

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Maja KASTELEC

**ANALIZA TRSOV KLONSKE SELEKCIJE
ŽLAHTNE VINSKE TRTE (*Vitis vinifera* L.) Z
MOLEKULSKIMI MARKERJI**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Maja KASTELEC

**ANALIZA TRSOV KLONSKE SELEKCIJE ŽLAHTNE VINSKE
TRTE (*Vitis vinifera* L.) Z MOLEKULSKIMI MARKERJI**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij - 1. stopnja

**MOLECULE MARKER ANALYSIS OF NOBLE GRAPEVINES (*Vitis
vinifera* L.) FROM CLONAL SELECTION**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je bilo v celoti opravljeno na Katedri za genetiko, žlahtnjenje rastlin in rastlinsko biotehnologijo Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je potrdila naslov diplomskega dela in mentorstvo doc. dr. Nataše Štajner.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: prof. dr. Denis RUSJAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maja Kastelec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dv1
DK	UDK 634.8:577.2(043.2)
KG	žlahtna vinska trta / genetika / mikrosatelitni marker / sorta / klon
AV	KASTELEC, Maja
SA	ŠTAJNER, Nataša (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2015
IN	ANALIZA TRSOV KLONSKE SELEKCIJE ŽLAHTNE VINSKE TRTE (<i>Vitis vinifera</i> L.) Z MOLEKULSKIMI MARKERJI
TD	Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij - 1. stopnja)
OP	X, 41 str., 8 pregl., 7 sl., 52 vir.
IJ	SI
JI	sl / en
AI	Vinogradništvo in vinarstvo sta se pri nas uveljavila v času keltskih in ilirskih plemen. Zelo pomembno izhodišče za ti panogi so donosne sorte, prilagojene na dane okoljske dejavnike. Pridobivanje oziroma izbor takšnih sort pa obsega številne metode vrednotenja kakovosti posamezne sorte oziroma tako imenovano klonsko selekcijo. Klonska selekcija poteka v daljšem časovnem obdobju, kjer se odbirajo najbolj aktualni kloni posameznih sort žlahtne vinske trte. Poleg morfološke identifikacije pa so se v zadnjem obdobju uveljavile tudi različne molekularne tehnike identifikacije na nivoju DNK. Za najbolj uporabne so se izkazali mikrosateliti, na osnovi katerih lahko izdelamo veliko število markerjev, ki so dovolj polimorfni, da lahko z njimi razločujemo med sortami in v nekaterih primerih celo kloni. Z verižno reakcijo s polimerazo smo na osnovi mikrosatelitskih markerjev identificirali 38 klonov, 15-ih različnih sort. V dveh primerih je prišlo do razlik med kloni znotraj posamezne sorte, in sicer pri klonih 'Laški rizling' SI-11, 'Renski rizling' SI-23, kjer je prišlo do razlik zaradi pojava himerizma. Pri sorti 'Chardonnay' SI-21 pa je prišlo do razlik med kloni zaradi pojava senčnih fragmentov. Mikrosateliti so torej dobra izbira za identifikacijo tako sort kot klonov in za razlikovanje med sortami, niso pa tako zelo učinkoviti pri zaznavanju razlik med kloni.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dv1
DC	UDC 634.8:577.2(043.2)
CX	nobel <i>Vitis vinifera</i> L. / genetics / microsatellite marker / variety / clone
AU	KASTELEC, Maja
AA	ŠTAJNER, Nataša (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Department of Agronomy
PY	2015
TI	MOLECULE MARKER ANALYSIS OF NOBLE GRAPEVINES (<i>Vitis vinifera</i> L.) FROM CLONAL SELECTION
DT	B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
NO	X, 41 p., 8 tab., 7 fig., 52 ref.
LA	sl
AL	sl / en
AB	<p>Viticulture and enology have appeared in our land at the time of Celtic and Illyrian tribes. Relevant for this area are profitable varieties, which are adapt to a certain environmental factors. For selection of such varieties we need to evaluate a number of methods related to production and quality of each variety. Such process is called clonal selection and it takes a long period of time to choose the most actual clones of each grapevine varieties. In addition to the morphological characterization various molecular techniques for identification and characterization at the DNA level were implemented in recent times. Microsatellites have proved to be the most useful molecular tool for genotyping of noble grapevines and on their basis we can produce a large number of markers. They are very abundant in the grapevine genome and very polymorphic for distinction between varieties and in some cases even clones. In the present work we have identified 38 clones of 15 different varieties using microsatellite markers. The clonal variability was discovered among clones for two out of fifteen varieties ('Laški rizling' SI-11, 'Renski rizling' SI-23) where the differences based on the occurrence of third allele (chimerisem). The differences among clones of 'Chardonnay' occurred as stutter bans by clone 'Chardonnay' SI-21. Microsatellites are therefore an excellent choice for the identification of varieties but they are not very effective in detecting differences between clones.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 VZROK IN NAMEN RAZISKAVE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IZVOR IN KLASIFIKACIJA ŽLAHTNE VINSKE TRTE (<i>Vitis vinifera</i> L.)	3
2.1.1 Izvor žlahtne vinske trte	3
2.1.2 Klasifikacija žlahtne vinske trte	3
2.2 KLONSKA SELEKCIJA	3
2.3 RAZVOJ VINOGRADNIŠTVA IN KLON. SELEKCIJE NA SLOVENSKEM	4
2.3.1 Razvoj vinogradništva v Sloveniji	4
2.3.2 Razvoj klonske selekcije v Sloveniji	5
2.4 OKARAKTERIZACIJA SORT ŽLAHTNE VINSKE TRTE	7
2.4.1 Morfološke metode	7
2.4.2 Kemijske metode	7
2.4.3 Molekularne metode	7
2.5 SSR MARKERJI ALI MIKROSATELITI	9
2.5.1 Analiza mikrosatelitov pri žlahtni vinski trti	10
2.5.2 Mutacije ob nastanku mikrosatelitskega markerja	11
2.6 POMNOŽEVANJE MIKROSATELITSKIH LOKUSOV S PCR METODO	12
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 MATERIAL	14
3.2 METODE	15
3.2.1 Izolacija DNK	15
3.2.2 Merjenje koncentracije DNK s fluorometrom	16
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo	16
3.2.4 Pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov v PCR	18
3.2.5 Priprava vzorcev za kapilarno elektroforezo	19
3.2.6 Analiza produktov PCR	19
3.2.7 Merjenje dolžine fragmentov	20
4 REZULTATI	21
4.1 IZOLACIJA DNK	21
4.2 DOLOČANJE DOLŽINE MIKROSATELITSKIH ALELOV	22

4.3	PRIMER VREDNOTENJA DOLŽINE ALELOV	23
4.4	GENOTIPIZACIJA KLONOV	24
4.5	ANALIZA KLONSKE VARIABILNOSTI	28
4.6	IDENTIFIKACIJA SORT	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	32
5.1	RAZPRAVA	32
5.2	SKLEPI	34
6	POVZETEK	36
7	VIRI	37
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Seznam vzorcev mladik vseh klonov, nabranih 17. 5. 2011 v baznem vinogradu STS Vrhopolje	14
Preglednica 2:	Izbor začetnih oligonukleotidov za PCR, z natančno določenim baznim zaporedjem (R-končni primer, F-začetni primer)	17
Preglednica 3:	Reagenti in njihov volumen na vzorec	18
Preglednica 4:	Razdelitev in označba primerjev	19
Preglednica 5:	Koncentracija vzorcev DNK	21
Preglednica 6:	Dolžine alelov na posameznih lokusih za sorto 'Laški rizling'	23
Preglednica 7:	Dobljeni aleli 38 klonov na 9 lokusih	25
Preglednica 8:	Primerjava naših podatkov genotipov z genotipi iz različnih podatkovnih bazam	30

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz zdrsov med replikacijo	11
Slika 2: Prikaz poteka PCR reakcije	13
Slika 3: Kapilarna elektroforeza 3130 XL Genetic Analyzer	20
Slika 4: GeneScanTM 600 LIZ (Applied Biosystems)	22
Slika 5: Lokusi VVMD5, VVMD7, VVMD25 in VVMD27 pomnoženi pri štirih klonih sorte 'Laški rizling'	24
Slika 6: Lokus VVMD7 pomnožen pri treh klonih sorte 'Renski rizling'	28
Slika 7: Lokus VVS2 pomnožen pri treh lokusih sorte 'Chardonnay'	29

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	molekularna metoda: dolžinski polimorfizem restrikcijskih fragmentov (ang. amplified fragment length polymorphism)
alel	ena od dveh ali več različic zapisa gena na določenem mestu na kromosomu
CTAB	cetil trimetil-amonijev bromid
dATP	deoksiriboadenozin trifosfat
dCTP	deoksiribocitidin trifosfat
delecija	izbris določenega zaporedja v DNK verigi
dGTP	deoksiribogvanozin trifosfat
dH ₂ O	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
dTTP	deoksiribotimidin trifosfat
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
ELISA test	encimsko vezan imunski test (ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FAM, VIC, NED, PET	fluorescentna barvila
fenotip	vse morfološke in fiziološke lastnosti organizma, ki se razvijejo na podlagi njegovega genotipa in vpliva okolja
fragment DNK	del genskega zapisa na DNK
genotip	celotna genetska informacija, ki jo vsebujejo geni določenega organizma
genotipizacija	določanje genskega zapisa organizma
heterozigoten	stanje, ko ima diploidna celica dva različna alela za isti gen
inercija	vnos določenega zaporedja v DNK verigo

klon	gensko popolnoma enak organizem ali celica, ki je nastala z nespolnim razmnoževanjem
lokus	mesto gena na kromosomu
MgCl ₂	magnezijev klorid
NaCl	natrijev klorid
O.I.V.	mednarodna organizacija za vinsko trto in vino (fr. Office international de la vigne et du vin)
PCR	polimerazna verižna reakcija (ang. polymerase chain reaction)
polimorfizem	pojavljanje različno oblikovanih osebkov iste vrste
primer	začetni oligonukleotid, ki se prilega obrobni regiji mikrosatelita
RAPD	molekularna metoda: naključno pomnoženi polimorfni DNK odseki (ang. random-amplified polymorphic DNA)
replikacija	podvojevanje DNK verige
RFLP	molekularna metoda: dolžinski polimorfizem restrikcijskih fragmentov (ang. restriction fragment length polymorphism)
SCAR	molekularna metoda (ang. sequence characterized amplified region)
SSR	molekularna metoda: enostavno ponovljiva sekvenca, mikrosatlit (ang. simple sequence repeat, microsatellite)
STS	seleksijsko trsničarsko središče

1 UVOD

Vinogradništvo in z njim tudi vinarstvo sta se pri nas začela uveljavljati okoli 2 400 let nazaj, v času keltskih in ilirskih plemen (Vinogradništvo ..., 2011). Ohranila sta se vse do danes, a žal se je ta dejavnost močno zmanjšala. V 19. stoletju so zabeležili 50 000 ha vinogradniških površin (Kuljaj, 2005), v začetku leta 2010 je bilo v register pridelovalcev grozdja in vina (RPGV) vpisanih 28 000 pridelovalcev, skupno so obdelovali 17 000 ha vinogradov. Vendar je dandanes velik del pridelovalcev neregistriranih kar pomeni, da je skupna površina vinogradov nekoliko večja od 22 000 ha (KGZS, 2012). Letno se na tolikšni površini pridelava povprečno 100 milijonov litrov vina, porabi pa 40 litrov na prebivalca (Kuljaj, 2005). V Pravilniku o seznamu geografskih označb za vina in trsnem izboru (2007) je vpisanih 52 sort vinske trte, 35 belih in 17 rdečih (Štrukelj-Mavrič in sod., 2012).

Glavni namen rajonizacije je zaščita geografskega porekla, kar pomeni, da je zaradi raznolike sestave tal, razgibanosti reliefa in podnebnih razlik, ki določajo kje bo katera sorta najbolj uspevala, Slovenija razdeljena na 3 vinorodne dežele, in sicer Podravje, Posavje in Primorska ter 9 vinorodnih okolišev, ki pa se dalje delijo v podokoliše, ožje okoliše, kraje in lege (Rusjan, 2009). Specifične ekološke razmere, ki vplivajo na raznolikost sort žlahtne vinske trte ter zaželena kakovost sadilnega materiala sta pred 60 leti spodbudili vinogradnike, da so pričeli s klonsko selekcijo žlahtne vinske trte na Slovenskem. Trsne cepljenke v Sloveniji namreč pridelujemo iz potrjenih matičnih trt klonov posameznih sort, ki so nastali na osnovi tuje in domače selekcije. Od svetovno razširjenih sort so bile v našo klonsko selekcijo vključene tiste sorte, ki so primerne za naše ekološke razmere (Koruza in sod., 2012).

Glavni cilj klonske selekcije je, odbira rastlin, ki so najboljše glede na rast in rodnost. Veliko vlogo pri klonski selekciji imajo podnebne razmere, ki se od območja do območja razlikujejo. Zato je potrebno neprestano pregledovati primernost klonov za določeno območje (Mohorič, 2005).

Leta 1992 smo dobili dve selekcijsko trsničarski središči (STS) v Vrhpolju pri Vipavi in Ivanjkovcih pri Ormožu, leta 2008 pa so bila izdelana zaključna poročila o preskušanju 39 novih slovenskih klonov 16-ih sort žlahtne vinske trte (Koruza in sod., 2012). Rezultat klonskih selekcij so potrjeni kloni sort 'Laški rizling', 'Sauvignon', 'Šipon', 'Rebula', 'Merlot', 'Žametovka', 'Pinela' in 'Zelen'. Pri nekaterih sortah so kloni med seboj zelo različni, kar je vidno v količini in kakovosti grozdja ter bujnosti ali rasti trt (Mohorič, 2005). Identifikacijo sort žlahtne vinske trte danes večinoma izvajamo z ampelografskimi metodami v manjši meri pa tudi z molekularnimi metodami na nivoju DNK (deoksiribonukleinska kislina). Morfološke metode temeljijo na opazovanju morfoloških razlik med rastlinami in zaradi vpliva okoljskih dejavnikov je včasih identifikacija sort in

klonov lahko tudi napačna. Uporaba molekularnih metod na področju identifikacije sort žlahtne vinske trte pa omogoča analizo na nivoju genotipa in je navadno dopolnilna metoda, ki se uveljavlja in širše uporablja predvsem v zadnjem času. Metoda se izvaja z uporabo različnih molekularnih markerjev, med katerimi so se najbolj uveljavili mikrosateliti. Pri žlahtni vinski trti je bilo v preteklosti razvitih več kot 500 mikrosatelitskih markerjev, od leta 2007, ko je bila objavljena sekvenca celotnega genoma žlahtne vinske trte se je število povečalo. Izredni potencial in uporabnost mikrosatelitskih markerjev pri določanju sort žlahtne vinske trte in podlag je bil dokazan v številnih raziskavah (Štajner, 2003).

1.1 VZROK IN NAMEN RAZISKAVE

Klonska selekcija se od 19. stoletja naprej uporablja za izboljšanje nekaterih pridelovalnih lastnosti sort žlahtne vinske trte (Ambrosi in sod., 1994, cit. po Regner in sod., 2006). Pri klonski selekciji se naravna raznolikost znotraj dane sorte uporablja za izboljšanje nekaterih lastnosti pomembnih za pridelavo vina, kar omogoča pridelovalcem, da ponudijo različne fenotipe znotraj ene sorte in za pridelavo oziroma predelavo odberejo najboljše. Različni kloni, ki predstavljajo variabilnosti posamezne sorte odražajo tudi rezultat pozitivne množične selekcije na osnovi izbranih vinogradniških karakteristik (Regner in sod., 2006).

Ker ima žlahtna vinska trta dolgo tradicijo gojenja, nekatere tradicionalne sorte kot npr. različne sorte 'Pinot' (npr. 'Modri Pinot', 'Sivi Pinot', 'Beli Pinot'), kažejo visoko stopnjo variabilnosti (Bassermann-Jordan, 1975, cit. po Regner, 2006). Stopnja variabilnosti je odvisna od razmnoževanja, razširjenosti po različnih območjih in intenzivnosti pridelave (Schöffling in Stellmacha, 1993, cit. po Regner, 2006).

Za namen žlahtnjenja je najprej potrebna identifikacija rastlinskega materiala oziroma posameznih klonov, prav tako pa je potrebno oceniti heterozigotnost materiala. Dalje je zelo priporočljiva indikacija genetske raznolikosti obstoječih klonov in hkrati potrditev identičnosti določene sorte z molekularnimi markerji.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Klone posameznih sort vključenih v poskus klonske selekcije žlahtne vinske trte bomo analizirali z mikrosatelitnimi molekularnimi markerji. Predvidevamo, da bomo potrdili identiteto klonov posameznih sort in odkrili variabilnost med kloni znotraj posamezne sorte. Na osnovi dobljenih razlik na posameznih mikrosatelitskih lokusih bomo ugotovili uporabno vrednost mikrosatelitov za ločevanje posameznih klonov. Ocenili bomo tudi primernost uporabljene biotehnološke metode za testiranje pri programih klonske selekcije, za odkrivanje napak pri poimenovanju in identifikaciji.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IZVOR IN KLASIFIKACIJA ŽLAHTNE VINSKE TRTE (*Vitis vinifera* L.)

2.1.1 Izvor žlahtne vinske trte

Trta se je razvila na zemlji pred človekom, kar lahko potrdimo s fosilnimi ostanki pečk in ostalih delov trte iz obdobja mezozoika, kenozoika in še poznejših dob. Domnevajo, da je rod *Vitis* nastal v eni mlajših geoloških dob (Doberšek, 1978).

Glede izvora žlahtne vinske trte lahko povzamemo po Negrulju (cit. po Doberšek, 1978), da sta najpomembnejši središči nastanka žlahtne vinske trte v severovzhodni Aziji in severovzhodni Ameriki. Rupcov (cit. po Doberšek, 1978) pa je še bolj natančen in pravi, da se je v Zakavkazu v Srednji Aziji in Iranu, na Daljnem vzhodu, v Sibiriji, na Kitajskem in v Severni Ameriki razvilo največ vrst žlahtne vinske trte in sadnih vrst. Z območja Male Azije so žlahtno vinsko trto in znanje o njenem gojenju ter pridobivanju soka in vina, širili v območja Evrope, natančneje v antične dežele, od tam pa v Italijo in ob Jadranski obali, kjer so se z vinogradništvom ukvarjali že 500 let pr. n. št. (Doberšek, 1978).

2.1.2 Klasifikacija žlahtne vinske trte

Vitis vinifera L. spada v evroazijsko skupino. V to geografsko skupino poleg nje spada tudi *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris*. Evroazijske trte ter poleg teh tudi vzhodno azijske in severno ameriške trte spadajo dalje v podrod *Euvitis*, rod *Vitis* in družino *Vitaceae* ali *Ampelideae*, v slovenskem jeziku so to vinikovke (Rusjan, 2009). Dalje spadajo v red *Vitales* (vinikovci), v nadred *Rhamnanae*, podrazred *Rosidae*, razred *Rosopsida* oziroma »prave dvokaličnice«, poddeblo *Magnoliophytina* ali kritosemenke, deblo *Spermatophyta* oziroma semenke ter v kraljestvo *Plantae* ali rastlin (Batič in sod., 2004).

2.2 KLONSKA SELEKCIJA

Klonska selekcija se je pričela leta 1876, ko so vinogradniki začeli z raziskavami na področju donosa in kakovosti posamezne sorte trte. Rezultati tega dela so prispevali k registraciji prvega klona žlahtne vinske trte, sorte 'Silvaner', s povprečnim donosom 6,0 - 6,4 kg/trto. Te raziskave so bile opravljene s strani Froelicha leta 1900. Danes je za skoraj vse pomembnejše sorte dostopen klonski material za razmnoževanje in se uporablja po vsem svetu. Trenutno je v Nemčiji registriranih okoli 600 klonov, v Franciji pa več kot 1000 (Schon in sod., 2009).

Žlahtna vinska trta je sicer zaradi dolge življenjske dobe nagnjena k prilagajanju na okoljske in patogene vplive, kar pa vodi k fenotipskim in genotipskim spremembam, ki jih imenujemo tudi klonska variabilnost. Klonska variabilnost je tu definirana kot sprememba v genomu, ki je bila pridobljena z nespolnim razmnoževanjem (Schon in sod., 2009). Z vegetativnim razmnoževanjem preko dolgih časovnih period pride do kopičenja mutacij v posameznih genotipih, kar se izrazi kot spremenjen fenotip. Klonska selekcija je tako orodje za izboljšanje pridelka (Regner in sod., 2006).

V klonski selekciji je potrebno fenotipske razlike znotraj sorte jasno opredeliti. Količinske lastnosti (npr.: število grozdov na trto ali zgradba grozda, donos) so prepoznavne na eni trti, kakovostne lastnosti (npr.: vsebnost sladkorja in kislin) pa so opazne le pri večjih nasadih, posajenih v raziskovalne namene oziroma za namene klonske selekcije. Cilji klonske selekcije so večinoma odvisni od sorte in njegove namembnosti. Tako je na primer pri pridobivanju podlag poudarek na zdravju materiala, da se prepreči prenos virusa po cepljenju na potomce, pri namiznem grozdju pa je najbolj pomembna lastnost npr. videz, ki pa pri vinskem grozdju nima glavne vloge (Schon in sod., 2009).

2.3 RAZVOJ VINOGRADNIŠTVA IN KLONSKE SELEKCIJE NA SLOVENSKEM

2.3.1 Razvoj vinogradništva v Sloveniji

Žlahtna vinska trta je ena najstarejših gojenih rastlin pri nas. Že v 15. in 16. stoletju so nekatere avtohtone sorte še posebej izstopale po svoji vsestranski kakovosti. Sicer pa se je vinogradniška dejavnost pri nas začela že v času Keltov. S prihodom Rimljanov se je vinogradništvo še izpopolnilo. V srednjeveškem času pa imajo največ zaslug za širjenje vinogradništva in kletarstva samostani, ki so imeli v posesti odlične vinogradniške lege in so bili tako vodilni strokovnjaki na tem področju (Medved, 1995).

V obdobju med 16. in 18. stoletjem je prišlo do razvoja intenzivnega vinogradništva. Cene vina so pričele naraščati in zato so začeli masovno saditi trto (Medved, 1995). Napredek v vinogradništvu se je nadaljeval tudi v 19. stoletju. Začeli so ustanavljati kmetijske družbe, dr. Janez Bleiweis je pričel z izdajanjem Kmetijskih in rokodelskih novic. Dobili smo tudi prvo vinarsko šolo v Mariboru, in sicer leta 1881. Pet let kasneje pa še kmetijsko šolo na Slapu pri Vipavi (Kuljaj, 2005).

Okoli leta 1880 je prišlo do pojava nove veje na področju vinogradništva, to je trsničarstvo. V tem obdobju se je namreč pojavila trtna uš (*Viteus vitisfoliae* F.) in potrebno je bilo cepljenje na trtno uš odporne vrste žlahtne vinske trte, ki so izvorno ameriške (Medved, 1995).

Pred začetkom 1. svetovne vojne se je število vinogradov ponovno začelo zmanjševati, zaradi vseh tegob v predhodnih letih. V kraljevini Jugoslaviji so bile razmere za gospodarjenje še vedno težke in tako so kmetje začeli s sajenjem samorodnic, katerih ni bilo potrebno oskrbovati. Kakovost vina je bila slaba in so ga morali celo sladiti z medom ali mu dodajati začimbe (Medved, 1995). Po 2. svetovni vojni pa je prišel čas velikih sprememb. Velike lastnike vinogradov in nemške vinske trgovce so zamenjale zadruga in državna gospodarstva. Poleg tega so kmetje začeli odhajati v mesta, kar je prispevalo še k večjemu opuščanju vinogradov (Medved, 1995).

2.3.2 Razvoj klonske selekcije v Sloveniji

Leta 1954 se je poleg organizirane odbire matičnih trt začela izvajati načrtna klonska selekcija ter pridobivanje novih sort žlahtne vinske trte in podlag s križanjem. Štiri leta pozneje se je to obdobje končalo z ukinitvijo državnih in šolskih posestev, vinarskih zadrug in vinarskega inštituta. Leta 1971 se je obnovilo 40 - 50 ha matičnjakov podlag, da bi sadili doma pridelan trtni sadilni material in ponovno začeli s pozitivno množično selekcijo matičnih trt ter lastno trsničarsko pridelavo. Klonska selekcija poteka torej v Sloveniji kontinuirano že skoraj 60 let. Gre za najvišji nivo genetske in zdravstvene selekcije, ki se opravi istočasno in z vsemi razpoložljivimi, sodobnimi in mednarodno potrjenimi priporočenimi postopki. Glavna usmeritev klonske selekcije v Sloveniji je odbira klonov gospodarsko pomembnih domačih sort žlahtne vinske trte in podlag, za katere ustreznega razmnoževalnega materiala ne moremo dobiti drugje in ki lahko vplivajo na izboljšanje tehnološke kakovosti pridelka, popestritev tržne ponudbe naših vin ali kakorkoli drugače pripomorejo k napredku našega vinogradništva (Koruza in sod., 2012).

Po letu 1970 se je v Sloveniji začela akcija zbiranja, ohranjanja in vrednotenja starih sort in klonov ter organizacija kolekcijskih nasadov, katere osnovni namen je zbiranje genskega materiala žlahtne vinske trte za nadaljnje žlahtnjenje. V kolekcijskih nasadih so ohranjene razširjene, standardne sorte različnih klonskih selekcij (primeri: 'Chardonnay', 'Beli Pinot', 'Ranina').

Poudarek pri klonski selekciji je na pozitivni množični selekciji. Matične trte, ki tu dosežejo največjo vsoto ocen, postanejo »elite«, ki gredo dalje v predklonsko selekcijo. Elitne trte, ki se tu izkažejo za najboljše so primerni klonski kandidati in se jih lahko razmnožuje v klonske linije. Klonske kandidate, ki so se po statistični obravnavi podatkov pokazali kot najboljši, se nato prijavi v uradno potrditev. Po uradni potrditvi se nov klon vpiše v register uradno potrjenih klonov, in dovoli se, skladno s pravilnikom, njegovo razmnoževanje v trsničarski pridelavi. Postopek klonske selekcije od odbire elitne trte do končnega postopka uradnega priznavanja skupno traja najmanj 18 let (Koruza in sod., 2012).

Med izvajanjem klonske selekcije nismo pozorni le na lastnosti, ki jih želimo ohraniti ali izraziti, ampak tudi na zdravstveno stanje trt. Okužbi se lahko izognemo z opravljanjem zdravstvene selekcije klonov, posledično pride do uporabe neokuženega sadilnega materiala in preprečitve širjenja okužbe (Krastanova in sod., 1995). Virusne okužbe povzročajo hiranje, slabšo rodnost in izrojevanje žlahtne vinske trte (Martelli, 2009). Prisotnost virusa v rastlinskem materialu ugotavljamo s seroliškim ELISA testom, z molekularnimi testi ali z indeksiranjem na določene sorte žlahtne vinske trte (Tomažič, 1999).

Klonska selekcija šteje med zelo pomembna orodja za izboljšavo genoma žlahtne vinske trte. Natančneje pa s klonsko selekcijo pridemo do najboljših rezultatov takrat, ko sta zdravstvena in genetska selekcija izvedeni hkrati, kar pomeni, da se razmnožuje klone, ki so bodisi naravno prosti škodljivih virusov ali pa so viruse eliminirali z različnimi tehnikami kot sta temperaturna obdelava ali preko meristemske kulture. V Evropski uniji je določeno, da se genetsko in zdravstveno selekcijo opravlja istočasno, drugod pa selekcija žlahtne vinske trte pomeni zgolj zdravstveno selekcijo (Mannini, 2000).

Veliko število udomačenih rastlin, vključno z bananovcem, krompirjem, žlahtno vinsko trto in kakavovcem, razmnožujejo vegetativno, da ohranijo z agronomskega vidika vredne genotipe. Vendar po več ciklih razmnoževanja kloni nakopičijo fenotipske razlike v obliki agronomskih lastnosti in pojavi se klonska raznolikost. Dejansko je nekaj klonskih selekcij pri žlahtni vinski trti, krompirju in bananah, ki pripeljalo do novih certificiranih klonov z zelo pomembnimi pridobitvami za prehrambeno industrijo (Carrier in sod., 2012).

Klonska selekcija temelji na genetski variabilnosti znotraj sort. Stopnja heterogenosti je odvisna od posamezne sorte. Možna razlaga te raznolikosti je poliklonsko poreklo sort in kopičenje genetskih mutacij v njihovih genotipih (Mannini, 2000).

Poliklonsko selekcionirani material vzdržuje gensko variabilnost med sortami in omogoča, da se sorta stabilno odziva v različnih okoljskih razmerah. Tudi raziskave v Sloveniji so pokazale, da bi lahko raznolikost med sortami razložili s poliklonskim izvorom. Raziskave so potekale na primeru sorte 'Refošk'. Opravili so okarakterizacijo akcesij povezanih z nazivom 'Refošk' z SSR markerji in glede na dobljene rezultate je lahko sorta 'Refošk' obravnavana kot poliklon. Sorte, predstavljene z različnimi, a genotipsko in fenotipsko podobnimi genotipi, so označene kot poliklon (Kozjak in sod., 2003).

Pri sortah 'Gamay', 'Modri Pinot', 'Nebbiolo' in 'Sangiovese' so morfološke raznolikosti dobro znane in včasih tako očitne, da je možno ločiti med seboj celo subvarietete ali biotipe. Po drugi strani pa k porasti fenotipskih raznolikosti znotraj populacije žlahtne vinske trte prispevajo virusna obolenja (Mannini, 2000).

2.4 OKARAKTERIZACIJA SORT ŽLAHTNE VINSKE TRTE

Ampelografija je veda o opisovanju, identifikaciji in klasifikaciji žlahtne vinske trte (Hrček, 1982). Identifikacija sort žlahtne vinske trte je namreč zelo pomembna za statistiko, odkrivanje novih sort in za zaščito genskih virov (OIV..., 2001).

Na območju današnje Slovenije prvi opisi sort žlahtne vinske trte segajo v leto 1499. Leta 1844 pa celo izide prvi ampelografski zapis v slovenščini, kot del Vinoreje, katere avtor je Matija Vertovec. V njej so opisane sorte 'Refošk', 'Danijela', 'Glera', 'Števerjana' in druge (Rusjan, 2009). Sicer pa so že Rimljani in Grki opravili prve opise žlahtne vinske trte, ki so v marsičem pomanjkljivi, a jih kljub temu štejejo med prva ampelografska proučevanja (Hrček, 1982). Do danes se je ampelografija zelo razvila. Pojavile so se nove metode in tehnike. Med te nove metode štejemo uporabo genskih markerjev, analizo antocianov in opravljanje morfologije cvetnega prahu (OIV ..., 2001).

Danes ločimo naslednje ampelografske metode (Rusjan, 2009):

- morfološke, kamor spadajo O.I.V. deskriptorji, filometrija in karpometrija
- kemijske, kamor uvrščamo kemotaksonomijo
- biokemijske, ki jih izvajamo z izoencimi ter
- molekularne, kjer uporabljamo genske markerje in DNK.

2.4.1 Morfološke metode

Pod pojmom ampelometrija združujemo dve metodi, in sicer filometrijo in karpometrijo. Filometrija opisuje in meri morfometrične lastnosti lista. Na listu lahko ovrednotimo 82 lastnosti, med katerimi je 21 specifičnih in so ključne za razpoznavanje sort med seboj. Pri karpometriji pa se meri morfometrične lastnosti jagod in grozdov (Rusjan, 2009).

2.4.2 Kemijske metode

S kemotaksonomijo se ugotavlja prisotnost sekundarnih rastlinskih metabolitov. Pri žlahtni vinski trti so to fenolne in aromatične snovi, alkaloidi in esencialna olja ter druge snovi, ki so značilne in specifične za posamezno sorto. Pri tem si pomagamo s spektrometričnimi in kromatografskimi metodami (Rusjan, 2009).

2.4.3 Molekularne metode

Molekularne metode niso podvržene vplivom okoljskih dejavnikov, razvojnemu stadiju fenofaze in zdravstvenemu stanju rastline ter načinu pridelave. Zato so zanesljivejši od prejšnjih metod, pri okarakterizaciji sort na nivoju genoma (Štajner, 2010).

V to skupino uvrščamo analize z izoencimi ter različne analize na nivoju DNK, kamor spadajo naslednje tehnike RFLP, RAPD, AFLP, SCAR in SSR markerji. Najbolj pa so se uveljavili vrstno specifični mikrosateliti (Štajner, 2010). Polimorfizem, ki ga zaznamo med sortami posamezne vrste je posledica razlik v dolžini mikrosatelitne regije in nastane zaradi napačnega prileganja ene od dveh vijačnic med replikacijo DNK.

Prvi od teh je bil razvit RFLP sistem ali polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov. Pri tej tehniki se z restrikcijskimi encimi razreže DNK ter se nato s hibridizacijo z radioaktivno označeno sondo zazna posebne fragmente (Striem in sod., 1990; Bourquin in sod., 1991, 1993, cit. po Javornik, 1996).

Pri RAPD-markerjih, naključno namnožimo polimorfno DNK in nato s pomočjo začetnega oligonukleotida, ki ima poljubno nukleotidno sekvenco, zaznamo posebne fragmente (Javornik, 1996). Ta sistem je cenejši in enostavnejši od prejšnjega, a ima slabo ponovljivost rezultatov. Kljub temu je bil pogosto uporabljen za iskanje razlik med sortami vinske trte (Teshammer in Zyprian, 1994; Moreno in sod., 1995; Stavrakakis in Biniari, 1998; This in sod., 1997, cit. po Javornik, 1996).

Sledil je razvoj SCAR tehnike, a se ni obdržala, ker jo je zasedla iznajdba SSR markerjev, ki jim pravijo tudi enostavne ponovljive sekvence ali mikrosateliti (Štajner, 2010). Tu uporabimo dva začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna sekvencam na začetku in koncu mikrosatelita. Osnova pri SSR-markerjih je PCR. Tip polimorfizma, ki ga zazna je insercija ali delecija enote ponovljive sekvence. Pojavnost v genomu je srednja, nivo polimorfizma visoka. Deduje se kodominantno. Za izvedbo moramo predhodno poznati zaporedje DNK-sekvenc (Javornik, 1996). Izkazali so se za najprimernejše pri iskanju razlik med sortami vinske trte (Štajner, 2010).

Rezultati ločevanja med kloni/sortami so odvisni od števila markerjev uporabljenih v raziskavi. Poleg števila markerjev pa je verjetnost, da najdemo različne alele večja, če uporabimo različne markerje kot na primer RAPD (Random Amplified Polymorphic DNK), Inter SSR, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Pri sorti 'Renski rizling' so za iskanje polimorfizma uporabili SSR markerje (Regner in sod. 2000, cit. po Regner in sod., 2006), prav tako pri sorti 'Traminec' (Imazio in sod., 2002; Regner in sod., 2002, cit. po Regner in sod., 2006) in nekaterih drugih sortah (Hocquigny in sod. 2004). Pri raziskavah sorte 'Žilavka' so za genetsko okarakterizacijo uporabili kombinacijo SSR in AFLP markerjev. S tem so pridobili bolj točen in izpopolnjen okvir za določanje genomske identitete znotraj sort. Različni markerji imajo različne strukture zaporedja primer-jev in so pomembni za pridobitev zanesljivih rezultatov v primeru raznolikosti, saj hkrati z njim raziskujemo različne dele genoma (Štajner in sod., 2012).

Ampelografske analize so uporabne za merjenje variabilnosti klonsko razmnoženega sadilnega materiala, čeprav zahtevajo veliko časa in je potrebno pozornost nameniti izbiri primernih spremenljivk. Mikrosateliti pa nudijo relativno hitro in enostavno analizo, pri kateri dobimo zanesljive rezultate in so zelo uporabni kot dopolnilna analiza v primerjavi z dobro uveljavljeno ampelometrijo (Kozjak in sod., 2001).

2.5 SSR MARKERJI ALI MIKROSATELITI

Izraz mikrosatelit je najpogosteje uporabljen za opis tandemske ponovljivih kratkih sekvenc, ki jih sestavlja največ 6 baz in je od začetka do konca brez prekinitev. Do sedaj so bili najdeni v vseh preiskanih organizmih. So zelo polimorfni, še posebej če so dolgi in neprekinjeni in so zato uporabni kot genetski markerji (Goldstein in Schlotterer, 1999). Visok polimorfizem, kodominantno dedovanje in dejstvo, da so neodvisni od okolja pa so funkcije, ki jih štejemo med lastnosti dobrih markerjev. Zaradi tega jih pogosto izberejo v študijah različnih rastlinskih vrst. Zanje je značilno tudi, da se ne nahajajo le na enem delu genoma, ampak so razpršeni po njem (Kozjak in sod., 2001).

Raznolikost med mikrosateliti pogosto nastane zaradi zdrsra DNK polimeraze, temu sledi še nepravilno parjenje med podvojevanjem (SSM- Slipped-Strand Mispairing) (Levison in Gutman, 1987, cit. po Štajner, 2010) ter neučinkovit DNK replikacijski popravljalni mehanizem (Strand in sod., 1993, cit. po Štajner, 2010).

Mutacija je vidna v dolžini in razporeditvi mikrosatelitov. Če pride do zdrsra DNK polimeraze med parjenjem vijačnic, se ta nepravilnost na mikrosatelitu kaže kot pridobitev ali izguba ene od ponovitev. Do tega pride zaradi nastanka zanke na matrični vijačnici ali na njeni kopiji. Če nastane zanka na prepisani verigi, potem se število ponovitev poveča, ravno nasprotno pa je v primeru, da nastane zanka na matrični verigi. Za koliko enot se bo ponovitev zmanjšala ali povečala pa je odvisno od števila zank, ki nastanejo (van Belkum in sod., 1998, cit. po Štajner, 2010).

Da mikrosatelit nastane, mora priti do dveh mutacij. Prva mutacija je njegov razvoj, kar pomeni, da nastajajo ponovitve, ki so dovolj dolge, da lahko povzročijo zdrs. Druga mutacija pa je nepravilno parjenje. Ta povzroči, da pride do dolžinskega polimorfizma (Taylor in sod., 1999, cit. po Štajner, 2010).

Na enak način kot nastopi rojstvo mikrosatelita, pride tudi njegov propad. Kar pomeni s kombinacijo dveh mutacij. Prva mutacija prepreči nepravilno parjenje, druga mutacija pa izbriše večji del ponovitev. Rezultat tega je neprepoznava homologna sekvenca DNK, ki pa vsebuje premalo ponovitve osnovnega motiva, da bi ga lahko imenovali mikrosatelit (Taylor in sod., 1999, cit. po Štajner, 2010).

Da se markerje lahko uporablja za identifikacijo vrste ali sorte, jih je potrebno izolirati. To se izvede z različnimi molekularnimi postopki. Pri tem potrebujemo začetne oligonukleotide, ki se prilegajo obrobni regiji mikrosatelita. Zaporedja začetnih oligonukleotidov izdelamo s pomočjo obrobnih regij že znanih mikrosatelitov, shranjenih v podatkovnih bazah DNK ali genomskih knjižnicah (Jakše in Javornik, 2001, cit. po Štajner, 2010) ali pa na osnovi mikrosatelitov izoliranih za specifično vrsto.

2.5.1 Analiza mikrosatelitov pri žlahtni vinski trti

Thomas in Scott (1993) sta prva raziskovala uporabo mikrosatelitov za identifikacijo sort žlahtne vinske trte in ugotovila, da se v DNK žlahtne vinske trte nahaja veliko mikrosatelitov ter da so koristni pri identifikaciji *Vitis vinifera* L. sort. Za okarakterizacijo evropske žlahtne vinske trte se uporablja set šestih do devetih mikrosatelitskih markerjev (This in sod., 2004).

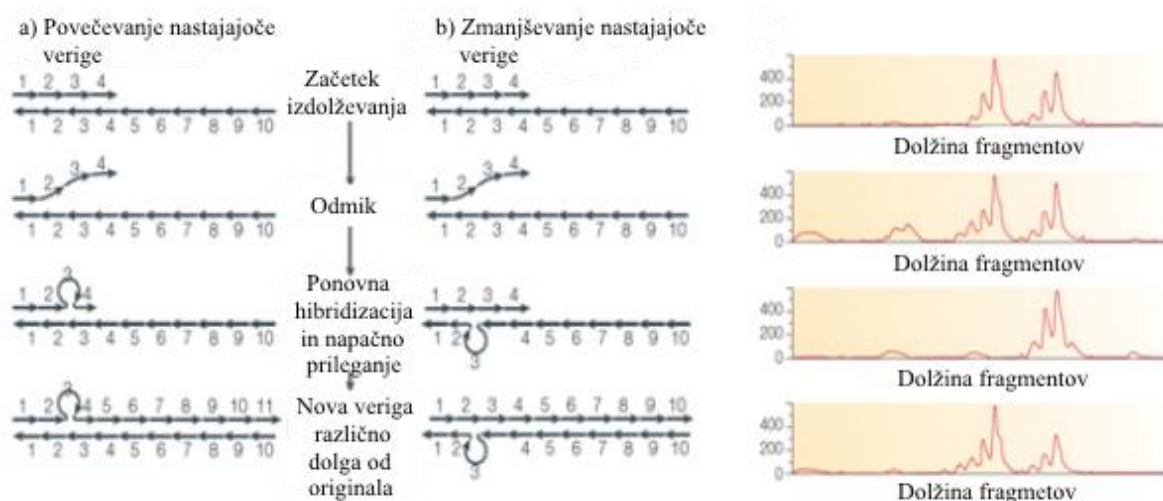
Izmed vseh DNK markerjev so mikrosateliti najpogosteje uporabljeni za identifikacijo sort, razkritje sinonimov in homonimov ter geografskega porekla, pri študijah genetskih povezav med večjimi skupinami sort in za okarakterizacijo klonske variabilnosti (Štajner in sod., 2012).

V Sloveniji se mikrosatelitske markerje v veliki meri uporablja za genotipizacijo starih slovenskih sort žlahtne vinske trte ter identifikacijo le-teh. Identifikacija lokalnih, nepoznanih sort je namreč pogosto težka samo z morfološkim opisom, ker je veliko sinonimov ali homonimov za določeno lokalno sorto. Uspešno so uporabili že 21 mikrosatelitskih markerjev za genotipizacijo 33-ih starih slovenskih sort žlahtne vinske trte iz genetske zbirke. Poleg sort, shranjenih v genetski zbirki je še veliko starih sort, ki so tipične za določeno območje. Nekatere od teh lokalnih sort so postale pomembne za pridelavo regionalnih vin, kot so 'Rebula' v Goriških Brdih, 'Zelen' in 'Pinela' v Vipavski dolini in 'Šipon' v Ormožu. Veliko pa je takih, ki so gojeni na majhnih območjih, v majhnem številu in se jih lahko izgubi zaradi zanemarjanja ali nadomeščanja z bolj popularnimi sortami kot so 'Merlot', 'Cabernet Sauvignon', 'Chardonnay' in 'Modri Pinot'. S pomočjo mikrosatelitskih markerjev so genotipizirali tudi niz 38-ih izbranih sort iz dveh vinorodnih okolišev. S tem so naredili prvi korak v smeri ohranjanja lokalnih slovenskih genetskih virov *Vitis* vrste. Uporabili so niz visoko informacijskih markerjev (VVS2, VVMD5, VVMD7, ssrVrZAG21, ssrVrZAG47, ssrVrZAG62, ssrVrZAG79), priporočenih s strani evropskega projekta GENRES 81. Ta raziskava je razrešila dvome v imenovanju sort. Našli so številne sorte z veliko sinonimi in homonimi. Na primer, razlike so se pokazale pri 'Glera' in 'Glera Briška', 'Rebula stara' in 'Rebula-100', medtem ko sta se sorti 'Ferjanščkova' in 'Merlot' izkazali za identični (Štajner in sod., 2011).

2.5.2 Mutacije ob nastanku mikrosatelitskega markerja

V primeru nastajanja novih mikrosatelitov pa poleg dolžinskega polimorfizma lahko pride tudi do nekaterih drugih mutacij, ki jih zaznamo v različnih oblikah, kot npr. himerizem, ničti aleli ali homoplazija. Druga posebnost značilna za nekatere mikrosatelite pa je pomnoževanje senčnih fragmentov, ki lahko zelo otežijo vrednotenje polimorfizma.

Ellegren (2004) je eden izmed znanstvenikov, ki so raziskovali senčne fragmente. Odkril je, da se zdrsi ene od verig DNK lahko pojavijo pri replikaciji mikrosatelitskih sekvenc tako v *in vitro* kot tudi v *in vivo* razmerah. V *in vitro* razmerah pride največkrat do zdrsa matrične verige, kar vodi k nastanku krajšega pomnožka, medtem ko je pri replikaciji *in vivo* matrična nit v primerjavi z nastajajočo bolj vpeta in rigidna, zato obstaja večja verjetnost, da pride do zdrsa nastajajoče niti (slika 1). Senčni fragmenti, ki nastanejo pri *in vitro* replikaciji, se od glavnega produkta razlikujejo za večkratnik dolžine osnovnega motiva mikrosatelita. Rezultat takega namnoževanja je prisotnost senčnih fragmentov (stutter bands). To so produkti, ki se od glavnega produkta razlikuje v velikosti.



Slika 1: Prikaz zdrsov med replikacijo (Ellegren, 2004)

Za himerizem pa pravimo, da gre za tip genetskega mozaika, ki je pogosto rezultat mutacij v eni celici apikalnega meristema in se širi z replikacijo in celično delitvijo. Večina osebkov zaradi te mutacije ne kaže fenotipskih posebnosti. Izjemi sta na primer sorti 'Pinot Meunier' in 'Sivi pinot'. Himerizem se lahko nahaja na različnih lokusih. Ob pregledu raziskav so odkrili, da se je tri-alelni profil najpogosteje pojavil na lokusu VVMD7. Poleg tega Jakše in sod. (2013) navajajo, da so pri zadnji študiji dobili sledeče rezultate: na lokusu VVMD7 so se nahajali trije aleli pri 12 različnih sortajih od 16-ih, ki so kazali himerizem.

Lahko pa pride do lažne smrti mikrosatelita, čemur pravimo ničti alel. Nastanek teh alelov je posledica sprememb nukleotidnih zaporedij v območju začetnega oligonukleotida, kar pomeni, da začetni oligonukleotidni ne zaznajo mesta prileganja. To lahko opazimo kot neuspelo namnoževanje lokusov med vrstami (Callan in sod., 1993, cit. po Štajner, 2010).

2.6 POMNOŽEVANJE MIKROSATELITSKIH LOKUSOV S PCR METODO

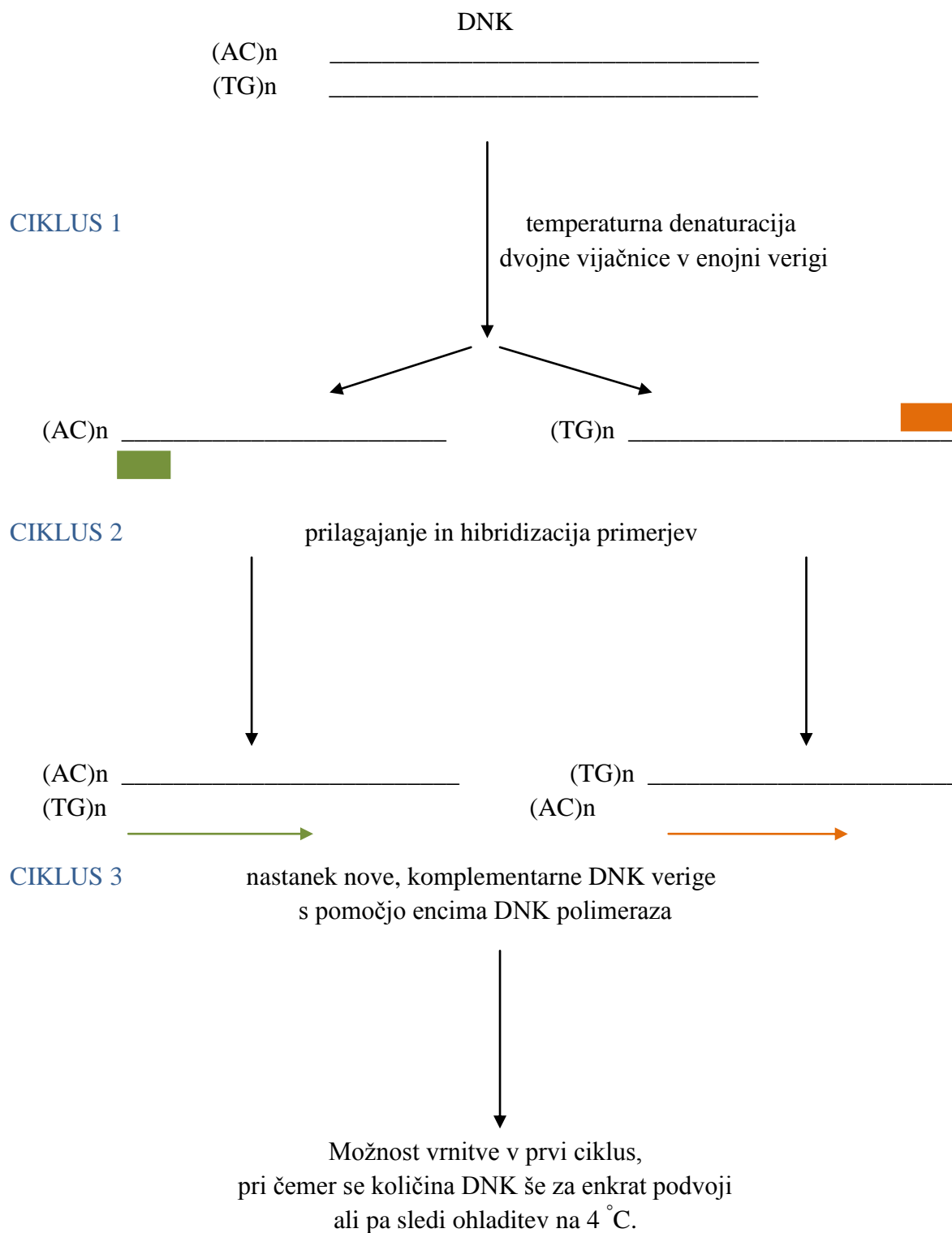
Genotipizacija mikrosatelitskih markerjev je danes uporabna metoda na mnogih področjih, od molekularne biologije do forenzičnih raziskav. Izvede se jo s pomočjo PCR metode. PCR metoda ali metoda polimerazne verižne reakcije (polymerase chain reaction) je bila razvita s strani Kary Mullis leta 1985. Ta tehnika je delovno veliko manj zahtevna in cenejša v primerjavi z zahtevnejšimi tehnikami molekularne biologije. S to metodo lahko željen segment DNK *in vitro* izoliramo in ga pomnožimo tudi do 10^8 – krat (Kump in Javornik, 1993). Tako dobimo, brez kloniranja večje število DNK molekul, katere dalje uporabimo za sekvenčno analizo, za neposredno določanje mutacij (Gašperič in Komel, 1996), pa tudi za odkrivanje polimorfizmov znotraj visoko ponavljajočih sekvenc, kot so mikrosateliti, a moramo predhodno vedeti nukleotidno zaporedje (Kump in Javornik, 1993).

Da reakcijo lahko izvedemo moramo poznati nukleotidno zaporedje predela DNK, ki obdaja segment, ki ga želimo pomnožiti. Glede na to zaporedje sestavimo začetni oligonukleotidni molekuli ali primer (Kump in Javornik, 1993), dolžine od 16 do 30 nukleinskih baz (Gašperič in Komel, 1996). Primer-ji pomagajo encimu DNK polimerazi začeti sintezo nove, komplementarne DNK verige (Kump in Javornik, 1993). Polimeraza DNK je termostabilna in prenese nad $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar je zelo pomembno, saj reakcija denaturacija dvojne vijačnice poteka pri temperaturah $92\text{-}94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gašperič in Komel, 1996).

Reakcija je sestavljena iz treh faz, ki se ponavljajo v ciklikih.

1. faza: denaturacija dvoverižne DNK pri temperaturah $92\text{-}94\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri čemer nastaneta dve enoverižni DNK molekuli.
2. faza: prilagajanje in hibridizacija primer-jev na komplementarna zaporedja na matrični enojni DNK verigi. Ta faza poteka pri temperaturah $35\text{-}56\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. faza: pričetek nastanka nove, komplementarne verige DNK, pri temperaturi $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ s pomočjo encima DNK polimeraza. Slednji se veže na kompleks DNK veriga – primer in vgrajuje nove deoksinukleotide ter tako gradi novo DNK verigo.

Po končanem prvem ciklu imamo podvojeno število DNK fragmentov. S ponavljanjem ciklov pa se to število eksponentno povečuje, saj lahko produkti prejšnje reakcije, to so komplementarne dvoverižne molekule DNK, vstopijo v drugi cikel (Kump in Javornik, 1993).



Slika 2: Prikaz poteka PCR reakcije

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Kot rastlinski material smo uporabili vršičke in liste mladik 38-ih klonov, 15-ih različnih sort. Mladi poganjki in listi so najprimernejši material za izolacijo DNK, saj se v meristemskem tkivu celice zelo hitro pomnožujejo in je prisotna velika količina DNK.

Preglednica1: Seznam klonov žlahtne vinske trte, vzorčenih 17. 5. 2011 v baznem vinogradu STS Vrhpolje

Vrsta v vinogradu	Sorta / Klon	Vrsta / Trta	Številka oznake na vzorcu
1	'Renski rizling' SI-24	5. trta	1
1	'Renski rizling' SI-23	5. trta	2
1	'Renski rizling' SI-22	5. trta	3
1	'Šipon' SI-18	5. trta	4
1	'Šipon' SI-17	5. trta	5
1	'Šipon' SI-16	5. trta	6
1	'Šipon' SI-15	5. trta	7
1	'Šipon' SI-14	5. trta	8
1	'Ranina' SI-6	5. trta	9
2	'Sauvignon' SI-3	5. trta	10
2	'Sauvignon' SI-2	5. trta	11
2	'Sauvignon' SI-1	5. trta	12
2	'Chardonnay' SI-21	5. trta	13
2	'Chardonnay' SI-40	5. trta	14
2	'Chardonnay' SI-39	5. trta	15
2	'Beli pinot' SI-19	6. trta	16
2	'Beli pinot' SI-20	5. trta	17
2	'Ranina' SI-7	5. trta	18
3	'Traminec' SI-8	5. trta	19
3	'Traminec' SI-9	5. trta	20
3	'Traminec' SI-10	5. trta	21
3	'Laški rizling' SI-11	5. trta	22
3	'Laški rizling' SI-12	5. trta	23
3	'Laški rizling' SI-13	5. trta	24

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Seznam vzorcev mladik vseh klonov, nabranih 17. 5. 2011 v baznem vinogradu STS Vrhpolje

Vrsta v Vinogradu	Sorta / Klon	Vrsta / Trta	Številka oznake na vzorcu
3	'Laški rizling' SI-41	4. trta	25
3	'Ranina' SI-4	5. trta	26
3	'Ranina' SI-5	5. trta	27
4	'Žametovka' SI-25	5. trta	28
6	'Barbera' SI-36	5. trta	29
9	'Refošk' SI-35	5. trta	30
13	'Rebula' SI-30	5. trta	31
16	'Rebula' SI-31	5. trta	32
19	'Rebula' SI-32	5. trta	33
22	'Rebula' SI-33	5. trta	34
25	'Rebula' SI-34	5. trta	35
28	'Zelen' SI-26	5. trta	36
30	'Pinela' SI-28	5. trta	37
32	'Malvazija' SI-37	5. trta	38

V analizi smo uporabili DNK naslednjih referenčnih sort: 'Barbera', 'Cabernet Sauvignon', 'Chardonnay', 'Merlot', 'Modri pinot', 'Sultanina' in 'Touriga National'. DNK smo izolirali v laboratoriju na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija DNK

Prvi korak, ki smo ga morali opraviti je bila izolacija DNK. Za vsak vzorec smo odvzeli nekaj mladih listov ter jih zmleli v terilnici, nato pa dodali 700-1000 μ l CTAB ekstrakcijske raztopine [1 M Tris-HCl, 0,5 EDTA, NaCl, dH₂O] ter dobro premešali. Dobljeno suspenzijo smo prelili v 1,5 ml mikrocentrifugirko in inkubirali 90 minut pri 68 °C v vodni kopeli. Temu je sledilo dodajanje 700 μ l mešanice kloroforma in izoamilalkohola, v razmerju 24 : 1. Dobro smo premešali ter centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 10.000 obratih/min. Uporabili smo napravo Eppendorf centrifuges 5804/R.

Nato smo ločili vodno fazo in ostanke organske faze. Vodno fazo smo previdno odpipetirali v novo 1,5 ml centrifugirko, dodali 70 μ l 3 M natrijevega acetata (pH 5,2) ter 700 μ l ledeno hladnega izopropanola in premešali. Dobljeno suspenzijo smo za 30 minut izpostavili temperaturi 20 °C. Nato je sledilo 10 minutno centrifugiranje pri 4 °C in 10.000

obratih/min. Pri tem je nastala oborina, ki smo jo spirali s 500 μ l 70 % etanola. Za tem smo ponovno centrifugirali, in sicer 10 minut pri 4 °C in 10.000 obratih/min, odstranili etanol in dobljeno oborino posušili pri sobni temperaturi. Dodali smo še 60 μ l pufra TE [1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, dH₂O], da bi se DNK raztopila in shranili pri temperaturi 4 °C. Pustili smo stati en dan in nato vzorce shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.2 Merjenje koncentracije DNK s fluorometrom

Naslednji korak je bil ugotavljanje količine DNK v vzorcih. Pri tem smo si pomagali z napravo DNK fluorometer DyNAQuantTM200 (GE Healthcare). Za merjenje smo pripravili delovno raztopino iz 10x TNE koncentrirane raztopine [100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, (pH 7)] z 10x redčenjem v destilirani vodi. Raztopino smo prefiltrirali skozi 0,2 μ m filter in ji dodali barvo Hoechts 33258 v koncentraciji 0,1 μ g/ml. Pripravljeno raztopino smo morali zaščititi pred svetlobo, saj je občutljiva nanjo. Navkljub prisotnosti RNK molekul, nukleotidov in proteinov, se barvilo veže na DNK vijačnico, kar omogoči lažje določanje njene koncentracije. Za kalibracijo aparata smo uporabili DNK telečjega timusa. Pred merjenjem smo kiveto napolnili z 2 ml predhodno narejeno raztopino [10x TNE pufer, dH₂O, Hoechts 33258] in 2 μ l DNK vzorca. Dobro smo premešali in kiveto postavili v fluorometer ter izmerili koncentracijo. Preden smo izmerili koncentracijo za nov vzorec smo kiveto očistili z destilirano vodo in ponovili postopek.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

Na osnovi literaturnih podatkov smo izbrali in naročili začetne oligonukleotide, s katerimi lahko pridobimo največ informacij oz. največjo stopnjo polimorfizma.

PCR metodo izvajamo s točno definiranimi začetnimi oligonukleotidi. Analizo PCR produktov lahko izvedemo z elektroforezo ali laserskim detekcijskim sistemom. Mi smo analizo opravili z laserjem, pri čemer pa moramo enega od primer-jev označiti z eno izmed fluorescentnih barvil, ki jim s kratico pravimo FAM, VIC, NED in PET ali uporabiti tretji univerzalni začetni oligonukleotid. Posamično označevanje je predrago, zato se poslužujemo drugačnega pristopa, in sicer, da enemu izmed lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov dodamo na 5' konec 18 baznih parov dolgo M13(-21) zaporedje (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), ki ga imenujemo »tail« ali rep. Torej poleg dveh osnovnih primer-jev, dodamo v PCR reakcijo tudi univerzalni začetni oligonukleotid, ki je na 5' koncu označen s fluorescentnim barvilom. V začetku PCR reakcije se lokusno specifični začetni oligonukleotid z M13(-21) repom veže na matrično DNK in pomnožuje lokuse. Ko se koncentracija začetnega oligonukleotida zmanjša, ga zamenja univerzalni začetni oligonukleotid, ki v produkte vgrajuje fluorescentna M13(-21) zaporedja. Prednosti univerzalnega začetnega oligonukleotida M13(-21) so, da je cenovno ugodnejši, saj je en fluorescentno obarvani primer z M13(-21) sekvenco lahko uporaben za vse fragmente,

poleg tega omogoča krajše cikle in dobre rezultate celo v minuti namnožene DNK, analizira lahko celo staro, degenerirano DNK (Schuelke, 2000).

Preglednica 2: Izbor začetnih oligonukleotidov za PCR, z natančno določenim baznim zaporedjem (R-končni primer, F-začetni primer)

Mikrosatelitni lokusi		Bazno zaporedje začetnih oligonukleotidov	Referenca
VVS2	R	AAA TTC AAA ATT CTA ATT CAA CTG G	Thomas in Scott, 1993
	F	tail* + CAG CCC GTA AAT GTA TCC ATC	
VVMD5	R	TAT ACC AAA AAT CAT ATT CCT AAA	Bowers in sod., 1996
	F	tail + CTA GAG CTA CGC CAA TCC AA	
VVMD7	F	AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT	Bowers in sod., 1996
	R	tail + CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT	
VVMD25	F	TTC CGT TAA AGC AAA AGA AAA AGG	Bowers in sod., 1999
	R	tail + TTG GAT TTG AAA TTT ATT GAG GGG	
VVMD27	F	GTA CCA GAT CTG AAT ACA TCC GTA AGT	Bowers in sod., 1999
	R	tail + ACG GGT ATA GAG CAA ACG GTG T	
VVMD28	F	AAC AAT TCA ATG AAA AGA GAG AGA GAG A	Bowers in sod., 1999
	R	tail + TCA TCA ATT TCG TAT CTC TAT TTG CTG	
VVMD32	F	TAT GAT TTT TTA GGG GGG TGA GG	Bowers in sod., 1999
	R	tail + GGA AAG ATG GGA TGA CTC GC	
VrZAG62	F	GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C	Sefc in sod., 1999
	R	tail + CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C	
VrZAG79	F	AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G	Sefc in sod., 1999
	R	tail + TGA CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C	

*oznaka za sekvenco 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

DNK fragmente smo namnožili s pomočjo PCR. Vzorce DNK vsakega klona smo v količini 5 µl (20 ng) odpipetirali v PCR tubice ter jih dali v centrifugo, da se je DNK ločila od stene tubice. Sledila je priprava PCR mešanice v 1,5 ml centrifugirki. Uporabili smo sterilno dH₂O, 5x PCR pufer (Promega), 25 mM MgCl₂ (Promega), 10 mM deoksinukleotidov (dATP, dCTP, dGTP ter dTTP), 10 µM raztopine lokusno specifičnega para začetnih oligonukleotidov (1 in 2) in 10 µM oligonukleotida TAIL (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), ki je imel na 5' koncu fluorescentno oznako 6FAM, VIC, NED in PET, podjetja Applied Biosystems in encim GoTaq[®] DNK polimerazo (Promega) v koncentraciji 5 U/µl. Končni volumen PCR mešanice je znašal 15 µl. Vse potrebne sestavine smo ves čas hranili na ledu.

Preglednica 3: Reagenti in njihov volumen na vzorec

Reagenti	Volumen/vzorec	Vsebnost v reakciji
dH ₂ O	3,550 µl	
5x PCR pufer	3 µl	1x
MgCl ₂	1,2 µl	2 mM
dNTP	1,2 µl	0,8 mM
začetni oligonukleotid1	0,3 µl	0,2 uM
začetni oligonukleotid 2	0,3 µl	0,2 uM
primer TAIL	0,375 µl	0,25 uM
encim TAQ	0,075 µl	0,375 U
Skupaj	10 µl	

Dobljeni volumen na vzorec smo pomnožili s številom vseh vzorcev. Pomnoževanje smo izvedli s PCR napravo 2720 Thermal Cycler podjetja Applied Biosystems®.

3.2.4 Pomnoževanje mikrosatelitskih lokusov v PCR

V PCR tubice smo odpipetirali 5 µl vzorca DNK ter dodali še 10 µl PCR reakcijske mešanice na vzorček. Sledilo je centrifugiranje vzorčkov, nato pa smo jih vstavili v PCR napravo. Lokuse smo namnožili pri temperaturi prileganja, ki naj bi bila optimalna glede na izračun sestave začetnih oligonukleotidov ter podatkov iz literature. Za to se uporablja različne temperaturne protokole pomnoževanja. Pri prvih petih ciklih v fazi prileganja začetnih oligonukleotidov spuščamo temperaturo za 1 °C v vsakem ciklu. S tem dosežemo večjo specifičnost pomnoževanja.

Pomnoževanje se odvija po naslednjem postopku:

prvih 5 minut se odvija pri 94 °C, sledi 5 ciklov, ki se odvijajo v naslednjem zaporedju: najprej je denaturacija, ki poteka 30 sekund pri 94 °C, sledi prileganje začetnih oligonukleotidov, ki se začne s temperaturo 60 °C ter traja 45 sekund. Pri vsakem ciklu se temperatura zniža za 1 °C. Končna temperatura je 55 °C. Temu sledi še faza izdolževanja, pri temperaturi 72 °C in traja 1,30 minut.

Prvim petim ciklom sledi še 30 ciklusov. Vsak se začne z denaturacijo pri 94 °C in traja 30 sekund. Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je 55 °C in se odvija 45 sekund, sledi še izdolževanje pri 72 °C in traja 1,30 minute. Posamezen ciklus pa se zaključi z 8 minutnim podaljševalnim korakom pri 72 °C.

3.2.5 Priprava vzorcev za kapilarno elektroforezo

Najprej smo vzorce združili v skupine po štiri. To nam omogoča univerzalen primer M13(-21), ki je še dodatno označen z enim izmed fluorescentnih barvil FAM, VIC, NED ali PET, ki ločijo posamezne primer-je med seboj.

Preglednica 4: Razdelitev in označba primer-jev

Specifični primerji		Fluorescentna barvila
1. skupina	VVS2	VIC
	VVMD5	NED
	VVMD7	FAM
	VVMD25	PET
2. skupina	VVMD27	VIC
	VVMD28	NED
	VVMD32	FAM
	ZAG62	PET
ZAG79		FAM

Od vsake PCR reakcije smo odpipetirali 4 μ l posameznega vzorca, ki je že vseboval specifičen mikrosatelitski primer, M13(-21)tail in fluorescentno barvilo. Kot kaže razpredelnica smo jih združili v eno tubico po štiri, jih dobro premešali in kratko centrifugirali. Po centrifugiranju smo iz vsake tubice odpipetirali 1 μ l združenih vzorcev ter jih prenesli v 96-mestno ploščo MicroAmp[®] podjetja Applied Biosystems. Vzorčkom smo pred analizo dodali še 0,5 μ l molekularnega standarda LIZ 600 (Applied Biosystems) in 10,6 μ l formamida. Formamid je močan denaturant in poruši strukturo dvojne vijačnice. GeneScan[™] 600 LIZ se uporablja pri meritvah fragmentov za analizo podatkov. En standard vsebuje 36 LIZ[®] barvno označenih, enovijačnih DNK fragmentov. Odkar je standard označen tudi s peto barvo, lahko uporabniki genotipizirajo večje število markerjev. GeneScan[™] 600 LIZ lahko izmeri fragmente dolge od 20 do 600 baznih parov. Dolžinski standard LIZ 600 pa smo uporabili za natančno določanje dolžine posameznih fragmentov. Plošče smo nato prelepili s samolepilno folijo (Brand), premešali ter centrifugirali.

3.2.6 Analiza produktov PCR

Analiza je potekala na Oddelku za zootehniko na Rodici (Groblje 3). In sicer na avtomatski kapilarni sekvenčni napravi 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). S kapilarno elektroforezo lahko dosežemo zelo veliko ločljivost fragmentov in ločimo celo molekuli, ki se razlikujeta za 1 bazni par, medtem ko lahko s klasično elektroforezo samo preverimo, če je produkt nastal ali ne. Razlike v dolžini mikrosatelitov so tako majhne, da jih pri uporabi agarozne elektroforeze ne ločimo med seboj.

3130 XL Genetic Analyzer deluje na osnovi kapilarne elektroforeze. Omogoča različne vrste sekvenciranja in analiziranja fragmentov. Fragmente zazna na podlagi fluorescence, s pomočjo laserja. Vsebuje 16 kapilar in omogoča analizo 16-ih vzorcev hkrati.



Slika 3: Kapilarna elektroforeza 3130 XL Genetic Analyzer (System Profile, 2005)

3.2.7 Merjenje dolžine fragmentov

Fragmente, ki jih zaznamo s kapilarno elektroforezo analiziramo s programsko aplikacijo GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems). Pri vrednotenju polimorfizma najprej določimo dolžinski standard in na osnovi tega pridobimo informacije o dolžinah vseh namnoženih fragmentov.

Pri vrednotenju podatkov in določanju smo si pomagali z javno dostopnimi podatkovnimi bazami mikrosatelitnih polimorfizmov žlahtne vinske trte, v katerih so zajete dolžine pomembnejših lokusov (podatkovne baze italijanskih in švicarskih laboratorijev) ter podatki pridobljeni v laboratoriju Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin. Podatke za primerjavo v različnih bazah smo standardizirali na osnovi referenčnih genotipov klonov, ki smo jih imeli v analizi. Standardizacija podatkov na osnovi referenčnih genotipov pomeni, da smo primerjali dolžine dobljenih alelov za referenčne genotipe z dolžinami podanimi v posamezni bazi in na osnovi dobljenih razlik, prilagodili dolžinam ostalih genotipov.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA DNK

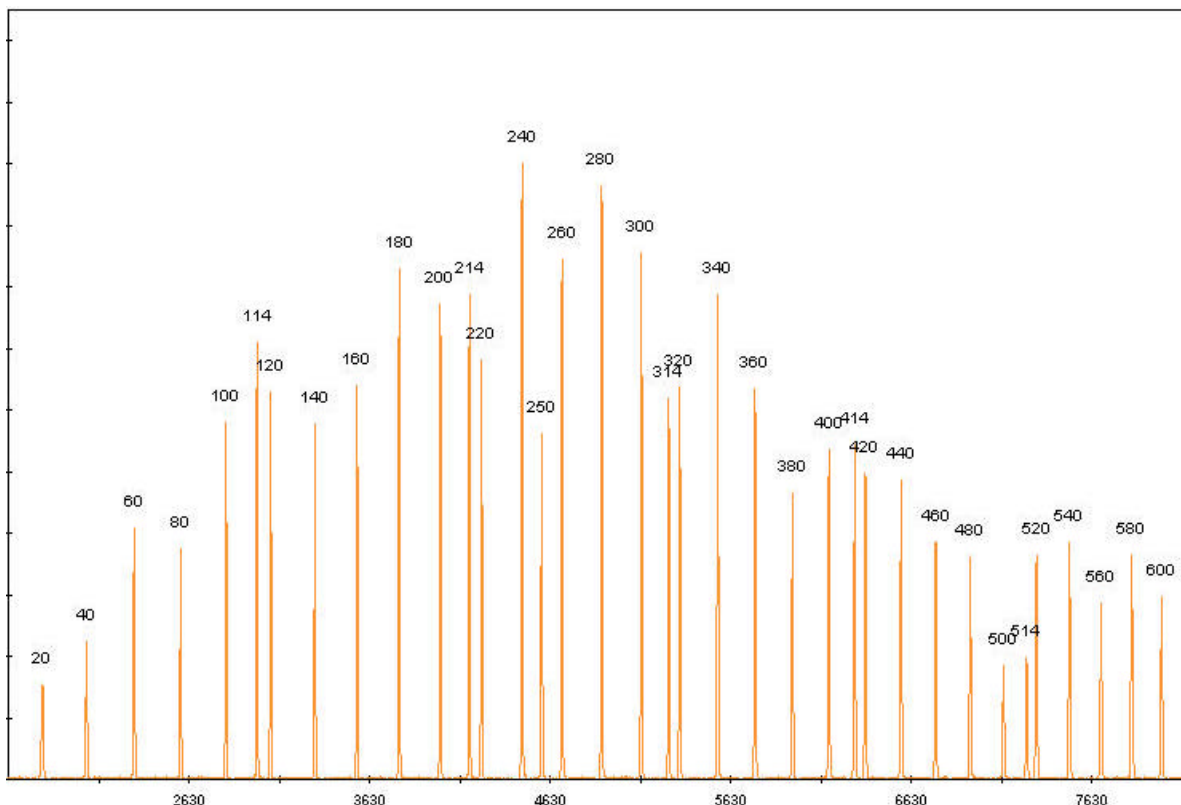
S CTAB metodo smo uspešno izolirali DNK 38-im klonom, 15-ih sort ter določili koncentracijo s pomočjo fluorometrije. Koncentracije DNK so bile od 38 ng/μl do 1046 ng/μl. Natančneje so koncentracije za posamezen klon navedene v preglednici 5.

Preglednica 5: Koncentracija vzorcev DNK

Kloni sort	Vsebnost DNK (ng/μl)
'Renski rizling' SI-22	700
'Renski rizling' SI-23	779
'Renski rizling' SI-24	802
'Šipon' SI-14	38
'Šipon' SI-15	342
'Šipon'N SI-16	482
'Šipon' SI-17	799
'Šipon' SI-18	709
'Ranina' SI-4	377
'Ranina' SI-5	968
'Ranina' SI-6	89
'Ranina' SI-7	319
'Sauvignon' SI-1	783
'Sauvignon' SI-2	615
'Sauvignon' SI-3	215
'Chardonnay' SI-21	514
'Chardonnay' SI-39	166
'Chardonnay' SI-40	266
'Beli pinot' SI-19	318
'Beli pinot' SI-20	986
'Traminec' SI-8	811
'Traminec' SI-9	385
'Traminec' SI-10	963
'Laški rizling' SI-11	593
'Laški rizling' SI-12	1012
'Laški rizling' SI-13	248
'Laški rizling' SI-41	1046
'Žametovka' SI-25	184
'Barbera' SI-36	818
'Refošk' SI-35	455
'Rebula' SI-30	730
'Rebula' SI-31	451
'Rebula' SI-32	638
'Rebula' SI-33	544
'Rebula' SI-34	236
'Zelen' SI-26	234
'Pinela' SI-28	241
'Malvazija' SI-37	277

4.2 DOLOČANJE DOLŽINE MIKROSATELITSKIH ALELOV

Dolžine alelov smo izmerili z računalniškim programom GeneMapper in na osnovi dolžinskega standarda.



Slika 4: GeneScan™ 600 LIZ (GeneScan ..., 2008)

Dolžinski standard LIZ600 (slika 4) se uporablja, kot je že navedeno v poglavju pregled objav, za pomoč pri merjenju dolžin fragmentov. Označen je s peto barvo in se tako jasno loči od primarnih fragmentov.

Os x prikazuje število baznih parov oziroma dolžino mikrosatelita, os y pa kako intenzivno je bil fragment namnožen. Oznaka S (size), pomeni velikost posameznega alela (slika 5, slika 6, slika 7).

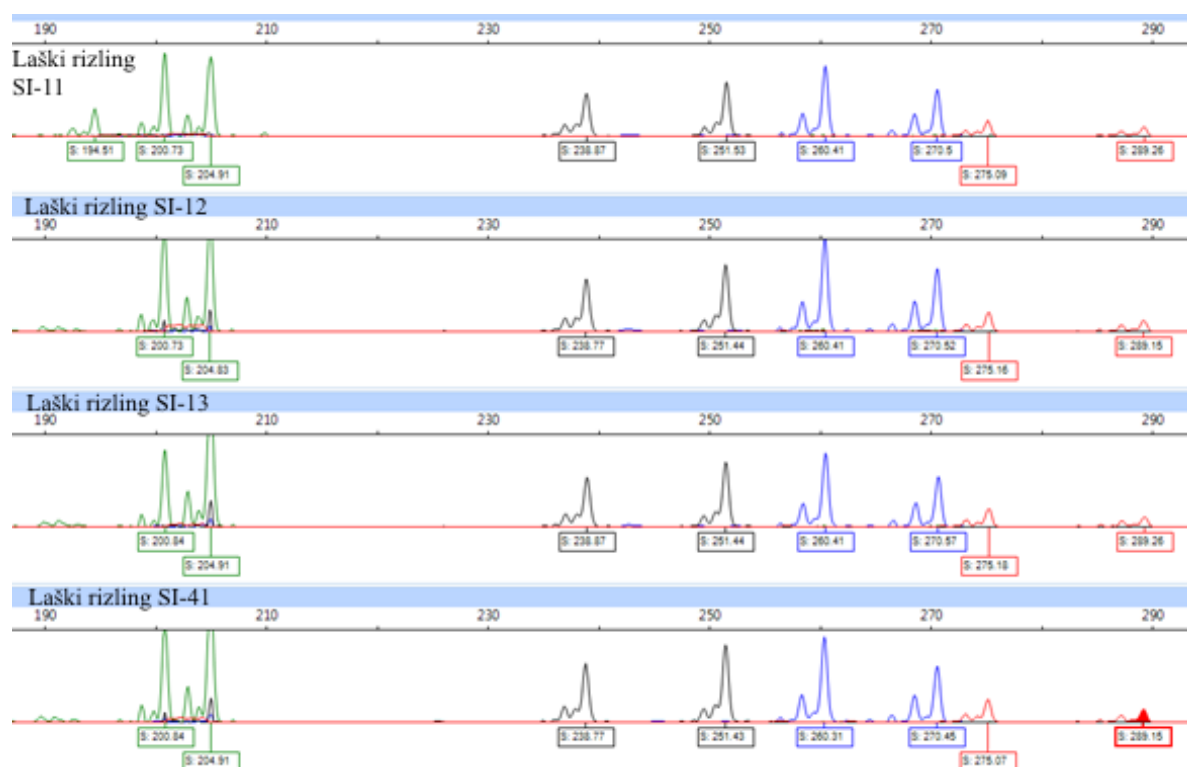
Posamezni lokusi pa so označeni z različnimi fluorescentnimi barvili, in sicer z VIC - zelena, NED - rumena, FAM - modra in PET - rdeča.

4.3 PRIMER VREDNOTENJA DOLŽINE ALELOV

Za primer vrednotenja smo vzeli sorto 'Laški rizling'. Na sliki 5 so lokusi označeni sledeče: VVMD5 s črno, VVMD7 z modro, VVMD25 z rdečo ter VVMD27 z zeleno bravo. V preglednici 6 pa imamo vnesene dolžine posameznih lokusov, ti podatki pa so vneseni na sliko 5, ki smo jih odčitali z elektroferogramom.

Preglednica 6: Dolžine alelov na posameznih lokusih za sorto 'Laški rizling'

Klon / Lokus	VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		
'Laški rizling' SI-11	239	251	260	271	275	289	201	205	195
'Laški rizling' SI-12	239	251	260	271	275	289	201	205	
'Laški rizling' SI-13	239	251	260	271	275	289	201	205	
'Laški rizling' SI-41	239	251	260	271	275	289	201	205	



Slika 5: Lokusi VVMD5, VVMD7, VVMD25 in VVMD27 pomnoženi pri štirih klonih sorte 'Laški rizling'

4.4 GENOTIPIZACIJA KLONOV

Kloni sort 'Šipon', 'Ranina', 'Sauvignon', 'Beli pinot', 'Tramincec', 'Žametovka', 'Barbera', 'Refošk', 'Rebula', 'Zelen', 'Pinela', in 'Malvazija' so bili med seboj enaki, saj pri genotipizaciji na 9-ih lokusih nismo dobili razlik v dolžinah alelov. Izjema so sorte 'Laški rizling', 'Renski rizling' ter 'Chardonnay'. Pri klonu 'Laški rizling' SI-11 smo poleg dveh alelov dolžin 201 in 205 baznih parov odkrili še tretji alel dolžine 195 baznih parov, ki se pri preostalih treh analiziranih klonih ni pomnožil (slika 5). Klon 'Renski rizling' SI-23 se razlikuje od klonov 'Renski rizling' SI-24 in 'Renski rizling' SI-22 na lokusu VVMD7, in sicer v številu alelov. 'Renski rizling' SI-23 ima namreč poleg dveh, tudi tretji alel dolžine 258 baznih parov (slika 6). V primeru sorte 'Chardonnay' pa gre za pojav senčnih fragmentov, ki so tako močno izraziti, da nas lahko zavedejo pri določanju točne dolžine alelov za klon 'Chardonnay' SI-21 (slika 7).

Kastelec M. Analiza trsov klonске selekcije žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.) z molekulskimi markerji.
Dipl. delo (VS). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2015

Preglednica 7: Dobljeni aleli 38 klonov sort žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.) na devetih lokusih

Lokus sorta/klon	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD 25		VVMD 27		VVMD 28		VVMD32		ZAG62		ZAG79		
'Renski rizling' SI-24	140	148	239	247	262	271	269	275	197	205	225	231	266	286	212	222	256	258	
'Renski rizling' SI-23	140	148	239	247	262	258	271	269	275	197	205	225	231	266	286	212	222	256	258
'Renski rizling' SI-22	140	148	239	247	262	271	269	275	197	205	225	231	266	286	212	222	256	258	
'Šipon' SI-18	130	150	239	253	252	262	259	261	195	210	225	245	278	286	206	222	250	262	
'Šipon' SI-17	130	150	239	253	252	262	259	261	195	210	226	245	278	286	206	222	250	262	
'Šipon' SI-16	130	150	239	253	252	262	259	261	195	210	225	245	278	286	206	222	250	262	
'Šipon' SI-15	130	150	239	253	252	262	259	261	195	210	225	245	278	286	206	222	250	262	
'Šipon' SI-14	130	150	239	253	252	262	n.p.*	n.p.	195	n. p.	225	245	n. p.	n. p.	206	222	250	262	
'Ranina' SI-4	130	148	241	241	246	256	269	269	201	210	215	265	286	286	212	214	252	264	
'Ranina' SI-5	130	148	241	241	246	256	269	269	201	210	215	265	286	286	212	214	252	264	
'Ranina' SI-6	n. p.	n. p.	n. p.	n. p.	246	256	269	269	201	210	215	265	286	286	212	214	252	264	
'Ranina' SI-7	130	148	241	241	246	256	269	269	201	210	215	265	286	286	212	214	252	264	
'Sauvignon' SI-3	130	148	241	245	252	271	261	269	191	205	231	233	254	270	206	212	258	260	

se nadaljuje

Kastelec M. Analiza trsov klonске selekcije žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.) z molekulskimi markerji.
Dipl. delo (VS). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2015

Nadaljevanje preglednice 7: Dobljeni aleli 38 klonov sort žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.) na devetih lokusih

Ime/lokus	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		ZAG62		ZAG79		
'Sauvignon' SI-2	130	148	241	245	252	271	261	269	191	205	231	233	254	270	206	212	258	260	
'Sauvignon' SI-1	130	148	241	245	252	271	261	269	191	205	231	233	254	270	206	212	258	260	
'Chardonnay' SI-21	134	140	247	251	252	256	259	275	197	205	215	225	254	286	206	214	256	258	
'Chardonnay' SI-40	134	140	247	251	252	256	259	275	197	205	215	225	254	286	206	214	256	258	
'Chardonnay' SI-39	134	140	247	251	252	256	259	275	197	205	215	225	254	286	206	214	256	258	
'Beli pinot' SI-19	134	148	241	251	252	256	259	269	201	205	215	233	254	286	206	212	252	258	
'Beli pinot' SI-20	134	148	241	251	252	256	259	269	201	205	215	233	254	286	206	212	252	258	
'Traminec' SI-8	148	148	245	251	256	271	269	269	205	205	230	230	254	286	206	212	258	264	
'Traminec' SI-9	148	148	245	251	256	271	269	269	205	205	230	230	254	286	206	212	258	264	
'Traminec' SI-10	148	148	245	251	256	271	269	269	205	205	230	230	254	286	206	212	258	264	
'Laški rizling' SI-11	132	148	239	251	260	271	275	289	201	205	195	243	255	254	286	212	214	264	264
'Laški rizling' SI-12	132	148	239	251	260	271	275	289	201	205		243	255	254	286	212	214	264	264

se nadaljuje

Kastelec M. Analiza trsov klonske selekcije žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.) z molekulskimi markerji.
Dipl. delo (VS). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2015

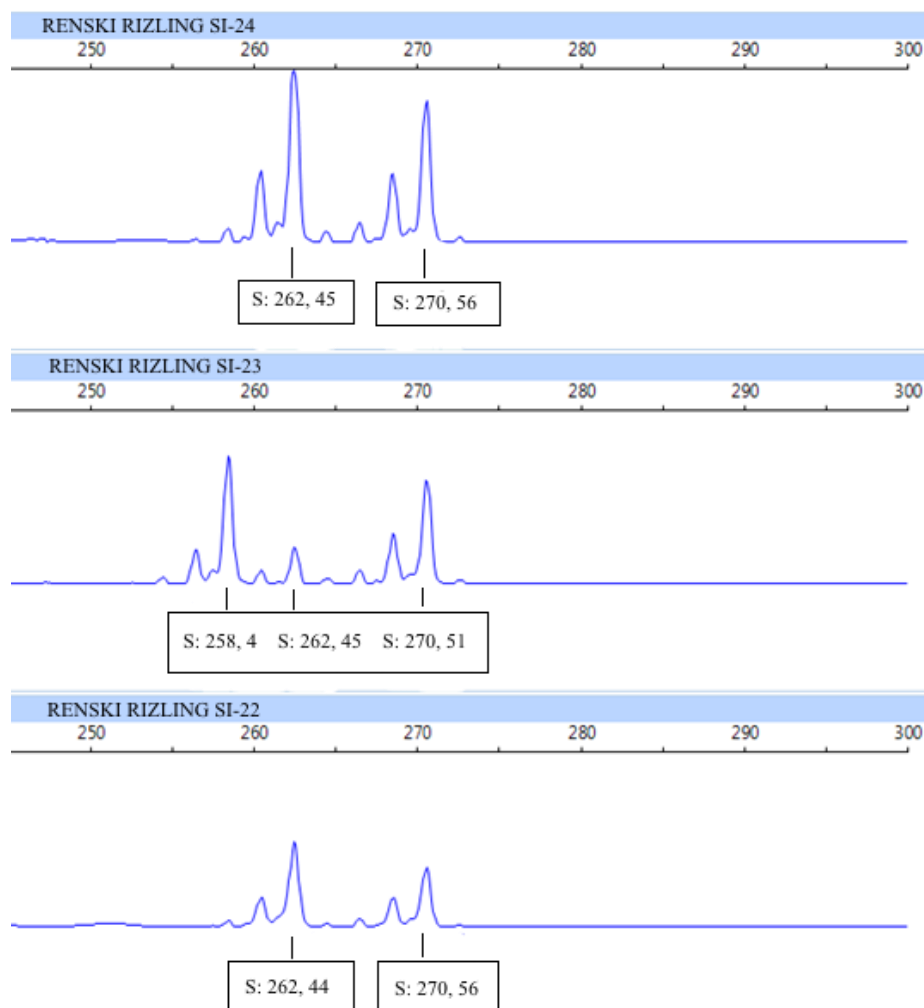
Nadaljevanje preglednice 7: Dobljeni aleli 38 klonov sort žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.) na devetih lokusih

Ime/lokus	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		ZAG62		ZAG79	
'Laški rizling' SI-13	132	148	239	251	260	271	275	289	201	205	243	255	254	286	212	214	264	264
'Laški rizling' SI-41	132	148	239	251	260	271	275	289	201	205	n. p.	n. p.	254	286	212	214	264	264
'Žametovka' SI-25	130	150	249	251	262	269	261	261	197	205	265	274	272	286	218	222	258	272
'Barbera' SI-36	132	132	239	239	262	267	259	275	201	205	231	257	266	286	210	218	256	272
'Refošk' SI-35	132	152	239	241	260	262	261	275	205	205	215	231	264	286	210	212	252	264
'Rebula' SI-30	140	148	245	247	252	262	275	283	195	201	225	231	n. p.	n. p.	214	218	250	264
'Rebula' SI-31	140	148	245	247	252	262	275	283	195	201	225	231	264	266	214	218	250	264
'Rebula' SI-32	140	148	245	247	252	262	275	283	195	201	225	231	264	266	214	218	250	264
'Rebula' SI-33	140	148	245	247	252	262	275	283	195	201	225	231	264	266	214	218	250	264
'Rebula' SI-34	140	148	245	247	252	262	275	283	195	201	225	231	264	266	214	218	250	264
'Zelen' SI-26	150	150	239	239	260	260	261	275	205	210	231	231	278	286	212	222	258	270
'Pinela' SI-28	130	130	245	247	260	263	259	269	195	197	225	255	270	286	222	222	256	264
'Malvazija' SI-37	140	140	235	253	252	252	275	275	195	195	n. p.	n. p.	270	286	206	206	250	268

*n.p. – ni pomnoženo

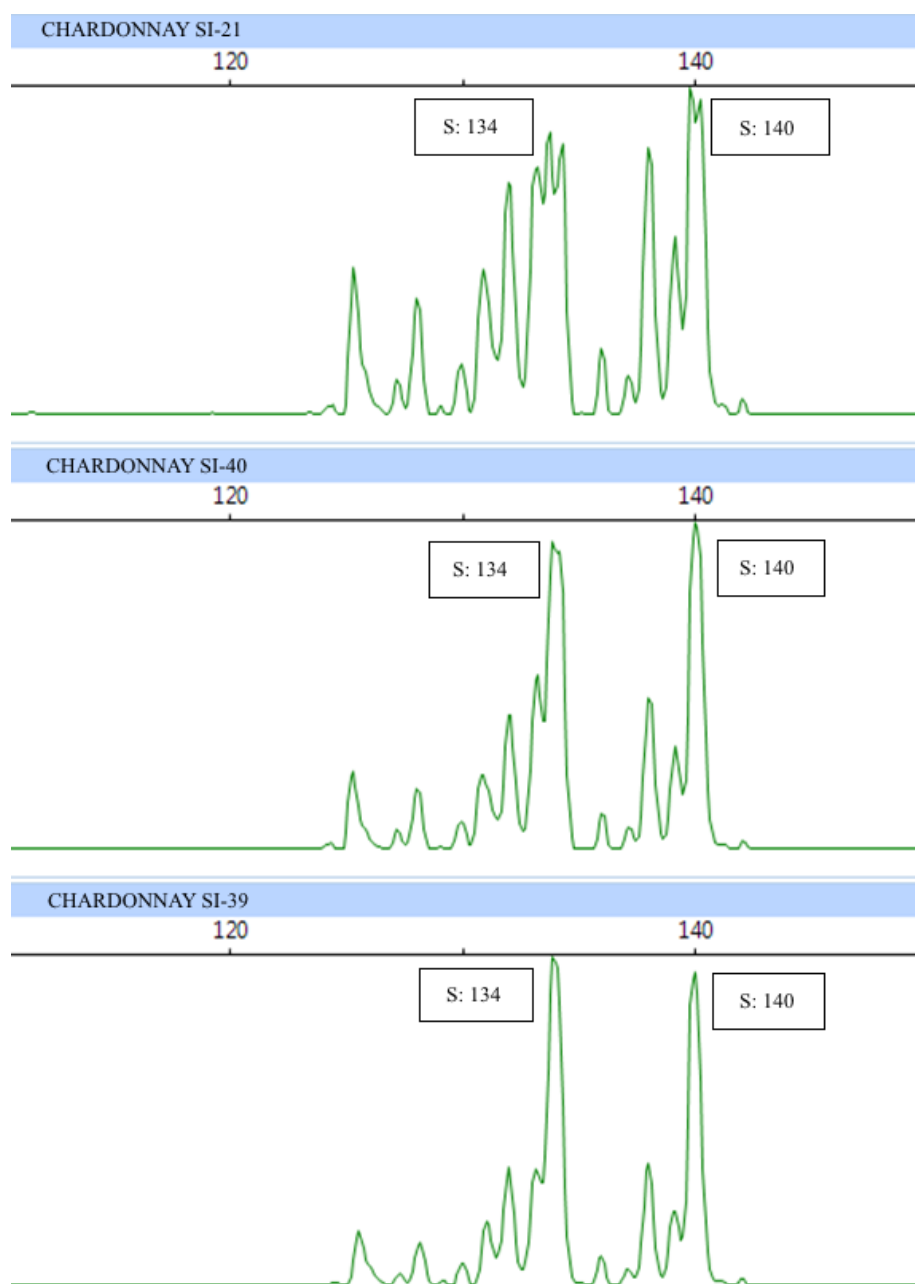
4.5 ANALIZA KLONSKE VARIABILNOSTI

'Renski rizling' SI-22 in 'Renski rizling' SI-24 sta si enaka in ne kažeta nikakršnih razlik na kateremkoli lokusu. 'Renski rizling' SI-23 pa ima na lokusu VVMD7 tri očitne vrhove; prvi kaže 258 baznih parov, drugi pa 263 baznih parov in tretji 271 baznih parov. Druga dva klona imata na tem lokusu pomnožena le dva alela, ki imata 263 in 271 baznih parov. Zaradi pojava tretjega alela se predpostavlja, da gre za himerizem.



Slika 6: Lokus VVMD7 pomnožen pri treh klonih sorte 'Renski rizling'

Pri sorti 'Laški rizling' je prišlo, tako kot v primeru sorte 'Renski rizling', do pojava himerizma. Na lokusu VVMD27 klona 'Laški rizling' SI-11 se je namreč poleg alelov dolžin 201 in 205 baznih parov pojavil še tretji alel dolžine 195 baznih parov.



Slika 7: Lokus VVS2 pomnožen pri treh lokusih sorte 'Chardonnay'

Na primeru klonov sorte 'Chardonnay', želimo prikazati različno pojavno obliko pomnoženih alelov (vrhov) in intenzivno pomnoževanje senčnih fragmentov (stutter bands). Na lokusu VVS2 imajo vsi kloni 'Chardonnay' SI-21, 'Chardonnay' SI-40 in 'Chardonnay' SI-39 po dva vrhova oziroma pomnožena oba alela, ki kažeta 134 in 140 baznih parov. Izpostavili smo ga le zato, ker so na klonu 'Chardonnay' SI-21 zelo izraziti staterji ali senčni fragmenti, ki nas lahko zavedejo pri določanju dolžine posameznega alela.

4.6 IDENTIFIKACIJA SORT

Sorte smo identificirali na osnovi primerjave podatkov z javno dostopnimi podatkovnimi bazami mikrosatelitov žlahtne vinske trte. Podatke o dolžinah alelov smo dobili na spletnih straneh italijanske baze podatkov (Grando in sod. 2002), švicarske baze podatkov (Vouillamoz in sod. 2006) in baze podatkov Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki je podatke pridobila v laboratoriju Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin (Vitis-WBC ..., 2015). Za primerjave smo uporabili različne podatkovne baze, kot je prikazano v preglednici 8.

Za primerjalno enoto smo uporabili dolžine alelov. Za posamezno sorto smo primerjali različno število lokusov iz različnih podatkovnih baz, odvisno od razpoložljivih podatkov. Po analizi primerjanih alelov na posameznih lokusih smo dobili v primeru vseh sort 100 % identičnost.

Preglednica 8: Primerjava naših podatkov genotipov z genotipi iz različnih podatkovnih baz

Sorta	Baza	Referenca	Št. primerjanih lokusov	Identičnost
RENSKI RIZLING	–	Sefc in sod., (2000)	5	100%
ŠIPON	francoska baza	Lacombe in sod. (2013)	4	100%
BARBERA	slovenska baza	Vitis-WBC ..., (2015)	9	100%
RANINA	francoska baza	Lacombe in sod., (2013)	7	100%
SAUVIGNON	francoska baza	Lacombe in sod., (2013)	5	100%
CHARDO-NNAY	slovenska baza	Vitis-WBC ..., (2015)	9	100%
BELI PINOT	švicarska baza	Vouillamoz in sod., (2006)	6	100%
TRAMINEC	italijanska baza	Grando in sod., (2002)	8	100%
LAŠKI RIZLING	francoska baza	Lacombe in sod., (2013)	7	100%
ŽAMETOVKA	slovenska baza	Vitis-WBC ..., (2015)	9	100%

Nadaljevanje preglednice 8: Primerjava naših podatkov genotipov z genotipi iz različnih podatkovnih baz

Sorta	Baza	Referenca	Št. primerjanih lokusov	Identičnost
REBULA	slovenska baza	Vitis-WBC ..., (2015)	8	100%
ZELEN	slovenska baza	Štajner in sod., (2008)	8	100%
PINELA	slovenska baza	Štajner in sod., (2008)	8	100%
MALVAZIJA	slovenska baza	Štajner in sod., (2008)	8	100%
REFOŠK	slovenska baza	Vitis-WBC ..., (2015)	9	100%

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Slovenija je vinorodna dežela, saj se trto goji na vseh območjih, od Prekmurja do Primorske. A pokrajina je od enega do drugega konca Slovenije močno raznolika, zaradi česar ne moremo in tudi ne smemo¹ v vseh območjih gojiti enakih sort. In navkljub strokovni izbiri primernih sort za določeno območje ter kmetovemu pravilnemu pristopu k pridelavi grozdja in vina, je lahko pridelek manjši in slabše kakovosti. S klonsko selekcijo je možno izboljšati izbor sort in s tem tudi njihovo kakovost ter stopnjo rodnosti. Niso samo okoljski dejavniki tisti, ki vplivajo na razvoj žlahtne vinske trte in količino pridelka. Eden izmed pomembnejših dejavnikov, ki vpliva na kakovost grozdja in vina so namreč tudi genetske zasnove. Zadnji dve desetletji se identifikaciji žlahtne vinske trte na nivoju DNK posveča več pozornosti tudi na področju klonske selekcije. Poleg morfoloških in kemijskih metod uporabljajo za identifikacijo žlahtne vinske trte tudi molekularne metode, kamor uvrščajo različne tehnike in med njimi so najbolj pogosto uporabljeni SSR, AFLP in RAPD markerji (Regner in sod., 2006). Za identifikacijo in genotipizacijo na nivoju sort se največ uporabljajo mikrosateliti, za vrednotenje klonske variabilnosti pa nekateri drugi markerji, kot npr. AFLP in RAPD markerji, v nekaterih primerih tudi mikrosateliti (Thomas in Scott, 1993).

Cilji poskusa so bili, preveriti koliko so mikrosateliti učinkoviti pri identifikaciji klonov posameznih sort, odkriti stopnjo variabilnosti med kloni posameznih sort in ovrednotiti informacijsko vrednost mikrosatelitov za ločevanje posameznih klonov na osnovi dobljenih variacij ter oceniti primernost biotehnoške metode za testiranje pri programih klonske selekcije.

Na podlagi dobljenih rezultatov alelnih dožin smo lahko določili identiteto posameznih klonov in potrdili 100 % ujemanje za vseh 38 klonov 15-ih sort žlahtne vinske trte. Različno je bilo le število primerjanih lokusov, kar pa je bilo odvisno od podatkov, ki smo jih pridobili iz baz dostopnih na spletu ali literaturi. Na osnovi dobljenih rezultatov ugotavljamo, da so mikrosatelitski markerji učinkoviti pri identifikaciji klonov, so pa manj učinkoviti v primeru diferenciacije klonov. Enake raziskave so se lotili tudi Laucou in sod. (2011). Navajajo, da so na osnovi analize 20-ih mikrosatelitnih lokusov pri 4370 akcesijah, ki so predstavljale tako zelo oddaljene sorte kot tudi ožje sorodne skupine posameznih križanj in klonske selekcije, ugotovili, da v primeru ločevanja sort dobijo razlike vsaj na 4-ih lokusih in v primeru ločevanja klonov posamezne sorte na manj kot 4-ih lokusih. Ugotovitve našega poskusa in predstavljeni rezultati iz obstoječe literature so dokaz, da je klonska variabilnost pričakovano manjša in jo z mikrosatelitnimi markerji težje odkrijemo.

¹ glede na Pravilnik o seznamu geografskih označb za vina in trsnem izboru

Zato bi bilo potrebno za odkrivanje klonske variabilnosti in razvoj novih markerjev za identifikacijo posameznih klonov uvesti nekatere druge markerske sisteme, kot npr. AFLP, S-SAP in RAPD markerji (Štajner in sod., 2009).

Kot je že znano se mikrosatelitske markerje uporablja tudi za genotipizacijo. V našem primeru smo preko določanja genotipa klonov ugotavljali kolikšne so variacije med kloni. V naši raziskavi smo tako klonski polimorfizem na osnovi mikrosatelitov odkrili samo v primeru dveh sort od 15-ih analiziranih. Od tega smo pri sorti 'Chardonnay' pri enem izmed klonov, na lokusu VVS2 zaznali senčne fragmente. Murray in sod. (1993) so senčnim fragmentom določili nukleotidno zaporedje in ugotovili, da so ti fragmenti za dva bazna para krajši, kar ustreza dolžini ene mikrosatelitske ponovitve (npr. AT). Pojav je izrazitejši pri dinukleotidnih mikrosatelitih in lahko povzroči napačno vrednotenje dolžine alelov. Do omenjenega pojava pride zaradi napačnega parjenja komplementarnih delov dvojne vijačnice (zdrsa) zaradi česar nastanejo zanke, kar privede do pomnoževanja krajšega ali daljšega produkta (odvisno na kateri vijačnici pride do nastanka zanke) (Murray in sod., 1993).

V primeru sorte 'Renski rizling' pa smo pri klonu SI-23 poleg dveh osnovnih alelov zaznali še tretji alel dolžine 258 baznih parov. Prav tako je bilo pri klonu 'Laški rizling' SI-11, kjer smo poleg osnovnih dveh alelov dolžin 201 in 205 baznih parov zaznali še tretji alel dolžine 195 baznih parov. Ta pojav smo označili za polimorfizem na nivoju himerizma.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da imajo mikrosateliti veliko uporabnost za genotipizacijo in identifikacijo sort, kar potrjujejo tudi številne raziskave narejene na tem področju. Za primer, Thomas in Scott (1993) navajata, da so mikrosateliti najbolj učinkoviti markerji za genotipizacijo žlahtne vinske trte (Thomas in Scott, 1993). Ne samo, da so v primerjavi z drugimi markerji cenejši in hitrejši, zaradi visoke mutacijske stopnje mikrosatelitskih sekvenc, temveč so to visoko informativni molekularni markerji, z največjo vrednostjo polimorfni informacij (Jakše in sod., 2013). Višja ko je stopnja variacije, lažje jih je zaznati, saj bolj jasno odstopajo od preostalega genotipa. Izmed vseh mikrosatelitov pa še posebej izstopa set šestih: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 oziroma devetih: VVMD32, VVMD36, VVMD25 mikrosatelitov (This in sod., 2004). V našem primeru sta se najbolj izkazala lokusa VVS2 ter VVMD7. Sicer pa Jakše in sod. (2013) navajajo, da je v primeru slovenskih vinskih sort najbolj informativen lokus VrZAG79 (Jakše in sod., 2013). Kljub vsemu so SSR markerji primerni za identifikacijo sort, upoštevajoč nizek nivo raznolikosti med kloni odkritimi s to tehniko (Laucau in sod., 2011) pa gotovo SSR markerji niso primerni za klonsko identifikacijo (Imazio in sod., 2002; Cipriani in sod., 2010).

Klonska selekcija je zaradi današnjih vse večjih podnebnih in okoljskih ekstremov nujna. Preko izločevanja neprilagojenih sort, izločimo lastnosti, ki onemogočajo pridobivanje kakovostnega in količinsko velikega pridelka. Seveda z uporabo mikrosatelitskih molekularnih markerjev pripomoremo k hitrejši in bolj učinkoviti analizi in tako je selekcija lahko bolj enostavna. V prvi vrsti zaradi nevezanosti na okoljske ter podnebne spremembe, zaradi česar so rezultati zanesljivi, dalje zaradi učinkovitosti ter ponovljivosti rezultatov. Na molekularnem nivoju je pomembna predvsem identifikacija sort z mikrosatelitskimi markerji in vrednotenje klonske raznolikosti z nekaterimi drugimi markerji, ki so naključno razporejeni po celotnem genomu in največkrat nespecifični (dominantni markerji, kot npr. AFLP, RAPD, S-SAP). V primeru, da na osnovi diferencialne analize najdemo polimorfizme oz. markerje, ki so vezani na določeno agronomsko pomembno lastnost pa se lahko poslužimo tudi selekcije z markerji (MAS - marker assisted selection), ki omogoča hitrejšo in učinkovitejšo žlahtnjenje.

Mikrosateliti so z diferenciacijo omejeni predvsem na sorte žlahtne vinske trte (Borrego in sod., 2002), včasih je z njimi možno klonsko razlikovanje. V primeru poliklonskega izvora sort se namreč lahko pri isti sorti, a različnem klonu pokaže drugačen mikrosatelitski profil. Raznolikost v primeru mikrosatelitskih markerjev je povezana predvsem s pojavom mutacij na osnovi verižnih zdrsov in posledično napačnih poravnjav v ponavljajočem se motivu mikrosatelita (Riaz in sod., 2002). Lahko pa pride tudi do mutacij v obrobni regijah in v primeru, da gre za prilegajoča mesta začetnih oligonukleotidov, pride do pojava ničtih alelov (Regner in sod., 2006). V primeru, da pri pomnoževanju mikrosatelitov identificiramo tretji alel, pa govorimo o himerizmu (Hocquigney in sod., 2004; Bertsch in sod., 2005).

5.2 SKLEPI

Klonska selekcija je zaradi vse večjih okoljskih ekstremov pomembna pri pridobitvi novih sort, prilagojenih na določene okoljske spremembe.

Zaradi ponovljivosti, učinkovitosti ter nevtralnosti s strani zunanjih dejavnikov so mikrosatelitni markerji primerni za identifikacijo kolonov kot sort žlahtne vinske trte, manj učinkoviti pa so za ugotavljanje raznolikosti na nivoju klonov. V našem primeru smo potrdili za vseh 15 sort vključenih v analizo, 100 % identičnost na nivoju mikrosatelitov z nekaterimi sortami identificiranimi v dostopni literaturi oz. javno dostopnih bazah podatkov. Mikrosatelitne markerje torej lahko uporabljamo za identifikacijo oziroma potrditev posamezne sorte in klonov na nivoju DNK, za diferenciacijo klonov pa bi izbrali molekulske markerje kot so AFLP ali S-SAP markerji, ki omogočajo pomnoževanje naključnih regij genoma in kot taki služijo predvsem za odkrivanje polimorfizmov, alhko pa iz njih razvijemo tudi markerje uporabne za identifikacijo na nivoju klonske variabilnosti.

V našem poskusu smo z mikrosateliti odkrili polimorfizem med kloni kultivarjev 'Renski rizling' in 'Chardonnay'. Klone posameznih vzorcev tako lahko determiniramo kot zelo homogene na nivoju mikrosatelitnega polimorfizma.

6 POVZETEK

Vinogradništvo in vinarstvo sta se pri nas obdržala kar 2 400 let, kljub obdobju pred 1. svetovno vojno, ko se je pojavila trtna uš, ki je bila prinesena iz Amerike in je povzročila veliko gospodarsko škodo. Začelo se je v času Keltov, se izpopolnilo s prihodom Rimljanov in se nadaljevalo z ustanovitvijo gorskih skupnosti ter z razvojem intenzivnega vinogradništva. Ustanovili so vinarsko šolo ter zaradi pojava trtne uši uvedli trsničarstvo, preko katerega je okoli 70 let pozneje prišlo do organizirane odbire matičnih trt in s tem načrtne klonske selekcije ter pridobitve novih sort in podlag žlahtne vinske trte. Klonska selekcija se izvaja že 60 let in v tem času so bili uvedeni in izpopolnjeni postopki za pridobivanje kakovostnega trtnega materiala. Zaradi take pestrosti med sortami žlahtne vinske trte, so že v času Rimljanov in Grkov opravili prve opise žlahtne vinske trte. Danes to vedo imenujemo ampelografija. Razvilo se je več metod, s katerimi so si pomagali razlikovati sorte žlahtne vinske trte med seboj. Začelo se je z morfološkimi metodami, kamor spadajo opisi pomembnejših delov rastlin posamezne sorte, sledile so kemijske ter biokemijske metode. Najsodobnejši način razlikovanja, ki pa se še razvija, je molekularni, na nivoju DNK.

Trsnice se ukvarjajo z razmnoževanjem rastlinskega materiala. In vsakič ko se lotimo razmnoževanja rastlin, imamo možnost izbirati med generativnim in vegetativnim razmnoževanjem. Pri generativnem razmnoževanju pridobimo povsem novo rastlino, z novim genskim zapisom, saj jo razmnožimo s semenom, ki je nastalo z izmenjavo očetovskega in materinskega genskega zapisa. V trsnicah pa se poslužujejo vegetativnega razmnoževanja, pri katerem dobimo klon matične rastline, to pomeni, da je potomec glede na fenotip in genotip identičen matični rastlini. V primeru, da pride do mutacij pa dobimo novo rastlino, ki je po fenotipu lahko enaka matični rastlini, po genotipu pa se od nje razlikuje. Nastali mutaciji pravimo klonska variabilnost.

Tudi na molekularnem nivoju se v zadnjem obdobju pogosto vrednoti klonska variabilnost različnih rastlinskih vrst. Za ugotavljanje klonskih variacij so uporabni genski markerji, v nekaterih primerih tudi mikrosateliti, ki pa so sicer bolj primerni za analize identifikacije in razlikovanje na nivoju sort. V naši raziskavi smo na osnovi dolžine mikrosatelitnih alelov potrdili identiteto 38 klonov 15-ih različnih sort žlahtne vinske trte, in pri primerjavi podatkov potrdili 100 % ujemanje oziroma identičnost naših rezultatov z dostopnimi podatki iz mikrosatelitnih podatkovnih baz. Izkazalo se je, da so SSR markerji najbolj učinkoviti za identifikacijo sort, manj pa pri ločevanju posameznih klonov znotraj sort. Na osnovi alelnega polimorfizma smo določili tudi raznolikosti med kloni in sicer samo v dveh primerih. V primeru sort 'Renski rizling' in 'Laški rizling' smo odkrili polimorfizem v obliki himerizma, kar pomeni, da se je pri enem odklonov pomnožil še tretji alel, v primeru sorte 'Chardonnay' smo na lokusu VVS2 zaznali senčne fragmente.

7 VIRI

- Batič F., Šircelj H., Turk B. Pregled rastlinskega sistema. 2004. Biotehniška fakulteta.
http://web.bf.unilj.si/ag/botanika/gradiva/AGR_ZOO_VET_Pregled%20sistema_Skripta.pdf (14. april 2013)
- Bertsch C., Kieffer F., Maillot P., Farine S., Butterlin G., Merdinoglu D., Walter B. 2005.
Genetic chimerism of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis. *BMC Plant Biology*, 5, 20: 7 str.
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-5-20.pdf> (14. april 2013)
- Borrego J., De Andre' s M.T., Go'mez J.L., Iba'n~ ez J. 2002. Genetic study of Malvasia and Tarrantes Groups through molecular markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 125–130
- Carrier G., 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, doi:10.1371/journal.pone.0032973: 10 str.
- Cipriani G., Spadotto A., Jurman I., Gaspero G., Crespan M., Meneghetti S., Frare E., Vignani R., Cresti M., Morgante M., Pezzotti M., Pe E., Policriti A., Testolin R. 2010. The SSR-based molecular proWle of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of diVerent geographic origin. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1569-1585
- Doberšek T. 1978. Vinogradništvo. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 429 str.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution nature reviews. *Genetics*, 5: 435-445
- Gašperič A., Komel R. 1996. Metode izboljšanja delovnih mikroorganizmov V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspore P. (ur.). Ljubljana, Bia: 185-212
- GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard, 2008, Applied Biosystems
https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_082407.pdf (10. julij. 2013)
- Goldstein D. B., Schlotterer C. 1999. Microsatellites, evolution and applications. Oxford, Oxford University Press: 368 str.
- Grando M.S. , Costantini L., Madini A., Segala C. Grape Microsatellite Collection. 2002. Laboratory of Molecular Genetics Istituto Agrario San Michele all'Adige (IASMA)
<http://meteo.iasma.it/genetica/gmc.html> (6. september 2013)

- Hocquigny S., Pelsy F., Dumas V., Kindt S., Heloir M.-C., Merdinoglu D. 2004. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*, 47: 579–589
- Hrček L. 1982. Vinogradništvo, II. del, Ampelografija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 97 str.
- Imazio S., Labra M., Grassi F., Winfield M., Bardini M., Scienza A. 2002. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivars “Traminer”. *Plant Breeding*, 121: 531–535
- Jakše J., Štajner N., Tomić L., Javornik B. 2013. Application of microsatellite markers in grapevine and olives. V: *The Mediterranean genetic code - grapevine and olive*. Poljuha D., Sladonja B. (ur.). Rijeka, InTech: 25-50
- Javornik B. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah – analiza genoma. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 287-298
- KGZS, Kivi Com d. o. o. Vinogradništvo in vinarstvo. 2012. Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije.
<http://www.kgzs.si/gv/kmetijstvo/rastlinska-pridelava/vinogradnistvo-in-vinarstvo.aspx>
(14. april 2013)
- Koruza B., Vaupotič T., Škvarč A., Korošec – Koruza Z., Rusjan D. 2012. Katalog slov. klonov vinske trte. Maribor, Kmetijsko gozdarski zavod: 93 str.
- Kozjak P., Korošec-Koruza Z., Tomažič I., Jakše J., Javornik B. 2001. Evaluation of clonal variability of cv. Refošk (*Vitis vinifera* L.) by ampelographic parameters and microsatellite analysis. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani*, 77, 1: 19-26
- Kozjak P., Korošec-Koruza Z., Javornik B. 2003. Characterization of cv. Refošk (*Vitis vinifera* L.) by SSR markers. *Vitis*, 42: 83-86
- Krastanova S., Perrin M., Barbier P., Demangeat G., Cornuet P., Bardonnet N., Otten L., Pinck L., Walter B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports*, 14, 9: 550-554
- Kuljaj I. 2005. Trte in vina na slovenskem. Ljubljana, Založba Magnolija: 208 str.
- Kump B., Javornik B. 1993. Proučevanje variabilnosti kmetijskih rastlin na nivoju DNK s PCR metodo. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani*, 61: 33-45

- Lacombe T., Boursiquot J.-M., Laucou V., Vecchi-Staraz M., Péros J.-P., This P. 2013. Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 401–414
- Laucou V., Lacombe T., Dechesne F., Siret R., Bruno J.-P., Dessup M., Dessup T., Ortigosa P., Parra P., Roux C., Santoni S., Vare`s D., Pe`ros J.-P., Boursiquot J.-M., This P. 2011. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 1233–1245
- Martelli G.P. 2009. Grapevine virology highlights 2006-09. V: Extended abstracts 16th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG). Boudon-Padieu E (ur.). Dijon, France (Le Progres Agricole et Viticole, 126): 15-23
- Mannini F. 2000. Clonal selection in grapevine: Interactions between genetic and sanitary strategies to improve propagation material. V: 7. International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding. Bouquet A., Boursiquot J.-M. (ur.). Montpellier, France. *Acta Horticulturae*, 528: 703-712
- Medved D. 1995. Najlepše trte na slovenskem. Maribor, Založba Obzorja Maribor: 235 str.
- Mohorič M. 2005. Vpliv na kakovost in pridelavo grozdja. *Agronom*, 10, 2: 12-14
- Murray V., Monchawin C., England P. 1993. The determination of the sequence present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Research*, 21, 10: 2395-2398
- OIV. 2001. OIV descriptor list for grape varieties and *Vitis* species. 2nd edition. <http://www.oiv.int/oiv/info/enplublicationoiv#grape> (18. april 2013)
- Regner F., Hack R., Santiago J. L. 2006. Highly variable *Vitis* microsatellite loci for the identification of Pinot Noir clones. *Vitis*, 45, 2: 85-91
- Riaz S., Garrison K.E., Dangl G.S., Boursiquot J.-M., Meredith C.P. 2002. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127: 508–514
- Rusjan D. 2009. Vinogradništvo in vinarstvo. Praktične vaje za študente 2. letnika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 166 str.
- Schon I., Martens K., Dijk P. 2009. Lost sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis. Netherlands. Springer: 617 str.

- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature America*, 18: 233-234
- Sefc K. M., Regner F., Turetschek E., Glossl J., Steinkellner H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, 42, 3: 367-73
- Sefc K. M., Lopes M. S., Lefort F., Botta R., Roubelakis-Angelakis K. A., Ibáñez J., Pejic I., Wagner H. W., Glössl J., and Steinkellner H. 2000. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 498-505
- System Profile. 2005. Applied Biosystems.
<http://www.baylor.edu/content/services/document.php/186487.pdf> (10. julij. 2013)
- Štajner N. 2003. Razvoj novih mikrosatelitskih DNK markerjev za genotipizacijo in gensko kartiranje hmelja (*Humulus lupulus* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana. Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 274 str.
- Štajner N., Korošec-Koruza Z., Rusjan D., Javornik B. 2008. Microsatellite genotyping of old Slovenian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) of the Primorje (coastal) winegrowing region. *Vitis*, 47: 201-204
- 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: 145-150
- Štajner N. 2010. Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo sortajev vinske trte (*Vitis vinifera* L.). *Acta agriculturae Slovenica*, 95, 2: 183-192
- Štajner N., Rusjan D., Korošec Koruza Z., Javornik B. 2011. Genetic characterization of old Slovenian grapevine varieties of *Vitis vinifera* L. by microsatellite genotyping. *American journal of enology and viticulture*, 62, 2: 250-255
- Štajner N., Javornik B., Tomić L., Jovanović Cvetković T., Cvetković M. 2012. Collection and genetic characterization of *Vitis vinifera* L. 'Žilavka' by microsatellites and AFLP markers. *Acta agriculturae Slovenica*, 99, 2: 143-150

- Štrukelj-Mavrič M., Brdnik M., Hauptman S., Štabuc R., Novak E., Martinčič J., Škvarč A. 2012. Vinogradniške razmere v Sloveniji danes V: 4. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo. Rusjan D. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 1-28
- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G. S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibáñez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhaes R., Meredith C. P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Mau E. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 7: 1448-58
- Thomas M. R., Scott N. S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal dna polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (stss). *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 8: 985-90
- Tomažič I. 1999. Določanje virusov in njihov vpliv na ampelografske lastnosti vinske trte (*Vitis vinifera*L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Oddelek za agronomijo: 96 str.
- Vinogradništvo in vinarstvo v Sloveniji. 2011.
<http://www.slovenianwines.net/sl/vinogradnistvo-in-vinarstvo-v-sloveniji/> (14. april 2013)
- Vitis-WBC, western-balkans vitis database, Grapevine cultivars genotypes. Biotechnical faculty. marec 2015.
<http://vitis.atcglabs.com/> (6. september 2013)
- Vouillamoz J.F., Frei A., Arnold C. 2006. Swiss Vitis Microsatellite Database (31. oktober 2006).
<http://www1.unine.ch/svmd/?alpha=R> (6. september 2013)

ZAHVALA

Zahvaljujem se družini za podporo ter spodbude. Ves čas so mi stali ob strani in mi vlivali voljo. Hvala bratu Marku tudi za vso pomoč pri reševanju tehničnih težav.

Velika zahvala gre tudi mentorici doc. dr. Nataši Štajner za potrpežljivost, jasne razlage in vso ostalo pomoč, ki je potrebna za dobro opravljano nalogo.

Hvaležna sem tudi Nadi Pintar, ki me je vodila skozi vsa laboratorijska dela in mi ob tem posredovala tudi nova znanja.

Zahvaljujem se tudi ge. Andreji Škvarč, vodji selekcijsko trsničarskega središča Vrhpolje, ki mi je omogočila material za opravljanje poskusa.

Hvala tudi prof. dr. Denisu Rusjanu, prof. dr. Zori Korošec-Koruza in prof. dr. Gregorju Ostercu za skrben pregled diplomske naloge.