEKULSKA KARAKTERIZACIJA SORTE 'REFOŠK'

4.1.1 Mikrosatelitski markerji

Mikrosatelitske markerje smo uporabili za potrditev sortne pristnosti analiziranih vzorcev. Pri vseh 113-ih analiziranih vzorcih smo ugotovili identičen genetski profil (preglednica 10) in s tem potrdili, da po mikrosatelitskem profilu vsi vzorci pripadajo sorti 'Refošk'. Pet lokusov je bilo heterozigotnih, medtem ko je bil pri lokusu VVMD27 določen samo en alel dolžine 208 bp in je sorta na tem lokusu homozigot. Dolžine alelov so zaradi uporabljene ekonomične metode daljše, zaradi podaljšanega začetnega oligonukleotida za 18 nukleotidov.

Preglednica 10: Predstavitev identificiranih genotipov, dobljenih z analizo mikrosatelitskih lokusov sorte 'Refošk'.

Table 10: Presentation of identified genotypes, which were obtained by microsatellite loci analysis of the grapevine variety 'Refošk'.

Mikrosatelitski lokus	Genotip (izražen kot dolžina namnoženih alelov v baznih parih)
VVMD5	241:243
VVMD7	262:264
VVMD27	208:208
VVMD32	266:289
VrZAG62	210:212
VrZAG79	256:268

4.1.2 Podatki o mikrosatelitskih profilih, pridobljenih iz podatkovnih zbirk

Iz mikrosatelitskih podatkovnih zbirk (Evropska podatkovna zbirka vinske trte (Maul in sod., 2012), Mednarodni katalog sort vinske trte (*Vitis* ..., 2007), Italijanska mikrosatelitska podatkovna zbirka vinske trte (Grape ..., 2002), podatkovna zbirka genotipov sort vinske trte iz območja zahodnega Balkana (*Vitis*-WBC ..., 2013) in iz objavljenih znanstvenih prispevkov (Kozjak in sod., 2003; Maletić in sod., 1999) smo pridobili podatke o dolžinah alelov pri različnih sortah z imenom 'Refošk', gojenih na območju Italije. Zaradi razlik v dolžinah enakih alelov, do katerih pride zaradi različnih uporabljenih tehnik in opreme smo dolžine pretvorili v razliko med daljšim in krajšim alelom. Rezultati so prikazani v preglednici 11. V preglednico smo vključili šest lokusov, ki so bili uporabljeni za analizo sorte 'Refošk' v okviru te naloge. Originalni podatki z akcesijskimi oznakami so v prilogi A.

Preglednica 11: Mikrosatelitski profili iz podatkovnih zbirk in iz raziskovalnih člankov prikazani kot razlika med daljšim in krajšim alelom. Več podaktov o omenjenih vzrocih je v prilogi A.

Table 11: Microsatellite profiles obtained from microsatellite databases and scientific articles, shown as subtracted value between longest and shortest alleles. More information about the mentioned samples is available in annex A.

Zap. št.	Mikrosatelitski lokus							
	Oznake vzorcev	Primarni vir podatkov	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VVMD32	VrZAG62	VrZAG79
Evropska podatkovna zbirka vinske trte								
1	Refosco nostrano	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
2	Refosco di Guarnieri	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
3	Refosco peduncolo rosso	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
4	Refosco dal peduncolo rosso	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
5	Refosco nostrano	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
6	Refosco di Rauscedo	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
7	Refosco nostrano	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
8	Terrano (1)	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
9	Terrano (2)	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
10	Terrano (3)	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
11	Terrano (4)	Maul in sod. (2012)	6	6	4	2	6	4
Mednarodni katalog sort vinske trte								
12	Refosco dal peduncolo rosso	Cipriani in sod. (2010a)	6	8	8	/	0	8
13	Terrano	Sefc in sod. (2000)	2	2	0	/	2	12
Italijanska mikrosatelitska podatkovna zbirka								
14	Refosco	Bowers in sod. (1996)	6	24	/	/	/	/
15	Refosco peduncolo rosso (1)	Sefc in sod. (2000)	6	8	/	/	0	8
16	Refosco peduncolo rosso (2)	IASMA	6	8	8	12	0	8
Podatakovna zbirka zahodno-balkanskih genotipov sort vinske trte								
17	Teranovka	Štajner in sod. (2013)	2	2	0	22	0	12
18	Refošk Istra	Štajner in sod. (2013)	2	2	0	22	2	12
Raziskovalni članki								
19	Refošk	Kozjak in sod. (2003)	/	0	0	20	0	12
20	Teran	Maletić in sod. (1999)	2	2	/	/	2	12
Rezultati naše analize								
21	Refošk		2	2	0	23	2	12

Iz preglednice 11 je razvidno, da se pri različnih sortah z imenom 'Refošk' gojenih na območju Italije pojavlja več različnih genotipov. Prvi genotip predstavljajo vzorci od 1 do 11, drugi genotip predstavljajo vzorci 12, 15 in 16 ter zadnji, tretji genotip, ki se večkrat pojavi, predstavljajo vzorci 13, 18, 20 ter genotip pod zaporednim številom 21, določen v okviru naše analize. Našemu genotipu je najbližji vzorec »refošk Istra« iz študije Štajner in sod. (2013). Razlikuje se samo pri lokusu VVMD32 za 1bp. Identičnost genotipa na 5 oziroma 4 lokusih z našim genotipom, je bila ugotovljena tudi pri vzorcih 'Terrano' iz študije Sefc in sod. (2000) in 'Teran' iz študije Maletić in sod. (1999). Prvi ni bil analiziran na lokusu VVMD32, medtem ko za drugi vzorec manjkata podatka dveh lokusov –

VVMD27 in VVMD32. Zanimivo pa je, da se vzorec »refošk« iz študije Kozjak in sod. (2003) razlikuje od našega genotipa pri treh od petih analiziranih lokusih.

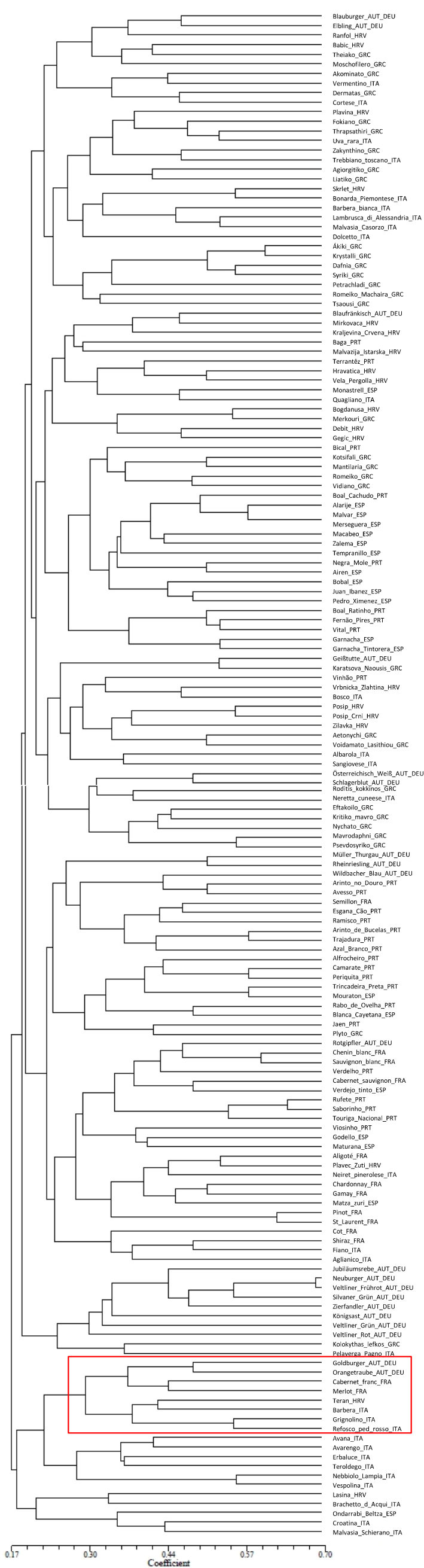
Na sliki 3 je prikazan dendrogram s 161 lokalnimi sortami iz 8 evropskih držav, ki smo ga dobili z obdelavo podatkov Sefc in sod. (2000). Vzorec sorte 'Teran', ki je na petih lokusih enak našemu genotipu sorte 'Refošk' se je uvrstil v skupino v kateri je od skupno 19 sort, uvrščenih 17 lokalnih sort zahodno-evropskih držav. Kot najbolj sorodna se je poleg sorte 'Teran' iz Hrvaške uvrstila italijanska sorta 'Barbera', sledi 'Grignolino' ter 'Refosco peduncolo rosso'.

4.1.3 Molekulski markerji AFLP

Z markerji AFLP smo želeli ovrednotiti genetsko variabilnost sorte 'Refošk' in odkriti morebitno povezavo med polimorfizmi in fenotipskimi lastnostmi različnih biotipov in z znamenji razbrazdanja. Po predamplifikaciji, ki smo jo izvedli z začetnimi oligonukleotidi brez dodanih selektivnih nukleotidov, smo preliminarно na 8-ih vzorcih testirali 56 kombinacij začetnih oligonukleotidov (*Pst*I z dodanimi nukleotidi: ATA, AAC, AGA in ACA; ter *Mse*I z dodanimi nukleotidi: AG, CG, CA, AC, CC, CTT, CAT, CAA, CAG, CAC, CTG, CTA, CTC in ACC) in se po pregledu elektroferogramov, glede na število namnoženih fragmentov, odločili za 8 kombinacij (preglednica 12). Celoten postopek namnoževanja markerjev AFLP smo izvedli v dveh ponovitvah. Rezultati namnoževanja markerjev AFLP so bili ponovljivi.

Rezultati analize AFLP glede na posamezno kombinacijo selektivnih začetnih oligonukleotidov so predstavljeni v preglednici 12. Skupno število markerjev, ki smo jih dobili z 8 kombinacijami začetnih oligonukleotidov je bilo 208. Pri kombinaciji P-ATA/M-CTT nismo našli nobenega polimorfnega markerja AFLP, medtem ko smo pri ostalih 7 kombinacijah začetnih oligonukleotidov odkrili 16 polimorfnih markerjev AFLP v skupini 113 analiziranih trt sorte 'Refošk'. Na posamezno kombinacijo začetnih oligonukleotidov smo odkrili od 1 do 5 polimorfnih markerjev, izraženo v odstotkih to pomeni od 2,3 do 18,8 odstotkov. Dolžina polimorfnih markerjev je bila od 100 do 397 bp (preglednica 13).

Polimorfne markerje AFLP smo uporabili za izdelavo binarne matrike, na kateri je temeljil izračun koeficienta podobnosti enostavnega ujemanja. Z metodo UPGMA smo analizirane vzorce združili v sorodstvene skupine.



Slika 3: Dendrogram, izrisan na osnovi Jaccardovega koeficienta podobnosti in metode UPGMA z uporabo podatkov mikrosatelitske analize. Koda države za imenom sorte označuje državo vzorčenja sort.

Figure 3: Dendrogram based on the Jaccard similarity coefficient and UPGMA method, created with the microsatellite loci data. The abbreviation after the variety name indicates the country of variety sampling.

Preglednica 12: Število vseh markerjev AFLP, število polimorfnih markerjev ter odstotek polimorfizma.
Table 12: Total number of AFLP markers, number of polymorphic markers and polymorphism percentage.

Kombinacija začetnih oligonukleotidov	Število vseh markerjev AFLP	Število polimorfnih markerjev	Polimorfizem (%)
6-FAM-P-AGA/M-CTT	43	1	2.3
VIC-P-AAC/M-CTG	29	2	6.9
6-FAM-P-AGA/M-CAT	23	3	13.0
VIC-P-AAC/M-AG	34	5	14.7
PET-P-ATA/M-CAA	16	3	18.8
6-FAM-P-AGA/M-AG	22	1	4.5
VIC-P-AAC/M-CTC	16	1	6.25
PET-P-ATA/M-CTT	25	/	/
Skupaj	208	16	7.7 (povprečje)

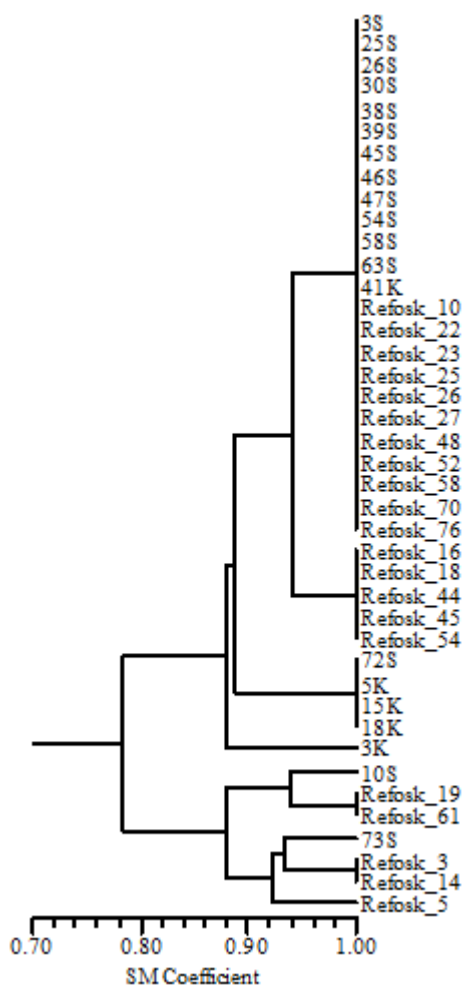
Ugotovili smo, da je imelo 72 vzorcev identičen AFLP profil, medtem ko se je ostalih 41 vzorcev, od skupine 72 vzorcev, ločilo po tem, da smo pri njih odkrili do 16 polimorfnih markerjev AFLP. Skupino 72 vzorcev smo zato poimenovali homogena skupina, skupino 41 vzorcev zaradi različnih profilov AFLP pa heterogena skupina. Ker so imeli vzorci iz homogene skupine v binarni matriki samo ničle, smo jih pri izdelavi dendrograma izključili. Dendrogram na sliki 4 tako prikazuje razporeditev vzorcev sorte 'Refošk' iz heterogene skupine.

Preglednica 13: Seznam in dolžina polimorfnih markerjev AFLP.
Table 13: List of AFLP polymorphic markers and their length.

Kombinacija začetnih oligonukleotidov	Dolžine polimorfnih markerjev AFLP izražene v številu baznih parov
P-AGA/M-CTT	191
P-AAC/M-CTG	101
	173
P-AGA/M-CAT	231
	320
	397
P-AAC/M-AG	100
	179
	200
	245
	251
P-ATA/M-CAA	117
	167
	178
P-AGA/M-AG	208
P-AAC/M-CTC	263

Kot je razvidno iz dendrograma so se vzorci heterogene skupine razvrstili v dve večji skupini, ki se ločujeta pri koeficientu podobnosti 0,7846. V večjo skupino, z najnižjim koeficientom podobnosti 0,8783, se je uvrstilo 16 vzorcev iz kolekcijskega vinograda, 5 vzorcev iz vinogradov iz vinorodnega okoliša Kras ter 13 vzorcev iz vinogradov iz vinorodnega okoliša Slovenska Istra. V manjšo skupino (z najnižjim koeficientom podobnosti 0,8792) se je uvrstilo 5 vzorcev iz kolekcijskega nasada ter po 1 vzorec iz vinogradov iz obeh vinorodnih okolišev.

Povprečna genetska raznolikost vseh lokusov je bila 0,0294 s standardnim odklonom 0,0155.



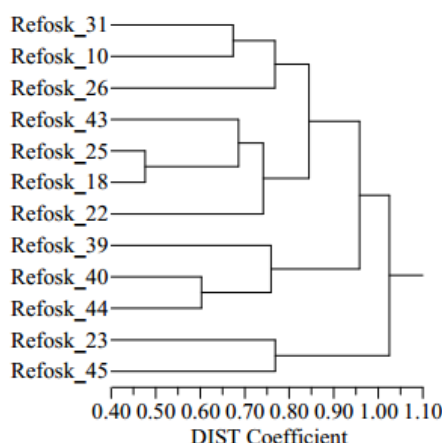
Slika 4: Dendrogram na osnovi analize AFLP. Genetsko podobnost med vzorci sorte 'Refošk' iz heterogene skupine, je bila določena s SM koeficientom in metodo UPGMA (vzorci označeni z Refosk_ in številom so iz kolekcijskega vinograda v Komnu, ostali vzorci so iz vinogradov).

Figure 4: Dendrogram, based on AFLP analysis. Genetic similarity between samples of the variety 'Refošk' from heterogeneous group was determined with the SM coefficient and UPGMA methods (samples named as Refosk followed by number are from the collection vineyard in Komen, other samples are from production vineyards).

4.2 AMPELOGRAFSKO PROUČEVANJE

Na podlagi rezultatov analize AFLP smo določili 12 biotipov sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu. Štirje biotipi so bili izbrani iz homogene skupine, medtem ko je bilo 8 biotipov sorte 'Refošk' izbranih iz heterogene skupine. Vse biotipe smo opisali z 22 OIV deskriptorji. Rezultati meritev, pretvorjeni v kategorije, določene s strani Mednarodnega urada za vinsko trto in vino, so v preglednici 14. Primarni podatki so v Prilogi B. Lastnosti pri katerih smo ugotovili varibilnost so bile: zbitost grozda (OIV 204), ki je varirala od rahlega do srednje zbitega; povprečna dolžina peclja (OIV 206) je bila od 46,2 do 72,5 mm; olesenelost peclja (OIV 207) se je gibala od srednje do močne oziroma do polovice in več kot polovica; število razvejanj peclja (OIV 209) se je gibalo od 1 do 5; oblika jagod (OIV 223) je bila rahlo sploščena do okrogla, povprečna masa grozda (OIV 502) se je gibala od 371 do 696 g. Masa posamezne jagode (OIV 503) se je gibala od 2,77 do 4,30 g; obarvanost mesa z antociani (OIV 231) se je gibala od neobarvanega do srednje obarvanega, vendar je obarvanost soka lahko posledica poškodbe jagodne kože ali prezrelosti. Lastnosti mošta, pri katerih je bila ugotovljena variabilnost so: vsebnost sladkorja v moštu (OIV 505) se je gibala od 18,2 do 23,3 %; vsebnost titrabilnih kislin (506) izraženih v g/l vinske kisline se je gibala od 10 do 11,8.

Podatke ampelografskega proučevanja smo uporabili za izdelavo dendrograma (slika 5). Dendrogram prikazuje 3 skupine s po tremi oz. štirimi vzorci, ter dva vzorca, 'Refošk' 23 in 'Refošk' 45, ki sta se ločila od ostalih skupin. Biotipi 'Refošk' 31, 39, 40 in 43 po analizi AFLP predstavljata homogene skupine, medtem ko so se po karakterizaciji OIV deskriptorjev razvrstili v vse tri skupine.



Slika 5: Dendrogram na osnovi ampelografskih lastnosti, določenih pri 12 biotipih sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda iz Komna, izrisan s koeficientom povprečne taksonomske razdalje in metode UPGMA.

Figure 5: Dendrogram based on ampelographic characters, determined for 12 biotypes of the variety 'Refošk' from the collection vineyard in Komen, obtained by using the average taxonomic distance and the UPGMA method.

Table 14: Results of ampelographic characterisation with 22 OIV descriptors of 12 'Refošk' biotypes. Measurements were conducted on 10 shoots from 3 to 5 vines per each biotype. Average values were transformed to categories, as determined by OIV descriptors.

[illegible]

4.3 INDEKSIRANJE

Za namen ugotavljanja prenosa bolezní razbrazdanja lesa s cepljenjem smo cepili 132 cepljenk. Od teh je bilo 62 cepljenk, pri katerih so bili cepiči sorte 'Refošk' cepljeni na podlago SO4, 60 cepljenk pri katerih smo mladike sorte 'Refošk' le prerezali in ponovno spojili ter 10 cepljenk, prav tako s spojenimi lastnimi deli mladike, iz podlage SO4. Za vsako posamezno kombinacijo je bilo od 8 do 12 cepljenk (preglednici 15 in 16).

4.3.1 Uspešnost cepljenja

Odstotek uspešno ukoreninjenih cepljenk s spojenimi lastnimi deli mladike pri sorti 'Refošk' se je gibal od 72,7 do 100 %. Ob zadnjem popisu cepljenk je bilo živih od 27,3 do 80 %. Največje odstotke smo zabeležili pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 48, najmanjše, od 27,3 do 40 %, pri biotipih 'Refošk' 43, 'Refošk' 51 in 'Refošk' 61.

Pri cepilnih kombinacijah 'Refošk'/SO4 se je odstotek uspešno koreninjenih cepljenk gibal od 70 do 91,7 %. Ob zadnjem popisu je bilo pri večini cepilnih kombinacijah ugotovljenih od 25 do 40 %, le pri cepilni kombinaciji z biotipom 'Refošk' 51 je bilo zabeleženih 60 % živih cepljenk.

4.3.2 Pojav znamenj bolezní razbrazdanja lesa na cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 48 in pri cepljenkah na podlago SO4

Prva znamenja v obliki drobnih brazd smo odkrili šele pri zadnjem pregledu septembra 2012 (39 mesecev po cepljenju) in sicer pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 48. Pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli pri biotipu 'Refošk' 38 je bilo ugotovljeno razbrazdanje na cepiču, medtem ko so se pri biotipu 'Refošk' 48 znamenja razbrazdanja pojavila na cepiču in na podlagi (slika 6). Pri cepljenkah na podlagi SO4 je bilo prav tako ugotovljeno razbrazdanje pri obeh biotipih, medtem ko na podlagi znamenj bolezní razbrazdanja lesa nismo opazili (preglednica 17).

4.3.3 Rezultati cepljenja pri biotipih 'Refošk' 20 in 'Refošk' 51

Biotipa 'Refošk' 20 in 'Refošk' 51 povzročata razbrazdanje na podlagi SO4, medtem ko po cepljenju cepič ohrani zdrav videz. Pri cepilnih kombinacijah z biotipom 'Refošk' 20 in 'Refošk' 51 tako na cepiču kot na podlagi, znamenj razbrazdanja nismo ugotovili.

Preglednica 15: Število vseh cepljenk s spojenimi lastnimi deli mladike, število rastočih cepljenk ob presajanju, ob dveh vmesnih pregledih in ob končnem pregledu.

Table 15: Total number of autografts, number of autografts at transplanting, at two intermediate times of inspection and at final inspection.

Oznaka trte s katere je bil vzet material	Število vseh cepljenk 12. 6. 2009	Število živih cepljenk ob presajanju 17. 9. 2009		Število cepljenk 6. 4. 2010		Število cepljenk 22. 4. 2011		Število cepljenk 3. 9. 2012	
		n	%	n	%	n	%	n	%
'Refošk' 20 IV/110	11	10	90,9	9	81,8	7	63,6	7	63,6
'Refošk' 38 VIII/44	10	9	90,0	9	90,0	7	70,0	7	70,0
'Refošk' 43 VIII/113	10	9	90,0	5	50,0	5	50,0	4	40,0
'Refošk' 48 IX/43	10	10	100,0	9	90,0	8	80,0	8	80,0
'Refošk' 51 IX/69	11	8	72,7	4	36,4	3	27,3	3	27,3
'Refošk' 61 XII/68	10	9	90,0	7	70,0	4	40,0	3	30,0
Skupaj/ Povprečje (%)	62	55	88,93	43	69,7	34	55,15	32	51,82
'SO4'	10	7	70,0	5	50,0	4	40,0	4	40,0
Skupaj/ Povprečje (%)	72	62	86,1	48	66,7	38	52,8	36	50,0

Preglednica 16: Število vseh cepljenk refoška na podlago SO4, število rastočih cepljenk ob presajanju, ob dveh vmesnih pregledih in ob končnem pregledu.

Table 16: Total number of grafts, where 'Refošk' was grafted on SO4, number of autografts at transplanting, at two intermediate times of inspection and at final inspection.

Oznaka trte s katere je bil vzet material	Število vseh cepljenk 12. 6. 2009	Število živih cepljenk ob presajanju 17. 9. 2009		Število cepljenk 6. 4. 2010		Število cepljenk 22. 4. 2011		Število cepljenk 3. 9. 2012	
		n	%	n	%			n	%
'Refošk' 20 IV/110	12	11	91,7	5	41,7	4,0	33,3	3	25,0
'Refošk' 38 VIII/44	10	7	70,0	3	30,0	3,0	30,0	3	30,0
'Refošk' 43 VIII/113	10	8	80,0	6	60,0	4,0	40,0	4	40,0
'Refošk' 48 IX/43	8	7	87,5	4	50,0	3,0	37,5	3	37,5
'Refošk' 51 IX/69	10	9	90,0	6	60,0	6,0	60,0	6	60,0
'Refošk' 61 XII/68	10	8	80,0	3	30,0	3,0	30,0	3	30,0
Skupaj/ Povprečje (%)	60	50	83,3	27	45,0	23,0	38,3	22	36,7

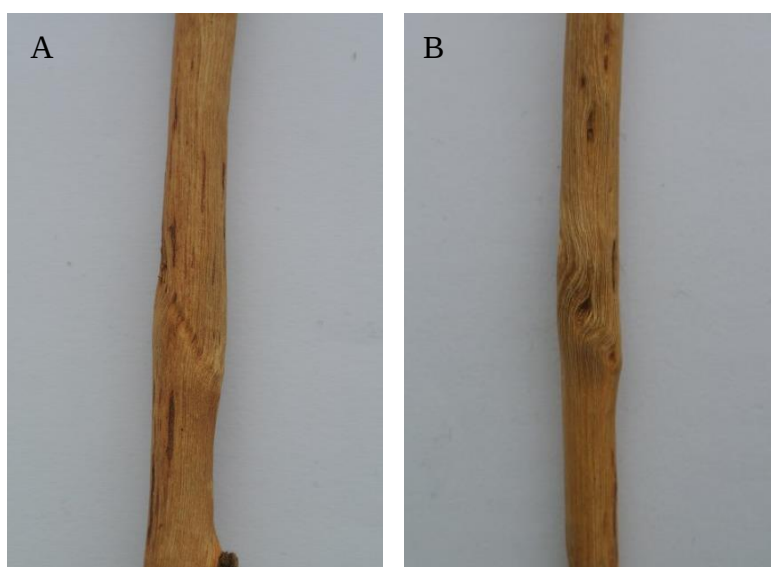
Preglednica 17: Pojav znamenj razbrazdanja lesa pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik in pri cepljenkah na podlagi SO4.

Table 17: Appearance of rugose wood disease symptoms on autografts and on grafts where SO4 rootstock was used.

Oznaka trte s katere je bil vzet material za cepljenje	Rezultati indeksiranja	
	Pojav znamenj pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli	Pojav znamenj pri cepljenkah na podlagi SO4
'Refošk' 20 IV/110	-/- ^a	-/-
'Refošk' 38 VIII/44	+/- (2/7) ^b	+/- (1/3)
'Refošk' 43 VIII/113	-/-	-/-
'Refošk' 48 IX/43	+/+ (2/8)	+/- (1/3)
'Refošk' 51 IX/69	-/-	-/-
'Refošk' 61 XII/68	-/-	-/-

^a Minus pred poševnico pomeni, da znamenj nismo opazili na cepiču, za poševnico pa, da znamenj nismo opazili na podlagi in obratno pri znaku plus.

^b Število v oklepaju pred poševnico pomeni število cepljenk z opaženimi znamenji, število za poševnico pomeni število vseh cepljenk pri določeni cepilni kombinaciji.



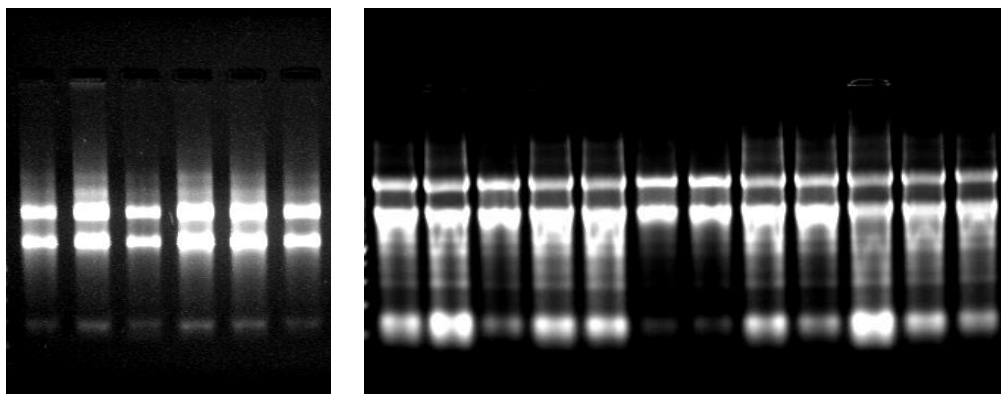
Slika 6: Znamenja bolezní razbrazdanja lesa na cepiču in podlagi pri cepljenki s spojenimi lastnimi deli mladike pri biotipu 'Refošk' 48 (A); znamenja bolezní razbrazdanja lesa na cepiču pri cepljenki 'Refošk' 38 na podlagi SO4 (B).

Figure 6: Symptoms of rugose wood disease on scion and rootstock on autografts of the biotype 'Refošk' 48 (A); symptoms of rugose wood disease on scion on 'Refošk' 38 grafted on SO4 rootstock (B).

4.4 ANALIZA IZRAŽENOSTI GENOV

4.4.1 Integriteta izolirane RNA

Integriteto RNA, izolirane iz cepljenk s spojenimi lastnimi deli mladik, vzetih iz trt 'Refošk' 38 VIII/44 in 'Refošk' 43 VIII/113, smo preverili na 1,5 % agaroznem gelu. RNA smo izolirali v treh časovnih obdobjih in sicer 3, 7 in 14 dni po cepljenju. Pri vsakem časovnem obdobju smo RNA izolirali iz 3 bioloških ponovitev. Pri vseh vzorcih na sliki 7 sta vidna dva močnejša fragmenta, ki ponazarjata 28S in 18S ribosomsko RNA. Lepo vidna fragmenta nakazujeta na dobro integriteto RNA in primerno za uporabo pri nadaljni analizi izraženosti genov.



Slika 7: Kontrola integritete RNA. Vzorci so označeni s številom, ki je navedeno v preglednici 18 v koloni »zaporedno število«. Vrstni red vzorcev je: 10, 2, 3, 4, 5, 15, 7, 8, 9, 1, 11, 12, 13, 14, 6, 16, 17 in 18.

Figure 7: Control of RNA integrity. Samples at each set are sorted according to time of sampling after grafting (3, 7 and 14 days after grafting). Superscripted numbers indicate biological replications.

Koncentracijo RNA smo določili s spektrofotometrom in pri tem izračunali še razmerje med A260 in A280. Izračunana razmerja so pri vseh vzorcih v optimalnem območju, ki je za RNA med 1,8 do 2,1. Za zagotovitev enakovrednejših pogojev smo za analizo edinstveno izraženih transkriptov s kitom GeneFishingTM DEG Premix Kit (Seegene) izbrali vzorce z A260/A280 razmerjem 2,1. Ti so v preglednici 18 navedeni od zaporednega števila 1 do 6. Ostale vzorce bomo uporabili za potrjevanje diferencialno izraženih genov s PCR v realnem času, ki ni zajeto v okvir te naloge.

Preglednica 18: Koncentracija in 260/280 razmerje izolirane RNA. Vzorci, uporabljeni za analizo izražnosti genov so označeni kot prva biološka ponovitev.

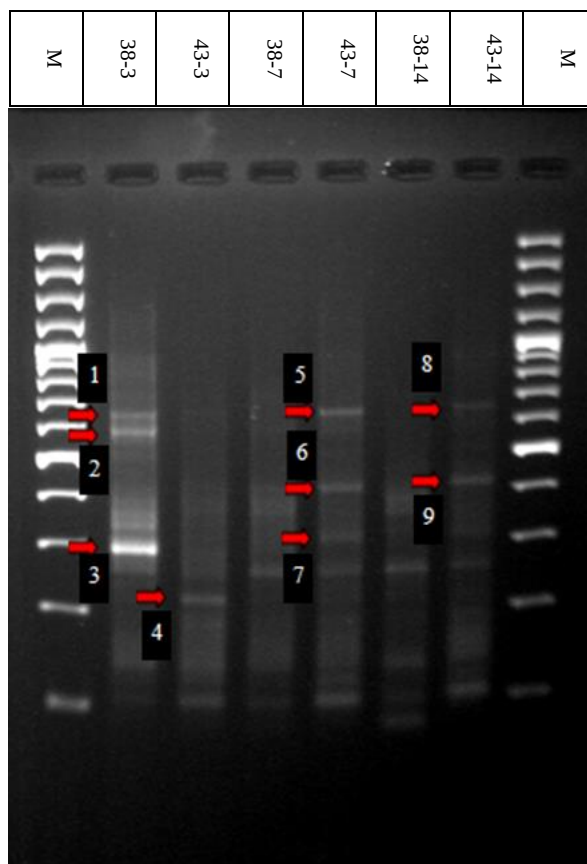
Table 18: Concentration of RNA and A260/A280 ratio. Samples, used for gene expression analysis, are marked as first biological replication.

Zap. št.	Biološka ponovitev	Vzorec	Koncentracija (ng/μl)	Skupna količina RNA (μg)	A260/A280
1	1	38 ^a _3 ^b	685,3	34,3	2,14
2		38_7	547,2	27,4	2,09
3		38_14	275,9	13,8	2,11
4		43_3	503,7	25,2	2,14
5		43_7	432,9	21,6	2,18
6		43_14	434,2	21,7	2,15
7	2	38_3	442,5	22,1	1,94
8		38_7	558,9	27,9	2,13
9		38_14	352,0	17,6	1,90
10		43_3	591,8	29,6	2,10
11		43_7	946,7	47,3	2,15
12		43_14	264,4	13,2	2,10
13	3	38_3	1332,1	66,6	2,14
14		38_7	695,6	34,8	2,16
15		38_14	575,7	28,8	2,06
16		43_3	169,7	8,5	2,07
17		43_7	687,8	34,4	2,13
18		43_14	357,1	17,9	1,94

^a biotip sorte 'Refošk', ^b število dni po cepljenju

4.4.2 Identifikacija diferenčno izraženih transkriptov

Za določitev edinstveno izraženih transkriptov smo RNA analizirali po navodilih, ki so bila priložena kitu GeneFishingTM DEG Premix Kit (Seegene). Po prvem koraku oziroma po reverzni transkripciji RNA v komplementarno DNA, je sledilo namnoževanje DNA, pri čemer je vsaka reakcija PCR potekala z dvema začetnima oligonukleotidoma. Eden od začetnih oligonukleotidov je bil »univerzalen« in se je uporabljal pri vsaki reakciji PCR v kombinaciji z drugim, selektivnim začetnim oligonukleotidom, ki je na 3' koncu vseboval zaporedje 10 nukleotidov, ki so prilegli na zaporedje tarčne komplementarne DNA. Skupno smo izvedli 11 reakcij PCR s 6 vzorci (cepljenke 'Refošk' 38 in 'Refošk' 43 s spojenimi lastnimi deli mladik, v treh časovnih obdobjih po cepljenju) in pri tem na agaroznem gelu identificirali 61 diferenčno prikazanih produktov PCR (preglednica 19). Primer diferenčnega prikaza je na sliki 8. Od 61 smo jih 47 uspešno klonirali in po sekvenciranju kolonij skupaj pridobili 258 zaporedij.



Slika 8: Primer diferenčnega prikaza produktov PCR med biotipoma 'Refošk' 38 in 'Refošk' 43 pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli. Profile izraženih transkriptov smo primerjali glede na časovno obdobje po cepljenju (3, 7 in 14 dni). Prikazani produkti PCR so nastali z ACP8 in dt-ACP2 začetnima oligonukleotidoma.

Figure 8: Example of differentially displayed PCR products between the biotypes 'Refošk' 38 and 'Refošk' 43, which were obtained with RNA from autografts. Expression profiles from the same time after grafting (3, 7 and 14 days) were compared. ACP8 and dt-ACP2 primers were used in this PCR reaction.

Preglednica 19: Rezultati analize diferenčnega prikaza, kloniranja in sekvenciranja. V analizo je bilo vključenih 6 cepljenk s spojenimi lastnimi deli mladik iz trt 'Refošk' 38 VIII/44 in 'Refošk' VIII/113. Od vsakega biotipa smo uporabili 3 cepljenke vzorčene 3, 7 in 14 dni po cepljenju.

Table 19: The results of differential display analysis, gene cloning and sequencing. Six autografts made from the material of two vines 'Refošk' 38 VIII/44 and 'Refošk' VIII/113, were included. For each biotype 3 autografts, sampled 3, 7 and 14 days after grafting, were used.

Oznaka začetnega oligonukleotida	Št. diferenčno prikazanih produktov PCR na agaroznem gelu	Št. uspešno kloniranih diferenčno prikazanih produktov PCR	Število sekvenčnih reakcij	Povprečno število sekvenčnih reakcij na posamezen diferenčno prikazan produkt PCR
ACP1	6	6	40	6,7
ACP2	7	7	34	4,9
ACP3	4	4	18	4,5
ACP4	9	8	56	7
ACP6	6	4	24	6
ACP7	3	2	4	2
ACP8	9	5	27	4,5
ACP10	4	2	8	4
ACP11	5	4	19	4,8
ACP12	4	3	18	6
ACP14	4	2	10	5
Skupaj	61	47	258	

Po združevanju sekvenc s CodonCode v3.7.1 programskim paketom smo dobili 41 sosesk in 45 posameznih sekvenc, skupaj 86 unikatnih sekvenc (preglednica 20). Pri biotipu 'Refošk' 38 smo ugotovili 35 edinstveno izraženih transkriptov, od tega smo jim 33 uspeli določiti funkcijo. Vsa zaporedja so prilegla k različnim genom. Pri dveh preostalih sekvencah, 2 posamezni zaporedji (ang. singleton), smo nato z BLAST analizo v neredundantni nukleotidni podatkovni zbirki (NCBI) ugotovili, da gre prav tako za DNA vinske trte (AM437853.2, AM446439.2), vendar funkcije nismo uspeli določiti (preglednica 24).

Pri biotipu 'Refošk' 43 smo ugotovili 41 edinstveno izraženih transkriptov, od tega smo 35 določili funkcijo. Ugotovili smo, da so k vsakemu od sledečih treh genov, VIT_05s0077g01390, VIT_19s0085g00880 in VIT_07s0129g00330, prilegla po dva transkripta in sicer, eno konsenzno zaporedje in eno posamezno zaporedje. Skupaj smo tako ugotovili 32 transkriptov z različno funkcijo. Zaporedja, ki jim nismo uspeli določiti funkcije, smo z BLAST orodjem iskali podobna zaporedja v neredundantni nukleotidni podatkovni zbirki (NCBI): pri enem posameznem zaporedju in pri konsenznem zaporedju smo ugotovili, da gre za genomsko DNA vinske trte (AM453487.1, AM480862.1). Preostali 4 transkripti niso imeli zadetka v nobeni od uporabljenih podatkovnih zbirk.

Pridobili smo tudi 10 konsenznih zaporedij, v katera so bili vključeni transkripti, ugotovljeni pri obeh biotipih sorte 'Refošk' (preglednica 25).

Preglednica 20: Število ugotovljenih transkriptov pri posameznem biotipu in pri obeh skupaj ter število zaporedij z določeno funkcijo s pomočjo podatkovnih zbirk 12xV1 (CRIBI) in RefSeq RNA (NCBI).

Table 20: Number of identified transcripts of each biotype and of both biotypes. The results of annotation, using 12xV1 (CRIBI) and RefSeq RNA (NCBI) databases.

Obravnavana	'Refošk' 38	'Refošk' 43	Pri obeh biotipih	Skupaj
Št. konsenznih zaporedij / št. zaporedij z določeno funkcijo	13/13	18/16	10/10	41/39
Št. posameznih zaporedij / št. zaporedij z določeno funkcijo	22/20	23/19		45/39
Št. vseh zaporedij / št. vseh zaporedij z določeno funkcijo	35/ 33	41/35	10/10	86/78

4.4.3 Funkcije diferenčno izraženih zaporedij

Ugotovljeni edinstveno izraženi geni so v preglednicah 22 in 23 ter razporejeni glede na GO kategorije bioloških procesov. V preglednici 25 so navedeni geni, ki so bili izraženi pri obeh biotipih. Te smo dobili, ker so se pri obeh biotipih izražali v različnih časovnih obdobjih po cepljenju. Opise genov in bioloških procesov zaradi nedvoumnosti navajamo v originalnem jeziku.

Geni, pri katerih v podatkovni zbirki 12xV1 niso imeli določene GO kategorije je bilo 13 pri biotipu 'Refošk' 38, 11 pri biotipu 'Refošk' 43 ter 2 pri genih izraženih pri obeh biotipih. Posamezen gen je bil lahko uvrščen v eno, dve ali več kategorij. Grafični prikaz zastopanosti vseh ugotovljenih GO kategorij, glede na posamezen biotip je na sliki 9.

4.4.3.1 GO kategorija - oksidacijsko redukcijski procesi

Največ edinstveno izraženih genov pri obeh biotipih je bilo uvrščenih v kategorijo oksidacijsko redukcijski procesi (GO:0055114) (preglednica 21). Geni iz te kategorije pri biotipu 'Refošk' 38 so:

- citokrom p450 monooksigenaza (VIT_01s0137g00560),
- beta-karoten hidroksilaza (VIT_02s0025g00240),
- c-1-tetrahidrofolat sintaza (VIT_07s0005g0070) in
- malat dehidrogenaza (VIT_09s0002g03620).

Rastlinske citokrom P450 monooksigenaze katalizirajo različne oksidacijske reakcije. Sodelovale naj bi pri metabolizmu fiziološko pomembnih metabolitov, med drugimi tudi takih, ki delujejo obrambno, npr. steroidi, maščobne kisline, lignini, terpeni, alkaloidi, fenilpropanoidi in fitoaleksini (Cheng in sod., 2010). Beta-karoten hidroksilaza sodeluje v biosintezi karotenoidov. Karotenoidi so zaradi antioksidativnega delovanja pomembni metaboliti pri toleranci rastlin na stres (Kim in sod., 2012). Karotenoidi so prekursorji za abscizinsko kislino, ki med drugim regulira tudi odziv rastline na stres (Finkelstein, 2013).

Beta-karoten hidroksilaza za delovanje potrebuje feredoksin, ki je bil pri biotipu 'Refošk' 38 prav tako diferenčno izražen (VIT_05s0020g03490). Feredoksini sodelujejo tudi pri presnovi oksidiranih tioredoksinov do sulfhidrila (tiola) (Javier Cejudo in sod., 2012).

Pri biotipu 'Refošk' 43 so bili v kategoriji oksidacijsko redukcijski procesi ugotovljeni geni za:

- peroksidazo (VIT_11s0016g05320),
- sterol 14-demetilazo (imenovan tudi obtusifoliol 14-demetilaza) (VIT_13s0047g0120) in
- sukcinat-semialdehid dehidrogenazo (VIT_19s0085g00880).

Sukcinat-semialdehid dehidrogenaza je eden od encimov, ki sodelujejo v GABA (γ -aminobutirna kislina) mehanizmu, katerega aktivnost se v rastlinah pri odzivu rastline na abiotiski ali biotski stres močno poveča. GABA mehanizem preprečuje akumulacijo ROS in posledično celično smrt (Bouché in sod., 2003).

4.4.3.2 Ostali edinstveno izraženi geni, ki sodelujejo pri odzivu rastline na stres

Pri biotipu 'Refošk' 38 smo poleg 4 genov iz oksidacijsko redukcijskih procesov identificirali še 5 edinstveno izraženih genov, ki jih povezujejo z odgovorom rastline na stres:

- gen VIT_04s0023g03470, vključen v zvijanje proteinov (GO:0006457), ki kodira šaperon (ang. chaperone) protein z DnaJ domeno,
- 2 gena iz kategorije fosforilacija proteinov (GO:0006468) *MAPKKK* (ang. mitogen-activated protein kinase kinase kinase, VIT_00s1194g00010) in *CIPK10* (ang. CBL interacting protein kinase 10, VIT_06s0004g07870), ki sta udeležena pri prenosu izvenceličnih signalov v celice,
- gen za receptor, podoben kinazi FERONIA (VIT_14s0068g00030) ter
- iz kategorije regulacija transkripcije (GO:0006355) gen za korepresopr *TPR4* (ang. TOPLESS related protein 4-like, VIT_09s0002g07020).

Pri biotipu 'Refošk' 43 pa smo poleg 3 genov iz kategorije oksidacijsko redukcijski procesi identificirali še 6 genov, ki naj bi sodelovali pri odgovoru rastline na stres:

- 2 gena iz skupine tioredoksinov: VIT_04s0023g02700 (ang. thioredoxin H-type like) in VIT_18s0001g13250 (ang. thioredoxin H-type 2-like) iz kategorije celična redoks homeostaza (GO:0045454),
- gen *MLO6* (ang. mildew resistance locus o, VIT_13s0019g04070) iz kategorije odgovor na biotski stimulus (GO:0009607),
- iz kategorije biosintezni procesi lignina smo ugotovili gen za kafeoil-CoA O-metiltransferazo (VIT_03s0063g00140),

- ter gena GRP1A (ang. glycine-rich RNA binding protein, VIT_03s0063g02610) in ubikvitinu NEDD8 podoben protein RUB2 (VIT19s0085g00040).

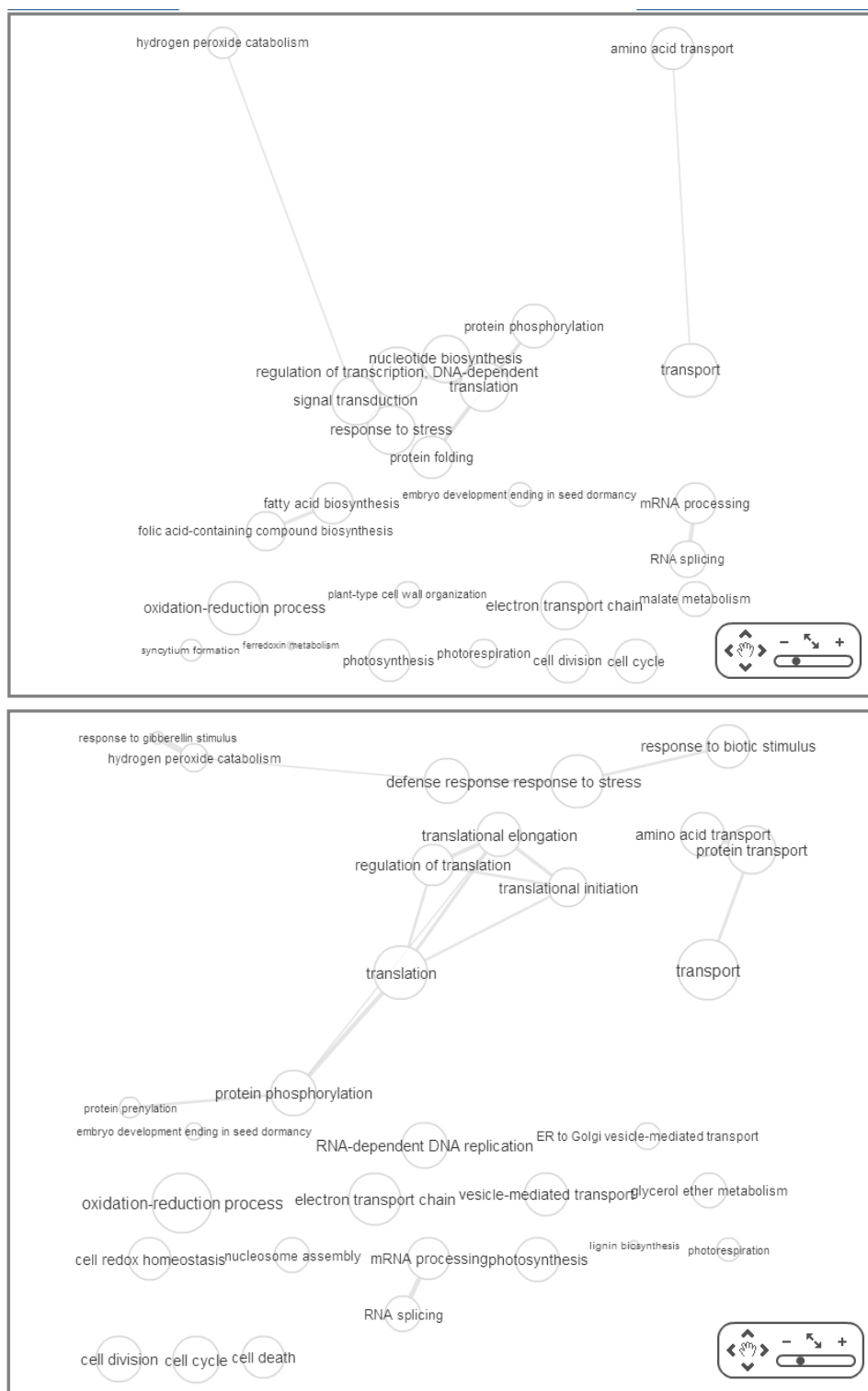
4.4.3.3 Geni, ki so bili izraženi pri obeh biotipih

Gene, ki so bili izraženi tako pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik biotipa 'Refošk' 38 kot tudi pri biotipu 'Refošk' 43 smo pridobili zato, ker niso bili izraženi pri obeh biotipih istočasno, in so se zato pri pregledu diferenčnega prikaza produktov PCR, prikazali kot edinstveno izraženi. Trije geni so bili iz kategorije oksidacijsko redukcijski procesi, večina ostalih ugotovljenih genov pa je bilo uvrščenih v biološke procese v povezavi z delitvijo celic (celična delitev (GO:0051301), celični cikel (GO:0007049)) in s sintezo proteinov (transport aminokislin (GO:0006865), procesiranje mRNA (GO:006397), fosforilacija proteinov (GO:0006468) ter izrezovanje RNA (GO:0008380)). Pri obeh biotipih se je kot odgovor na stres izrazil tudi *ASR2* gen (ang. abscisic stress ripening protein 2, VIT_18s0072g00380, za katerega velja, da regulira izražanje genov ter da deluje tudi kot šaperon.

Preglednica 21: Seznam GO kategorij bioloških procesov, v katere so bili uvrščeni edinstveno izraženi geni pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 43 in GO kategorij bioloških procesov, v katere so uvrščeni geni, izraženi pri obeh biotipih.

Table 21: List of GO categories of biological processes, as identified with differentially expressed genes in biotypes 'Refošk' 38 and 'Refošk' 43 and GO categories of biological processes, where genes identified at both biotypes were annotated.

GO kategorije bioloških procesov	38	43	38 in 43	Skupaj
Transport aminokisline (GO:0006865)			1	1
Celični cikel (GO:0007049)			1	1
Celična smrt (GO:0008219)		1		1
Delitev celice (GO:0051301)			1	1
Celična redoks homeostaza (GO:0045454)		2		2
Obrambni odgovor (GO:0006952)		1		1
Transportna veriga elektronov (GO:0022900)	1	2		3
Razvoj embrija z zaključkom v dormanci semena (GO:0009793)			1	1
Z vezikli uravnavan transport med ER in Golgijevim aparatom (GO:0006888)		2		2
Sinteza maščobnih kislin (GO:0006633)	1			1
Feredoksin metabolni proces (GO:0006124)	1			1
Biosinteza spojina s folno kislino (GO:0009396)	1			1
Glicerol eter metabolni proces (GO:0006662)		2		2
Katalni proces vodikovega peroksida (GO:0042744)		1	1	2
Znotraj celični transport proteinov (GO:0006886)		1		1
Biosinteza lignina (GO:0009809)		1		1
Metabolni proces malata (GO:0006108)	1			1
Procesiranje mRNA (GO:0006397)			1	1
Strukturiranje nukleosomov (GO:0006334)		1		1
Biosinteza nukleotidov (GO:0009165)	1			1
Oksidacijsko redukcijski procesi (GO:0055114)	4	3	3	10
fotorepiracija (GO:0009853)			1	1
fotosinteza (GO:0015979)	1	1		2
Organizacija rastlinske celične stene (GO:0009664)	1			1
Specijacija primarnega rastnega vršička poganjka (GO:0010072)	1			1
Zvijanje proteinov (GO:0006457)	1			1
Fosforilacija proteinov (GO:0006468)	4		1	5
Prenilacija proteinov (GO:0018342)		1		1
Regulacija transkripcije (GO:0006355)	2	2		4
Od DNA odvisna regulacija transkripcije (GO:0006355)	1			1
Regulacija translacije (GO:0006417)		1		1
Odgovor na biotske stimulanse (GO:0009607)		1		1
Odgovor na gibereline (GO:0009739)		1		1
Odgovor na stres (GO:0006950)	1		1	2
Izrezovanje RNA (GO:0008380)			1	1
Od RNA odvisno DNA podvojevanje (GO:0006278)		1		1
Prenos signalov (GO:0007165)	1			1
Nastanek večjedrnih celic (GO:0006949)	1			1
Translacija (GO:0006412)	3	2		5
Elongacija translacije (GO:0006414)		2		2
Iniciacija translacije (GO:0006413)		1		1
Transport (GO:0006810)	1	3	1	5
Z vezikli uravnavan transport (GO:0016192)		2		2



Slika 9: Grafični prikaz GO kategorij bioloških procesov, v katerih so bili ugotovljeni diferenčno izraženi geni pri biotipu 'Refošk' 38 (zgoraj) in pri biotipu 'Refošk' 43 (spodaj).

Figure 9: Graphical visualization of GO biological process categories, from where differential expressed genes were identified in biotype 'Refošk' 30 (above) and in biotype 'Refošk' 43 (below).

Preglednica 22: Diferenčno izraženi geni pri biotipu 'Refošk' 38. Pripadajoče E vrednosti in ostale informacije v zvezi s poravnavo so podane v prilogi C.
Table 22 : Differentially expressed genes of biotype 'Refošk' 38. E values and other alignment information are available in Annex C.

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)			Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)	
Identifikacijska oznaka	Opis	Biološki proces (GO kategorija)	Identifikacijska oznaka	Opis
VIT_05s0020g03490	ferredoxin	electron transport chain (GO:0022900)	XM_002282481.2	PREDICTED: Vitis vinifera ferredoxin-1-like (LOC100244206), mRNA
VIT_02s0025g00240	Beta-carotene hydroxylase	fatty acid biosynthetic process (GO:0006633)	NM_001281197.1	Vitis vinifera beta-carotene hydroxylase (BCH1), mRNA
VIT_05s0020g03490	ferredoxin	ferredoxin metabolic process (GO:0006124)	XM_002282481.2	PREDICTED: Vitis vinifera ferredoxin-1-like (LOC100244206), mRNA
VIT_07s0005g00070	5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-5	folic acid-containing compound biosynthetic process (GO:0009396)	XM_002263092.2	PREDICTED: Vitis vinifera c-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic-like (LOC100255621), mRNA
VIT_09s0002g03620	NADP-dependent malic enzyme	malate metabolic process (GO:0006108)	NM_001281101.1	Vitis vinifera malate dehydrogenase (VVME2), mRNA
VIT_18s0041g01280	Adenylate kinase, chloroplast	nucleotide biosynthetic process (GO:0009165)	/	/
VIT_01s0137g00560	CYP71B34	oxidation-reduction process (GO:0055114)	XM_002285436.2	PREDICTED: Vitis vinifera cytochrome P450 71B35-like, transcript variant 2 (LOC100245779), mRNA
VIT_02s0025g00240	Beta-carotene hydroxylase	oxidation-reduction process (GO:0055114)	NM_001281197.1	Vitis vinifera beta-carotene hydroxylase (BCH1), mRNA
VIT_07s0005g00070	5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-5	oxidation-reduction process (GO:0055114)	XM_002263092.2	PREDICTED: Vitis vinifera c-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic-like (LOC100255621), mRNA
VIT_09s0002g03620	NADP-dependent malic enzyme	oxidation-reduction process (GO:0055114)	NM_001281101.1	Vitis vinifera malate dehydrogenase (VVME2), mRNA
VIT_19s0015g01760	Photosystem I reaction center subunit V (PSAG)	Photosynthesis (GO:0015979)	XM_002264197.2	PREDICTED: Vitis vinifera photosystem I reaction center subunit V, chloroplastic-like (LOC100244683), mRNA
VIT_06s0004g04860	Alpha-expansin 6 precursor	plant-type cell wall organization (GO:0009664)	XM_002283494.2	PREDICTED: Vitis vinifera expansin-A4-like (LOC100263987), mRNA
VIT_09s0002g07020	TPR4/WSIP2 (topless-related 4)	primary shoot apical meristem specification (GO:0010072)	XM_003632712.1	PREDICTED: Vitis vinifera topless-related protein 4-like, transcript variant 2 (LOC100247343), mRNA

se nadaljuje

nadaljevanje

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)			Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)	
Identifikacijska oznaka	Opis	Biološki proces (GO kategorija)	Identifikacijska oznaka	Opis
VIT_04s0023g03470	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	protein folding (GO:0006457)	XM_002265808.2	PREDICTED: Vitis vinifera chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like (LOC100247204), mRNA
VIT_00s1194g00010	MAPKKK5	protein phosphorylation (GO:0006468)	XM_003635470.1	PREDICTED: Vitis vinifera mitogen-activated protein kinase kinase kinase ANP1-like (LOC100853209), mRNA
VIT_04s0008g03020	Serine/threonine/tyrosine kinase DSK2	protein phosphorylation (GO:0006468)	XM_002283429.2	PREDICTED: Vitis vinifera serine/threonine-protein kinase HT1-like (LOC100257625), mRNA
VIT_06s0004g07870	CBL-interacting protein kinase 16	protein phosphorylation (GO:0006468)	NM_001281285.1	Vitis vinifera CBL-interacting protein kinase 10 (CIPK10), mRNA
VIT_14s0068g00030	feronia receptor-like kinase	protein phosphorylation (GO:0006468)	XM_002277652.2	PREDICTED: Vitis vinifera receptor-like protein kinase FERONIA (LOC100246444), mRNA
VIT_09s0002g07020	TPR4/WSIP2 (topless-related 4)	regulation of transcription (GO:0006355)	XM_003632712.1	PREDICTED: Vitis vinifera topless-related protein 4-like, transcript variant 2 (LOC100247343), mRNA
VIT_17s0000g08290	Dof zinc finger protein DOF5.6	regulation of transcription (GO:0006355)	XM_002279586.1	PREDICTED: Vitis vinifera dof zinc finger protein DOF5.6-like (LOC100265549), mRNA
VIT_00s0204g00170	Lil3 protein	regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	XM_003635026.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100855146 (LOC100855146), mRNA
VIT_04s0023g03470	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	response to stress (GO:0006950)	XM_002265808.2	PREDICTED: Vitis vinifera chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like (LOC100247204), mRNA
VIT_06s0004g07870	CBL-interacting protein kinase 16	signal transduction (GO:0007165)	NM_001281285.1	Vitis vinifera CBL-interacting protein kinase 10 (CIPK10), mRNA
VIT_06s0004g04860	Alpha-expansin 6 precursor	syncytium formation (GO:0006949)	XM_002283494.2	PREDICTED: Vitis vinifera expansin-A4-like (LOC100263987), mRNA
VIT_05s0020g01140	Ribosomal protein L18	Translation (GO:0006412)	XM_002270783.2	PREDICTED: Vitis vinifera 50S ribosomal protein L18-like, transcript variant 1 (LOC100261418), mRNA
VIT_05s0020g02990	Ribosomal protein S16 (RPS16C) 40S	Translation (GO:0006412)	XM_002281314.2	PREDICTED: Vitis vinifera 40S ribosomal protein S16-like (LOC100254540), mRNA
VIT_09s0070g00050	Ribosomal protein S12 (RPS12C) 40S	Translation (GO:0006412)	XM_002272015.1	PREDICTED: Vitis vinifera 40S ribosomal protein S12-like, transcript variant 1 (LOC100255187), mRNA
VIT_05s0020g03490	ferredoxin	Transport (GO:0006810)	XM_002282481.2	PREDICTED: Vitis vinifera ferredoxin-1-like (LOC100244206), mRNA

se nadaljuje

nadaljevanje

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)	Podatkovna zbirka RefSeq	RNA (NCBI)
Identifikacijska oznaka	Identifikacijska oznaka	Opis
Opis	Biološki proces (GO kategorija)	
VIT_06s0009g01930	5'-AMP-activated protein kinase beta-2 subunit	/
VIT_00s0270g00120	Alpha-amylase/subtilisin inhibitor	/
VIT_18s0001g08780	BSD domain-containing protein	/
VIT_01s0011g05390	Invertase/pectin methylesterase inhibitor	/
VIT_16s0022g00960	Invertase/pectin methylesterase inhibitor	/
VIT_06s0009g03660	Protein kinase	/
VIT_15s0046g00200	unknown protein	/
VIT_10s0042g01130	Zinc finger (C3HC4-type ring finger)	/
VIT_17s0000g00800	Zinc finger (DHHC type)	/
VIT_02s0025g01080	/	/
VIT_03s0097g00240	/	/
VIT_05s0077g00900	/	/
/	/	/
	XM_002282658.1	PREDICTED: Vitis vinifera probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein-like (LOC100256192), mRNA

Preglednica 23: Diferenčno izraženi geni pri biotipu 'Refošk' 43. Pripadajoče E vrednosti in ostale informacije v zvezi s poravnavo so v prilogi D.
Table 23: Differentially expressed genes of biotype 'Refošk' 43. E values and other alignment information are available in Annex D.

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)		Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)		
Identifikacijska oznaka	Opis	Biološki proces (GO kategorija)	Identifikacijska oznaka	Opis
VIT_13s0019g04070	MLO1	cell death (GO:0008219)	NM_001281076.1	Vitis vinifera MLO6 protein (MLO6), mRNA
VIT_04s0023g02700	Thioredoxin H	cell redox homeostasis (GO:0045454)	XM_002274169.1	PREDICTED: Vitis vinifera thioredoxin H-type 2-like (LOC100253934), mRNA
VIT_18s0001g13250	Thioredoxin H-type 1	cell redox homeostasis (GO:0045454)	NM_001281234.1	Vitis vinifera thioredoxin H-type-like (LOC100250566), mRNA
VIT_13s0019g04070	MLO1	defense response (GO:0006952)	NM_001281076.1	Vitis vinifera MLO6 protein (MLO6), mRNA
VIT_18s0001g13250	Thioredoxin H-type 1	electron transport chain (GO:0022900)	NM_001281234.1	Vitis vinifera thioredoxin H-type-like (LOC100250566), mRNA
VIT_04s0023g02700	Thioredoxin H	electron transport chain (GO:0022900)	XM_002274169.1	PREDICTED: Vitis vinifera thioredoxin H-type 2-like (LOC100253934), mRNA
VIT_05s0051g00940	Bet1 SNARE 1-1	ER to Golgi vesicle-mediated transport (GO:0006888)	XM_002285644.1	PREDICTED: Vitis vinifera bet1-like SNARE 1-1 (LOC100266580), mRNA
VIT_07s0005g02990	Bet1 SNARE 1-1	ER to Golgi vesicle-mediated transport (GO:0006888)	XM_002262949.2	PREDICTED: Vitis vinifera bet1-like SNARE 1-1 (LOC100266980), mRNA
VIT_18s0001g13250	Thioredoxin H-type 1	glycerol ether metabolic process (GO:0006662)	NM_001281234.1	Vitis vinifera thioredoxin H-type-like (LOC100250566), mRNA
VIT_04s0023g02700	Thioredoxin H	glycerol ether metabolic process (GO:0006662)	XM_002274169.1	PREDICTED: Vitis vinifera thioredoxin H-type 2-like (LOC100253934), mRNA
VIT_11s0016g05320	Peroxidase	hydrogen peroxide catabolic process (GO:0042744)	XM_002282102.1	PREDICTED: Vitis vinifera peroxidase 25-like (LOC100262758), mRNA
VIT_01s0113g00540	Vesicle transport v-SNARE 13	intracellular protein transport (GO:0006886)	XM_002266807.1	PREDICTED: Vitis vinifera vesicle transport v-SNARE 12-like, transcript variant 1 (LOC100259152), mRNA
VIT_03s0063g00140	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	lignin biosynthetic process (GO:0009809)	NM_001281118.1	Vitis vinifera caffeoyl-CoA O-methyltransferase (LOC100233087), mRNA

se nadaljuje

nadaljevanje

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)			Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)	
Identifikacijska oznaka	Opis	Biološki proces (GO kategorija)	Identifikacijska oznaka	Opis
VIT_14s0081g00500	Histone H1	nucleosome assembly (GO:0006334)	XM_002270175.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100259836 (LOC100259836), mRNA
VIT_11s0016g05320	Peroxidase	oxidation-reduction process (GO:0055114)	XM_002282102.1	PREDICTED: Vitis vinifera peroxidase 25-like (LOC100262758), mRNA
VIT_13s0047g01200	Obtusifoliol 14-demethylase (CYP51)	oxidation-reduction process (GO:0055114)	XM_002274092.2	PREDICTED: Vitis vinifera sterol 14-demethylase-like (LOC100252340), mRNA
VIT_19s0085g00880	Succinate-semialdehyde dehydrogenase (SSADH1)	oxidation-reduction process (GO:0055114)	XM_002265478.2	PREDICTED: Vitis vinifera succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial-like (LOC100262240), mRNA
VIT_11s0016g01400	PSBX (photosystem II subunit X)	photosynthesis (GO:0015979)	XM_002279899.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100243957 (LOC100243957), mRNA
VIT_05s0102g00230	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type I alphasubunit	protein prenylation (GO:0018342)	XM_002264351.2	PREDICTED: Vitis vinifera protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha-like (LOC100247502), mRNA
VIT_05s0051g00940	Bet1 SNARE 1-1	protein transport (GO:0015031)	XM_002285644.1	PREDICTED: Vitis vinifera bet1-like SNARE 1-1 (LOC100266580), mRNA
VIT_07s0005g02990	Bet1 SNARE 1-1	protein transport (GO:0015031)	XM_002262949.2	PREDICTED: Vitis vinifera bet1-like SNARE 1-1 (LOC100266980), mRNA
VIT_19s0177g00100	Translation initiation factor eIF-1	regulation of translation (GO:0006417)	XM_002281836.1	PREDICTED: Vitis vinifera protein translation factor SUI1 homolog-like, transcript variant 1 (LOC100245122), mRNA
VIT_13s0019g04070	MLO1	response to biotic stimulus (GO:0009607)	NM_001281076.1	Vitis vinifera MLO6 protein (MLO6), mRNA
VIT_07s0129g00330	Lateral organ boundaries protein 39	response to gibberellin stimulus (GO:0009739)	XM_002284260.2	PREDICTED: Vitis vinifera LOB domain-containing protein 38-like (LOC100261250), mRNA
VIT_08s0056g00700	La domain-containing protein	RNA-dependent DNA replication (GO:0006278)	XM_002266673.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100258658 (LOC100258658), mRNA
VIT_03s0063g00130	Ribosomal protein S16 (RPS16A) 40S	translation (GO:0006412)	XM_002285065.1	PREDICTED: Vitis vinifera 40S ribosomal protein S16-like (LOC100250286), mRNA
VIT_07s0197g00010	Ribosomal protein L25	translation (GO:0006412)	XM_003635484.1	PREDICTED: Vitis vinifera 50S ribosomal protein L25-like (LOC100854002), mRNA
VIT_08s0040g02330	Elongation factor 1-alpha 1	translational elongation (GO:0006414)	XM_004199308.1	Millerozyma farinosa CBS 7064 hypothetical protein (Piso0_002793) mRNA, complete cds

se nadaljuje

nadaljevanje

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)		Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)		
Identifikacijska oznaka	Opis	Biološki proces (GO kategorija)	Identifikacijska oznaka	Opis
VIT_16s0098g01010	Ribosomal protein P1 (RPP1B) acidic 60S	translational elongation (GO:0006414)	XM_003634102.1	Vitis vinifera 60S acidic ribosomal protein P1-2-like (LOC100853764), mRNA
VIT_19s0177g00100	Translation initiation factor eIF-1	translational initiation (GO:0006413)	XM_002281836.1	PREDICTED: Vitis vinifera protein translation factor SUI1 homolog-like, transcript variant 1 (LOC100245122), mRNA
VIT_01s0011g00590	Acclimation of photosynthesis to environment	transport (GO:0006810)	XM_002274285.2	PREDICTED: Vitis vinifera pentatricopeptide repeat-containing protein At1g26460, mitochondrial-like (LOC100249185), mRNA
VIT_04s0023g02700	Thioredoxin H	transport (GO:0006810)	XM_002274169.1	PREDICTED: Vitis vinifera thioredoxin H-type 2-like (LOC100253934), mRNA
VIT_18s0001g13250	Thioredoxin H-type 1	transport (GO:0006810)	NM_001281234.1	Vitis vinifera thioredoxin H-type-like (LOC100250566), mRNA
VIT_01s0113g00540	Vesicle transport v-SNARE 13	vesicle-mediated transport (GO:0016192)	XM_002266807.1	PREDICTED: Vitis vinifera vesicle transport v-SNARE 12-like, transcript variant 1 (LOC100259152), mRNA
VIT_09s0002g02400	Prenylated rab acceptor (PRA1)	vesicle-mediated transport (GO:0016192)	XM_002279736.2	PREDICTED: Vitis vinifera PRA1 family protein F2-like (LOC100258362), mRNA
VIT_01s0026g02720	ATP/GTP-binding protein	/	XM_002268815.2	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100260241 (LOC100260241), mRNA
VIT_02s0012g01410	TRN2 (TORNADO 2)	/	XM_002278705.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100266064 (LOC100266064), mRNA
VIT_07s0005g01800	Agenet domain-containing protein	/	XM_003632366.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100855416 (LOC100855416), mRNA
VIT_13s0047g00720	AP2-associated kinase	/	XM_002263400.2	PREDICTED: Vitis vinifera putative disease resistance protein At3g14460-like (LOC100242803), mRNA
VIT_03s0063g02610	GRP7 (cold, circadian rhythm, and RNA binding 2)	/	XM_003631610.1	PREDICTED: Vitis vinifera glycine-rich RNA-binding protein GRP1A-like (LOC100853676), mRNA
VIT_19s0085g00040	Related to Ubiquitin 1 (RUB1)	/	XM_002265828.2	PREDICTED: Vitis vinifera ubiquitin-NEDD8-like protein RUB2 (LOC100241051), mRNA
VIT_18s0001g13190	MAPK (MPK9)	/	XM_003634325.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100852518 (LOC100852518), mRNA

se nadaljuje

nadaljevanje

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)		Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)	
Identifikacijska oznaka	Opis	Identifikacijska oznaka	Opis
VIT_18s0001g04680	RPG related protein 1 RR1	XR_078168.2	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100255792 (LOC100255792), miscRNA
VIT_05s0077g01390	Zinc finger (C2H2 type) protein (ZFP6)	/	/
/	/	XM_003633980.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100852754 (LOC100852754), mRNA
/	/	XM_002282124.2	PREDICTED: Vitis vinifera protein CYP04-like (LOC100265781), mRNA

Preglednica 24: Rezultati analize sekvenc z BLAST orodjem po neredundantni nukleotidni podatkovni zbirki (NR/NT) NCBI. Uporabljene so bile samo sekvence, ki jim nismo uspeli določiti funkcije v podatkovni zbirki genov vinske trte 12xV1 (CRIBI) in referenčni RNA podatkovni zbirki (NCBI).

Table 24: Results of BLAST analysis, using the non-redundant nucleotide sequences database (nr/nt) NCBI. Only sequences which were not annotated with the previous analysis using gene prediction database of grapevine (12xV1) and reference RNA database (NCBI).

Identifikacijska oznaka	Opis	Dolžina sekvence	Začetek poravnave	Konec poravnave	E-vrednost	Identičnost (%)
'Refošk' 38						
AM437853.2	Vitis vinifera contig VV78X148514.15, whole genome shotgun sequence	212	17	212	9E-85	96
AM446439.2	Vitis vinifera contig VV78X018060.3, whole genome shotgun sequence	144	13	144	3E-58	98
'Refošk' 43						
AM453487.1	Vitis vinifera contig VV78X068875.9, whole genome shotgun sequence	365	8	365	2E-168	96
AM480862.1	Vitis vinifera contig VV78X079260.6, whole genome shotgun sequence	255	6	255	8E-126	99

Preglednica 25: Seznam genov, ki so bili ugotovljeni pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik pri obeh biotipih sorte 'Refošk'. Pripadajoče E-vrednosti in ostale informacije v zvezi s poravnavno so podane v prilogi E.

Table 25: List of genes that were expressed in autografts of both 'Refošk' biotypes. E-values and other information are available in Annex E.

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)			Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)	
Identifikacijska oznaka	Opis	Biološki proces (GO kategorija)	Identifikacijska oznaka	Opis
VIT_18s0001g08270	Amino acid permease 6	amino acid transport (GO:0006865)	XM_002285521.2	PREDICTED: Vitis vinifera amino acid permease 6-like (LOC100257555), mRNA
VIT_08s0058g00640	Patellin-5	cell cycle (GO:0007049)	XM_002264443.2	PREDICTED: Vitis vinifera patellin-6-like (LOC100246625), mRNA
VIT_08s0058g00640	Patellin-5	cell division (GO:0051301)	XM_002264443.2	PREDICTED: Vitis vinifera patellin-6-like (LOC100246625), mRNA
VIT_07s0005g04970	NADH dehydrogenase	embryo development ending in seed dormancy (GO:0009793)	XM_002265813.2	PREDICTED: Vitis vinifera NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13-B-like (LOC100244646), mRNA
VIT_06s0004g07770	Peroxidase	hydrogen peroxide catabolic process (GO:0042744)	XM_002269882.2	PREDICTED: Vitis vinifera Peroxidase 4 (LOC100257005), mRNA
VIT_00s0220g00030	Small nuclear ribonucleoprotein F	mRNA processing (GO:0006397)	XM_002272210.2	PREDICTED: Vitis vinifera small nuclear ribonucleoprotein F-like (LOC100263985), mRNA
VIT_06s0004g07770	Peroxidase	oxidation-reduction process (GO:0055114)	XM_002269882.2	PREDICTED: Vitis vinifera Peroxidase 4 (LOC100257005), mRNA
VIT_06s0080g00980	Secoisolariciresinol dehydrogenase	oxidation-reduction process (GO:0055114)	XM_002272513.1	PREDICTED: Vitis vinifera momilactone A synthase-like (LOC100255259), mRNA
VIT_07s0005g04970	NADH dehydrogenase	oxidation-reduction process (GO:0055114)	XM_002265813.2	PREDICTED: Vitis vinifera NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13-B-like (LOC100244646), mRNA
VIT_07s0005g04970	NADH dehydrogenase	photorespiration (GO:0009853)	XM_002265813.2	PREDICTED: Vitis vinifera NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13-B-like (LOC100244646), mRNA
VIT_08s0040g02640	Serine/threonine-protein kinase AFC1	protein phosphorylation (GO:0006468)	XM_002278088.2	PREDICTED: Vitis vinifera serine/threonine-protein kinase AFC1-like (LOC100251648), mRNA

se nadaljuje

nadaljevanje

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)		Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)		
Identifikacijska oznaka	Opis	Biološki proces (GO kategorija)	Identifikacijska oznaka	Opis
VIT_18s0072g00380	Absciscic stress ripening protein 2 (ASR2)	response to stress (GO:0006950)	XM_003634472.1	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100250281, transcript variant 8 (LOC100250281), mRNA
VIT_00s0220g00030	Small nuclear ribonucleoprotein F	RNA splicing (GO:0008380)	XM_002272210.2	PREDICTED: Vitis vinifera small nuclear ribonucleoprotein F-like (LOC100263985), mRNA
VIT_08s0058g00640	Patellin-5	transport (GO:0006810)	XM_002264443.2	PREDICTED: Vitis vinifera patellin-6-like (LOC100246625), mRNA
VIT_11s0016g03140	ERD7 (EARLY-responsive TO dehydration 7)	/	XM_002280398.2	PREDICTED: Vitis vinifera uncharacterized LOC100259546 (LOC100259546), mRNA
/	/	/	XM_002278059.2	PREDICTED: Vitis vinifera PRA1 family protein B4-like (LOC100241569), mRNA

5 RAZPRAVA

5.1 GENETSKA RAZNOLIKOST SORTE 'REFOŠK'

Identifikacija različnih biotipov in ohranitev gensko raznolikega materiala sta pomembni tako z vidika boljšega prilagajanja sorte na različne naravne selekcijske pritiske, kot so novi škodljivci in bolezni, okoljske spremembe, kot tudi zaradi prilagajanja novim tehnologijam pridelave in predelave grozdja ter zaradi izboljšanja kakovosti in posebnosti vin (Mannini, 2000).

S stališča pridelovalca, ki v vinogradu goji trte izključno določenega klona, to pomeni, da ima vsaka trta v vinogradu identičen genotip in posledično večjo izenačenost pri razvoju in rasti. Take trte potrebujejo zaščito proti boleznim ali ostale ukrepe vzgoje v istem času, kar poveča učinkovitost tretiranja. V času trgatve je grozdje enakomerno dozorelo in je zato lahko vse potrgano hkrati, v času, ko doseže optimalno kakovost. V primeru gnilobe grozdja je klonski vinograd s tolerantnejšim klonom primernejši in bolj odporen v primerjavi z mešanim vinogradom. Uporaba klonskega materiala ima tako ekonomske kot ekološke prednosti (Forneck, 2005).

Klonski vinograd s stališča ekologije predstavlja najvišjo obliko monokulture. Rastline z enakim genotipom bi lahko ob pojavu novih bolezni ali škodljivcev v hipu propadle, vendar do sedaj še ni zapisov, da bi bili klonski vinogradi bolj ogroženi od ostalih nasadov. Najverjetneje je to zaradi tega, ker je vsak vinograd že tako ali tako monokulturni nasad, kjer so genetske razlike med različnimi kloni oziroma biotipi majhne (Forneck, 2005).

Genetsko variabilnost lahko ugotavljamo na podlagi razlik v fenotipu (morfološki in biokemijski markerji) ali s proučevanjem variabilnosti molekule DNA (molekulski markerji). Na razvoj fenotipskih lastnosti poleg dednega zapisa močno vplivajo tudi okoljski dejavniki ter zdravstveno stanje trte (Mannini, 2000; Sefc in sod., 2001). Prav zaradi tega so za namene ovrednotenja genetske variabilnosti vse bolj pogosto v uporabi analitske tehnike, ki temeljijo na proučevanju DNA molekule (Barth in sod., 2009; María Ortiz in sod., 2004). V procesu selekcije vinske trte pa so ampelografske metode, ki temeljijo na fenotipskih lastnostih še vedno nujne, saj lahko le na tak način pridobimo informacije o agro-bioloških lastnostih odbranih matičnih trsov in klonov.

5.1.1 Analiza mikrosatelitskih lokusov

Mikrosatelitske markerje smo uporabili, da preverimo sortno pristnost vzorcev sorte 'Refošk'. Vzorce smo analizirali s 6 mikrosatelitskimi lokusi. Pri vseh vzorcih smo ugotovili identičen genotip in s tem potrdili sortno pristnost proučevanih vzorcev.

Da bi preverili skladnost ugotovljenega genotipa smo rezultate primerjali s predhodnimi rezultati slovenskih študij in sicer Kozjak in sod. (2003) in Štajner in sod. (2013). Primerjali smo razlike med dvema pomnoženima aleloma, saj bi za primerjave relativnih dolžin alelov potrebovali referenčne sorte v vseh primerjanih analizah. Ugotovljeni genotip je bil v primerjavi z rezultati Štajner in sod. (2013) pri vzorcu »refošk Istra« na 5 mikrosatelitskih lokusih identičen, medtem ko se je na lokusu VVMD32 razlikoval za 1 bp, kar je najverjetneje posledica zaokroževanja dolžin mikrosatelitskih alelov na celo število. Zanimivo je, da smo pri rezultatih Kozjak in sod. (2003) ugotovili enak rezultat samo pri lokusu VVMD27, pri vseh ostalih pa razliko za 2 oz. 3 bp (preglednica 11), kar je posledica vrednotenja lokusa kot homozigotnega namesto heterozigotnega. Pogosto različno vrednotenje heterozigotov in homozigotov, kjer se alela razlikujeta za 2 bp so ugotovili tudi This in sod. (2004), ko so proučevali skladnost rezultatov analize istih vzorcev z mikrosateliti pridobljenih v 10 različnih laboratoriji z različno tehnologijo.

Identičen genotip smo na 4 oz. 5 analiziranih mikrosatelitskih lokusih ugotovili tudi pri vzorcih sort 'Teran' in 'Terrano', ki so ga določili Maletić in sod. (1999) in Sefc in sod. (2000). Prvi so vzorce za analizo pridobili iz Inštituta za kmetijstvo in turizem iz Poreča in iz Fakultete za kmetijstvo iz Zagreba. Iz Inštituta za kmetijstvo in turizem iz Poreča je bil prav tako pridobljen vzorec Terrano, ki so ga v analizo vključili Sefc in sod. (2000).

5.1.1.1 Sorta 'Refošk' v primerjavi s sorto 'Refosco peduncolo rosso' ter z nekaterimi lokalnimi evropskimi sortami

Z analizo podatkov, shranjenih v mikrosatelitskih podatkovnih zbirkah so bili ugotovljeni 3 genotipi, ki so bili ugotovljeni več kot enkrat (preglednica 11). Prvi genotip predstavljajo vzorci od 1 do 11 in znotraj te skupine je uvrščenih več sort z imenom 'Refošk', ki jih gojijo na območju Italije, npr. 'Refosco nostrano', 'Refosco di Guamieri', 'Refosco peduncolo rosso', 'Refosco di Rauscedo' in 'Terrano'. Vzorci 12, 15 in 16, glede na analizirane lokuse, predstavljajo drugi genotip. V tej skupini se pojavlja samo 'Refosco dal peduncolo rosso' (za ta tip so značilni rdeči jagodni peceljčki). Vzorci 13, 18, 20 in genotip iz naše analize pod zaporednim številom 21 predstavljajo 3 genotip, ki je značilen za sorto 'Refošk', ki jo gojijo v Istri. Glede na različna poimenovanja znotraj prve skupine sklepamo, da trenutno še vedno ni določenih standardnih genotipov za posamezne sorte ali biotipe z imenom 'Refošk' na območju Italije, na katere bi lahko primerjali neznane biotipe.

Z namenom, da bi ugotovili v katero skupino sort vinske trte se uvrsti sorta 'Refošk', smo s pomočjo rezultatov Sefc in sod. (2000) izdelali dendrogram. V študijo je bilo vključenih 161 lokalnih sort iz Avstrije, Nemčije, Francije, Portugalske, Hrvaške, Grčije, Španije in iz Italije. Iz dendrograma je razvidno, da se je vzorec sorte 'Terrano' (ki ima na 5 mikrosatelitskih lokusih identičen genotip sorti 'Refošk') uvrstil v skupino, v kateri je še 12 sort iz Italije, 2 iz Francije, 1 iz Hrvaške in 1 iz Španije. Uvrstitev sorte 'Refošk' v skupino

zahodno evropskih sort so ugotovili tudi Štajner in sod. (2013). Omenjene ugotovitve kažejo na to, da se sorta 'Refošk' po genetskem zapisu uvršča v skupino zahodno-evropskih sort (*Proles occidentalis*) in ne v črnomorsko ekološko skupino *Proles pontica*, kamor je trenutno uvrščena na osnovi morfoloških lastnosti (Negrulj, 1959).

Z gotovostjo lahko tudi potrdimo, da se sorta 'Refošk', ki jo gojimo v Sloveniji razlikuje od številnih sort z imenom 'Refošk', ki jih gojijo v Italiji, na nivoju DNA. V dendrogramu sta se sorti 'Refošk' in 'Refosco peduncolo rosso' razvrstili skupaj, kar nakazuje na določeno sorodstveno povezavo.

5.1.2 Analiza markerjev AFLP

S 6 kombinacijami selektivnih začetnih oligonukleotidov smo ugotovili 16 od skupno 208 ponovljivih polimornih markerjev AFLP, ki so analizirane vzorce sorte 'Refošk' razdelili v dve večji skupini. V tako imenovani homogeni skupini je imelo vseh 72 vzorcev enak genetski profil, medtem ko je drugo heterogeno skupino, sestavljalo 41 vzorcev, pri katerih smo ugotovili do 16 dodatnih markerjev AFLP. V izdelavo dendrograma smo vključili samo vzorce iz heterogene skupine.

Število ugotovljenih polimornih markerjev AFLP in uspešnost ločevanja se med raziskavami znotraj-sortne in klonske variabilnost razlikuje in je odvisno od števila analiziranih vzorcev, števila namnoženih markerjev in genetskega materiala. Fanizza in sod. (2003) je pri analizi 4 klonov sorte 'Italia' z 49 kombinacijami selektivnih začetnih oligonukleotidov namnožil 3880 markerjev, vendar ni ugotovil nobenega polimornega markerja; Filippetti in sod. (2005) so z 9 kombinacijami uspeli ločiti samo 3 od skupno 26 klonov sorte 'Sangiovese'; Anhalt in sod. (2011) so pri sorti 'Rizling' z 10 kombinacijami začetnih oligonukleotidov namnožili 375 markerjev, od tega jih je bilo kar 135 polimornih, vendar večina klonov ni kazala nobene oziroma eno ali dve mutaciji na vseh 10 kombinacijah.

Povprečna genska raznolikost, podatek ki poda možnost, da sta dve naključno izbrani mesti različni (možnost, da sta dva naključno izbrana haplotipa med vzorci različna), je 0,0294 s standardnim odklonom 0,0155. Dobljena vrednost je manjša, kot je bila ugotovljena npr. med kloni sorte 'Pinot Noir': $0,04 \pm 0,021$ (Blaich in sod., 2007), in podobna ugotovljeni vrednosti med kloni sorte 'Pinot Gris': $0,023 \pm 0,014$ (Konradi in sod., 2007).

Klonsko variabilnost vinske trte na nivoju DNA pripisujejo somatskim mutacijam, poliklonskemu nastanku sort ter himerizmu, pri katerem gre za spremembo genetskega materiala samo v enem sloju tkiva. Največje gonilo somatskih mutacij predstavljajo mobilni elementi oziroma transpozoni (Carrier in sod., 2012). Strokovno utemeljitev za poliklonski nastanek sort podajajo Filippetti in sod. (1999), ki ugotavljajo, da so si sejanci

iz samooprašenih cvetov morfološko podobni, medtem ko so jih z mikrosatelitskimi lokusi lahko ločili.

Apikalni meristem je sestavljen iz večih ločenih plasti. Pri trti naj bi bil apikalni meristem iz dveh plasti celic (Thompson in Olmo, 1963). Iz vsake od teh plasti se razvijejo različna tkiva in vsaka plast se razvija neodvisno od druge (Pelsy, 2010). V kolikor pride do spremembe genetskega materiala v samo enem sloju in se tovrstno stanje z vegetativnim razmnoževanjem prenaša naprej, tak organizem imenujemo periklinalna himera (Thompson in Olmo, 1963). Identifikacijo himernih organizmov omogočajo mikrosatelitski markerji in sicer v primeru, ko se pri mikrosatelitskem lokusu pojavijo trije ali štirje aleli, npr. Hocquigny in sod. (2004) so potrdil himerizem pri treh klonih sorte 'Sivi pinot', ko so odkrili 3 alelni profil na štirih mikrosatelitskih lokusih (VVS2, VVMD7, VVMD32, VMC5g7) izmed 50 analiziranih lokusih. Pri sorti 'Pinot Meunier' (ali 'Črni rizling', mutacija sorte 'Modri pinot' (Vršič, 2008)), so himerizem potrdili Franks in sod. (2002). Stenkamp in sod. (2009) so z markerji AFLP proučevali variabilnost 6 klonov Samtrot (mutacija sorte 'Črni rizling' - brez dlačič (Vršič, 2008)), 11 klonov sorte 'Pinot Meunier' (tudi oni so z mikrosatelitskimi markerji potrdili himerizem) in 8 mutantov sorte 'Pinot Meunier'. Večja genetska variabilnost je bila ugotovljena med nehimernimi mutanti (1,3 %) v primerjavi s himernimi kloni (0,6 %), kar nakazuje na stabilnost periklinalne himere.

Glede na to, da s 6 mikrosatelitskimi lokusi nismo odkrili različnih genotipov, bi lahko na podlagi tega sklepali, da je sorta 'Refošk' monoklonalna. Vendar če predpostavimo, da bi z analizo večih mikrosatelitskih lokusov lahko odkrili polimorfizem in ob upoštevanju rezultatov analize AFLP, ko je bilo pri 41 vzorcih ugotovljenih od 10 do 16 dodatnih markerjev AFLP glede na homogeno skupino, lahko sklepamo, da je sorta 'Refošk' poliklonske narave iz sicer iz genetsko različnih prednikov, vendar morfološko zelo podobnih. Cervera in sod. (1998) so namreč ugotovili, da je bil koeficient podobnosti med različnimi sortami v razponu od 0,70 do 0,90, medtem ko bi vzorci s koeficientom podobnosti na 0,90 lahko pridapadali isti sorti. Visok delež podobnosti, nad 92,9 %, je bil ugotovljen tudi med kloni sorte 'Traminer' (Imazio in sod., 2002). Med 70 kloni sorte 'Pinot noir' je bila ugotovljena podobnost nad 94 % (Blaich in sod., 2007).

5.1.3 Analiza ampelografskega preučevanja biotipov in ugotavljanje povezave med ampelografskimi lastnostmi ter znamenji bolezní razbrazdanja z markerji AFLP

S proučevanjem morfoloških in kemijski lastnosti grozdov, jagod in mošta smo ugotovili, da med posameznimi biotipi sorte 'Refošk' prihaja do razlik. Lastnosti, kot sta zbitost in masa grozda ter velikost jagod so pomembne agronomske lastnosti. Stopnja zbitosti ima velik pomen pri okužbi s sivo grozdno plesnijo (*Botrytis cinerea*) (Vail in Marois, 1990). Za pridelavo kakovostnih vin so primernejše manjše jagode, saj se antociani nahajajo le v vakuolah zunanjega hipodermisa (notranji sloj kože), medtem ko je meso obarvano le pri

nekaterih sortah (npr. 'Gamay' ali barvarica) ali pri prezrelem grozdju, kjer se barvila sproščajo iz kože v meso (Keller, 2010).

Ampelografsko preučevanje biotipov sorte 'Refošk' smo izvedli, da bi ugotovili, ali lahko tudi na morfološkem in kemijskem nivoju biotipe ločimo glede na ugotovljeno razvrstitev z markerji AFLP. Na osnovi dendrograma, ki razvršča biotipe sorte 'Refošk' glede na ampelografsko preučevanje povezave z razvrstitvijo osnovano na analizi AFLP nismo ugotovili. K temu je verjetno pripomogel izbor deskriptorjev, močno odvisnih od posameznega letnika, obremenitve trt in zdravstvenega stanja. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno ampelografsko preučevanje biotipov podaljšati na več let in vključiti preučevanje lastnosti, na katere manj vplivata okolje ali okužba z virusom, npr. filometrijske meritve listov: oblika peceljnega sinusa, meritve kotov žil, ki niso odvisne od velikosti ampak samo od oblike, kar velja tudi za različna razmerja med dolžinami (Tomažič, 1999).

Da bi ugotovili, ali lahko bolezen razbrazdanja lesa povežemo z markerji AFLP smo pri vzorčenju sorte 'Refošk' vsak trs, razen treh najstarejših trt iz Merč, Šepulj in Marezig, iz katerega smo vzeli list za izolacijo DNA pregledali za znamenji bolezní razbrazdanja lesa, vendar povezave med boleznijo razbrazdanja lesa in molekulskimi markerji nismo ugotovili.

Študije, pri katerih ravno tako niso ugotovili povezave med markerji AFLP in ampelografskimi lastnostmi je kar nekaj. Imazio in sod. (2002) niso ugotovili povezave med genetsko variabilnostjo in ampelografskimi lastnostmi (morfolologija lista, barva jagod ter velikost in oblika semen) klonov sorte 'Traminer'. Martinez in sod. (2003) niso ugotovili statistično značilne povezave med morfološkimi lastnostmi in rezultati analize AFLP pri sorti 'Criollas'. Meneghetti in sod. (2012b) niso ugotovili povezave med AFLP in morfološkimi meritvami pri različnih tipih sorte 'Malvazija'. Blaich in sod. (2007) prav tako niso ugotovili povezave markerjev AFLP z lastnostmi grozda in nekaterimi drugimi lastnostmi pri proučevanju 70 klonov sorte 'Pinot noir', razen za zgodnejše zorenje. Isti avtorji so mnenja, da možnost za identifikacijo markerja v povezavi z morfološko lastnostjo zavisi od velikosti vzorca, natančnosti pri vrednotenju fenotipa ter od izbranega genetskega materiala. Kot razlog za slabo korelacijo med markerji AFLP in morfološkimi markerji bi lahko poleg tega, da tudi z večjim številom markerjev analiziramo majhen del genoma, navedli še, da so mutacije, ki povzročijo spremembe fenotipa omejene na manjše regije ali točkovne mutacije, ki jih s tehniko AFLP težje ugotovimo (Fanizza in sod., 2003).

5.2 KOMPLEKS BOLEZNI RAZBRAZDANJA PRI SORTI 'REFOŠK'

5.2.1 Indeksiranje

Namen indeksiranja je bil preveriti ali se znamenja bolezní razbrazdanja lesa pojavijo pri cepljenju zeleno na zeleno in v kolikem času po cepljenju lahko pričakujemo pojav znamenj. Na splošno za kompleks bolezní razbrazdanja lesa velja, da se znamenja bolezní pojavljajo tudi pri cepljenkah iz prizadetih trsov (Martelli, 1993). Omenjeno velja tudi za tip razbrazdanja, ki se pojavlja na sorti 'Refošk'. V kolekcijskem vinogradu v Komnu, trte istega biotipa kažejo podobna znamenja razbrazdanja lesa. Trte biotipa 'Refošk' 38 so najbolj prizadete; ob pregledu v avgustu 2013 je rastlo še 6 trt od vseh 22 posajenih trt; preračunano v odstotke to pomeni, da je propadlo 72,7 % trt pri omenjenemu biotipu.

Drugi cilj indeksiranja pa je bil ugotoviti ali se znamenja razbrazdanja lesa pojavijo tudi na cepljenkah, pri katerih mladiko prerežemo in ponovno združimo. Slednji poskus bi pokazal ali je morda vzrok za razvoj bolezní razbrazdanja lesa genetska inkompatibilnost, ali pa se znamenja pokažejo kot fiziološki odziv rastline na stres, povzročen s cepljenjem oziroma v kombinaciji fiziološkega odziva in okužbe s patogeni.

Dosedanje raziskave so bolezen razbrazdanja lesa obravnavale kot posledico okužbe s patogeni in so se osredotočale predvsem na iskanje povezave z virusi, vendar vzrok oziroma povzročitelj bolezní še ni pojasnjen. Enako velja tudi za bolezen razbrazdanja lesa na sorti 'Refošk'.

Indeksiranje se običajno izvaja na standardnih indikatorskih rastlinah: *V. rupestris* 'St. George', 'LN 33' (Couderc 1613 x *V. berlandieri*) and 'Kober 5BB' (*V. berlandieri* x *V. riparia*); in s tehniko cepljenja imenovano okulacija. Indeksiranje v okviru te naloge je bilo zastavljeno tako, da smo mladike biotipov sorte 'Refošk' cepili na podlago SO4 (*V. Berlandieri* x *V. Riparia*), saj smo hoteli ugotoviti ponovljivost razvoja znamenj bolezní razbrazdanja lesa, kot se kaže v kolekcijskem vinogradu. SO4 je tudi v vinogradih pogosto uporabljena podlaga za sorto 'Refošk'.

Za izvedbo cepljenja zeleno na zeleno smo se odločili, ker ima ta tehnika kar nekaj prednosti pred cepljenjem z olesenelimi rozgami in sicer (Walter in sod., 1990): znamenja nekaterih bolezní se pojavijo že v nekaj tednih (medtem ko je pri cepljenju na suho za razvoj znamenj potrebnih 2 ali več let (Credi, 1997b; Martelli, 1993)), za izvedbo cepljenja je potrebnega manj prostora in lahko se ga izvaja skozi celotno rastno dobo. Cepljenje na zeleno se uporablja tudi v zdravstveni selekciji vinske trte v Sloveniji. Vendar so Walter in sod. (1990) ugotovili, da se na zelenih cepljenkah v 3 mesecih niso pojavila znamenja na indikatorju 'Kober 5BB' in *V. rupestris*. Isti avtorji so izvedli primerjavo med cepljenjem z

olesenelimi rozgami in z zelenim cepljenjem in ugotovili, da so se znamenja plutavosti lesa razvila na več indikatorjih v primerjavi z zelenimi cepljenkami.

Odstotek živih cepljenek (sorta 'Refošk' cepljena na podlago SO4) se je pri zadnjem pregledu gibal pri večini biotipov od 25 do 40 %, le pri biotipu 'Refošk' 51 je dosegel 60 %. Odstotek živih cepljenk s spojenimi lastnimi deli je pri zadnjem pregledu bolj variabilen v primerjavi z odstotkom pri cepljenkah na podlago SO4 in se je gibal od 27,3 do 80 %. Največji uspeh cepljenja je bil zabeležen ravno pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 48, ki v kolekcijskem vinogradu v Komnu kažeta znamenja bolezní razbrazdanja lesa, medtem ko je bil pri biotipih 'Refošk' 43, 'Refošk' 51 in 'Refošk' 61 ugotovljenih največ propadlih cepljenk.

Glede na to, da je bil uspeh cepljenja pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik največji ravno pri biotipih, ki povzročata razbrazdanje na sorti 'Refošk' ter da je bil uspeh cepljenja pri cepljenkah na podlagi SO4, podoben kot pri kontrolnih biotipih, 'Refošk' 43 in 'Refošk' 61, lahko predpostavimo, da bolezen razbrazdanja lesa ne vpliva na uspeh cepljenja. Uspeh cepljenja pripisujemo naključnemu dogodku. V primeru, da bi se cepljenke z domnevno okuženim materialom slabše prijele, bi se tak sadilni material lahko izločalo že v trsnicah v začetnih fazah proizvodnje sadilnega materiala.

5.2.1.1 Pojav znamenj bolezní razbrazdanja lesa na sorti 'Refošk'

S pojavom znamenj bolezní razbrazdanja lesa pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 48 smo, da se bolezen prenaša s cepljenjem. Ker so se znamenja bolezní razvila tudi na cepljenkah s spojenimi lastnimi deli pri biotipih 'Refošk' 38 in 'Refošk' 48, lahko s tem izključimo dejavnik inkompatibilnosti. Genetsko inkompatibilnost so pri bolezní propadanje trt sorte 'Syrah' izključili tudi Renault-Spilmont in sod. (2007), ko so pri cepljenju klonov sorte 'Syrah' na sorto 'Syrah' na cepljenkah ugotovili znamenja bolezní. Možen vzrok za razvoj bolezní bi tako lahko bil fiziološki odziv rastline na stres povzročen s cepljenjem ali sinergijski učinek stresa in patogenov. Majhno število cepljenk z opaženimi znamenji lahko v primeru sinergijskega učinka z virusi razložimo s tem, da se v zelene mladike še niso prenesli virusi, odgovorni za razvoj bolezní. Poznano je namreč, da so virusi neenakomerno porazdeljeni po rastlini (Fiore in sod., 2009; Rowhani in Uyemoto, 1997). Credi (1997a) in Martelli (1993) kot razlog navajajo tudi latentnost znamenj. Upoštevati moramo tudi, da bi se znamenja lahko pojavila, v kolikor bi cepljenke vzgajali v trsnici še dodatno leto ali če bi v rastlinjaku uporabili drugačne rastne pogoje.

Čeprav smo cepili zeleno na zeleno, smo za pojav prvih znamenj morali čakati več kot 3 leta, kar je podobno kot pri indeksiranju z uporabo olesenelih rozg (Credi, 1997b; Martelli, 1993).

5.2.1.2 Odsotnost znamenj bolezní razbrazdanja lesa na podlagi SO4

Biotipa 'Refošk' 20 in 51 v kolekcijskem vinogradu povzročata razbrazdanje na podlagi SO4, medtem ko sama ohranita zdrav videz. V našem poskusu nismo opazili znamenj na cepljenkah s spojenimi lastni deli, kot tudi ne na cepljenkah na podlagi SO4. Vseeno predpostavljamo, da sta omenjena biotipa vir bolezní razbrazdanja lesa, saj se tovrstno razbrazdanje pojavlja samo pri teh biotipih. V kolikor bi razbrazdanje v kolekcijskem vinogradu povzročila okužena podlaga, bi se razbrazdani trsi pojavljali po celotnem vinogradu in ne samo pri teh dveh biotipih. Neuspešen pojav znamenj lahko morda pripišemo drugemu klonu podlage SO4, ki je bil upravljen za indeksiranje, od tistega, na katerega so cepljene trte v vinogradu ali zaradi zdravstvenega stanja podlag (v primeru, da je razvoj znamenj povzročil sinergizem virusov v biotipih in v podlagi), saj se z razvojem novih tehnologij, ki omogočajo odkrivanje novih virusov povečuje število obveznih testiranj sadilnega materiala. Razlika v občutljivosti klonov je bila ugotovljena tudi pri različnih klonih sorte 'Syrah' na bolezen propadanja trt sorte 'Syrah' (ang. Syrah decline), ki prav tako povzroča spremembe na cepljenem mestu in propad rastlin (Renault-Spilmont in sod., 2007).

Credi (1997b) je predpostavil, da je razvoj znamenj bolezní razbrazdanja lesa odvisen tudi od abiotiskih dejavnikov, kot na primer velja za virusno bolezen zvijanja listov in kjer izbira indikatorja za detekcijo te bolezní zavisi od klimatskih pogojev (Pathogen-tested ..., 2008). Walter in sod. (1990) predpostavljajo, da bi se lahko v primeru cepljenja zeleno na zeleno razvoj znamenj izboljšalo s prilagoditvijo temperaturnih in svetlobnih pogojev. Z optimizacijo pogojev bi lahko izboljšali razvoj znamenj tudi pri biotipih 'Refošk' 38 in 48. S poskusom smo potrdili rezultat indeksiranja zeleno na zeleno, ki so ga izvedli Walter in sod. (1990), ki ravno tako po nekaj mesecih niso odkrili znamenj bolezní razbrazdanja lesa na indikatorjih V. rupestris in Kober 5BB. Zaključili so, da bi bilo za razvoj bolezní potrebno počakati več časa.

5.2.2 Analiza izraženosti genov

Z metodo diferenčnega prikaza smo pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik, v treh različnih časovnih odbobjih po cepljenju, pri biotipih 'Refošk' 38 identificirali 33 edinstveno izraženih genov, pri biotipu 'Refošk' 43 pa 32 edinstveno izraženih genov; skupaj 65 genov.

Poškodba pri rastlini povzroči, da se aktivira veliko različnih genov (Zhou in Thornburg, 1999), kar potrjuje tudi identifikacija večjega števila genov pri obeh biotipih iz GO kategorij bioloških procesov, npr. regulacija transkripcije, procesiranje mRNA, izrezovanje RNA, sinteza aminokislin, regulacija translacije, elongacija translacije, iniciacija

translacije ter biološki procesi postrnslacijskih modifikacij, kot so zvijanje proteinov, fosforilacija, prenilacija, in transport proteinov.

Pri obeh biotipih je bila z največ geni zastopana GO kategorija oksidacijsko redukcijski procesi, kar potrjuje predhodne ugotovitve, da se pri odzivu rastline na ranitev najprej sprožijo številni oksidacijski procesi oz. oksidacijski izbruh (ang. oxidative burst), ki poškodovano mesto zaščitijo pred okužbo z mikroorganizmi in zaščitijo rastlino pred dodatno izgubo celičnih komponent (Zhou in Thornburg, 1999). Ugotovljeno je bilo, da ima veliko vlogo pri tem vodikov peroksid, ki nastaja z genetsko kontroliranim procesom z NADPH oksidazami in deluje kot pomembna signalna molekula (Laloi in sod., 2004; Zhou in Thornburg, 1999). Ker je vodikov peroksid sam po sebi toksičen za rastlinske celice, nastajajo številne peroksidaze, ki zmanjšujejo koncentracijo vodikovega peroksida (Zhou in Thornburg, 1999). Pri biotipu 'Refošk' 43 smo npr. identificirali gen za peroksidazo (VIT_11s0016g05320).

5.2.2.1 Ugotovljeni geni pri biotipu 'Refošk' 43

Poleg ugotovljenega gena za peroksidazo pri biotipu 'Refošk' 43 smo pri kategoriji oksidacijsko redukcijski procesi identificirali še gen za sukcinat-semialdehid dehidrogenazo (*SSADH*). Bouché in sod. (2003) so pri navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) z mutiranim *SSADH* genom ugotovili hiter porast vodikovega peroksida, ko so izpostavili rastline UV svetlobi in povišani temperaturi. Zvišana koncentracija vodikovega peroksida je povzročila nekroze. *SSADH* je eden od treh genov pri GABA mehanizmu in Bouché in sod. (2003) so prišli do zaključka, da omenjeni mehanizem preprečuje kopičenje reaktivnih kisikovih intermediatov in posledično celične smrti, kar je ključnega pomena za uspešno obrambo rastline pred okoljskim stresom.

V kategoriji redoks homeostaza smo identificirali različna tipa tioredoksinov h. Promotorske regije tioredoksinov vsebujejo regulatorne elemente, ki sodelujejo pri odzivu rastline na okoljske signale. Ferreira in sod. (2006) so pri poskusu s topolom (*P. euphratica*), ko so rastline izpostavili vročini, ugotovili akumulacijo tioredoksinov h, kar so povezali z odgovorom rastline na oksidativen stres. Tioredoksin h namreč deluje antioksidativno (Laloi in sod., 2004) in zato pripomore k vzpostavitvi redkos ravnovesja. Povečano izražanje tioredoksin h genov je bilo ugotovljeno tudi pri listih trte, ki so bili tretirani z vodikovim peroksidom. (Haddad in Heidari Japelaghi, 2014). Prav tako sta Haddad in Heidari Japelaghi (2014) ugotovila povečano izražanje tioredoksinov h pri potaknjencih v različnih pogojih, kot so suša, zasoljenost in vročinski stres.

Kafeoil-CoA 3-O-metiltransferaza (*CCoAOMT*) je protein, ki sodeluje pri procesu suberizacije/lignifikacije (Barel in Ginzberg, 2008). *CCoAOMT* pretvori kafeoil-CoA v ferul-CoA in po mišljenju strokovnjakov naj bi bil udeležen pri obrambi rastline z

utrjevanjem celične stene (Barel in Ginzberg, 2008). Domnevno kafeoil-CoA 3-O metiltransferaza je bila identificirana kot najbolj izražena pri sončnici, izpostavljeni sušnemu stresu (Fulda in sod., 2011).

Za *GRP* (ang. glycine-rich RNA-binding protein) (VIT_03s0063g02610) so (Sano in sod., 2013) pri sušenju riževih semen ugotovili povečano sintezo teh proteinov. Predpostavili so, da *GRP* proteini delujejo kot molekularni šaperoni, ki ohranjajo stabilnost dlje živečih mRNA molekul. Šaperoni ali vročinski (ang. heat shock) proteini imajo pomembno vlogo tudi pri delovanju celic v stresnih situacijah, ker takrat sodelujejo pri ponovnem zvijanju proteinov, pri katerih je zaradi stresa prišlo do denaturacije ali pa poškodovan protein razgradijo (Mayer in Bukau, 2005).

RUB proteini (VIT_19s0085g00040), imenovani tudi *NEDD8* (ang. neural precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8) sodeluje pri popravilu DNA, DNA podvojevanju, transkripciji in organizaciji kromatina (Xirodimas, 2008). Zhang in sod. (2013) so pri rastlinah navadnega repenjakovca, ki so jih gojili na gojišču s povečano koncentracijo NaCl ugotovili povečano izražanje tega gena, kar naj bi izboljšalo fiziološke lastnosti rastlin v stresnih rastnih razmerah.

Zadnji identificirani gen, ki smo ga prav tako uvrstili med gene, ki se izrazijo pri odgovoru rastline na stres je *MLO6* (VIT_13s0019g04070). Pri okužbi ječmena z žitno pepelovko so (Piffanelli in sod., 2002) pri delno občutljivem genotipu z mutirano alelno obliko *mlo-5* opazili delno nekrozo na mestu okužbe, medtem ko pri divjem tipu, občutljivem na bolezen, z normalno alelno obliko *MLO*, do nekroz ni prišlo. *MLO* gen namreč deluje zaviralno na obrambni mehanizem rastline (Piffanelli in sod., 2002). Povečano izražanje *MLO6* gena je bilo ugotovljeno pri vinski trti pri povzročenem stresu z mehansko poškodbo listov in sicer brusilnim papirjem ter pri tretiranju listov s H₂O₂ in salicilno kislino, kot dveh obrambnih signalnih metabolitov (Feechan in sod., 2008).

5.2.2.2 Ugotovljeni geni pri biotipu 'Refošk' 38

Pri biotipu 'Refošk' 38 smo identificirali manj genov kot pri biotipu 'Refošk' 43, ki bi jih lahko glede na obstoječo literaturo povezali z odzivom na stres ali cepljenje. Tako kot pri biotipu 'Refošk' 43 smo tudi pri biotipu 'Refošk' 38 identificirali gen, ki preprečuje poškodbe celic zaradi nastalega vodikovega peroksida, to je protein malat dehidrogenaza (VIT_09s0002g03620) (Oh in sod., 2002), kar nakazuje, da so se cepljenke tudi pri biotipu 'Refošk' 38 odzvale z oksidacijskim stresom.

Gen za receptor, podoben kinazi *FERONIA* (VIT_14s0068g00030) ima pomembno vlogo pri izdolževanju celic med vegetativno rastjo (Guo in sod., 2009). Duan in sod. (2010) so izvedli eksperiment s transgenimi rastlinami navadnega repenjakovca z izničnim genom

(genotip *fer-4*), s krajšim transkriptom (*fer-5*) ter z normalnim alelom za protein *FERONIA*. Pri nastajanju koreninskih laskov so pri genotipu *fer-4* ugotovili, da so bili statistično značilno krajši, kazali so hujše oblike deformacij in propadli kmalu po nastanku, medtem ko so bili koreninski lasi pri genotipu *fer-5* krajši v primerjavi z divjim genotipom in so kazali le manjša znamenja prizadetosti. Pri koreninah in v koreninskih laskih je znano, da avksini sprožijo rast z akumulacijo ROS z NADPH oksidazami. Pri tretiranju rastlin z avksini so Duan in sod. (2010) ugotovili, da je pri genotipih z okvarjenim genom prišlo do manjše akumulacije ROS in rastline so bile manj odzivne na dodatek hormona. (Duan in sod., 2010) so predpostavili, da ima gen *FER* pomembno vlogo pri razvoju in rasti, saj okvara *FER* gena povzroči močno zaostalost.

V prihodnje bi bilo smiselno preučiti gen *FER* pri obeh biotipih, saj bi lahko glede na zgornje ugotovitve prispeval k razvoju znamenj bolezní razbrazdanja lesa. Glede na to, da smo pri biotipu 'Refošk' 38 identificirali manjše število genov za proteine z antioksidativnim delovanjem lahko sklepamo, da je pri biotipu 'Refošk' 38 prišlo do manjšega oksidativnega stresa in posledično do aktivacije manjšega števila genov, udeleženih pri odzivu rastline na stres.

CIPK protein kinaze, ki pri stresu delujejo kot pomemben signalni sistem, po predvidevanjih (Yin in sod., 2012) sodelujejo pri vzpostavitvi začetne komunikacije celic med podlago in cepičem. Pri hidrolizi celične stene poškodovanih celic se sproščajo oligosaharidi, ki delujejo kot pomembne signalne molekule, tudi pri odzivu rastline na stres. Prenašalci sladkorja *SWEET* proteini zaznajo tuje sladkorje s cepiča in jih prenesejo v celice podlage, kjer to kot signal zaznajo *CIPK* proteini in na ta način se vzpostavi medcelično komuniciranje (Yin in sod., 2012). *CIPK* in *MAPKKK* sta dva razreda kinaz, ki sta udeležena pri odzivu rastline na stres in ob pojavu abscizinske kisline (Finkelstein, 2013). Abscizinska kislina predstavlja centralni regulator pri odzivu rastline na stres in povzroči večje spremembe pri izražanju genov ter v fizioloških procesih, s katerimi se rastlina prilagaja stresnim situacijam (Danquah in sod., 2014).

Amilaza/subtilizin inhibitor (VIT_00s0270g00120) spada v razred inhibitornih proteinov, ki inhibirajo proteine izločene od različnih patogenov med okužbo (Fitzgerald in sod., 2011).

DnaJ proteini (proteini z J domeno) sodelujejo kot kofaktorji s HSP70s (ang. 70-kDa heat shock proteins) šaperoni. Proteini z J domeno preprečujejo zvijanje proteinov v nepravilno obliko s pomočjo vezave hidrofobnih molekul različnih substratov ali proteinov samih in tako preprečujejo znotraj-molekulske interakcije. J domena služi za interakcijo s HSP70s proteini (Mayer in Bukau, 2005).

TOPLESS in *TOPLESS-related (TPL)* korepresorji uravnavajo izražanje genov v različnih procesih, npr. hormonsko signaliziranje in odgovor na stres. Po zadnjih odkritjih *TPL* korepresorji sodelujejo tudi v mehanizmih, ki so udeleženi pri signaliziranju z avksini ter jasmonsko kislino, za katero je prav tako znano da sodeluje pri odgovoru rastline na stres (Causier in sod., 2012).

Z analizo diferenčno izraženih transkriptov smo skupaj pri cepljenkah obeh biotipov ugotovili 65 diferenčno izraženih genov, ki predstavljajo kandidatne transkripte za nadaljnje preučevanje razvoja bolezni. S preučevanjem njihovega nukleotidnega zaporedja in nivoja njihove izraženosti, bo potrebno v nadaljnjih raziskavah proučiti in s tem poskusiti identificirati glavni dejavnik, ki sproži razvoj bolezni razbrazdanja lesa pri vinski trti. Vzrok se lahko namreč nahaja v spremenjenem izražanju genov ali v mutaciji samega gena, zaradi česar se lahko spremeni protein. Z nadaljnjo raziskavo bomo preučili tudi funkcijo izraženih transkriptov, ki jim v podatkovnih zbirkah genov le-te nismo uspeli določiti. Prav tako pozornost zaslužijo štirje transkripti, ki smo jih odkrili pri biotipu 'Refošk' 43 in v nobeni od uporabljenih zbirk nismo našli podobnega zaporedja, kar pomeni da gre za sedaj še za neznano zaporedja. Odkrili smo številne diferenčno izražene gene, ki jih povezujejo z odgovorom rastline na stres. S tem smo tezo, da se bolezen razbrazdanja lesa pojavi kot posledica odziva rastline na stres ali zaradi sinergističnega učinka med odzivom na stres in patogeni, le še podkrepili. Pri bolezni propadanje sorte 'Syrah' so Renault-Spilmont in sod. (2007) z analizo mikrosatelitskih lokusov prišli do podobnega zaključka, ko so ugotovili, da se eden od mikrosatelitskih lokusov, pri katerem so ugotovili korelacijo z občutljivimi kloni sorte 'Syrah' na bolezen, nahaja v promotorju transkripcijskega faktorja HSFA1D, ki ga povezujejo z vročinskim stresom. Raziskav na področju izraženosti genov v povezavi z razbrazdanjem lesa nismo zasledili, zato ta raziskava odpira nove možnosti pri proučevanju te bolezni.

6 SKLEPI

Z mikrosatelitskimi markerji smo potrdili sortno pristnost vzorcev, vključenih v analizo.

Z markerji AFLP smo analizirane vzorce sorte 'Refošk' na podlagi 16 polimorfnih markerjev razvrstili v dve skupini. Prav tako smo med biotipi sorte 'Refošk' z ampelografskim preučevanjem odkrili variabilnost na nivoju fenotipa, vendar pa povezave med fenotipom in markerji AFLP nismo ugotovili.

Preverili smo, če obstaja povezava med markerji AFLP in trsi sorte 'Refošk', ki so kazali znamenja bolezní razbrazdanja lesa, vendar povezave s fenotipom tudi v tem primeru nismo ugotovili.

S pojavom znamenj razbrazdanja na cepljenkah s cepilnim materialom iz trt 'Refošk' 38 VIII/44 in 'Refošk' 48 IX/43, smo potrdili hipotezo, da se povzročitelj bolezní razbrazdanja lesa prenaša s cepljenjem.

Pojav znamenj razbrazdanja na cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladike, kot enega od možnih povzročiteljev za razvoj bolezní, izključuje inkompatibilnost med podlago in cepičem. S tem smo tudi predpostavili, da bi se bolezen lahko pojavila zgolj zaradi fiziološkega odziva rastline na stres ali zaradi sinergističnega učinka stresa in okužbe s patogeni.

Z analizo diferenčno izraženih transkriptov smo primerjali produkte PCR med biotipoma 'Refošk' 38, ki je občutljiv na bolezen razbrazdanja lesa, in 'Refošk' 43, pri katerem nismo opazili znamenj razbrazdanja. Rastlinski material za izolacijo smo pridobili iz cepljenk s spojenimi lastnimi deli in sicer 3, 7 in 14 dni po cepljenju. Pri biotipu 'Refošk' 38 smo ugotovili 33 edinstveno izraženih genov, medtem ko smo pri biotipu 'Refošk' 43 ugotovili 32 edinstveno izraženih genov.

Na vprašanje ali je bolezen razbrazdanja lesa genetsko pogojena ali jo domnevno povzroča patogen nismo uspeli odgovoriti. V nadaljnjih raziskavah bomo ugotovljene gene, ki predstavljajo kandidatne transkripte preučili na nivoju njihove izraženosti in nukleotidnega zaporedja ter tako poskusili ugotoviti vzrok za razvoj bolezní.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Sorta 'Refošk' je stara lokalna sorta. Lokalne sorte dajejo prepoznavnost regijam in lahko predstavljajo vir dohodka pridelovalcem grozdja in vina. V dolgem času gojenja so se razvili različni biotipi sorte 'Refošk', ki pa se zaradi selekcije iz pridelave izgubljajo, s tem pa prihaja do erozije genskih virov in do izgube genetskega materiala potencialno zanimivega za pridelavo v različnih mikroklimatskih razmerah. Trenutno je v Sloveniji uradno potrjen samo en klon sorte 'Refošk', zaradi česar menimo, da je potreba po proučevanju genetskega materiala sorte 'Refošk' še toliko večja. Za primer navajamo sorto 'Rebula', pri kateri je uradno potrjenih 5 klonov in je bila po podatkih za leto 2010 v Sloveniji zastopana z 2.166.543 trsi, medtem ko je bilo vseh trt sorte 'Refošk' 6.226.886 (Štrukelj in sod., 2012).

V okviru raziskave smo opravili karakterizacijo genetske variabilnosti sorte 'Refošk' z markerji AFLP, pri čemer so bili mikrosatelitski markerji uporabljeni za potrditev sortne pristonosti vzorcev. V analizo smo vključili vzorce sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu, 3 stare trse iz Merč, Šepulj in Marezig, ter vzorce, ki smo jih pridobili iz vinogradov v vinorodnih okoliših Slovenska Istra in Kras. Z mikrosatelitskimi markerji smo pri vseh 113 analiziranih vzorcih ugotovili identičen genotip in s tem potrdili, da vsi vzorci pripadajo sorti 'Refošk'. S primerjavo ugotovljenega genotipa z rezultati mikrosatelitskih analiz številnih sort z imenom 'Refošk', ki smo jih pridobili iz različnih podatkovnih zbirkah (Evropska podatkovna zbirka vinske trte, Mednarodni katalog sort vinske trte, Italijanska mikrosatelitska podatkovna zbirka, Podatkovna zbirka genotipov sort vinske trte iz območja zahodnega Balkana) in v objavljenih v znanstvenih prispevkih, smo potrdili, da se sorta 'Refošk' tudi na genetskem nivoju loči od ostalih sort z imenom Refošk, ki jih gojijo na območju Italije. Ugotovili smo 3 najpogostejše zastopane genotipe. Dva smo ugotovili pri sortah iz Italije, enega pa sorti 'Refošk' iz Istre. Poimenovanja znotraj posamezne skupine genotipov so različna, kar nakazuje na to, da še vedno niso določene standardne sorte številnih sort ali biotipov z imenom 'Refošk', na katere bi se lahko primerjalo rezultate.

Z izdelavo dendrograma na osnovi rezultatov Sefc in sod. (2000) smo ugotovili, da se je sorta 'Terrano' (vzorec iz Inštituta za kmetijstvo in turizem v Poreču, ki je na petih mikrosatelitskih lokusih enak našemu genotipu sorte 'Refošk') uvrstila v skupino, v kateri je bilo še 12 sort iz Italije, 1 iz Hrvaške, 1 iz Španije in 2 iz Francije. Uvrstitev sorte 'Refošk' v skupino zahodno Evropskih sort so ugotovili tudi Štajner in sod. (2013). Omenjene ugotovitve kažejo na to, da sorta 'Refošk' po genetskem zapisu spada v skupino zahodno-evropskih sort vinske trte (*Proles occidentalis*) in ne v črnomorsko ekološko skupino *Proles pontica*, kamor je trenutno uvrščena na osnovi morfoloških lastnosti.

Z markerji AFLP smo vzorce sorte 'Refošk' razvrstili v dve skupini. V prvo skupino ali homogeno skupino je bilo uvrščenih 72 vzorcev, v drugo skupino ali heterogeno skupino, pa je bilo uvrščenih 41 vzorcev. Slednji so se od prve skupine ločili po tem, da je bilo pri njih ugotovljenih do 16 polimorfni markerjev, medtem ko pri vzorcih iz homogene nismo ugotovili nobenega polimorfnega markerja AFLP.

S preučevanjem biotipov sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu z 22 OIV ampelografskimi deskriptorji smo poskusili ugotoviti povezavo med preučevanimi lastnostmi in markerji AFLP. Razlike med biotipi smo ugotovili pri večih lastnostih. Med agronomsko pomembne lastnosti sodijo zbitost grozda, masa grozda ter velikost jagod, saj imajo velik pomen npr. pri okužbi s sivo grozdno plesnijo ter na vsebnost antocianov v vinu. Vendar pa povezave med lastnostmi biotipov in markerji AFLP nismo ugotovili.

Drugi del raziskave se je navezoval na kompleks bolezní razbrazdanja lesa vinske trte, ki je ena od najpomembnejših bolezní vinske trte, razširjena po vsem svetu (Martelli, 1993). Prizadete rastline kažejo odklone od normalne rasti, so manj bujne in propadejo v nekaj letih po sajenju (Martelli, 1993). Med občutljive sorte pri nas uvrščamo sorto 'Refošk', kjer so v vinogradih z močnejšo okužbo v osemdesetih letih 20. stoletja na Krasu ugotovili tudi do 50 % propadlih trsov (Korošec-Koruza, 1982). Ker se znamenja bolezní pojavljajo tudi pri cepljenkah s cepilnimi materialom odvzetim iz prizadetih trsov, domnevanju da bolezen povzroča virus, po nekaterih ugotovitvah naj bi se povzročitelj prenašali tudi s prenašalci, vendar resnični povzročitelj bolezní razbrazdanja lesa vse do danes ostaja nepojasnen.

Da bi ugotovili, ali lahko bolezen razbrazdanja lesa povežemo z markerji AFLP smo pri vzorčenju sorte 'Refošk' vsak trs, razen treh najstarejših trt iz Merč, Šepulj in Marezig, iz katerega smo vzeli list za izolacijo DNA pregledali za znamenja bolezní razbrazdanja lesa, vendar povezave med boleznijo razbrazdanja lesa in molekulskimi markerji nismo ugotovili.

V sklopu preučevanja bolezní razbrazdanja lesa pri sorti 'Refošk', sta bila izvedena tudi dva poskusa z indeksiranjem in analiza edinstveno izraženih transkriptov. Prvo indeksiranje je bilo izvedeno z namenom, da bi potrdili prenos povzročitelja bolezní razbrazdanja lesa s cepljenjem, medtem ko je drugi poskus z indeksiranjem služil za pridobivanje rastlinskega materiala za analizo izraženosti genov. Oba poskusa z indeksiranjem smo izvedli z biotipi sorte 'Refošk' iz kolekcijskega vinograda v Komnu in sicer s tehniko cepljenja zeleno na zeleno. Izbrali smo štiri biotipe sorte 'Refošk', ki so v vinogradu kazali znamenja razbrazdanja ali na cepiču ali povzročajo razbrazdanje na podlagi SO4, in dva biotipa za kontrolo, ki v vinogradu nista kazala znamenj, ter izvedli cepljenje na podlago SO4 in cepljenje pri katerem smo mladiko le prerezali in ponovno spojili. Znamenja bolezní razbrazdanja lesa smo opazili pri cepljenkah na podlagi SO4 in pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli z rastlinskim materialom, vzetim iz trsov 'Refošk' 38 VIII/44 in 'Refošk' 48

IX/43. S tem smo potrdili, da se povzročitelj bolezní razbrazdanja lesa prenaša s cepljenjem ter glede na to, da so se znamenja pojavila tudi na cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik, smo za razvoj bolezní razbrazdnja lesa izključili možnost inkompatibilnosti. Obenem smo na podlagi te ugotovitve predpostavili, da se bolezen razbrazdanja lesa lahko pojavi zgolj zaradi fiziološkega odziva rastline na stres ob cepljenju ali zaradi sinergističnega učinka med stresom in okužbe s patogeni. Pri pregledu preživelih cepljenk smo ugotovili, da bolezen razbrazdanja lesa ne vpliva na uspeh cepljenja.

Z analizo izraženosti genov smo ugotovili 68 diferenčno izraženih genskih zaporedij, ki so se edinstveno izrazili pri cepljenkah s spojenimi lastnimi deli mladik pri biotipu 'Refošk' 38 pri katerem se pojavijo znamenja bolezní in pri biotipu 'Refošk' 43, ki po cepljenju ohrani zdrav videz. Rastlinski material smo vzorčili 3, 7 in 14 dni po cepljenju, iz cepljenega mesta smo izolirali RNA in nato s kitom GeneFishingTM DEG Expression Kit (Seegene) za diferenčni prikaz identificirali diferenčno izražene transkripte. Le-te smo po izolaciji iz agaroznega gela, ponovno namnožili s pomočjo plazmidov. Ko smo z uporabo Sangerjeve tehnologije in kapilarne elektroforeze transkriptom določili zaporedja, smo le-te z BLAST analizo in z uporabo podatkovnih zbirk 12xV1 (CRIBI) in RefSeq RNA (NCBI) določili biološko funkcijo. Identificirali smo tudi 4 transkripte z genomsko DNA vinske trte vendar z neznano funkcijo ter 4 transkripte, za katere v nobeni od uporabljenih zbirk nismo našli podobnega zaporedja, kar pomeni, da gre za neznana zaporedja.

Pri obeh biotipih je bila z največ geni zastopana GO kategorija oksidacijsko redukcijski procesi, kar potrjuje predhodne ugotovitve, da se pri odzivu rastline na stres najprej sprožijo številni oksidacijski procesi, t.i. oksidacijski izbruh, ki rastlino privede v oksidativni stres. Pri tem ima najpomembnejšo vlogo vodikov peroksid, ki je pomembna signalna molekula in povzroči, da se sprožijo nadaljnji biološki procesi, s katerimi se rastlina prilagaja na stresne situacije. Pri biotipu 'Refošk' 38 smo poleg 4 genov iz oksidacijsko redukcijskih procesov identificirali še 5 edinstveno izraženih genov, povezanih z odgovorom rastline na stres, medtem ko smo pri biotipu 'Refošk' 43 poleg 3 genov iz kategorije oksidacijsko redukcijski procesi identificirali še 6 genov, s pomembno vlogo v odzivu na stres. Omenjeni rezultati podpirajo hipotezo, da se bolezen morda pojavi zaradi odziva rastline na stres ali zaradi sinergističnega učinka med odzivom na stres in okužbe s patogeni.

7.2 SUMMARY

'Refošk' is an old, local grapevine variety. Local varieties give regions visibility and they can present an additional source of income to the producers of grapes and wines. During its long cultivation different 'Refošk' biotypes originated, but, due to selection, they were excluded from production vineyards which has lead to the erosion of genetic resources and loss of potentially interesting genetic material for production in various microclimate conditions. Currently only one clone of variety 'Refošk' is officially certified in Slovenia making studies of genetic resources even more important. For comparison, the variety 'Rebula' has 5 certified clones and according to the data from 2010, 2.166.543 vines were grown in Slovenia compared to 6.226.886 vines for the variety 'Refošk' (Štrukelj in sod., 2012).

In this study, characterization of genetic variation of the variety 'Refošk' was performed by AFLP markers and microsatellite markers were used to confirm trueness-to-type. Samples from a collection vineyard in the Komen, three old vines from Merče, Šepulje and Marežige and samples obtained from production vineyards in the winegrowing districts Slovenska Istra and Kras were included into analysis. Microsatellite analysis revealed an identical genotype for all samples and therefore confirmed trueness to type for all samples. By comparing the observed genotype with the results of microsatellite analysis of numerous varieties named 'Refošk' grown in Italy, which were obtained from databases (The European Vitis Database, Vitis International variety catalog, the Italian microsatellite database, database of genotypes of grape varieties from the Western Balkans region) and from scientific articles, it was confirmed that variety 'Refošk', grown in Slovenia is different at the genetic level from the varieties named 'Refošk' cultivated in Italy. In all of the varieties, the 3 most frequently represented genotypes were identified. Two belongs to varieties cultivated in Italy and one genotype was identified for the variety 'Refošk' grown in Slovenia. Different designations within the first group were observed, which indicates a standard reference variety or biotype for the variety 'Refošk' still does not exist.

By creating a dendrogram, based on the results of Sefc et al. (2000) it was identified that the variety 'Terrano' (sample from the Institute for Agriculture and Tourism from Porec, who had an identical genotype at the 5 analyzed loci compared with 'Refošk' grown in Slovenia) was grouped together with 12 varieties from Italy, 1 from Croatia, 1 from Spanish and 2 varieties from French. Clasification of 'Refošk' to a group with Western European varieties was found by Štajner et al. (2013) as well, which implies that the variety 'Refošk' belongs to the group of Western European grape varieties (*Proles occidentalis*) and not in the Black Sea ecological group *Proles pontica*, as currently hypothesised on the basis of morphological traits.

The AFLP molecular markers classified analysed samples in two groups. The first group, or homogeneous group, contained 72 samples, while in the second group, or heterogeneous group, included 41 samples. The latter were separated from the first group by 16 polymorphic markers, while in the samples from first group no polymorphic AFLP markers were identified. Therefore, only samples from a heterogeneous group were used for the creation of dendrogram. From the dendrogram it is evident that samples of the variety 'Refošk' from second group possess additional genetic variability.

The variability between individual biotypes of 'Refošk' from the collection vineyard in Komen, was found when describing them with OIV descriptors as well. Agronomically important traits that showed variability are cluster density, cluster weight and berry size. They have great impact on infection with botrytis gray mold and anthocyanins content. However, a correlation between AFLP markers and the variable traits was not identified.

The second part of the research was addressed to the rugose wood disease complex, which is one of the most important diseases of the grapevine and spreads worldwide (Martelli, 1993). Affected plants show deviations from normal growth, are less vital and die within a few years after planting (Martelli, 1993). In Slovenia, 'Refošk' is considered a sensitive variety; in vineyards with strong infections up to 50 % of vines died (Korosec-Koruza, 1982). On the basis that the casual agents are transmitted with grafting, and according to some studies agents could be transmitted by vectors as well, it is hypothesised that the disease is caused by a virus, but the real cause of rugose wood remains unknown.

In order to find out whether the rugose wood disease could be correlated with AFLP markers, all sampled vines, except old vines from Merče, Šepulje and Marežige, used for genetic characterization were examined for rugose wood disease symptoms. However, no correlation of molecular markers with vines showing rugose wood disease symptoms was observed.

Within the study of rugose wood in the grapevine variety 'Refošk', two experiments with biological indexing and analysis of differentially expressed transcripts were carried out as well. The first biological indexing was performed to confirm the sensitivity of 'Refošk' biotypes to rugose wood disease, while the second biological indexing was used for sampling the tissue for gene expression analysis. Both experiments with biological indexing were performed with 'Refošk' biotypes from the collection vineyard in Komen, using the green grafting technique. Four 'Refošk' biotypes which showed symptoms of rugose wood on scions or on the rootstock SO4, and two biotypes with a healthy appearance as a control, were used for indexing. To perform biological indexing 'Refošk' was grafted on SO4 rootstock and shoots were autografted as well. Symptoms of rugose wood were observed on grafts, grafted on SO4 and on autografts, which were made with plant material taken from vines Refošk 38 VIII/44 and Refošk 48 IX/43. Results confirmed that causal

agents were transmitted with grafting and, on the basis of symptoms that appeared on the autografts, excluded genetic incompatibility as a potential causal agent of rugose wood. At the same time we assumed that the rugose wood disease could occur simply due to the physiological responses to grafting or due to a synergistic effect of response to stress and infection of pathogens. Examination of successfully grafted plants showed that rugose wood disease had no impact on the success of grafting.

With the gene expression analysis 68 differentially expressed gene transcripts were identified at the autografts of 'Refošk' 38 biotype and 'Refošk' 43 biotype. 'Refošk' 38 biotype showed symptoms of rugose wood, whereas 'Refošk' 43 biotype maintained a healthy appearance after grafting. Plant material was sampled 3, 7 and 14 days after grafting from the grafting site and RNA was isolated, followed by a differentially display analysis, conducted with GeneFishingTM DEG Expression Kit (SeeGene) in order to identify the differentially expressed transcripts. Those were reamplified with gene cloning method using plasmids. Sequences, that were obtained with capillary electrophoresis using Sanger technology, were further analysed with the BLAST tool, using databases 12xV1 (CRIBI) and RefSeq RNA (NCBI) with the aim to identify the function of uniquely expressed genes. In addition, 4 transcripts with grapevine sequences were not annotated to any of known grapevine genes, and for the last 4 transcripts no similar sequences were found in any of used databases, what means that they are unknown.

For both biotypes, GO category oxidation and reduction processes was present with most genes, which confirmed previous findings that in the first stress response step, numerous oxidation processes that lead plants in oxidative stress are triggered. The most important factor is hydrogen peroxide, which is an important signaling molecule and triggers further biological processes which help plants to adapt themselves to stressful agents. For biotype 'Refošk' 38, in addition to four genes from the oxidation reduction processes, an additional 5 differentially expressed genes associated with plant response to stress were identified. For biotype 'Refošk' 43, beside 3 genes from category oxidation and reduction processes, 6 genes with an important role in the response to stress were identified. Results support the hypothesis, that rugose wood disease is expressed due to plant response to stress or due to synergistic effect of plant response to stress and pathogen infection.

8 VIRI

- Anhalt U.C.M., Crespo Martínez S., Rühl E., Forneck A. 2011. Dynamic grapevine clones—an AFLP-marker study of the *Vitis vinifera* cultivar Riesling comprising 86 clones. *Tree Genetics & Genomes*, 7, 4: 739-746
- Barel G., Ginzberg I. 2008. Potato skin proteome is enriched with plant defence components. *Journal of Experimental Botany*, 59, 12: 3347-3357
- Barth S., Forneck A., Verzeletti F., Blauch R., Schumann F. 2009. Genotypes and phenotypes of an ex situ *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmel.) Beger germplasm collection from the Upper Rhine Valley. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 8: 1171-1181
- Blaich R., Konradi J., Ruhl E., Forneck A. 2007. Assessing genetic variation among Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) clones with AFLP markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 4: 526-529
- Bonavia M., Digiario M., Boscia D., Boari A., Bottalico G., Savino V., Martelli G.P. 1996. Studies on 'corky rugose wood' of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. *Vitis*, 35, 1: 53-58
- Bonfiglioli R., Habili N., Green M., Schliefer L.F., Symons R.H. 1998. The hidden problem - Rugose wood associated viruses in Australian viticulture. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 420: 9-13
- Bonin A., Ehrich D., Manel S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, 16, 18: 3737-3758
- Bouché N., Fait A., Bouchez D., Møller S.G., Fromm H. 2003. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 11: 6843-6848
- Bouyahia H., Boscia D., Savino V., La Notte P., Pirolo C., Castellano M.A., Minafra A., Martelli G.P. 2005. *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* is linked with grapevine vein necrosis. *Vitis*, 44, 3: 133-137
- Bowers J.E., Dangl G.S., Meredith C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 3: 243-246
- 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
- Brdnik M. 1982. Selekcija sorte Refošk (*Vitis vinifera* L. cv. 'Refošk') v kraškem vinorodnem okolišu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 53 str.
- Carrier G., Le Cunff L., Dereeper A., Legrand D., Sabot F., Bouchez O., Audeguin L., Boursiquot J.-M., This P. 2012. Transposable elements are a major cause of somatic polymorphism in *Vitis vinifera* L. *PLoS ONE*, 7, 3: e32973

- Causier B., Ashworth M., Guo W., Davies B. 2012. The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 158, 1: 423-438
- Cervera M.T., Cabezas J.A., Sancha J.C., Martínez de Toda F., Martínez-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). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 97, 1-2: 51-59
- Cheng D., Lin H., Takahashi Y., Walker M.A., Civerolo E., Stenger D. 2010. Transcriptional regulation of the grape cytochrome P450 monooxygenase gene CYP736B expression in response to *Xylella fastidiosa* infection. *BMC Plant Biology*, 10, 1: 135
- Cipriani G., Frazza G., Peterlunger E., Testolin R. 1994. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. *Vitis*, 33: 211-215
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Peterlunger E. 2010a. Molecular characterization of the autochthonous grape cultivars of the region Friuli Venezia Giulia - North-Eastern Italy. *Vitis*, 49, 1: 29-38
- Cipriani G., Spadotto A., Jurman I., Di Gaspero G., Crespan M., Meneghetti S., Frare E., Vignani R., Cresti M., Morgante M., Pezzotti M., Pe E., Policriti A., Testolin R. 2010b. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 121, 8: 1569-1585
- Cookson S.J., Clemente Moreno M.J., Hevin C., Nyamba Mendome L.Z., Delrot S., Trossat-Magnin C., Ollat N. 2013. Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signalling, and secondary metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 64, 10: 2997-3008
- Credi R. 1997a. Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. *Plant Disease*, 81, 11: 1288-1292
- Credi R. 1997b. Indexing tests on a grapevine rugose wood disease and mechanical transmission of two associated viruses. *Phytopathologia Mediterranea*, 36: 1-7
- Cretazzo E., Meneghetti S., De Andrés M.T., Gaforio L., Frare E., Cifre J. 2010. Clone differentiation and varietal identification by means of SSR, AFLP, SAMPL and M-AFLP in order to assess the clonal selection of grapevine: the case study of Manto Negro, Callet and Moll, autochthonous cultivars of Majorca. *Annals of Applied Biology*, 157, 2: 213-227
- Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H. 2014. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances*, 32, 1: 40-52
- Duan Q., Kita D., Li C., Cheung A.Y., Wu H.-M. 2010. FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 41: 17821-17826
- Electronic Statistics Textbook. 2013. Tulsa, OK. StatSoft.

- <http://www.statsoft.com/textbook/> (oktober, 2013)
- Errea P. 1998. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. *Scientia Horticulturae*, 74, 3: 195-205
- Excoffier L., Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567
- Fanizza G., Chaabane R., Ricciardi L., Resta P. 2003. Analysis of a spontaneous mutant and selected clones of cv. Italia (*Vitis vinifera*) by AFLP markers. *Vitis*, 42, 1: 27-30
- Feechan A., Jermakow A.M., Torregrosa L., Panstruga R., Dry I.B. 2008. Identification of grapevine MLO gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Functional Plant Biology*, 35, 12: 1255-1266
- Ferreira s., Hjernø K., Larsen M., Wingsle G., Larsen P., Fey S., Roepstorff P., Salomé pais M. 2006. Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress. *Annals of Botany*, 98, 2: 361-377
- Filippetti I., Intrieri C., Ceminari M., Bucchetti B., Pastore C. 2005. Molecular characterization of officially registered Sangiovese clones and of other Sangiovese-like biotypes in Tuscany, Corsica and Emilia-romagna. *Vitis*, 44, 4: 167-172
- Filippetti I., Silvestroni O., Thomas M.R., Intrieri C. 1999. Diversity assessment of seedlings from self-pollinated Sangiovese grapevines by ampelography and microsatellite DNA analysis. *Vitis*, 38, 2: 67-71
- Finkelstein R. 2013. Absciscic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*, 11: e0166. doi: 10.1199/tab.0166
- Fiore N., Prodan S., Pino A.M. 2009. Monitoring grapevine viruses by ELISA and RT-PCR through the year. *Journal of Plant Pathology*, 91, 2: 489-493
- Fitzgerald T.L., Shapter F.M., McDonald S., Waters D.L.E., Chivers I.H., Drenth A., Nevo E., Henry R.J. 2011. Genome diversity in wild grasses under environmental stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 52: 21140-21145
- Forcato C. 2010. Gene prediction and functional annotation in the *Vitis vinifera* genome. Doktorska disertacija. Padova, Univerza v Padovi: 120 str.
- Forneck A. 2005. Plant breeding: Clonality — a concept for stability and variability during vegetative propagation. V: *Progress in Botany*. vol 66. Esser K., Lüttge U., Beyschlag W., Murata J. (eds.). Berlin Heidelberg, Springer: 164-183
- Franks T., Botta R., Thomas M.R., Franks J. 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 104, 2-3: 192-199
- Fulda S., Mikkat S., Stegmann H., Horn R. 2011. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Biology*, 13, 4: 632-642
- Garau R., Prota V.A., Piredda R., Boscia D., Prota U. 1994. On the possible relationship between Kober stem grooving and grapevine virus A. *Vitis*, 33: 161-163

Get annotation. 2010.

http://genomes.cribi.unipd.it/grape/get_annotation.php (november, 2013)

Goheen A.C. 1989. Virus diseases and grapevine selection. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40: 67-72

Golino D.A. 2007. Emerging grapevine diseases. V: *Proceedings of the Syrah vine health symposium*. Smith J.R. (ed.). Davis, University of California: 5-7

Goszczynski D. 2010. Rugose wood-associated viruses do not appear to be involved in Shiraz (Syrah) decline in South Africa. *Archives of Virology*, 155, 9: 1463-1469

Grape microsatellite collection. 2002.

<http://meteo.iasma.it/genetica/gmc.html> (oktober, 2013)

Grimplet J., Cramer G.R., Dickerson J.A., Mathiason K., Van Hemert J., Fennell A.Y. 2009. VitisNet: "Omics" integration through grapevine molecular networks. *PLoS ONE*, 4, 12: e8365

Grimplet J., Van Hemert J., Carbonell-Bejerano P., Diaz-Riquelme J., Dickerson J., Fennell A., Pezzotti M., Martinez-Zapater J. 2012. Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences. *BMC Research Notes*, 5, 1: 213

Guo H., Li L., Ye H., Yu X., Algreen A., Yin Y. 2009. Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 106, 18:7684-7653

Haddad R., Heidari Japelaghi R. 2014. Abiotic and oxidative stress-dependent regulation of expression of the thioredoxin h multigenic family in grape *Vitis vinifera*. *Biologia*, 69, 2: 152-162

Hocquigny S., Pelsy F., Dumas V., Kindt S., et al. 2004. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*, 47, 3: 579-589

Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte : ilustrirani prikaz trsnega izbora za Slovenijo. Ptuj, SVA Veritas: 173 str.

Hwang I.T., Kim Y.J., Kim S.H., Kwak C.I., Gu Y.Y., Chun J.Y. 2003. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques*, 35, 6: 1180-1184

Imazio S., Labra M., Grassi F., Winfield M., Bardini M., Scienza A. 2002. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. *Plant Breeding*, 121, 6: 531-535

Imlay J.A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, 57: 395-418

Jaillon O., Aury J.-M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Hugueney P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyere C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu

- D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pé E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.-F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449, 7161: 463-467
- Javier Cejudo F., Ferrandez J., Cano B., Puerto-Galan L., Guinea M. 2012. The function of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system in plastid redox regulation and signalling. *Febs Letters*, 586, 18: 2974-2980
- Javot H., Maurel C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90, 3: 301-313
- Keller M. 2010. The science of grapevines: anatomy and physiology. Amsterdam, Academic Press/Elsevier: 377 str.
- Kim S.H., Ahn Y.O., Ahn M.-J., Lee H.-S., Kwak S.-S. 2012. Down-regulation of beta-carotene hydroxylase increases beta-carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. *Phytochemistry*, 74: 69-78
- Konradi J., Blaich R., Forneck A. 2007. Genetic variation among clones and sports of 'Pinot noir' (*Vitis vinifera* L.). *European Journal of Horticultural Science*, 72, 6: 275-279
- Korošec-Koruza Z. 1982. Propadanje mladih trt na Krasu. *Sodobno kmetijstvo*, 7-8: 312-316
- 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., Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114, 2: 149-158
- Laloi C., Apel K., Danon A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 3: 323-328
- Laucou V., Lacombe T., Dechesne F., Siret R., Bruno J.P., Dessup M., Dessup T., Ortigosa P., Parra P., Roux C., Santoni S., Varès D., Péros J.P., Boursiquot J.M., This P. 2011. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 122, 6: 1233-1245
- Le Maguet J., Beuve M., Herrbach E., Lemaire O. 2012. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. *Phytopathology*, 102, 7: 717-723
- Lee J.-M., Kubota C., Tsao S.J., Bie Z., Hoyos Echevarria P., Morra L., Oda M. 2010. Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae*, 127, 2: 93-105
- Lima M.F., Alkowni R., Uyemoto J.K., Golino D., Osman F., Rowhani A. 2006. Molecular analysis of a California strain of Rupestris stem pitting-associated virus isolated from declining Syrah grapevines. *Archives of Virology*, 151, 9: 1889-1894
- Maletić E., Sefc K.M., Steinkellner H., Kontić J.K., Pejić I. 1999. Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and detection of synonymous cultivars in neighboring regions. *Vitis*, 38, 2: 79-83

- Mannini F. 2000. Clonal selection in grapevine: interactions between genetic and sanitary strategies to improve propagation material. *Acta Horticulturae*, 528: 703-712
- María Ortiz J., Pedro Martín J., Borrego J., Chávez J., Rodríguez I., Muñoz G., Cabello F. 2004. Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 4: 403-409
- Martelli G.P. 1993. Rugose wood complex. V: Graft-transmissible diseases of grapevines: Handbook for detection and diagnosis. Martelli G.P. (ed.). Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 45-54
- Martelli G.P., Boudon-Padieu E. 2006. Graft incompatibility. V: Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004 (Options méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 55). Martelli G.P., Boudon-Padieu E. (ed.). Bari, CIHEAM: 93-98
- Martinez L., Cavagnaro P., Masuelli R., Rodriguez J. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6, 3: 244-253
- Maul E., Sudharma K.N., Kecke S., Marx G., Müller C., Audeguin L., Boselli M., Boursiquot J.M., Bucchetti B., Cabello F., Carraro F., Crespan M., De Andrés M.T., Dias J.E., Ekhvaia J., Gaforio L., Gardiman M., Grando M.S., Gyropoulos D., Jandurova O., Kiss E., Kontic J., Kozma P., Lacombe T., Laucou V., Legrand D., Maghradze D., Marinoni D., Maletic E., Moreira Maia F. 2012. The European *Vitis* Database (www.eu-vitis.de): a technical innovation through an online uploading and interactive modification system. *Vitis*, 51, 2: 79-85
- May P. 1994. Using grapevine rootstocks: the Australian perspective. Australia, Winetitles Pty Limited: 62 str.
- Mayer M.P., Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 6: 670-684
- Meneghetti S., Costacurta A., Morreale G., Calò A. 2012a. Study of intra-varietal genetic variability in grapevine cultivars by PCR-derived molecular markers and correlations with the geographic origins. *Molecular Biotechnology*, 50, 1: 72-58
- Meneghetti S., Poljuha D., Frare E., Costacurta A., Morreale G., Bavaresco L., Calò A. 2012b. Inter- and intra-varietal genetic variability in Malvasia cultivars. *Molecular Biotechnology*, 50, 3: 189-199
- Meng B., Johnson R., Peressini S., Forsline P.L., Gonsalves D. 1999. Rupestris stem pitting associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 2: 191-199
- Meng B., Pang S., Forsline P., McFerson J., Gonsalves D. 1998. Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting virus. *Journal of General Virology*, 79, 8: 2059-2069

- Meng B., Rebelo A.R., Fisher H. 2006. Genetic diversity analyses of grapevine *Rupestris* stem pitting-associated virus reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties. *Journal of General Virology*, 87, 6: 1725-1733
- Morelli M., Minafra A., Boscia D., Martelli G. 2011. Complete nucleotide sequence of a new variant of grapevine *rupestris* stem pitting-associated virus from southern Italy. *Archives of Virology*, 156, 3: 543-546
- Mudge K., Janick J., Scofield S., Goldschmidt E.E. 2009. A History of Grafting. V: *Horticultural Reviews*. Janick J. (ed.). vol 35. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 437-493
- Nakaune R., Inoue K., Nasu H., Kakogawa K., Nitta H., Imada J., Nakano M. 2008. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of *Rupestris stem pitting-associated virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 74, 2: 156-163
- Negrulj A.M. 1959. Vinogradstvo s osnovami ampelografii i selekcii. 3. izdaja. Moskva, Gosud. izd-vo sel'skohozjajstvennoj literatuty: 399 str.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press: 512 str.
- Oh T.J., Kim I.G., Park S.Y., Kim K.C., Shim H.W. 2002. NAD-dependent malate dehydrogenase protects against oxidative damage in *Escherichia coli* K-12 through the action of oxaloacetate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 1: 9-14
- OIV descriptor list for grape varieties and *Vitis* species. 2009. 2nd ed. Paris, International Organisation of Vine and Wine
- Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. 2008. *EPPO Bulletin*, 38, 3: 422-429
- Pelsy F. 2010. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. *Heredity*, 104, 4: 331-340
- Petrovič N., Meng B., Ravnikar M., Mavrič I., Gonsalves D. 2003. First detection of *Rupestris Stem Pitting Associated Virus* particles by antibody to a recombinant coat protein. *Plant Disease*, 87, 5: 510-514
- Piffanelli P., Zhou F.S., Casais C., Orme J., Jarosch B., Schaffrath U., Collins N.C., Panstruga R., Schulze-Lefert P. 2002. The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiology*, 129, 3: 1076-1085
- Pina A., Errea P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. *Scientia Horticulturae*, 106, 1: 1-11
- Rakoczy-Trojanowska M., Bolibok H. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 2: 221-238
- Regner F., Wiedeck E., Stadlbauer A. 2000. Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. *Vitis*, 39, 3: 103-107

- Renault-Spilmont A.S., Grenan S., Boursiquot J.M. 2007. Syrah decline in French vineyards: Rootstocks and Syrah clone impact, pathological and genetics studies. V: Proceedings of the Syrah Vine Health Symposium. Smith J.R. (ed.). Davis, University of California: 5-7
- Ripper M. 2003. Der Karster "Terrano": eine öenologisch-chemische Studie/von Maximilian Ripper. Görz, Selbstverlage: 30 str.
- Rohlf F.J. 1998. NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02i. New York, Exeter Software
- Rowhani A., Uyemoto J.K. 1997. A comparison between serological and biological assays in detecting *Grapevine leafroll associated viruses*. Plant Disease, 81, 7: 799-801
- Rusjan D., Korošec-Koruza Z. 2006. Morphometrical and biochemical characteristics of red grape varieties (*Vitis vinifera* L.) from collection vineyard Ampelografski vrt. Acta agriculturae Slovenica, 89, 1: 245-257
- Rusjan D., Pipan B., Pelengic R., Meglic V. 2012. Genotypic and Phenotypic Discrimination of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Varieties of the 'Vitovska' and 'Garganja' Denominations. European Journal of Horticultural Science, 77, 2: 84-94
- Sano N., Masaki S., Tanabata T., Yamada T., Hirasawa T., Kashiwagi M., Kanekatsu M. 2013. RNA-binding proteins associated with desiccation during seed development in rice. Biotechnology Letters, 35, 11: 1945-1952
- Sarooshi R.A., Bevington K.B., Coote B.G. 1982. Performance and compatibility of 'Muscat Gordo Blanco' grape on eight rootstocks. Scientia Horticulturae, 16, 4: 367-374
- Scandalios J.G. 2002. The rise of ROS. Trends in Biochemical Sciences, 27, 9: 483-486
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, 18, 2: 233-234
- Sefc K.M., Lefort F., Grando M., Scott K.D., Steinkellner H., Thomas M.R. 2001. Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. V: Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Roubelakis-Angelakis K.A. (ed.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 433-456
- Sefc K.M., Lopes M.S., Lefort F., Botta R., Roubelakis-Angelakis K.A., Ibáñez J., Pejić I., Wagner H.W., Glössl J., Steinkellner H. 2000. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. TAG Theoretical and Applied Genetics, 100, 3: 498-505
- 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
- Standard nucleotide BLAST. 2013.
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (november, 2013)

- Stenkamp S., Becker M., Hill B., Blaich R., Forneck A. 2009. Clonal variation and stability assay of chimeric Pinot Meunier (*Vitis vinifera* L.) and descending sports. *Euphytica*, 165, 1: 197-209
- Supek F., Bošnjak M., Škunca N., Šmuc T. 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of Gene Ontology terms. *PLoS ONE*, 6, 7: e21800
- Sweetman C., Wong D., Ford C., Drew D. 2012. Transcriptome analysis at four developmental stages of grape berry (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) provides insights into regulated and coordinated gene expression. *BMC Genomics*, 13, 1: 691
- Štajner N., Jakše J., Javornik B., Masuelli R.W., Martinez L.E. 2009. Highly variable AFLP and S-SAP markers for the identification of 'Malbec' and 'Syrah' clones. *Vitis*, 48, 3: 145-150
- Štajner N., Tomić L., Ivanišević D., Korać N., Cvetković-Jovanović T., Beleski K., Angelova E., Maraš V., Javornik B. 2013. Microsatellite inferred genetic diversity and structure of Western Balkan grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Tree Genetics & Genomes*, 10: 127-140
- Štrukelj M.M., Brdnik M., Hauptman S., Štabuc R., Novak E., Martinčič J., Škvarč A. Vinogradniške razmere v Sloveniji danes. V: Zbornik referatov. 4. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Nova Gorica, 25-26 jan. 2012. Rusjan D. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 1-28
- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibáñez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhães R., Meredith C., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 109, 7: 1448-1458
- Thompson M.M., Olmo H.P. 1963. Cytohistological studies of cytochimeric and tetraploid grapes. *American Journal of Botany*, 50, 9: 901-906
- Tomažič I. 1999. Določanje virusov in njihov vpliv na ampelografske lastnosti vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 96 str.
- Tomažič I. 2002. Raziskava povzročitelja bolezní razbrazdanja lesa vinske trte (*Vitis* sp.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 162 str.
- Tomažič I., Korošec-Koruza Z., Petrovič N. 2005a. Sanitary status of Slovenian indigenous grapevine cultivar Refošk = État sanitaire de la vigne indigene cv. Refosk en Slovénie. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 39, 1: 19-22
- Tomažič I., Petrovič N., Korošec-Koruza Z. 2005b. Effects of rugose wood and GLRaV-1 on yield of cv. 'Refošk' grapevines. *Acta agriculturae Slovenica*, 85, 1: 91-96
- Vail M.E., Marois J.J. 1990. Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 81: 188-191
- Valič N., Milevoj L. Trtna uš (*Dactulosphaira vitifoliae* Fitch) - spet aktualen škodljivec vinske trte. V: Zbornik predavanj in referatov 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin v Portorožu od 3. do 4. marca 1999. 4. slovenski posvet o varstvu rastlin,

- Portorož, 3-4 mar. 1999. Maček J. (ur.) Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 499-503
- Vitis-WBC, Western-Balkans Vitis Database Grapevine cultivars genotypes. 2013.
<http://vitis.atcglabs.com/index.html> (oktober, 2013)
- Vitis International Variety Catalogue. 2007.
<http://www.vivc.de/> (oktober, 2013)
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.v.d., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 21: 4407-4414
- Vršič S. 2008. Modri pinot - kralj rdečih vin. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede: 105 str.
- Walter B., Bass P., Legin R., Martin C., Vernoy R., Collas A., Vesselle G. 1990. The use of a green-grafting technique for the detection of virus-like diseases of the grapevine. *Journal of Phytopathology*, 128, 2: 137-145
- Waugh R., McLean K., Flavell J.A., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.B.T., Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1 like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular & General Genetics*, 253, 6: 687-694
- Xirodimas D.P. 2008. Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochemical Society Transactions*, 36: 802-806
- Yang H., Sweetingham M.W., Cowling W.A., Smith P.M.C. 2001. DNA fingerprinting based on microsatellite-anchored fragment length polymorphisms, and isolation of sequence-specific PCR markers in lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Molecular Breeding*, 7: 203-209
- Yin H., Yan B., Sun J., Jia P., Zhang Z., Yan X., Chai J., Ren Z., Zheng G., Liu H. 2012. Graft-union development: a delicate process that involves cell-cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 63, 11: 4219-4232
- Zhang Y.-P., Uyemoto J.K., Golino D.A., Rowhani A. 1998. Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology*, 88, 11: 1231-1237
- Zhang Y., Feng D., Bao Y., Ma X., Yin N., Xu J., Wang H. 2013. A novel wheat related-to-ubiquitin gene TaRUB1 is responsive to pathogen attack as well as to both osmotic and salt stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 1: 151-159
- Zheng B.S., Chu H.L., Jin S.H., Huang Y.J., Wang Z.J., Chen M., Huang J.Q. 2010. cDNA-AFLP analysis of gene expression in hickory (*Carya cathayensis*) during graft process. *Tree Physiology*, 30, 2: 297-303
- Zhou L., Thornburg R. 1999. Wound-inducible genes in plants. V: Inducible Gene Expression in Plants. Smallwood M. (ed.). Wallingford, CAB International: 127-158
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 2: 176-183

ZAHVALA

Delo je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) v okviru programa mladih raziskovalcev (pogodba št. 1000-08-310189).

Najprej bi se rad zahvalil mentorici doc. dr. Irmi Vuk za dano možnost sodelovanja ter za strokovno pomoč pri raziskovalnem delu.

Posebna zahvala gre somentorju izr. prof. dr. Jerneju Jakšetu, ki je bil najpogosteje prvi naslov za kakršnokoli pomoč ali nasvet. Tako pri izvedbi raziskav, kot pri pisanju doktorske disertacije in člankov mi je namenil veliko časa.

Hvala doc. dr. Dunji Bandelj za koristne nasvete, pomoč pri pripravi člankov in doktorske disertacije ter za prevzem mentorstva na ARRS.

Hvala doc. dr. Nataši Štajner, prof. dr. Zori Korošec-Koruzi ter prof. dr. Stanislavu Trdanu za hiter pregled doktorske disertacije in za koristne nasvete.

Velika zahvala gre ge. Andreji Škvarč, univ. dipl. inž. agr., vodji Seleksijsko trsničarskega središča Vrhpolje, za prijazno odstopljen prostor v rastlinjaku, ki smo ga potrebovali za izvedbo dveh poskusov z indeksiranjem. Ge. Andreji Škvarč in g. Mateju Vrčonu bi se rad zahvalil tudi za pomoč pri indeksiranju ter za 3 letno oskrbovanje cepljenk.

Hvala ge. Majdi Brdnik, univ. dipl. inž. agr., svetovalki specialistki za vinogradništvo iz Kmetijsko svetovalne službe Sežana, za pomoč pri izbiri vinogradov na območju Krasa in slovenske Istre ter za pomoč pri vzorčenju rastlinskega materiala za genetske analize.

Zahvala gre tudi Vinakoper, Vinakras Sežana in zasebnim pridelovalcem, ki so mi dovolili vzorčenje v njihovih vinogradih.

Prav tako bi se želel zahvaliti Alenki Baruca Arbeiter za uvajanje v laboratorijsko delo ter dr. Tjaši Rešetič za uvajanje v metodo kloniranja DNA.

Največja zahvala gre ženi Teji za vso podporo, razumevanje in vsestransko pomoč ter Luku za potrpežljivo čakanje na tatov prosti čas.

PRILOGA A

Podatki o številnih sortah z imenom 'Refošk' iz mikrosatelitskih podatkovnih zbirk

Evropska podatkovna zbirka vinske trte (Maul in sod., 2012)		
Identifikacijska oznaka	Sorta	Akcesijska oznaka
1 Mariabino	Refosco nostrano	ITA368#SANOSVALDO/220U54-46
2 Refosco	Refosco di Guarnieri	ITA368#SANOSVALDO/V7_12-24.28
Refosco dal		
3 peduncolo rosso	Refosco peduncolo rosso	ITA368#SANOSVALDO/253U55-76
Refosco dal		
4 peduncolo rosso	Refosco dal peduncolo rosso	ITA388-R#1171
5 Refosco nostrano	Refosco nostrano	ITA388-R#1172
6 Refosco Rauscedo	Refosco di Rauscedo	ITA368#SANOSVALDO/254U55-79
7 Refoscone	Refosco nostrano	ITA368-SANOSVALDO/227U54-04
8 Teran	Terrano (1)	HRV041-SA#11-63
9 Terrano	Terrano (2)	DEU098-1991-128
10 Terrano	Terrano (3)	ITA388-R#1218
11 Terrano turk	Terrano (4)	ITA368#SANOSVALDO/249U55-58
Mednarodni katalog sort vinske trte		
	Sorta	Vir
12	Refosco dal peduncolo rosso	Cipriani in sod. 2010a
13	Terrano	Sefc in sod. 2000
Italijanska mikrosatelitska podatkovna zbirka (http://meteo.iasma.it/genetica/gmc.html)		
14	Refosco	Bowers in sod. 1996
15	Refosco peduncolo rosso (1)	Sefc in sod. 2000
16	Refosco peduncolo rosso (2)	Laboratory of Molecular Genetics IASMA (GMC - Grape Microsatellite Collection)
Podatkovna zbirka zahodno-balkanskih genotipov sort vinske trte (Vitis-WBC) (http://vitis.atcglabs.com/index.html)		
17 Teranovka		(Štajner in sod., 2013)
18 98 Refosk Istra		
Raziskovalni članki		
19	Refošk	Kozjak in sod. 2003.
20	Teran	Maletic in sod. 1999.
Ugotovljeni rezultati		
21	Refošk	

se nadaljuje

nadaljevanje

Mikrosatelitski lokusi in ugotovljene dolžine alelov (v bp)												
	VVMD5	VVMD5	VVMD7	VVMD7	VVMD27	VVMD27	VrZAG62	VrZAG62	VrZAG79	VrZAG79	VVMD32	VVMD32
1	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
2	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
3	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
4	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
5	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
6	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
7	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
8	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
9	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
10	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
11	218	224	229	235	171	175	172	178	234	238	234	236
12	228	234	239	247	182	190	194	194	251	259	/	/
13	228	230	247	249	190	190	192	194	239	251	/	/
14	226	232	239	263	/	/	/	/	/	/	/	/
15	224	230	238	246	/	/	193	193	250	258	/	/
16	223	229	237	245	179	187	194	194	249	257	248	260
17	224	226	247	249	190	190	194	194	240	252	250	272
18	224	226	247	249	190	190	194	196	240	252	250	272
19	/	/	248	248	191	191	195	195	238	250	255	275
20	224	226	244	246	/	/	191	193	238	250	/	/
21	223	225	244	246	190	190	192	194	238	250	248	271

PRILOGA B

Rezultati ampelografskega proučevanja

Priloga B1: Rezultati ampelografskega proučevanja grozdov

Biotip	Uradna oznaka trsa	Število grozdov na trto	Število grozdov na mladiko OIV 201 (1-2-3-4)	Velikost grozda OIV 202 (mm)	Širina grozda OIV 203 (mm)	Zbitost grozda OIV 204 (1-3-5-7-9)	Dolžina peclja OIV 206 (mm)	Izenačenost jagod OIV 222 (1-2)	Oblika grozda OIV 208 (1-2-3)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Masa posameznega grozda OIV 502 (g)
44	44/1	8	2	180	130	3	47	2	2	7	1	670
	44/1		2	145	155	3	40	2	2	7	5	588
	44/2	16	2	140	110	5	70	2	2	5	5	493
	44/2		2	185	130	3	55	2	2	7	5	442
	44/2		2	150	135	5	55	2	2	5	5	487
	44/2		2	145	125	3	45	1	2	5	5	343
	44/3	20	2	180	140	5	60	2	2	7	1	637
	44/3		1	145	100	5	45	2	2	5		377
	44/3		2	170	130	5	80	2	2	7	5	663
	44/3		2	160	115	3	80	2	2	7	5	442
Povprečje / OIV kategorija			2	160 / 5	127 / 5	3	57,7 / 3	2	2	5		514,2 / 5
22	22/28	10	2	190	110	3	45	2	2	7	5	494
	22/28		2	170	120	3	45	2	2	5	5	478
	22/29	13	2	160	120	5	45	2	2	7	5	495
	22/29		2	170	120	5	45	2	2	5	1	506
	22/32	18	1	145	115	5	55	2	2	5		547
	22/32		1	180	125	5	60	2	2	7		491
	22/37	20	2	115	130	7	70	2	2	5	7	512

se nadaljuje

nadaljevanje

Biotip	Uradna oznaka trsa	Število grozdov na trto	Število grozdov na mladiko OIV 201	Velikost grozda OIV 202 (mm)	Širina grozda OIV 203 (mm)	Zbitost grozda OIV 204 (1-3-5-7-9)	Dolžina peclja OIV 206 (mm)	Izenačenost jagod OIV 222 (1-2)	Oblika grozda OIV 208 (1-2-3)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Masa posameznega grozda OIV 502 (g)
22	22/37		1	170	120	5	65	2	2	7		579
	22/35	11	2	180	125	3	45	1	2	5	7	553
	22/35		1	150	130	5	62	2	2	5		502
Povprečje / OIV kategorija			2	163 / 5	121,5 / 5	5	53,7 / 3	2	2		5	515,7 / 5
10	10/95	12	2	125	110	5	85	2	2	7	1	386
	10/95		1	160	110	5	70	2	2	7		528
	10/96	17	1	140	125	5	60	2	2	5		352
	10/96		2	130	120	5	90	2	2	5		455
	10/102	8	2	165	135	5	45	2	2	7		539
	10/102		1	140	110	5	75	2	2	5		319
	10/103	9	1	145	125	5	75	2	2	7		544
	10/103		1	200	130	3	80	2	2	7		502
	10/107	13	2	180	120	5	75	2	2	7	7	665
	10/107		2	140	110	3	70	2	2	7	7	418
Povprečje / OIV kategorija			2	152,5 / 5	119,5 / 5	5	72,5 / 5	2	2		7	470,8 / 5
18	18/48	21	1	170	110	3	50	2	2	1		377
	18/48		1	140	120	3	60	2	2	7		372
	18/53	8	1	150	120	5	65	2	2	7		570
	18/53		1	165	120	5	70	2	2	5		520
	18/56	8	2	140	125	5	60	2	2	5	5	475

se nadaljuje

nadaljevanje

Biotip	Uradna oznaka trsa	Število grozdov na trto	Število grozdov na mladiko OIV 201	Velikost grozda OIV 202 (mm)	Širina grozda OIV 203 (mm)	Zbitost grozda OIV 204 (1-3-5-7-9)	Dolžina peclja OIV 206 (mm)	Izenačenost jagod OIV 222 (1-2)	Oblika grozda OIV 208 (1-2-3)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Masa posameznega grozda OIV 502 (g)
18	18/56		2	160	100	5	45	2	2	5	5	307
	18/60	11	2	160	120	5	90	2	2	1	5	490
	18/60		2	180	150	5	80	2	2	5	5	596
	18/65	13	2	150	145	5	55	2	2	7	5	483
	18/65		1	130	130	5	55	2	2	5		405
Povprečje / OIV kategorija			2	154,5 / 5	124 / 5	5	63 / 5	2	2		5	459,5 / 5
43	43/114	7	2	170	115	5	35	2	2	7	7	561
	43/114		2	165	155	5	40	2	2	7	5	671
	43/115	14	2	180	130	5	75	2	2	7	7	593
	43/115		2	180	125	5	90	1	2	7	7	605
	43/115		2	170	125	5	100	2	2	7	5	586
	43/117	12	2	150	100	5	65	2	2	5	5	406
	43/117		2	160	160	5	70	1	2	7	7	590
	43/117		1	175	145	5	90	2	2	7		620
	43/119	10	2	150	105	5	65	2	2	5	5	358
	43/119		1	140	100	5	50	2	2	5		209
Povprečje / OIV kategorija			2	164 / 5	126 / 5	5	68 / 5	2	2		7	519,9 / 5
31	31/4	6	2	160	125	5	55	2	2	7	7	521
	31/4		2	90	120	5	38	2	2	7	7	357
	31/5	11	2	160	135	5	65	3	2	7	5	789

se nadaljuje

nadaljevanje

Biotip	Uradna oznaka trsa	Število grozdov na trto	Število grozdov na mladiko OIV 201	Velikost grozda OIV 202 (mm)	Širina grozda OIV 203 (mm)	Zbitost grozda OIV 204 (1-3-5-7-9)	Dolžina peclja OIV 206 (mm)	Izenačenost jagod OIV 222 (1-2)	Oblika grozda OIV 208 (1-2-3)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Masa posameznega grozda OIV 502 (g)
31	31/5	11	2	150	125	5	70	2	2	7	5	559
	31/5		1	130	125	5	67	2	2	5		393
	31/5		1	150	100	3	65	2	2	5		347
	31/5		1	140	130	5	45	2	2	7		492
	31/6		2	165	115	7	50	2	2	7	5	744
	31/6		1	150	135	7	35	2	2	5		632
	31/6		2	165	165	5	50	2	2	5	5	690
Povprečje / OIV kategorija			2	146 / 5	127,5 / 5	5	54 / 3	2	2		5	552,4 / 5
39	39/62	7	2	160	130	3	50	2	2	7	5	458
	39/62	12	2	180	110	3	70	2	2	7	5	351
	39/52		2	135	105	3	40	2	2	7	5	354
	39/52		1	110	130	5	40	2	2	7		313
	39/52		2	170	140	3	40	2	2	7	5	474
	39/52		2	180	110	3	55	2	2	7	5	404
	39/53		2	150	115	5	75	2	2	7	5	550
	39/53		1	140	120	3	50	2	2	5		367
	39/53	14	2	155	110	3	55	2	2	5	1	291
	39/53		2	135	110	3	40	2	2	1	1	271
Povprečje / OIV kategorija			2	151,5 / 5	118 / 5	3	51,5 / 3	2	2		5	383,3 / 3

se nadaljuje

nadaljevanje

Biotip	Uradna oznaka trsa	Število grozdov na trto	Število grozdov na mladiko OIV 201	Velikost grozda OIV 202 (mm)	Širina grozda OIV 203 (mm)	Zbitost grozda OIV 204 (1-3-5-7-9)	Dolžina peclja OIV 206 (mm)	Izenačenost jagod OIV 222 (1-2)	Oblika grozda OIV 208 (1-2-3)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Masa posameznega grozda OIV 502 (g)
26	26/116	18	2	190	135	5	40	2	2	7	5	661
	26/116		2	180	135	5	50	2	2	7	5	799
	26/119	12	2	190	130	5	70	2	2	7	5	568
	26/119		1	150	100	5	80	1	2	7		500
	26/7	8	1	160	135	5	45	2	2	7		657
	26/7		1	180	150	5	55	2	2	7		1026
	26/13	15	1	160	125	5	80	2	2	7		748
	26/13		2	170	125	5	50	2	2	7	5	649
	26/9	12	2	180	140	5	70	1	2	7	5	705
	26/9		2	170	110	3	60	2	2	7	5	649
Povprečje / OIV kategorija			2	173 / 5	128,5 / 5	5	60 / 3	2	2	7		696,2 / 7
40	40/63	17	2	175	110	3	47	2	2	5	1	383
	40/63		2	140	120	5	75	2	2	7	5	449
	40/71	17	2	165	100	3	60	2	2	5	5	382
	40/71		1	140	120	5	45	2	2	7		408
	40/75	18	2	150	110	3	47	2	2	5	1	352
	40/75		2	160	100	5	37	2	2	5	5	399
	40/75		1	145	110	3	55	2	2	5		384
	40/75		1	140	140	5	50	2	2	5		458
	40/72	7	2	180	140	3	55	2	2	7	7	590

se nadaljuje

nadaljevanje

Biotip	Uradna oznaka trsa	Število grozdov na trto	Število grozdov na mladiko OIV 201	Velikost grozda OIV 202 (mm)	Širina grozda OIV 203 (mm)	Zbitost grozda OIV 204 (1-3-5-7-9)	Dolžina peclja OIV 206 (mm)	Izenačenost jagod OIV 222 (1-2)	Oblika grozda OIV 208 (1-2-3)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Masa posameznega grozda OIV 502 (g)
40	40/72		1	160	130	7	65	2	2	7		637
Povprečje / OIV kategorija			2	155,5 / 5	118 / 5	3	53,6 / 3		2		5	444,2 / 5
25	25/81	18	2	155	130	5	80	2	2	7	7	421
	25/81		2	165	100	3	75	2	2	5	5	333
	25/83	18	2	170	140	5	70	2	2	7	1	782
	25/83		2	140	120	5	55	2	2	7	5	455
	25/85	15	2	140	120	5	70	2	2	5	5	492
	25/85		1	170	125	5	75	2	2	5		562
	25/90	14	1	145	110	5	70	2	2	7		421
	25/90		1	150	120	5	80	2	2	7		442
	25/99	12	2	150	130	5	60	2	2	7	5	466
	25/99		2	170	120	5	45	1	2	7	5	552
Povprečje / OIV kategorija			2	155,5 / 5	121,5 / 5	5	68 / 5	2	2		5	492,6 / 5
45	45/7	14	1	180	120	5	35	2	2	1		365
	45/7		1	125	95	5	39	2	2	7	1	260
	45/7		2	160	110	5	47	2	2	5	5	348
	45/8	17	2	170	110	5	40	2	2	5	5	363
	45/8		3	165	130	5	60	2	2	7	5	428
	45/8		2	175	120	5	40	2	2	5	1	379
	45/13	19	2	155	135	5	70	2	2	7	5	577

se nadaljuje

nadaljevanje

Biotip	Uradna oznaka trsa	Število grozdov na trto	Število grozdov na mladiko OIV 201	Velikost grozda OIV 202 (mm)	Širina grozda OIV 203 (mm)	Zbitost grozda OIV 204 (1-3-5-7-9)	Dolžina peclja OIV 206 (mm)	Izenačenost jagod OIV 222 (1-2)	Oblika grozda OIV 208 (1-2-3)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Olesenelost peclja OIV 207* (1-5-7)	Masa posameznega grozda OIV 502 (g)
45	45/13		2	160	115	5	96	2	2	7	7	355
	45/13		1	85	95	5	84	2	2	5		251
	45/13		2	130	115	5	62	2	2	7	1	388
Povprečje / OIV kategorija			2	150,5 / 5	114,5 / 5	5	57,3 / 3	2	2	5		371,4 / 3
23	23/45	20	2	150	115	5	45	2	2	7	5	470
	23/45		1	120	90	5	40	2	2	5		340
	23/48	11	2	160	110	5	50	2	2	7	5	506
	23/48		2	130	125	5	40	2	2	5	1	387
	23/53	16	1	165	110	5	40	2	2	5		296
	23/53		2	145	125	5	70	2	2	7	7	341
	23/59	8	2	165	130	5	47	1	2	7	7	346
	23/59		2	135	110	3	35	1	2	7	5	296
	23/55	8	2	155	100	3	40	1	2	7	7	381
	23/55		2	145	120	3	55	2	2	5	5	350
Povprečje / OIV kategorija			2	147 / 5	113,5 / 5	5	46,2 / 3	2	2	5		371,3 / 3

Priloga B2: Rezultati ampelografskega proučevanja grozdov in grozdnih jagod

Biotip	Uradna oznaka trsa	Stopnja ločljivosti peclja			Masa jagode	Dolžina jagode			Širina jagode			Oblika jagode			Barva kože			Izenačenost barve kožice			Razvejanost primarnega grozda			Dolžina pecljev jagod			Intenzivnost obarvanosti mesa z antociani OIV 231		
		OIV 240 (1-2-3)			OIV 503 (g)	OIV 220 (mm)			OIV 221 (mm)			OIV 223 (od 1 do 10)			OIV 225 (1-2-3-4-5-6)			OIV 226 (1-2)			OIV 209 (1-2-3-4-5)			OIV 238 (mm)			OIV 231 (1-3-5-7-9)		
44	44/1	3	3	3	129	19	19	20	19	18	18	3	2	3	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	3	1	1		
	44/1	3	3	3		19	19	19	17	18	18	2	2	2	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	3	1	1		
	44/2	3	3	3		20	21	20	18	19	19	3	2	3	6	6	6	6	6	6	3	6	7	7	3	1	1		
	44/2	3	3	3		19	19	19	18	18	18	3	3	2	6	6	6	6	6	6	4	7	9	8	3	1	1		
	44/2	3	3	3		20	21	21	18	21	18	3	2	2	6	6	6	6	6	6	3	8	8	8	3	1	1		
	44/2	3	3	3		19	19	19	18	17	17	3	2	3	6	6	6	6	6	6	3	6	6	8	3	1	1		
	44/3	3	3	3		20	18	20	19	17	18	2	3	3	6	6	6	6	6	6	5	7	8	7	3	1	1		
	44/3	3	3	3		19	20	20	18	19	19	3	2	3	6	6	5	6	6	6	2	7	6	8	1	1	1		
	44/3	3	3	3		20	19	21	19	18	19	3	2	3	6	6	6	6	6	6	2	8	7	6	1	1	1		
	44/3	3	3	3		20	20	19	17	18	18	4	2	2	6	6	6	6	6	6	4	7	8	7	1	1	1		
Povprečje / OIV kategorija		3			4,30 / 5	20 / 5			18 / 5			3			6			6			3			7,0 / 3			1		
22	22/28	3	3	3	125	18	18	19	17	17	18	2	6	2	6	6	6	6	6	6	4	6	7	7	3	1	1		
	22/28	3	3	3		21	21	21	19	19	19	3	8	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	7	3	1	1		
	22/29	3	3	3		17	18	18	16	18	18	2	3	2	6	6	6	6	6	6	2	7	8	8	3	1	1		
	22/29	3	3	3		19	18	19	17	16	19	3	2	2	6	6	6	6	6	6	3	9	9	8	3	1	1		
	22/32	3	3	3		21	20	20	19	19	19	3	2	2	6	6	6	6	6	6	2	7	8	8	3	1	1		
	22/32	3	3	3		20	19	21	19	18	19	2	3	8	6	6	6	6	6	6	2	6	7	7	3	1	1		
	22/37	3	3	3		22	22	20	19	20	19	3	8	2	6	6	5	6	6	6	3	7	8	7	1	1	1		

se nadaljuje

nadaljevanje																											
Biotip	Uradna oznaka trsa	Stopnja ločljivosti peclja			Masa jagode	Dolžina jagode			Širina jagode			Oblika jagode			Barva kože			Izenačenost barve kožice			Razvejanost primarnega grozda	Dolžina pecljev jagod			Intenzivnost obarvanosti mesa z antociani		
		OIV 240 (1-2-3)			OIV 503 (g)	OIV 220 (mm)			OIV 221 (mm)			OIV 223 (od 1 do 10)			OIV 225 (1-2-3-4-5-6)			OIV 226 (1-2)			OIV 209 (1-2-3-4-5)	OIV 238 (mm)			OIV 231 (1-3-5-7-9)		
22	22/37	3	3	3		21	20	20	20	19	19	3	2	8	6	6	6	6	6	4	7	6	5	1	1	1	
	22/35	3	3	3		17	16	16	16	15	16	3	2	3	6	6	6	6	6	2	7	6	7	1	1	1	
	22/35	3	3	3		19	19	19	17	17	17	3	2	2	6	6	6	6	6	2	9	7	7	1	1	1	
Povprečje / OIV kategorija		3			4,17 / 5	19 / 5			18 / 5			2			6			6			2	7,2 / 3			1		
10	10/95	3	3	3	108	19	18	18	17	18	16	2	3	6	6	6	6	6	6	0	9	7	7	5	3	1	
	10/95	3	3	3		17	18	18	16	17	17	2	3	2	6	6	6	6	6	2	9	8	9	5	3	1	
	10/96	3	3	3		21	19	20	19	17	19	3	3	2	6	6	6	6	6	2	8	7	7	5	3	1	
	10/96	3	3	3		17	20	18	17	17	17	2	8	3	6	6	6	6	6	2	7	6	8	5	3	1	
	10/102	3	3	3		17	19	18	17	17	17	2	3	2	6	6	6	6	6	2	8	7	7	3	3	1	
	10/102	3	3	3		19	19	19	17	18	17	3	3	3	6	6	6	6	6	0	9	8	7	3	1	1	
	10/103	3	3	3		19	18	19	17	19	18	3	1	3	6	6	6	6	6	2	8	8	7	3	1	1	
	10/103	3	3	3		19	18	19	17	16	19	2	3	2	6	6	6	6	6	2	7	9	8	3	1	1	
	10/107	3	3	3		19	17	18	18	16	17	2	3	2	6	6	6	6	6	2	7	9	7	3	1	1	
	10/107	3	3	3		16	16	15	15	15	15	2	3	2	6	6	6	6	6	2	8	7	7	3	1	1	
Povprečje / OIV kategorija		3			3,60 / 3	18 / 5			17 / 5			3			6			6			2	7,7 / 3			3		
18	18/48	3	3	3	118	18	19	20	17	18	18	6	2	3	6	6	6	6	6	1	7	7	7	3	1	1	
	18/48	3	3	3		18	16	18	17	16	16	2	2	3	6	6	6	6	6	1	7	8	5	3	1	1	
	18/53	3	3	3		18	20	20	18	18	19	2	8	3	6	6	6	6	6	2	7	6	7	3	1	1	
	18/53	3	3	3		19	18	20	16	16	19	2	2	3	6	6	6	6	6	4	9	7	7	3	1	1	
	18/56	3	3	3		19	17	19	16	17	18	3	2	3	6	6	6	6	6	3	9	7	6	3	1	1	
se nadaljuje																											

se nadaljuje

nadaljevanje																													
Biotip	Uradna oznaka trsa	Stopnja ločljivosti peclja			Masa jagode	Dolžina jagode			Širina jagode			Oblika jagode			Barva kože			Izenačenost barve kožice			Razvejanost primarnega grozda			Dolžina pecljev jagod			Intenzivnost obarvanosti mesa z antociani OIV 231		
		OIV 240 (1-2-3)			OIV 503 (g)	OIV 220 (mm)			OIV 221 (mm)			OIV 223 (od 1 do 10)			OIV 225 (1-2-3-4-5-6)			OIV 226 (1-2)			OIV 209 (1-2-3-4-5)			OIV 238 (mm)			OIV 231 (1-3-5-7-9)		
18	18/56	3	3	3		17	16	15	17	17	15	2	2	2	6	6	6	6	6	6	3	7	5	7	3	1	1		
	18/60	3	3	3		19	21	19	16	20	17	3	3	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	7	3	1	1		
	18/60	3	3	3		20	20	20	18	18	18	3	3	2	6	6	6	6	6	6	2	8	6	7	3	1	1		
	18/65	3	3	3		18	20	20	17	19	19	3	2	2	6	6	6	6	6	6	2	8	8	9	3	1	1		
	18/65	3	3	3		18	19	20	18	18	19	2	3	2	6	6	6	6	6	6	2	7	7	8	3	1	1		
Povprečje / OIV kategorija		3			3,93 / 3	19 / 5			18 / 5			2			6			6			2	7,1 / 3			1				
43	43/114	3	3	3	114	18	18	19	16	17	18	2	3	2	6	6	6	6	6	6	4	9	7	6	1	1	3		
	43/114	3	3	3		20	20	19	18	18	17	3	3	3	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	1	1	3		
	43/115	3	3	3		19	20	18	17	18	16	2	2	3	6	6	6	6	6	6	4	7	8	9	1	1	3		
	43/115	3	3	3		18	19	20	17	18	19	2	3	3	6	6	6	6	6	6	4	7	7	7	1	1	3		
	43/115	3	3	3		20	18	15	19	19	18	2	2	2	6	6	6	6	6	6	5	8	8	9	1	1	3		
	43/117	3	3	3		20	20	19	18	19	17	8	2	3	6	6	6	6	6	6	5	7	7	7	1	1	3		
	43/117	3	3	3		19	19	20	18	18	18	2	2	3	6	6	6	6	6	6	5	7	7	8	1	1	3		
	43/117	3	3	3		18	20	20	17	20	18	3	2	3	6	6	6	6	6	6	5	8	7	7	1	3	3		
	43/119	3	3	3		17	19	17	16	17	17	3	2	2	6	6	6	6	6	6	4	7	7	6	1	3	3		
	43/119	3	3	3		18	19	19	17	18	17	3	2	3	6	6	6	6	6	6	4	7	7	7	1	3	3		
Povprečje / OIV kategorija		3			3,80 / 3	19 / 5			18 / 5			2			6			6			4	7,3 / 3			1				
31	31/4	3	3	3	117	18	18	19	17	16	18	3	3	2	6	6	6	6	6	6	4	8	7	7	5	5	3		
	31/4	3	3	3		18	18	17	17	15	15	3	2	2	6	6	6	6	6	6	4	5	5	6	1	5	1		
	31/5	3	3	3		19	19	18	17	18	17	4	2	2	6	6	6	6	6	6	5	5	7	7	5	3	1		
se nadaljuje																													

se nadaljuje

nadaljevanje																													
Biotip	Uradna oznaka trsa	Stopnja ločljivosti peclja			Masa jagode	Dolžina jagode			Širina jagode			Oblika jagode			Barva kože			Izenačenost barve kožice			Razvejanost primarnega grozda			Dolžina pecljev jagod			Intenzivnost obarvanosti mesa z antociani OIV 231		
		OIV 240 (1-2-3)			OIV 503 (g)	OIV 220 (mm)			OIV 221 (mm)			OIV 223 (od 1 do 10)			OIV 225 (1-2-3-4-5-6)			OIV 226 (1-2)			OIV 209 (1-2-3-4-5)			OIV 238 (mm)			OIV 231 (1-3-5-7-9)		
31	31/5	3	3	3		19	18	18	17	17	16	2	3	3	6	6	6	6	6	6	3	7	7	8	3	3	1		
	31/5	3	3	3		20	21	19	18	19	18	2	3	2	6	6	6	6	6	6	3	8	9	8	7	1	7		
	31/5	3	3	3		17	19	18	17	17	18	2	3	2	6	6	6	6	6	6	2	7	7	9	3	3	3		
	31/5	3	3	3		21	19	21	19	18	19	3	2	3	6	6	6	6	6	6	4	8	8	8	1	7	1		
	31/6	3	3	3		20	21	20	18	20	19	2	3	2	6	6	6	6	6	6	3	8	8	9	5	5	3		
	31/6	3	3	3		19	19	19	18	18	18	3	2	3	6	6	6	6	6	6	3	8	8	9	1	1	5		
	31/6	3	3	3		19	20	18	19	17	16	2	3	6	6	6	6	6	6	3	8	9	7	5	5	5			
Povprečje / OIV kategorija		3			3,90 / 3	19 / 5			18 / 5			2			6			6			3			7,5 / 3			3		
39	39/62	3	3	3	90	18	16	18	17	15	17	2	3	2	6	6	6	6	6	6	3	7	8	8	1	1	3		
	39/62	3	3	3		16	16	17	15	15	16	2	3	2	6	6	6	6	6	6	2	8	8	7	1	1	3		
	39/52	3	3	3		18	19	17	16	17	16	3	2	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	8	1	1	3		
	39/52	3	3	3		20	18	18	18	17	17	3	2	8	6	6	6	6	6	6	2	7	7	7	1	1	3		
	39/52	3	3	3		18	17	18	16	16	18	3	2	3	6	6	6	6	6	6	3	8	8	8	1	1	3		
	39/52	3	3	3		17	18	16	16	17	15	3	2	3	6	6	6	6	6	6	4	7	7	10	1	1	3		
	39/53	3	3	3		17	16	16	16	15	15	2	3	2	6	6	6	6	6	6	2	10	6	7	1	1	3		
	39/53	3	3	3		18	19	19	16	18	19	3	2	2	6	6	6	6	6	6	2	8	8	10	1	5	3		
	39/53	3	3	3		15	16	16	15	15	15	3	3	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	8	1	5	3		
	39/53	3	3	3		18	16	15	16	16	15	2	3	2	6	6	6	6	6	6	2	7	8	7	1	5	3		
Povprečje / OIV kategorija		3			3,00 / 3	17 / 5			16 / 5			3			6			6			2			7,7 / 3			1		
26	26/116	3	3	3	123	20	20	19	19	19	18	8	2	2	6	6	6	6	6	6	2	8	6	7	1	1	3		
	26/116	3	3	3		20	21	19	18	20	18	3	3	2	6	6	6	6	6	6	3	7	7	7	1	1	3		

se nadaljuje

nadaljevanje																													
Biotip	Uradna oznaka trsa	Stopnja ločljivosti peclja			Masa jagode	Dolžina jagode			Širina jagode			Oblika jagode			Barva kože			Izenačenost barve kožice			Razvejanost primarnega grozda			Dolžina pecljev jagod			Intenzivnost obarvanosti mesa z antociani OIV 231		
		OIV 240 (1-2-3)			OIV 503 (g)	OIV 220 (mm)			OIV 221 (mm)			OIV 223 (od 1 do 10)			OIV 225 (1-2-3-4-5-6)			OIV 226 (1-2)			OIV 209 (1-2-3-4-5)			OIV 238 (mm)			OIV 231 (1-3-5-7-9)		
26	26/119	3	3	3		17	18	19	17	17	17	3	3	2	6	6	6	6	6	6	2	8	8	8	1	3	3		
	26/119	3	3	3		20	18	16	18	17	16	3	2	2	6	6	6	6	6	6	3	8	7	8	1	3	3		
	26/7	3	3	3		21	21	20	20	19	18	2	3	2	6	6	6	6	6	6	3	8	8	8	1	3	3		
	26/7	3	3	3		19	22	21	19	20	18	2	3	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	6	1	3	3		
	26/13	3	3	3		19	20	20	18	19	19	2	2	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	8	1	3	3		
	26/13	3	3	3		20	20	18	17	18	16	8	3	2	6	6	6	6	6	6	4	8	6	7	1	3	3		
	26/9	3	3	3		19	18	19	18	17	17	2	3	3	6	6	6	6	6	6	5	8	8	8	1	3	3		
	26/9	3	3	3		18	17	18	17	17	18	2	2	2	6	6	6	6	6	6	4	9	8	8	1	3	3		
Povprečje / OIV kategorija		3			4,10 / 5	19 / 5			18 / 5			2			6			6			3			7,5 / 3			3		
40	40/63	3	3	3	90	17	16	16	16	15	15	3	2	2	6	6	6	6	6	6	4	7	7	9	1	1	3		
	40/63	3	3	3		17	18	18	16	17	16	3	2	3	6	6	6	6	6	6	3	6	6	7	1	1	3		
	40/71	3	3	3		17	17	17	16	16	17	3	2	2	6	6	6	6	6	6	3	8	7	7	1	1	3		
	40/71	3	3	3		19	20	19	17	19	17	3	2	3	6	5	5	6	6	6	3	7	8	7	1	1	3		
	40/75	3	3	3		17	17	17	16	17	17	3	3	2	6	6	6	6	6	6	2	8	6	7	1	1	3		
	40/75	3	3	3		17	15	17	16	15	16	2	2	3	6	6	6	6	6	6	3	7	8	7	1	1	3		
	40/75	3	3	3		18	17	17	16	16	16	2	3	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	8	1	3	3		
	40/75	3	3	3		18	18	17	16	17	16	3	8	3	6	6	6	6	6	6	3	9	10	8	1	3	3		
	40/72	3	3	3		16	16	18	16	16	17	2	2	3	6	6	6	6	6	6	3	8	7	8	1	3	3		
	40/72	3	3	3		17	17	15	16	16	14	2	2	3	6	6	6	6	6	6	3	9	8	9	1	3	3		
Povprečje / OIV kategorija		3			3,00 / 3	17 / 5			16 / 5			3			6			6			3			7,6 / 3			1		

se nadaljuje

nadaljevanje

Biotip	Uradna oznaka trsa	Stopnja ločljivosti peclja			Masa jagode	Dolžina jagode			Širina jagode			Oblika jagode			Barva kože			Izenačenost barve kožice			Razvejanost primarnega grozda			Dolžina pecljev jagod			Intenzivnost obarvanosti mesa z antociani OIV 231		
		OIV 240 (1-2-3)			OIV 503 (g)	OIV 220 (mm)			OIV 221 (mm)			OIV 223 (od 1 do 10)			OIV 225 (1-2-3-4-5-6)			OIV 226 (1-2)			OIV 209 (1-2-3-4-5)			OIV 238 (mm)			OIV 231 (1-3-5-7-9)		
25	25/81	3	3	3	122	22	21	18	20	21	17	3	2	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	7	1	5	3		
	25/81	3	3	3		17	18	19	17	17	18	2	3	3	6	6	6	6	6	6	3	8	8	8	1	5	3		
	25/83	3	3	3		20	20	20	18	19	19	2	2	3	6	6	6	6	6	6	2	7	7	8	1	5	3		
	25/83	3	3	3		18	18	19	18	18	18	2	2	3	6	6	6	6	6	6	2	6	8	7	1	3	3		
	25/85	3	3	3		19	19	18	17	18	18	2	8	2	6	6	6	6	6	6	2	8	7	7	1	3	3		
	25/85	3	3	3		20	20	18	18	18	18	3	8	2	6	6	6	6	6	6	0	8	8	8	1	3	3		
	25/90	3	3	3		19	19	19	18	17	17	3	3	2	6	6	6	6	6	6	2	7	9	8	1	3	3		
	25/90	3	3	3		20	19	20	19	17	17	8	2	3	6	6	6	6	6	6	2	8	8	8	1	3	3		
	25/99	3	3	3		18	18	19	17	17	16	2	3	2	6	6	6	6	6	6	4	7	6	8	1	3	3		
	25/99	3	3	3		16	17	16	17	16	16	2	3	3	6	6	6	6	6	6	3	7	6	7	1	3	3		
Povprečje / OIV kategorija		3			3,05 / 3	19 / 5			18 / 5			3			6			6			2			7,4 / 3			3		
45	45/7	3	3	3	83	19	18	18	16	17	17	3	2	2	6	6	6	6	6	6	5	8	8	7	1	1	5		
	45/7	3	3	3		18	17	17	17	16	16	2	2	2	6	6	6	6	6	6	6	9	10	8	1	1	3		
	45/7	3	3	3		17	18	18	16	18	17	2	2	3	6	6	6	6	6	6	7	9	7	8	1	1	3		
	45/8	3	3	3		17	18	16	16	17	14	2	2	2	6	6	6	6	6	6	7	8	8	9	1	1	3		
	45/8	3	3	3		18	17	17	17	16	17	2	3	2	6	6	6	6	6	6	6	7	8	9	1	5	3		
	45/8	3	3	3		18	17	19	11	16	18	2	2	2	6	6	6	6	6	6	5	6	6	7	1	5	3		
	45/13	3	3	3		18	18	19	18	17	18	2	2	2	6	6	6	6	6	6	5	9	8	8	1	5	3		
	45/13	3	3	3		18	19	17	17	17	16	3	3	2	6	5	6	6	1	6	5	7	8	8	1	5	3		

se nadaljuje

nadaljevanje																													
Biotip	Uradna oznaka trsa	Stopnja ločljivosti peclja			Masa jagode	Dolžina jagode			Širina jagode			Oblika jagode			Barva kože			Izenačenost barve kožice			Razvejanost primarnega grozda			Dolžina pecljev jagod			Intenzivnost obarvanosti mesa z antociani OIV 231		
		OIV 240 (1-2-3)			OIV 503 (g)	OIV 220 (mm)			OIV 221 (mm)			OIV 223 (od 1 do 10)			OIV 225 (1-2-3-4-5-6)			OIV 226 (1-2)			OIV 209 (1-2-3-4-5)			OIV 238 (mm)			OIV 231 (1-3-5-7-9)		
45	45/13	3	3	3		17	17	18	16	16	16	3	2	2	6	5	6	6	1	6	5	9	7	10	1	5	3		
	45/13	3	3	3		18	18	18	17	17	17	3	3	3	5	6	6	1	6	6	4	7	7	9	1	5	3		
Povprečje / OIV kategorija		3			2,77 / 3	18 / 5			16 / 5			2			6			6			4			8,0 / 3			3		
23	23/45	3	3	3	84	17	17	16	17	16	16	3	2	2	6	6	6	6	6	6	4	7	6	7	5	5	5		
	23/45	3	3	3		17	17	18	15	16	16	3	2	2	6	6	6	6	6	6	4	10	7	9	5	5	5		
	23/48	3	3	3		17	16	17	17	15	15	2	3	3	6	6	6	6	6	6	5	8	7	8	5	5	5		
	23/48	3	3	3		17	17	16	15	15	15	3	2	3	6	6	6	6	6	6	5	8	7	7	5	5	5		
	23/53	3	3	3		17	16	15	16	15	14	3	2	3	6	6	6	6	6	6	5	8	8	8	5	5	5		
	23/53	3	3	3		16	16	15	15	15	15	3	3	2	6	6	6	6	6	6	5	8	8	8	5	3	3		
	23/59	3	3	3		18	16	15	17	16	15	3	3	2	6	6	6	6	6	6	4	7	7	7	3	3	3		
	23/59	3	3	3		15	16	16	15	16	15	3	2	2	6	6	6	6	6	6	4	5	6	6	3	3	3		
	23/55	3	3	3		17	17	16	16	16	15	3	2	2	6	6	6	6	6	6	5	8	7	7	1	1	1		
	23/55	3	3	3		16	19	16	15	18	14	2	2	3	6	6	6	6	6	6	5	8	9	8	3	7	3		
		3			2,80 / 3	16 / 5			16 / 5			3			6			6			4			7,5 / 3			5		

Priloga B3: Rezultati ampelografskega proučevanja mošta

Biotip	Izplen mošta	Sladkorna stopnja v moštu	Titribilne kisline v moštu	pH mošta
	OIV 233 (%) / OIV kategorija	OIV 505 (°Brix) / OIV kategorija	OIV 506 (izražene v g vinske kisline / l) / OIV kategorija	OIV 508 (pH) / OIV kategorija
44	68 / 5	18,2 / 5	11,95 / 7	3,1 / 3
22	70 / 5	19,6 / 7	11,02 / 7	3,0 / 3
10	66 / 5	21,9 / 7	10,15 / 5	3,0 / 3
18	70 / 5	21,8 / 7	11,41 / 7	3,3 / 3
43	72 / 5	20,8 / 7	10,60 / 7	3,1 / 3
31	67 / 5	20,9 / 7	10,45 / 5	3,1 / 3
39	66 / 5	22,1 / 7	10,36 / 5	3,4 / 3
26	70 / 5	20,4 / 7	10,33 / 5	3,2 / 3
40	69 / 5	19,2 / 5	10,42 / 5	3,0 / 3
25	68 / 5	20,8 / 7	11,08 / 7	3,1 / 3
45	72 / 5	18,7 / 5	11,77 / 7	3,1 / 3
23	67 / 5	23,3 / 7	10,03 / 5	3,2 / 3

PRILOGA C

Rezultati analize sekvence biotipa 'Refošk' 38 z BLAST orodjem (CRIBI 12xV1 in NCBI RefSeq RNA)

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)				Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)						
				Identities						
Gene ID	Score	Expect	%	(Query length)	Accession No.	Length	Start	End	E-value	Identity
Contigs										
VIT_00s1194g00010	621	9,00E-178	99	346/347 (353)	XM_003635470.1	353	10	353	1,00E-179	100
VIT_05s0077g000900	410	2,00E-114	99	229/230 (233) /		/	/	/	/	/
VIT_04s0023g03470	800	0.0	97	465/478 (488)	XM_002265808.2	488	12	488	0	97
VIT_04s0008g03020	129	2,00E-30	98	73/74 (78)	XM_002283429.2	78	5	78	7,00E-28	99
VIT_06s0004g07870	937	0.0	100	519/519 (524)	NM_001281285.1	524	6	494	0	100
VIT_09s0070g00050	915	0.0	99	514/518 (517)	XM_002272015.1	517	4	517	0	99
VIT_06s0004g04860	167	8,00E-41	98	94/95 (460)	XM_002283494.2	460	7	460	0	99
VIT_06s0009g01930	944	0.0	99	525/526 (547)	XM_002270647.2	547	6	547	0	99
VIT_14s0068g00030	100	1,00E-20	79	90/113 (511)	XM_002277652.2	511	8	244	3,00E-117	99
VIT_09s0002g03620	836	0.0	98	471/478 (484)	NM_001281101.1	484	7	484	0	99
VIT_02s0025g01080	520	2,00E-147	96	308/318 (324)	XM_002273721.2	324	7	324	7,00E-149	97
VIT_05s0020g03490	477	2,00E-134	99	267/269 (275)	XM_002282481.2	275	7	275	5,00E-135	99
VIT_17s0000g08290	390	2,00E-108	99	218/219 (222)	XM_002279586.1	222	4	222	7,00E-109	99
Singletons										
VIT_18s0001g08780	940	0.0	98	533/540 (541) /		/	/	/	/	/
VIT_06s0009g03660	931	0.0	99	524/529 (535)	XM_002279480.2	535	7-312	395-535	4,00E-155	99
VIT_07s0005g00070	583	4,00E-166	98	331/336 (530)	XM_002263092.2	530	7	421	0	99

se nadaljuje

nadaljevanje

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)				Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)						
Gene ID	Score	Expect	%	Identities	Accession No.	Length	Start	End	E-value	Identity
				(Query length)						
VIT_09s0002g07020	890	0,00E+00	100	493/493 (516)	XM_003632712.1	516	24	516	0	100
VIT_01s0137g00560	865	0.0	99	482/484 (490)	XM_002285436.2	490	7	486	0	99
VIT_17s0000g00800	832	0.0	99	467/471 (471)	XM_002284216.1	471	1	471	0	99
VIT_02s0025g00240	807	0.0	98	457/464 (463)	NM_001281197.1	463	7	397	0	99
VIT_15s0046g00200	798	0.0	99	444/445 (450)	XM_003633898.1	450	6	336	5,00E-169	99
VIT_01s0011g05390	722	0.0	99	403/405 (410)	XR_078082.1	410	6	280	7,00E-138	99
VIT_00s0204g00170	650	0.0	99	362/363 (368)	XM_003635026.1	368	6	368	0	99
VIT_10s0042g01130	531	1,00E-150	99	297/299 (303)	XM_002273392.2	303	5	303	3,00E-151	99
VIT_16s0022g00960	232	1,00E-60	97	134/138 (287)	NM_001281212.1	287	3	113	8,00E-43	96
VIT_05s0020g02990	336	3,00E-92	99	188/189 (225)	XM_002281314.2	225	4	225	4,00E-110	99
VIT_19s0015g01760	268	1,00E-71	98	153/156 (166)	XM_002264197.2	166	11	166	5,00E-70	98
VIT_05s0020g01140	268	1,00E-71	99	150/151 (156)	XM_002270783.2	156	9	156	1,00E-70	100
VIT_18s0041g01280	273	2,00E-73	100	151/151 (156) /		/	/	/	/	/
VIT_00s0270g00120	857	0,00E+00	99	477/478 (512)	XM_002265499.2	512	7	503	0	99
/	/	/	/	/	XM_002282658.1	97	7	87	2,00E-33	100
VIT_18s0001g13190	331	1,00E-90	97	193/198 (203)	XM_003634325.1	203	6	203	7,00E-90	97
VIT_03s0097g00240	111	5E-24	71	185/260 (470) /		/	/	/	/	/

se nadaljuje

PRILOGA D

Rezultati analize sekvenc biotipa 'Refošk' 43 z BLAST orodjem (CRIBI 12xV1 in NCBI RefSeq RNA)

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)					Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)					
Gene ID	Score	Expect	%	Identities	Accession No.	Length	Start	End	E-value	Identity
				(Query length)						
Contigs										
VIT_05s0102g00230	596	4,00E-170	97	341/349 (400)	XM_002264351.2	400	7	400	0	98
VIT_13s0047g00720	178	8,00E-45	98	101/103 (107)	XM_002263400.2	107	65	107	1,00E-10	98
VIT_03s0063g02610	628	7,00E-180	99	351/353 (362)	XM_003631610.1	362	6	362	0	99
VIT_03s0063g00140	619	3,00E-177	99	346/348 (355)	NM_001281118.1	355	8	355	2,00E-173	99
VIT_08s0056g00700	215	9,00E-56	100	119/119 (243)	XM_002266673.1	243	21	139	2,00E-54	100
VIT_07s0129g00330	1040	0.0	99	581/584 (590)	XM_002284260.2	590	7	590	0	99
VIT_16s0098g01010	843	0.0	98	479/487 (500)	XM_003634102.1	500	5	500	0	98
VIT_13s0019g04070	632	0.0	99	352/353 (464)	NM_001281076.1	464	5	461	0	99
VIT_01s0026g02720	1005	0.0	99	559/560 (565)	XM_002268815.2	565	6	565	0	99
VIT_19s0085g00880	939	0.0	99	523/525 (530)	XM_002265478.2	530	6	530	0	99
VIT_13s0047g01200	700	0.0	98	394/398 (497)	XM_002274092.2	497	7	497	0	99
VIT_07s0005g02990	773	0.0	99	430/432 (463)	XM_002262949.2	463	5	463	0	99
VIT_08s0040g02330	114	4,00E-25	72	147/203 (403)	XM_004199308.1	403	60	232	3,00E-33	82
VIT_18s0001g13190	457	2,00E-128	97	266/274 (279)	XM_003634325.1	279	6	279	9,00E-128	97
VIT_01s0011g00590	475	7,00E-134	99	265/266 (272)	XM_002274285.2	272	7	272	5,00E-135	99
VIT_03s0063g00130	398	1,00E-110	95	237/249 (257)	XM_002285065.1	257	8	257	9,00E-108	97

se nadaljuje

nadaljevanje

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)				Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)						
Gene ID	Score	Expect	%	Identities	Accession No.	Length	Start	End	E-value	Identity
				(Query length)						
Singletons										
VIT_05s0051g00940	482	5,00E-136	98	275/280 (284)	XM_002285644.1	284	5	284	1,00E-135	98
VIT_19s0085g00880	450	2,00E-126	98	254/257 (257)	XM_002265478.2	257	7	257	3,00E-126	99
VIT_19s0177g00100	304	2,00E-82	98	173/176 (180)	XM_002281836.1	180	5	180	4,00E-81	98
VIT_02s0012g01410	994	0.0	99	556/559 (565)	XM_002278705.1	565	6	564	0	99
VIT_11s0016g05320	893	0,00E+00	98	509/517 (522)	XM_002282102.1	522	6	522	0	98
VIT_14s0081g00500	881	0,00E+00	98	499/506 (511)	XM_002270175.1	511	6	511	0	99
VIT_07s0005g01800	637	0.0	91	394/431 (436)	XM_003632366.1	436	6	436	0	99
VIT_18s0001g13250	583	3,00E-166	91	362/396 (401)	NM_001281234.1	401	5	232	9,00E-112	99
VIT_05s0077g01390	138	3,00E-32	98	78/79 (326)	/	/	/	/	/	/
VIT_11s0016g01400	565	6,00E-161	99	316/318 (321)	XM_002279899.1	321	2	316	9,00E-162	99
VIT_01s0113g00540	536	3,00E-152	99	299/300 (310)	XM_002266807.1	310	11	310	2,00E-153	99
VIT_09s0002g02400	471	8,00E-133	98	266/269 (271)	XM_002279736.2	271	6	271	7,00E-133	99
VIT_07s0197g00010	416	5,00E-116	97	239/244 (246)	XM_003635484.1	246	5	246	2,00E-119	99
VIT_19s0085g00040	363	2,00E-100	99	204/206 (212)	XM_002265828.2	212	7	212	2,00E-99	99
VIT_18s0001g04680	605	8E-173	99	338/340 (370)	XR_078168.2	370	7	370	0	99
/	/	/	/	/	XM_003633980.1	160	9	160	4,00E-71	99
/	/	/	/	/	XM_002282124.2	80	9	63	3,00E-17	98
VIT_04s0023g02700	444	1,00E-124	99	248/249 (252)	XM_002274169.1	252	4	252	2,00E-125	99
VIT_07s0129g00330	883	0	99	492/494 (500)	XM_002284260.2	500	7	500	0	99

PRILOGA E

Rezultati analize sekvenc z BLAST orodjem (CRIBI 12xV1 in NCBI RefSeq RNA), ki so bile ugotovljene pri obeh biotipih; pri biotipu 'Refošk' 38 in 'Refošk' 43

Zbirka genov vinske trte 12Xv1 (CRIBI)				Podatkovna zbirka RefSeq RNA (NCBI)						
Gene ID	Score	Expect	%	Identities	Accession No.	Length	Start	End	E-value	Identity
				(Query length)						
Contigs										
VIT_18s0072g00380	1067	0.0	99	593/594 (601)	XM_003634472.1	601	8	601	0	99
VIT_08s0040g02640	408	8E-114	100	226/226 (265)	XM_002278088.2	265	19	265	1E-125	100
VIT_06s0004g07770	985	0.0	100	546/546 (556)	XM_002269882.2	556	11	556	0	100
VIT_06s0080g00980	901	0.0	98	511/519 (524)	XM_002272513.1	524	6	524	0	98
VIT_08s0058g00640	928	0.0	100	514/514 (517)	XM_002264443.2	517	4	517	0	100
VIT_18s0001g08270	563	2E-160	99	315/317 (321)	XM_002285521.2	321	5	321	1E-161	99
VIT_00s0220g00030	601	1E-171	99	335/336 (442)	XM_002272210.2	442	6	442	0	99
VIT_07s0005g04970	904	0.0	99	504/506 (511)	XM_002265813.2	511	6	511	0	99
VIT_11s0016g03140	372	5E-103	98	211/214 (238)	XM_002280398.2	238	6	238	3E-113	99
/	/	/	/	/	XM_002278059.2	311	9	311	1E-153	99