

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Katja KONCILJA

**ANALIZA ZNOTRAJVRSTNE VARIABILNOSTI  
ŽLAHTNE VINSKE TRTE (*Vitis vinifera* L.) SORTE  
'MERLOT' Z MIKROSATELITNIMI MARKERJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Katja KONCILJA

**ANALIZA ZNOTRAJVRSTNE VARIABILNOSTI ŽLAHTNE VINSKE  
TRTE (*Vitis vinifera* L.) SORTE 'MERLOT' Z MIKROSATELITNIMI  
MARKERJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INTRAVARIETAL VARIABILITY ANALYSIS OF GRAPEVINE  
VARIETY 'MERLOT' (*Vitis vinifera* L.) WITH MICROSATELITES  
MARKERS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je dne 29. 5. 2008 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorja imenovala doc. dr. Jerneja JAKŠETA in somentorja doc. dr. Denisa RUSJANA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Katja VADNAL  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Jernej JAKŠE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Članica: izr. prof. dr. Zlata LUTHAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Katja Koncilja

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 634.8:575.21:577.2.08:606 (043.2)  
KG vinska trta / genetika / mikrosatelitni markerji / Merlot / znotrajvrstna variabilnost / genetska analize  
KK AGRIS F30  
AV KONCILJA, Katja  
SA JAKŠE, Jernej (mentor), RUSJAN Denis (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2010  
IN ANALIZA ZNOTRAJVRSTNE VARIABILNOSTI ŽLAHTNE VINSKE TRTE (*Vitis vinifera* L.) SORTE 'MERLOT' Z MIKROSATELITNIMI MARKERJI  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 42, [1] str., 6 sl., 9 pregl., 39 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Pri genetski analizi sorte 'Merlot', posajeni v Sloveniji, je bilo ugotovljeno, da le-ta pri enem mikrosatelitnem lokusu odstopa od referenčne francoske sorte 'Merlot'. To je redek primer identifikacije klonske variabilnosti vinske trte z mikrosatelitnimi markerji, ki je morda tudi značilna za slovensko selekcijo omenjene sorte. Zaradi slednjega smo izvedli poskus z analizo večjega števila trt sorte 'Merlot' z mikrosatelitnimi markerji. Rastlinski material smo nabrali v letu 2008 na različnih lokacijah vinorodnega okoliša Goriška brda (vinorodna dežela Primorska). V analizo smo vključili 39 vzorcev sorte 'Merlot' in 8 vzorcev referenčnih sort. Mikrosatelitne profile smo izdelali z 8 mikrosatelitnimi markerji (VVS2, VrZAG62, VrZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27 in VVMD32), katere smo ločili na ALFexpress elektroforetski napravi, ki deluje na principu detekcije fluorescence. Pomnoževanje 8 mikrosatelitnih markerjev v PCR smo predhodno optimizirali na manjšem številu vzorcev DNA vinske trte. Genetsko variabilnost smo ocenili na podlagi deleža skupnih alelov. Potrdili smo razliko pri sorti 'Merlot' pri lokusu VVMD27, pri katerem smo ugotovili 3 različne alele in dva različna genotipa; prevladujoč genotip, ki je enak genotipu francoske sorte 'Merlot', pri devetih vzorcih (25 % analiziranih) pa smo potrdili drugačen oziroma mutiran genotip. Iz dobljenih rezultatov smo z mikrosatelitnim polimorfizmom potrdili znotrajvrstno variabilnost pri lokusu VVMD27. Sklepamo, da gre za brstno mutacijo mikrosatelitnega alela, ki bi lahko bila značilna za slovensko selekcijo sorte 'Merlot', saj kar šest trt iz kolekcijskega vinograda Kromberk od sedmih analiziranih kaže omenjeno mutacijo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 634.8:575.21:577.2.08:606 (043.2)  
CX *Vitis vinifera* L./ genetics / genetic analysis / microsatellite markers / intravarietal variability  
CC AGRIS F30  
AU KONCILJA, Katja  
AA JAKŠE, Jernej (supervisor), RUSJAN, Denis (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2010  
TI INTRAVARIETAL VARIABILITY ANALYSIS OF GRAPEVINE VARIETY 'MERLOT' (*Vitis vinifera* L.) WITH MICROSATELLITES MARKERS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 42, [1] p., 6 fig., 9 tab., 39 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Previous genetic genotyping of grapevine cultivar 'Merlot' sampled from Slovenian vineyard discovered interesting mutation. Particular grapevine differed at one analyzed microsatellite locus from reference French variety 'Merlot' DNA sample. This is very rare occasion of identification of clonal variation by the means of microsatellite markers. Mutation can be of from Slovenian selection origin of variety 'Merlot', thus we decided to analyze larger number grapevines with microsatellite markers. Grapevine material was collected in 2008 on different locations in winegrowing district Goriška brda. Thirty-nine vines of variety 'Merlot' and eight reference vines were included in the analysis. Microsatellite profiles have been amplified on eight different microsatellite loci (VVS2, VrZAG62, VrZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, and VVMD32), which were analyzed using ALFexpressII fluorescent genetic analyzer. Amplification of microsatellite markers in PCR was optimized first on smaller number of grapevine DNA samples. Genetic variability was assessed based on percentage of common alleles. The presence of described mutation on microsatellite locus VVMD27 was confirmed with presence of three different alleles and two different grapevine 'Merlot' genotypes. More frequent was genotype with the same genetic profile which is characteristic for French reference Merlot variety, but nine samples (25 % of analyzed) was of mutated origin. Our results confirmed intravarietal variability at locus VVMD27. We assume that bud mutation of microsatellite allele occurred, which could be characteristics for Slovenian region, since six vines out of seven analyzed originated in collection vineyard Kromberk.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo slik	VII
Kazalo preglednic	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 POVOD IN NAMEN RAZISKAVE	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED GOJENJA VINSKE TRTE	3
2.2 KLASIFIKACIJA VINSKE TRTE	3
2.3 METODE IDENTIFIKACIJE SORT VINSKE TRTE	3
<b>2.3.1 Ampelografske metode</b>	<b>3</b>
<b>2.3.2 Molekulski markerji</b>	<b>5</b>
2.3.2.1 Markerji RFLP-polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov	6
2.3.2.2 Markerji AFLP-polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov	6
2.3.2.3 Markerji RAPD-tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA	7
2.3.2.4 Mikrosateliti	7
<b>2.3.3 Identifikacija sort vinske trte</b>	<b>11</b>
2.3.3.1 Študije klonske variabilnosti vinske trte in razlikovanje klonov s pomočjo molekulskih markerjev	11
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>13</b>
3.1 MATERIAL	13
<b>3.1.1 Sorta 'Merlot'</b>	<b>15</b>
3.1.1.1 Poreklo	15
3.1.1.2 Botanični opis	15

3.1.1.3	Kloni sorte 'Merlot'	16
3.1.1.4	Zastopanost sorte 'Merlot' v vinorodni deželi Primorska	17
3.2	METODE DELA	18
<b>3.2.1</b>	<b>Izolacija rastlinske DNA</b>	18
<b>3.2.2</b>	<b>Merjenje koncentracije DNA</b>	19
<b>3.2.3</b>	<b>Izbor začetnih oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo</b>	19
<b>3.2.4</b>	<b>Priprava DNA vzorcev za PCR</b>	20
<b>3.2.5</b>	<b>Namnoževanje mikrosatelitskih lokusov v PCR</b>	21
<b>3.2.6</b>	<b>Ločevanje PCR produktov</b>	23
3.2.6.1	Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza	23
3.2.6.2	Interni in eksterni standard	24
<b>3.2.7</b>	<b>Določevanje dolžin mikrosatelitov</b>	25
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	26
4.1	IZOLACIJA DNA	26
4.2	GENOTIPIZACIJA	27
<b>4.2.1</b>	<b>Določanje dolžin mikrosatelitnih alelov</b>	27
<b>4.2.2</b>	<b>Genotipi analiziranih sort vinske trte</b>	32
<b>4.2.3</b>	<b>Identifikacija vzorcev 10, 11 in 28</b>	34
<b>4.2.4</b>	<b>Polimorfizem sorte 'Merlot' pri lokusu VVMD27</b>	35
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	36
5.1	RAZPRAVA	36
5.2	SKLEPI	38
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	39
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	40

## KAZALO SLIK

- Slika 1: Razlaga himernega polimorfizma pri sorti 'Sivi pinot'. Sorta 'Sivi pinot' PG52 (A) ima himerni rastni vršiček, ki pri mikrosatelitnem lokusu VVS2 kaže 3 alele. To je posledica tega, da so skupki celic L1 in L2 rastnega vršička drugačnega genotipa. S pomočjo somatske embriogeneze so lahko regenerirali rastline (B), ki so imele genotip kot ga imajo L1 celice rastnega vršička in posledično dobili modro barvo grozda. Ko so sorto 'Sivi pinot' samooprašili pa so dobili drug heterozigoten genotip z belo barvo grozdja. (Pelsy, 2010) 12
- Slika 2: Rastlinski material (listi in vršički) (Benedetič, 2010) 13
- Slika 3: Gojitvena oblika guyot (enošparonski vodoravno vezan) v vinogradu s sorto 'Merlot' (Benedetič, 2010) 16
- Slika 4: Potek cikla PCR reakcije, primer pomnoževanja mikrosatelitnega lokusa (Kozjak, 2001) 22
- Slika 5: Primer polimorfizma osmih standardnih vzorcev sort vinske trte pri petih analiziranih mikrosatelitnih lokusih: VVMD25, VVMD32, VVS2, ZAG62 in ZAG79. Pri strani so pri vsakem kultivarju zapisani genotipi v obliki izmerjenih dolžin alelov, glej tudi preglednico 8. Sort vinske trte so naslednji: 1- Slovenski 'Merlot', ki je v predhodni analizi kazal mutacijo na mikrosatelitnem lokusu VVMD27, 2-standardni 'Merlot', pridobljen iz Francije, 3-'Modri pinot', 4-'Chardonnay', 5-'Cabarnet sauvignon', 6-'Sultanina', 7-'Touriga nacional' in 8-'Barbera' 29
- Slika 6: Odkrit polimorfizem pri vzorcih sorte 'Merlot' pri lokusu VVMD27. Pri standardni DNA 'Merlot' iz Francije razberemo genotip 192:190, medtem ko smo pri 9-ih vzorcih slovenskega 'Merlot' odkrili genotipm 192:188 35



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Referenčne sorte vinske trte, ki omogočajo medsebojno primerjavo rezultatov in smo jih vključili v analizo	13
Preglednica 2: Nabrani in analizirani vzorci vinske trte sorte 'Merlot'	14
Preglednica 3: Vinogradi, število pridelovalcev in povprečna velikost vinograda na pridelovalca po vinorodnih okoliših vinorodne dežele Primorska v Registru pridelovalcev grozdja in vina (Štabuc in sod., 2007)	17
Preglednica 4: Delež (%) sort vinske trte v Sloveniji glede na število trt (Štabuc in sod., 2007)	18
Preglednica 5: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov (a – forward; b – reverse orientacija), a začetni oligonukleotid je bil na 5' koncu označen s CY5 fluorescentnim barvilom	20
Preglednica 6: Optimizirani pogoji verižne reakcije s polimerazo (PCR) za posamezen lokus uporabljen pri genotipizaciji vzorcev 'Merlot'	21
Preglednica 7: S fluorimetrijo določene koncentracije DNA posameznih vzorcev vinske trte sorte 'Merlot'	26
Preglednica 8: Alelni profili in genotipi analiziranih sort vinske trte pri osmih mikrosatelitnih lokusih, vzorci 1-8 so standardne sorte, ki se uporabljajo pri genotipizaciji in omogočajo primerjavo z javno dostopnimi bazami genotipskih podatkov (vzorec 1 je slovenski 'Merlot', pri katerem je bila odkrita mutacija pri lokusu VVMD27, vzorec 2 pa je standardna sorta 'Merlot' pridobljena iz Francije), sledi 39 vzorcev sorte 'Merlot' vzorčenih v tej nalogi	30
Preglednica 9: Primerjava genotipov med standardnimi sortami 'Merlot', 'Chardonnay' in izstopajočimi vzorci 10, 11 in 28	34

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Alel	ena izmed različnih oblik zapisa dednega materiala na določenem mestu v kromosomu
Ampelografija	je znanstvena veda, ki preučuje in opisuje sorte vinske trte
°C	stopinja Celzija; enota za merjenje temperature po skali, pri kateri je vrelišče vode pri 100 °
DNA	dezoksiribonukleinska kislina
Genetski markerji	značilni kratki deli DNA, ki so polimorfni med osebkami in katerih delovanje lahko sledimo
Heterozigot	alela na obeh kromosomih sta različna
Himera	je individuum, ki je sestavljen iz genetsko različnih celic
Homozigot	alela na obeh kromosomih sta enaka
Kodominantno dedovanje	dedovanje, pri katerem se pri heterozigotu oba alela dedujeta neodvisno in ni nobeden prevladujoč nad drugim. Oba alela enakovredno prispevata k fenotipu
Lokus	mesto na kromosomu, kjer se nahaja gen oziroma zaporedje nukleotidov DNA za neko lastnost organizma; mesto markerja v molekuli DNA
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
Polimorfizem	prisotnost dveh ali več alelov enega gena v populaciji
Sinonim	izraz, ki pomeni poimenovanje iste sorte z različnimi imeni
Somatska mutacija	mutacija v celicah, katere niso določene za generativni razplod. Če se mutirana celica razmnožuje, to lahko povzroči lokalizirano spremembo tkiva
SSR	mikrosatelit, enostavna zaporedja (angl. Simple Sequence Repeat)
Variabilnost	lastnost organizmov, da se spreminjajo pod vplivom okolja ali zaradi sprememb dednih lastnosti
µg/ml	mikrogram na mililiter

## 1 UVOD

Vinogradništvo je ena najstarejših kmetijskih panog v zgodovini človeštva. Razlikovanje in identifikacija ekonomsko pomembnih sort vinske trte ima danes velik pomen pri trgovanju z rastlinskim materialom-cepljenkami in vinom (Sefc in sod., 1998). V preteklosti je identifikacija sort temeljila le na ampelografskih metodah, pri katerih opisujemo morfološke značilnosti vinske trte.

Prenos in izmenjava sort vinske trte sta intenzivno potekala po celem svetu, kjer so na različnih območjih iste sorte poimenovali z različnimi imeni. Razvili so se tudi novi ekotipi, ki so jih opisovali kot nove sorte. V večini primerov ni znan geografski ali genetski izvor današnjih sort vinske trte. Zaradi morfoloških podobnosti so bile sorte nepravilno identificirane in poimenovane. S klonsko selekcijo so odbirali trte za nadaljnje razmnoževanje na podlagi parametrov pridelave in ne po morfoloških značilnostih, kar je povzročilo še več težav pri poimenovanju (Galet, 1989).

Vegetativno razmnoževanje je bilo pogosta metoda širjenja vinske trte že v rimskih časih, kar lahko zasledimo v knjigi III in IV rimskega pisatelja Columella (Robinson, 2006). Večina današnjih ekonomsko pomembnih sort žlahtne vinske trte je znanih že stoletja, vendar do devetnajstega stoletja njihovo gojenje ni bilo dokumentirano. Zmožnost razlikovanja sort in razjasnitve sinonimov ter homonimov je zelo pomembna pri reševanju problemov pri trgovanju s sadilnim materialom in vinom.

Identifikacijo sort vinske trte danes izvajamo s klasičnimi ampelografskimi metodami ter s molekulskimi metodami, ki razlikujejo sorte na nivoju DNA. Na voljo imamo različne molekulske markerje, med katerimi pa po svojih pozitivnih lastnostih najbolj izstopajo mikrosateliti. Prednost mikrosatelitnih markerjev je predvsem v zanesljivosti in ponovljivosti rezultatov ter razmeroma enostavni izvedbi analiz (Kozjak, 2001).

### 1.1 POVOD IN NAMEN RAZISKAVE

Pri genetski analizi vinskih sort žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.) na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje (v nadaljevanju Katedra) je bilo ugotovljeno, da slovenska trta sorte 'Merlot' pri enem mikrosatelitnem lokusu (VVMD27) po genotipskem profilu odstopa od referenčne francoske trte iste sorte. Trta sorte 'Merlot', rastoča v Sloveniji, je imela genotip 192:188, medtem ko je imela referenčna francoska trta iste sorte genotip 192:190. To je redki primer identifikacije klonske variabilnosti z mikrosatelitnim markerjem. Namen našega dela je preučitev možne omenjene variabilnosti znotraj skupine trt sorte 'Merlot', posajene v Sloveniji, oziroma v kakšni meri je ta mutacija zastopana med omenjenimi trtami.

Glede na odkrito mutacijo pri trti sorte 'Merlot', posajeni v Sloveniji, predpostavljamo, da bi lahko ta bila značilna za slovensko selekcijo sorte 'Merlot'.

## 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da bomo potrdili ali zavrnili prisotnost mutacije mikrosatelitnega alela, ki bi lahko bil značilen za nekatere trte sorte 'Merlot', posajene v Sloveniji. Dobili bomo tudi oceno o zastopanosti omenjenega polimorfizma v vinogradih po Sloveniji.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINSKI PREGLED GOJENJA VINSKE TRTE

Najstarejši dokumenti, ki pričajo o gojenju vinske trte pri nas, izhajajo iz 9. stoletja v času vladanja Karla Velikega. Tudi iz srednjega veka se je ohranilo več pisnih dokumentov, ki omenjajo stanje takratnega vinogradništva (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Razvoj vinogradništva pri nas je bil najbolj izrazit v začetku 19. stoletja. Tako imenovano stoletje velikih reform in naglega razvoja tehnike se je pokazalo tudi v razvoju vinogradništva v naših krajih. Po takratnih izmerah naj bi bilo na območju današnje Slovenije okrog 50 tisoč ha vinogradov (Hrček in Korošec-Koruza, 1996). Ob koncu 19. stoletja pa je slovensko vinogradništvo močno prizadel napad trsne uši (*Daktulosphaira vitifoliae*). V kratkem času je trsna uš uničila skoraj vse naše vinograde žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.). Rešitev te katastrofe je bilo cepljenje evropske žlahtne trte na odporno ameriško trto kot podlago. Zaradi potreb po cepljenju na ameriške podlage so se začele razvijati trsnice. Med prvimi trsnicami na Primorskem je bila ustanovljena trsnica v Izoli leta 1895. Obnovo vinogradov ter razvoj trsnic sta prekinili obe svetovni vojni. Med vojnama je bila pridelava cepljenk neorganizirana in nekontrolirana. Posledice vojn so se kazale v drastičnem zmanjšanju števila trsnic tudi desetletje po končani drugi svetovni vojni. Po letu 1957 je ostala na Primorskem le ena trsnica, v Vrhpolju, ki je imela zmogljivost 1,2 milijona cepljenk.

### 2.2 KLASIFIKACIJA VINSKE TRTE

Taksonomsko uvrščamo vinsko trto v družino *Vitaceae*. V to družino spada več kot 1000 vrst razvrščenih v 15 oziroma 16 rodov. Vrste, ki jih uvrščamo v rod *Vitis*, se od vrst iz ostalih rodov razlikujejo v glavnem v morfologiji cveta. Rod *Vitis* sestavljata dva podroda, *Muscadinia* in *Euvitis*. Podrod *Euvitis* je številčnejši in zajema okoli 70 vrst, v podrodu *Muscadinia* pa so trenutno opisane le tri vrste (Jackson, 2000).

### 2.3 METODE IDENTIFIKACIJE SORT VINSKE TRTE

#### 2.3.1 Ampelografske metode

Med tradicionalne metode za identifikacijo in razlikovanje sort spada ampelografija, katere del imenujemo ampelometrija ali filometrija (metoda za opisovanje listov). Beseda ampelografija je izpeljana iz grških besed *ampelos*, kar pomeni trta, in *grafos*, ki pomeni opisovanje. Ampelografija je veda, ki se ukvarja z opisovanjem morfoloških lastnosti vrst vinske trte rodu *Vitis*.

Že Rimljani so poudarjali raznovrstnost sort vinske trte, kakor tudi težave pri njihovem razlikovanju. Tako so razlikovali le vina slabe kakovosti in vina dobre kakovosti. Šele v štirinajstem in petnajstem stoletju so se začela uporabljati imena sort. Med najzgodnejšimi omenjenimi imeni sort so 'Traminer' (1349; 'Traminec'), 'Rülander' (1375; 'Sivi Pinot'), 'Rheinriesling' (1435; 'Renski rizling') in 'Gutedel' (1423; 'Žlahtnina'), (Sefc in sod., 1998). Znanstvene temelje sodobne ampelografije je postavil de Clemente leta 1807 pri svojem opisu andaluzijskih sort. Temeljitejše preučevanje sort, njihovo opisovanje in sistematika, se je v Evropi začelo v 19. stoletju. Viala in Vermorel sta v 1902-1910 v Franciji opisala 600 sort. Razlikovanje sort je postalo izrednega pomena šele v drugi polovici devetnajstega stoletja, ko so se z uvozom sadilnega materiala iz Amerike v Evropo prenesle številne bolezni in škodljivci (oidij (*Uncinula necator*) leta 1852, trsna uš (*Dactulosphaira vitifoliae*) leta 1863, peronospora (*Plasmopara viticola*) leta 1878, črna pegavost (*Phomopsis viticola*) leta 1885). Te razmere so prisilile vinogradnike v iskanje ustreznih metod za razlikovanje sort, predvsem zaradi iskanja sort, odpornih na bolezni in škodljivce.

Najstarejša slovenska knjiga iz vinogradništva je izšla v Ljubljani leta 1844 z naslovom Vinoreja za Slovence avtorja Matija Vertovca. Za slovensko ampelografijo so važna opisovanja avstrijskega ampelografa Hermanna Goetheja. Ta je leta 1876 izdal knjigo Atlas vinogradništva Nemčije in Avstrije ter Splošno ampelografijo, ki je izšla leta 1878 v Gradcu.

Da bi pridobili enotno mednarodno metodologijo, je mednarodna ampelografska komisija pri O.I.V. (Office de la Vigne et du Vin) leta 1951 v Montpellier-ju v Franciji izdala Mednarodni ampelografski register za opisovanje sort. Register zajema sistematičen opis kod in ponekod tudi slikovne prikaze vrednotenja posameznih deskriptorjev. Register je bil leta 1984 izpopolnjen glede na namen opisovanja (genska banka, varstvo rastlin). Po tem registru zajema opis neke sorte naslednje elemente:

- ime in sinonime
- izvor, klasifikacijo in zgodovino sorte
- geografsko razprostranjenost sorte
- botanični opis sorte (mladica, rozga, list, cvet, grozd, jagoda in pečka)
- agrobiotične lastnosti (fenofaze, bujnost in značilnost rasti, rodnost, odpornost na bolezni in škodljivce, odpornost na nizke temperature, sortna agrotehnika, kakovost grozdja, afiniteta z ameriškimi podlagami)
- gospodarsko – tehnološke lastnosti (mehanična sestava grozda in jagode, kemijska sestava mošta, vrste proizvodov iz grozdja)
- variacije in kloni
- rajonizacijo
- bibliografske podatke.

Kljub sicer sistematično določenemu opisovanju morfoloških lastnosti lista, se srečujemo z nekaterimi pomanjkljivostmi te metode (Cipriani in sod., 1994):

- pri filometriji merimo parametre na odraslih listih, kar pomeni, da smo omejeni na čas rastne dobe.
- s sadikami trte trgujemo v olesenem stanju, kjer nimamo na voljo listov za identifikacijo. Napake v tem primeru opazimo lahko šele čez nekaj časa, ko trta pride v rodnost.
- pri podlagah večinoma ne opisujemo listov, saj imamo v glavnem opraviti z olesenelimi podlagami.
- na morfološke značilnosti vplivajo ekološki dejavniki, zdravstveno in prehransko stanje vinske trte ter tehnologija pridelave.

Kljub vsemu ampelografskemu delu in raziskavam ne moremo še točno povedati koliko sort vinske trte je v svetu in koliko jih je v gospodarski rabi. Podatki navajajo, da je okoli 10000 sort, od tega se jih gospodarsko goji okoli 1300. Ti podatki se spreminjajo, saj je mnogo sinonimov za isto sorto in zaradi križanja novih sort (moderne križanci).

Uporaba ampelografskih metod za identifikacijo in razlikovanje zahteva izkušenega opisovalca. Prav tako nikjer v svetu ni kolekcije, v kateri bi bile zastopane vse sorte. Tako je kljub jasnim ampelografskim deskriptorjem v komercialnih vinogradih in kolekcijah veliko napačno poimenovanih sort (Lopes in sod., 1999).

### **2.3.2 Molekulski markerji**

Prvi markerji, ki so se uporabljali za vrednotenje variabilnosti rastlin, so bili fenotipski ali morfološki. Njihova uporaba je bila povezana s številnimi metodološkimi težavami, kot so zamudno delo, razpoložljivost markerjev, odvisnost markerjev od razvojne stopnje rastlin in okolja ter subjektivni pristop pri vrednotenju. Razvoj in uporaba izoencimskih markerjev sta genetsko analizo vodila na molekularni nivo, vendar je bila zaradi majhne številčnosti njihova uporaba omejena. Razvoj molekularnih markerjev je omogočil revolucionaren pristop k preučevanju genomov (Bandelj Mavsar, 2005).

Marker je katerokoli zaporedje DNA, ki ga lahko brez večjih težav odkrijemo in spremljamo njegovo dedovanje. Glede na namen preučevanja organizma lahko izbiramo med hibridizacijskimi (markerji RFLP-polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov) in PCR (markerji RAPD-tehnika naključno namnožene polimorfne DNA, AFLP-polimorfizem dolžine namnoženih fragmentov, mikrosateliti) tehnikami (Bandelj Mavsar, 2005).

Prednost vseh molekularnih markerjev pred opisovanjem morfoloških lastnosti je njihova neodvisnost od okoljskih razmer. Pri analizi DNA nismo odvisni od razvojnega stadija in lahko proučujemo DNA vinske trte tudi v času njenega mirovanja. Prav tako je velika prednost molekularnih markerjev v tem, da zdravstveno stanje vinske trte ne vpliva na rezultat analiz. Ti so neodvisni tudi od tehnologije pridelave (Kozjak, 2001).

Za identifikacijo sort kmetijskih rastlin je na voljo več molekularskih markerjev, vendar niso vsi v širši uporabi oziroma se uporabljajo v različne namene. Najbolj pogosti za identifikacijo in proučevanje variabilnosti so opisani v nadaljevanju.

#### 2.3.2.1 Markerji RFLP-polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov

Ta hibridizacijska tehnika je bila prvi razvit markerski sistem, ki je omogočil odkrivanje polimorfizma na nivoju DNA. Tehnika RFLP temelji na razrezu DNA z restrikcijskimi encimi. Razrezani fragmenti se nato elektroforetsko ločijo in prenesejo na membrano. Sledi zaznavanje specifičnih fragmentov DNA s hibridizacijo z radioaktivno označeno sondo. Razlike med preučevanimi organizmi se opazijo kot različni vzorci restrikcijskih fragmentov DNA, ki nastanejo kot posledica mutacij nukleotidnega zaporedja, kar spremeni restrikcijsko mesto. Prednosti tega markerskega sistema se kažejo v dobri ponovljivosti rezultatov v različnih laboratorijih. Markerji RFLP so kodominantni, kar omogoča razlikovanje med heterozigotnimi in homozigotnimi osebki. Za preučevanje organizma je potrebno predhodno poznavanje zaporedja DNA. Med slabosti te metode pa uvrščamo tehnično zahtevnost te metode.

#### 2.3.2.2 Markerji AFLP-polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov

Tehnika AFLP je osnovana na selektivnem pomnoževanju restrikcijskih fragmentov, dobljenih z razrezom DNA z restrikcijskimi endonukleazami. Postopek vključuje naslednje korake:

1. razrez DNA z restrikcijskimi endonukleazami in ligacija adapterjev;
2. selektivno pomnoževanje množice restrikcijskih fragmentov;
3. elektroforeza in analiza namnoženih fragmentov.

Polimorfizem markerjev AFLP nastane zaradi:

- mutacij na restrikcijskih mestih (transpozicije, insercije in delecije),
- insercij in delecij med mesti prilaganja začetnih oligonukleotidov.

Velika prednost AFLP metode pred drugimi DNA tehnikami je detekcija velikega polimorfizma v eni sami PCR reakciji brez predhodnega poznavanja DNA zaporedja preučevanega organizma. Prednost te tehnike je tudi v veliki ponovljivosti rezultatov, v večjem številu lokusov, ki so istočasno analizirani v poskusu, uporabna je pri kompleksnejših genomih ter ponuja možnost pomnoževanja potencialno neskončnega števila markerjev brez predhodnega poznavanja nukleotidnega zaporedja preučevanega organizma.

To tehniko se uporablja pri proučevanju geografske distribucije sort rastlin in filogenije, za verifikacijo in identifikacijo posameznih vrst in sort, za kloniranje genov na podlagi izdelanih kart itd. Markerji AFLP so zelo uporabni za definiranje genetskih razmerij med



sortami, ker ponujajo možnost projiciranja večjega števila anonimnih lokusov. AFLP tehnika pri vinski trti se v glavnem uporablja za analizo klonske variabilnosti.

### 2.3.2.3 Markerji RAPD-tehnika naključno pomnožene polimorfne DNA

Tehnika RAPD temelji na naključnem pomnoževanju neznanih predelov DNA z uporabo začetnega oligonukleotida, ki je dolg 10 bp s poljubnim nukleotidnim zaporedjem. Rezultat namnoževanja so produkti DNA ali markerji RAPD, ki se ločijo z elektroforezo na agaroznem gelu, zaznavanje le teh pa poteka s pomočjo etidijevega bromida pod UV svetlobo (Bandelj Mavsar, 2005).

Markerji RAPD se pogosto uporabljajo pri rastlinah zaradi enostavnosti izvajanja tehnike in nizke cene. Metoda ne vključuje hibridizacije, zato radioaktivne sonde niso potrebne. Za reakcijo so potrebne majhne koncentracije DNA in v kratkem času je možno analizirati večje število vzorcev. Ta metoda ne zahteva predhodnega poznavanja nukleotidnih zaporedji genoma, zato je uporabna tudi pri preučevanju manj znanih vrst. Markerji RAPD imajo tudi pomankljivosti. Kakovost reakcije PCR je odvisna od kakovosti, stabilnosti in koncentracije izhodiščno izolirane DNA, od občutljivosti na temperaturni profil, od kakovosti in koncentracije *Taq* polimeraze,  $MgCl_2$  in začetnih oligonukleotidov. Težave so lahko tudi pri vrednotenju markerjev in interpretaciji kompleksnih elektroforegramov. Omejenost RAPD tehnike je včasih povezana tudi z naravo markerjev, saj so leti dominantni, kar pomeni, da ne moremo razlikovati heterozigotnih od homozgotnih dominantnih osebkov.

Tehniko RAPD raziskovalci uporabljajo pri identifikaciji molekularskih markerjev vezanih na lokuse ali gene za agronomsko pomembne lastnosti. Markerji RAPD so uporabni tudi pri molekularski karakterizaciji, identifikaciji sort in preučevanju filogenetskih odnosov sadnih vrst jablane, murve, hruške, mandlja, breskev, naktarin, sliv in vinske trte.

### 2.3.2.4 Mikrosateliti

Mikrosateliti so kratka, 2-6 baznih parov dolga, ponovljiva nukleotidna zaporedja, ki so naključno razporejena v jedrnem genomu višjih organizmov. Zaradi sprememb v številu kopij ponovljivih sekvenc, ki so posledica napak pri prepisovanju DNA, je dolžina mikrosatelitov zelo variabilna. Osnoven motiv je sestavljen iz enega do šestih nukleotidov, ki se tandemsko ponavljajo. Glede na število nukleotidov v motivu razlikujemo: mononukleotide, dinukleotide, trinukleotide itd. mikrosatelite.

Skupna lastnost evkariontskih genomov je, da vsebujejo tandemsko ponavljajočo se DNA, ki so jo poimenovali satelitna DNA. Satelitno DNA glede na dolžino osnovnega motiva delimo v tri skupine (Chambers in MacAvoy, 2000):

- sateliti: sestavljeni iz osnovnega nukleotidnega zaporedja (motiv) dolžine do 200 baznih parov, dosežejo skupno dolžino več deset tisoč bp,



Ko so mikrosateliti za določeno vrsto že poznani, se lahko uporabijo tudi za molekularno-genetske analize sorodnih vrst. Obrobna zaporedja mikrosatelitske DNA so lahko med sorodnimi vrstami ohranjena, zato so nekateri začetni oligonukleotidi, ki so pripravljani za eno vrsto, uspešno namnožujejo tudi regijo DNA druge vrste. So pa mikrosateliti zaradi svoje hipervariabilnosti idealno orodje za molekularno identifikacijo posameznikov. Vsak posameznik ima namreč edinstven vzorec alelov, ki je specifičen, zato ga imenujejo genetski profil (Bandelj Mavsar, 2005).

Mikrosateliti so bili uspešno uporabljeni tudi v rastlinski genetiki pri ugotavljanju genetske sorodnosti med posamezniki. Ker se dedujejo kodominantno, so idealno orodje za starševske analize in analize rodovnikov. S pomočjo mikrosatelitov pridobivamo tudi informacije o žlahtnjenju neke rastline in strukturah populacij.

Mikrosatelitni markerji so lokusno specifični, zanje je značilen visok polimorfizem in kodominantno dedovanje. Uporabljajo se na različnih področjih populacijske genetike, v forenzični medicini, pri študijah sorodstvenih razmerij in določevanju starševstva, pri mapiranju genomov, služijo pa tudi kot markerji za nekatere degenerativne bolezni človeka. Mikrosatelitni markerji so tudi eden najbolj uporabnih markerskih sistemov pri študijah vinske trte, predvsem pri identifikaciji sort in izdelavi rodovnikov (Lavrenčič, 2006).

Analiza vinske trte velikokrat vključuje uporabo kombinacije različnih molekularskih markerjev in primerjavo z biokemijskimi markerji ter ampelografskimi opisi.

#### 2.3.2.4.1 Značilnosti mikrosatelitnih markerjev

Mikrosatelitni markerji združujejo več lastnosti primernih markerjev za preučevanje populacijske genetike. Obrobne sekvence mikrosatelitnih ponovljivih motivov so ohranjene. Na podlagi teh sekvenc izdelamo začetne oligonukleotide za pomnoževanje '*in vitro*' (Kozjak, 2001).

Prednosti mikrosatelitnih markerjev:

- so lokusno specifični,
- detekcija je enostavna s PCR pomnoževanjem in elektroforetskim ločevanjem namnoženih fragmentov,
- so pogosto zelo polimorfni, kar omogoča identifikacijo sort in izdelavo unikatnih alelnih profilov,
- zaradi njihove velike gostote v genomu predstavljajo teoretično neomejeno število markerjev,
- se kodominantno dedujejo, kar omogoča ločevanje homozigotov od heterozigotov in rekonstrukcijo križanj ter izdelavo rodovnikov,
- ponujajo možnost avtomatizacije in standardizacije določevanja dolžin alelov ter so primerljivi med laboratoriji,

- izolirani začetni oligonukleotidi iz ene vrste so lahko uporabni tudi pri drugi vrsti ali pri ozko sorodnih vrstah znotraj rodu in v določenih primerih tudi med rodovi znotraj družine,
- multikompleksen PCR omogoča pomnoževanje do 5 lokusov v eni sami PCR reakciji. Pri zelo optimiziranih sistemih z avtomatsko detekcijo pa lahko sočasno analiziramo tudi do 15 lokusov pri enem vzorcu.

Slabosti in omejitve mikrosatelitnih markerjev:

- Identifikacija mikrosatelitnih markerjev v določenem organizmu zahteva izdelavo in pregledovanje genomskih knjižnic, kar je dolgotrajen in cenovno potraten postopek.
- Potrebno je optimizirati verižno reakcijo s polimerazo za vsak par začetnih oligonukleotidov oz. za vsak posamezen lokus posebaj.
- Pri genotipizaciji z mikrosatelitnimi markerji se pojavljajo problemi povezani s PCR pomnoževanjem. Določeni aleli se zaradi substitucij, insercij ali delecij na mestih prilagajanja začetnih oligonukleotidov ne pomnožujejo. Take alele označujemo kot ničte alele.
- Zaradi zdrsa *Taq* polimeraze v času sinteze mikrosatelitov, predvsem pri pomnoževanju mono- in dinukleotidnih mikrosatelitov, nastanejo številni PCR produkti različnih dolžin, kar otežuje točno določanje alelov.

Dodatne probleme povzročajo fragmenti, ki se med seboj razlikujejo za en bazni par, kot posledica tandence *Taq* polimeraze ki lahko dodaja posamezne A nukleotide k PCR produktom. Tudi to dodatno otežuje določanje alelov.

Mikrosatelitni markerji se pri študijah vinske trte uporabljajo za:

- identifikacijo in razlikovanje sort,
- izdelavo rodovnikov na osnovi poznanih ali nepoznanih potekov križanj,
- proučevanje sorodstvenih odnosov med sortami,
- odkrivanje sinonimov in homonimov,
- razlikovanje klonov znotraj sort in odkrivanje možnih poliklonskih sort,
- proučevanje strukture populacij na osnovi genetske variabilnosti,
- proučevanje mutacij, evolucijskih procesov in filogenije,
- odkrivanje geografskega izvora ter
- izdelavo genetskih in fizičnih genomskih kart.

Podatki o identiteti sort in podlag vinske trte se shranjujejo v podatkovnih bazah, kar omogoča primerjavo med sortami in podlagami v svetovnem merilu. Ena od večji in vsakomur dostopnih podatkovnih baz za vinsko trto je grška podatkovna baza, dosopna na internetnem naslovu <http://gvd.biology.uoc.gr/gvd/index.htm> (Greek Vitis Database). Ta poleg ampelografskih opisov vključuje tudi genetske opise, izdelane z jedrnimi in kloroplastnimi mikrosateliti.

### 2.3.3 Identifikacija sort vinske trte

Glavni namen identifikacije namiznih in vinskih sort vinske trte ter podlag je ureditev kolekcij, komercialnih vinogradov in matičnih nasadov. Pri sortah in podlagah vinske trte se pojavljajo številni sinonimi in homonimi. Eden izmed razlogov za to so človeške migracije, pri čemer so po svetu s seboj prenašali rastlinski material. Pri prenosu je tako mnogokrat prišlo do zamenjave cepljenk ali poimenovanj, saj v olesenem stanju težko razlikujemo sorte. Tako so sorte dobivale nova imena (pojav sinonimov), ponekod pa so se osnovna imena obdržala in dodala le zemljepisna imena.

S poznavanjem identitete se izognemo napakam pri trgovanju in nepravilnem imenovanju ter sajenju sadik v vinograd. Zelo pomembno je poznavanje identitete izhodiščne trte za pridobivanje klonov. Poleg identifikacije posameznih sort in podlag je veliko raziskav namenjenih preučevanju sorodstvenih razmerij različnih tipov ene sorte in poznavanju genetske strukture sort, ki zajemajo večje število genetsko in morfološko podobnih tipov.

Prav tako je identifikacija sort izrednega pomena pri preverjanju sestave sortnih vin. Pri eni od takih analiz, ko so ugotavljali prisotnost sort v mešanem moštu in vinu, so dokazali, da je kljub dodatnim kvasovkam mogoče analizirati DNA vinske trte v fermentirajočem moštu, čeprav je detekcija namnoženih produktov s PCR odvisna od trajanja fermentacije. S trajanjem fermentacije se je povečala stopnja degradiranosti rastlinske DNA. Ta analiza kaže možnost uporabe mikrosatelitskih markerjev pri identifikaciji sort v komercialnih vinih (Siret in sod., 2000).

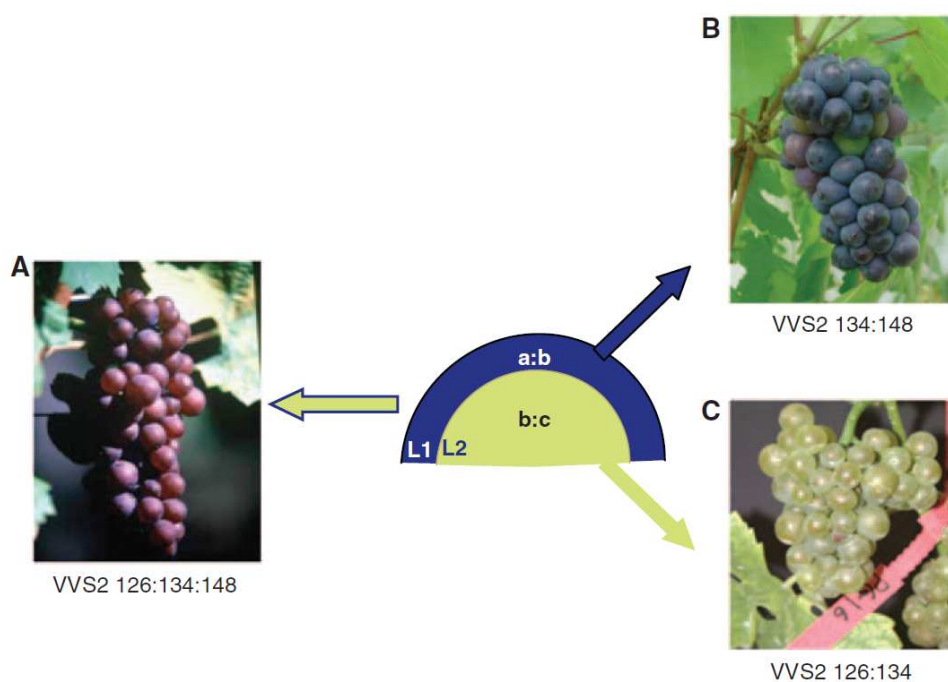
V zadnjih letih se za identifikacijo sort vinske trte uporablja tudi mikrosatelitne markerje. V okviru projekta GENRES CT96 081 so predlagali set štetih visoko informativnih mikrosatelitnih markerjev za razlikovanje sort vinske trte (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZag62, VrZag79) (This in sod., 2003). Vseh šest smo vključili v pričujoče delo in dodali še 2 lokusa (VVMD25, VVMD32).

#### 2.3.3.1 Študije klonske variabilnosti vinske trte in razlikovanje klonov s pomočjo molekularskih markerjev

Z izrazom klon opisujemo nespolno razmnoževanje brez cikla mejoze, kar rezultira v potomcih, ki naj bi bili identični izvorni rastlini, razen v primeru, ko se zgodi mutacija. Danes je vse več dokazov, da je »klonalnost« dinamičen koncept, genetska variabilnost se ustvarja z različnimi drugimi mehanizmi, ki so značilni za brezspolne cikle. Ti mehanizmi so naslednji: 1) somatske mutacije, 2) somaklonalna variabilnost, 3) delovanje retrotranspozonov, 4) pojav himer in 5) epigenetske spremembe. Vsi ti tipi mutacij so bili pri vinski trti potrjeni z uporabo molekularskih markerjev (Forneck, 2005). Pomembno vlogo pri variabilnosti ima tudi fitosanitarno stanje vinske trte, kjer lahko okužbe z virusi, viroidi ali fitoplazmami vplivajo na fenotipske spremembe.

Klonsko variabilnost kultivarjev vinske trte je nedavno v svojem delu dobro opisal Pelsy (2010). V delu je nazorno opisal variabilnost klonov vinske trte, ki poslednično kaže na različne genotipe, v nekaterih primerih pa tudi fenotipe.

Molekulski markerji se sedaj rutinsko uporabljajo pri študijah klonske variabilnosti vinske trte. V začetku so bolj uporabljali anonimne AFLP ali RAPD markerje, ti tehnologiji sta namreč ponujali boljšo resolucijo pri pregledovanju genoma vinske trte (Forneck in sod., 2003, Regner in sod., 2000). Mikrosatelitni markerji so se v začetku uporabljali predvsem za razlikovanje sort vinske trte in so domnevali, da so za študije klonske variabilnosti neprimerni. Kasneje so opisali veliko primerov, kjer lahko razlikujemo klone sort vinske trte z mikrosatelitnimi markerji npr. 'Sivi pinot' (Hocquigny in sod., 2004), 'Modri pinot', 'Chardonnay' (Riaz in sod., 2002), pri sinonimnih sortah 'Black Currant' in 'Mavri Corinthiaki' (Ibanez in sod., 2000) in tudi pri sorti 'Pikolit' (Zulini in sod., 2005). Prav študije z mikrosateliti so potrdile, da je razvoj himernih rastnih vršičkov glavni tip mutacij, ki povzroča klonsko variabilnost. Taka himera je lahko stabilizirana v obliki sorte, ki kaže na določenem lokusu 3 alele ali pa se izselekcioniira iz ravnega vršička samo en tip celic. Če ta nosi mutiran mikrosatelitni alel, ga tudi detekiramo. Potrditev himerne sorte 'Sivi pinot' in možen razvoj novih genotipov in fenotipske variabilnosti je s poskusom ločitve celic meristema v tkivni kulturi te sorte dokazal v svojem delu Pelsy (2010). Razlaga himernega stanja sorte 'Sivi pinot' iz omenjenega dela je predstavljena na sliki 1.



Slika 1: Razlaga himernega polimorfizma pri sorti 'Sivi pinot'. Sorta 'Sivi pinot' PG52 (A) ima himerni rastni vršiček, ki pri mikrosatelitnem lokusu VVS2 kaže 3 alele. To je posledica tega, da so skupki celic L1 in L2 ravnega vršička drugačnega genotipa. S pomočjo somatske embriogeneze so lahko regenerirali rastline (B), ki so imele genotip kot ga imajo L1 celice ravnega vršička in posledično dobili modro barvo grozda. Ko so sorta 'Sivi pinot' samooprašili pa so dobili drug heterozigoten genotip z belo barvo grozolja. (Pelsy, 2010)

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

Rastlinski material (liste in vršičke (slika 2)) 42-ih trt sorte 'Merlot' smo nabrali na začetku rastne dobe v letu 2008 na 31-ih različnih lokacijah vinorodnega okoliša Goriška brda (vinorodna dežela Primorska) ter v kolekcijskem nasadu v Kromberku pri Novi Gorici, kjer smo nabrali sedem vzorcev. Trte smo za čas poskusa označili zaradi potrebe po sledenju rastlin. Za referenčne sorte za lažjo primerjavo rezultatov pa smo izbrali osem sort, ki so že opisane v javnih bazah vinske trte. DNA teh vzorcev smo dobili v laboratoriju Katedre. Izbrane referenčne sorte so predstavljene v preglednici 1. Izbor vzorcev je prikazan v preglednici 2.

Preglednica 1: Referenčne sorte vinske trte, ki omogočajo medsebojno primerjavo rezultatov in smo jih vključili v analizo

Številka vzorca	Referenčne sorte:
1.	'Merlot', posajen v Sloveniji, ki je v predhodni analizi kazal mutacijo na mikrosatelitnem lokusu VVMD27
2.	standardni 'Merlot', pridobljen iz Francije (v nadaljevanju omenjen tudi kot francoski 'Merlot')
3.	'Modri pinot'
4.	'Chardonnay'
5.	'Cabarnet sauvignon'
6.	'Sultanina'
7.	'Touriga nacional'
8.	'Barbera'



Slika 2: Rastlinski material (listi in vršički) (Benedetič, 2010)

Preglednica 2: Nabrani in analizirani vzorci vinske trte sorte 'Merlot'

Št. vzorca:	NASLOV PARCELE: lastnik; kraj; vrsta-trta (3 vrsta, 3 trta)
1.	Božič Andrej, Zali breg 13 (3/3)
2.	Markučič Simon, Zali breg 6 (3/3)
3.	Marinič Miro, Zali breg 11 (3/3)
4.	Mikulin Milenka, Biljana 1 (3/3)
5.	Kristančič Jožef, Višnjevnik 39 (3/3)
6.	Polenčič Andrej, Senožeče 9 (3/3)
7.	Sirk Miloš, Drnovk 2 (3/3)
8.	Sirk Ivan, Višnjevnik 21 (3/3)
9.	Mužič Franc, Medana 7 (3/3)
10.	Kocina Vasilija, Medana 40,42 (3/3)
11.	Kocina Vasilija, Medana 40,42 (6/3)
12.	Gabrijelčič Barbara, Krasno 3 (3/3)
13.	Gabrijelčič Barbara, Krasno 3 (6/3)
14.	Skubin Roman, Medana (3/3)
15.	Mikolin Roman, Nova gorica (3/3)
16.	Medlešček Estera, Krasno 21a – Trbunk (3/3)
17.	Mikolin Iztok, Šolarca (3/3)
18.	Jakončič Silva, Vipolže (3/3)
19.	Marinič Silva, Biljana 42b (3/3)
20.	Benedetič Klemen, Oblanč (3/3)
21.	Kocina Adrijana, Vipolže 73b (3/3)
22.	Simčič Sergej, Vipolže 73a (3/3)
23.	Medvešček Estera, Roševi (3/3)
24.	Medvešček Estera, Roševi (3/3)
25.	Benedetič Klemen, Kočevo
26.	Benedetič Klemen, Kočevo (2 klon)
27.	Jakončič Uroš, Končevo (3/3)
28.	Jakončič Uroš, Pri bloku (3/3)
29.	Krapež Iztok, Pri bloku (3/3)
30.	Krapež Iztok, Pri bloku (6/3)
31.	Martinčič Iztok, Dol. Cerovo 44 (3/3)
32.	Martinčič Iztok, Dol. Cerovo 44 (6/3)
33.	Srebernič Hilaris, Dol. Cerovo 23 (3/3)
34.	Skočaj Ivo, Vipolže 74 (3/3)
35.	Kristančič Egidij, Vipolže 99 (3/3)
	<b>Kromberk</b>
36.	1. vrsta
37.	2. vrsta
38.	3. vrsta
39.	4. vrsta
40.	5. vrsta
41.	6. vrsta
42.	7. vrsta



### 3.1.1 Sorta 'Merlot'

#### 3.1.1.1 Poreklo

Sinonimi sorte 'Merlot' so 'Merlot crni', 'Merlou', 'Plant Medoc', 'Merlau', 'Pulliat vignole' (Francija), 'Bigney Vitraile' (Anglija). Geografski izvor sorte 'Merlot' je iz Francije (originalno ime 'Merlot noir'), in sicer iz okolice dežele Bordeaux (Medoc). Ta sorta je najbolj razširjena v njegovi domovini Franciji, najdemo pa ga tudi v številnih vinorodnih deželah zmerne klime, v Sloveniji pa ga smejo pridelovati samo v vinorodni deželi Primorska.

Po geografski razvrstitvi izvora *Vitis vinifera* L. spada sorta 'Merlot' v skupino zahodnoevropskih sort *Proles occidentalis* (Hrček in Korošec-Koruza, 1996) in podskupino *Gallica*.

Sorta 'Merlot' daje zelo kakovostna vina, srednje alkoholna, rubinasto rdeče barve. V sortimentu za Slovenijo je predvidna kot priporočena sorta v vseh okoliših primorskega rajona, razen v kraškem, kjer zavzema mesto dovoljene sorte (Nemanič, 1999).

#### 3.1.1.2 Botanični opis

Za sorto 'Merlot' je značilna srednje bujna rast in srednje do pozno dozorevanje grozdja. List je srednje velik, tro - ali petdelen, peceljni sinus pa ima obliko črke «U». List je globoko narezan, temnozelene barve, na spodnji strani rahlo pajčevinast, z izraženimi žilami. Listni pecelj je dolg, močan in nekoliko rdečkast (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Jagode so okroglaste oblike in modre barve z srednje debelo kožico in čvrstim mesom. Grozd je srednje velik, valjaste oblike in včasih z enim ali dvema krilcema. Trte sorte 'Merlot' dokaj bogato rodijo, posebno pri povišanih gojitvenih oblikah. Najustreznejši za to sorto je gojitvena oblika Guyot, pa tudi kordonski gojitveni sistem s povišanimi gojitvenimi oblikami. Na sliki 3 je prikazan vinograd sorte 'Merlot' z gojitveno obliko guyot.



Slika 3: Gojitvena oblika guyot (enošparonski vodoravno vezan) v vinogradu s sorto 'Merlot' (Benedetič, 2010)

Tej sorti najbolj ugajajo srednje težka in ne prevlažna tla ter odcedne in tople lege. Proti pezebi je sorazmerno dobro odporna. Dokaj odporna je proti peronospori (*Plasmopara viticola*) in oidiju (*Uncinula necator*), vendar občutljiva na sivo grozdno plesen (*Botrytis cinerea*) (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

### 3.1.1.3 Kloni sorte 'Merlot'

Klon je po botanični definiciji vegetativno razmnožen potomec izvorne matične rastline, ki je bil predhodno odbran na določeno lastnost v točno določenem postopku klonske selekcije in je neokužen z znanimi virusi in virozam podobnimi boleznimi (Schöffling in sod., 1993).

*Vitis vinifera* L. je vrsta, ki je v preteklosti v glavnem nastajala s tujim opraševanjem, kar se kaže v veliki heterozigotnosti potomcev. Z rekombinacijo starševskih genov so nastali potomci, ki se med seboj in tudi od staršev genetsko razlikujejo. Kljub temu pa je potomstvo nastalo s križanjem dveh različnih genotipov lahko med seboj fenotipsko podobno.

Klonski material dobimo z (Silvestroni in sod., 1997):

- vegetativnim razmnoževanjem ene rastline ali
- vegetativnim razmnoževanjem večih genetsko zelo sorodnih in fenotipsko podobnih rastlin.

Pri vegetativnem razmnoževanju lahko zaradi somatskih mutacij nastanejo različni biotipi. Kloni, ki izhajajo iz genetsko sorodnih trt so si kljub genetski raznolikosti lahko fenotipsko podobni, zaradi česar jih uvrščamo v isto sorto (Filipetti in sod., 1999). Za take klone je značilna morfološka uniformnost, ker izhajajo iz zelo sorodne ali izolirane populacije.

Pri morfološki raznolikosti klonov se poleg načina pridobivanja klonov upošteva tudi fitopatološki in okoljski vidik.

Klonska selekcija zajema odbiro in uradno potrjevanje klonov ter certifikacijo potrjenih klonov (vzdrževanje in razmnoževanje) (Topolovec, 1996). Temelj klonske selekcije v Sloveniji je pozitivna množična selekcija, pri kateri odbira matične trte za pridobivanje cepičev temelji na vizualnem pregledu fenotipa in na zdravstveni selekciji. Pozitivna množična selekcija poteka 5 let. Najboljše trte, ki jih imenujemo tudi elite gredo v postopek klonske selekcije.

#### 3.1.1.4 Zastopanost sorte 'Merlot' v vinorodni deželi Primorska

Leta 2007 je bilo na Primorskem 6835 ha vinogradov, od tega je 4691 ha ali 73 % vinogradov mlajših od 25 let. Mladi vinogradi imajo pogosto izenačeno sortno sestavo, po kakovosti in količini pa imajo izenačen pridelek (Škrjat, 2009). Nekaj splošnih podatkov je predstavljenih v preglednici 3.

Preglednica 3: Vinogradi, število pridelovalcev in povprečna velikost vinograda na pridelovalca po vinorodnih okoliših vinorodne dežele Primorska v Registru pridelovalcev grozdja in vina (Štabuc in sod., 2007)

Vinorodni okoliš	Vinogradi (ha)	Vinograd na pridelovalca (ha) RPGV	Število vinogradov	Število pridelovalcev
GORIŠKA BRDA	1963	2,24	3144	876
VIPAVSKA DOLINA	2573	1,37	4727	1871
KRAS	650	0,71	2452	905
SLOVENSKA ISTR	1648	1,69	2359	971
<b>PRIMORSKA</b>	<b>6835</b>	<b>1,48</b>	<b>12682</b>	<b>4623</b>
SLOVENIJA SKUPAJ	17192	0,61	22220	27773

Po zastopanosti sort v Sloveniji je na prvem mestu sorta 'Laški rizling', sledijo pa ji 'Refošk', 'Chardonnay' in 'Sauvignon'. Sorta 'Merlot' je po številu trt na petem mestu. V Primorski vinorodni deželi ima sorta 'Merlot' po številu posajenih trt največji delež (21 %) v vinorodnem okolišu Vipavska dolina, sledijo Goriška brda (19 %), nato Slovenska Istra (7 %), v vinorodnem okolišu Kras pa je najmanj. Zastopanost sort v Sloveniji je prikazana v preglednici 4.

Preglednica 4: Delež (%) sort vinske trte v Sloveniji glede na število trt (Štabuc in sod., 2007)

Sorta	Odstotek (%)	Sorta	Odstotek (%)
'Laški rizling'	15,9	'Renski rizling'	4,2
'Refošk'	7,4	'Modra frankinja'	3,7
'Chardonnay'	7,3	'Beli pinot'	3,5
'Sauvignon'	6,2	'Sivi pinot'	3,1
'Merlot'	6,1	'Cabernet sauvignon'	2,8
'Žametovka'	5,8	'Rumeni muškatac'	2,2
'Rebula'	4,7	'Kraljevina'	1,5
'Šipon'	4,6	'Zeleni sauvignon'	1,4
'Malvazija'	4,2	'Traminec'	1,2

### 3.2 METODE DELA

Liste in vršičke vinske trte sorte 'Merlot' smo nabrali v začetku rastne dobe v letu 2008. Rastlinski material smo nabirali na različnih lokacijah vinorodnega okoliša Goriška brda, ter v kolekcijskem nasadu Kromberk. Trte smo za čas poskusa označili, rastlinski material pa smo ustrezno zapakirali in shranili v hladilnik do prvih analiz.

Zaradi velike občutljivosti uporabljenih metod dela na kontaminacijo smo uporabljali avtoklavirano steklovino, plastiko, vodo in raztopine kemikalij. Prostorsko smo tudi ločili izolacijo DNA in njeno namnoževanje. Med delom smo PCR mešanice in vse druge uporabljene encime hranili na ledu. Večino del smo izvedli v sterilnih pogojih v brezprašni komori.

#### 3.2.1 Izolacija rastlinske DNA

Genomsko DNA smo izolirali iz mladih listov in vršičkov po CTAB metodi opisani po Kump in sod. (1992). Približno 1-2 cm<sup>2</sup> rastlinskega tkiva oziroma del vršička smo zdrobili v terilnici ob dodatku 2 ml CTAB ekstrakcijskega pufra [2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 % (v/v)  $\beta$ -merkaptotanol], ki je bil predhodno segret na 68 °C. Mešanico smo prenesli v 2 mikrocentrifugirki in inkubirali 1,5 – 2 uri pri 68 °C z občasnim mešanjem. Po končani inkubaciji smo vzorcem dodali mešanico kloroforma in izoamilalkohola pripravljene v razmerju 24:1 (za odstranjevanje proteinov) in jih dobro premešali. Suspenzije vzorcev smo centrifugirali 15 min pri relativni centrifugalni sili 12.000 g in pri temperaturi 4 °C (centrifuga Beckman J2-HS). Nato smo supernatant odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in postopek ponovili z namenom, da bi odstranili čim več proteinov. Supernatant smo nato previdno prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in DNA precipitirali z dodatkom 70  $\mu$ l 3M natrijevega acetata (pH 5,2) in 1 volumnom ledeno-hladnega izopropanola (ohlajen pri -20 °C). Vzorce smo premešali in jih ohladili v zmrzovalniku za najmanj pol ure. Nato smo jih

ponovno premešali in centrifugirali 10 min pri 12.000 g in temperaturi 4 °C. Ko smo odlili supernatant smo oborini dodali 1 ml 70 % etanola ter premešali, da se je usedla DNA odlepila od centrifugirke in vzorec ponovno centrifugirali 10 min pri 13.000 g. Po končanem centrifugiranju smo etanol odstranili in vzorce posušili pri sobni temperaturi. Oborini smo nato dodali 60 µl TE pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] in vzorce DNA shranili v hladilniku pri 4 °C, do nadaljnjih analiz.

### **3.2.2 Merjenje koncentracije DNA**

Koncentracijo DNA smo izmerili s pomočjo mini flourometra DynaQuant200 (Amersham Biosciences), po navodilih proizvajalca.

Za delovno raztopino smo uporabili filtrsko steriliziran 1X TNE pufer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4], ki smo mu predhodno dodali barvilo H33258 v koncentraciji 0,1 µg/ml (iz založne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml). Za umeritev aparata smo uporabili DNA telečjega priželjca v koncentraciji 100 ng/µl (raztopina pripravljena v 1X TNE pufru).

Glede na izmerjene koncentracije smo v destilirani vodi pripravili razredčitve DNA vzorcev vinske trte na 4 ng/µl. Te razredčitve smo hranili pri 4 °C.

### **3.2.3 Izbor začetnih oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo**

Za analizo DNA z mikrosateliti smo odbrali osem parov začetnih oligonukleotidov oziroma osem mikrosatelitnih lokusov. Izbor začetnih oligonukleotidov je temeljil na pogostosti uporabe mikrosatelitnih markerjev v strokovni literaturi in po izkušnjah iz laboratorija Katedre. Izbrani začetni oligonukleotidi so opisani v preglednici 5. Začetni oligonukleotid vsakega para je bil na 5' koncu iznačen s CY5 barvilom, kar je omogočalo kasnejšo fluorescentno detekcijo pomnoženih DNA fragmentov na ALF Express II laserski napravi. Z začetnim oligonukleotidom smo v PCR fragment vnesli omenjeno fluorescentno molekulo, na podlagi katere smo fragment lahko tudi vizualizirali.

Izbrali smo naslednje mikrosatelitske markerje:

- VVS2 (Thomas in Scott, 1993),
- VVMD5, VVMD7 (Bowers in sod., 1996),
- VVMD25, VVMD27, VVMD32 (Bowers in sod., 1999),
- ssrVrZAG62, ssrVrZAG79 (Sefc in sod., 1999).

Preglednica 5: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov (a – forward; b – reverse orientacija), a začetni oligonukleotid je bil na 5' koncu označen s CY5 fluorescentnim barvilom

Mikrosatelitni lokus		Bazno zaporedje začetnega oligonukleotida 5'→3'
VVS2	a	CAG CCC GTA AAT GTA TCC ATC
	b	AAA TTC AAA ATT CTA ATT CAA CTG G
VVMD5	a	CTA GAG CTA CGC CAA TCC AA
	b	TAT ACC AAA AAT CAT ATT CCT AAA
VVMD7	a	AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT
	b	CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT
VVMD25	a	TTC CGT TAA AGC AAA AGA AAA AGG
	b	TTG GAT TTG AAA TTT ATT GAG GGG
VVMD27	a	GTA CCA GAT CTG AAT ACA TCC GTA AGT
	b	ACG GGT ATA GAG CAA ACG GTG T
VVMD32	a	TAT GAT TTT TTA GGG GGG TGA GG
	b	GGA AAG ATG GGA TGA CTC GC
VrZAG62	a	GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C
	b	CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C
VrZAG79	a	AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G
	b	TGC CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C

### 3.2.4 Priprava DNA vzorcev za PCR

Na uspešno pomnoževanje PCR produktov v verižni reakciji s polimerazo vplivajo vse sestavine reakcijske mešanice, predvsem pa je pomembno količinsko razmerje med njimi.

Reakcijo PCR smo pripravili v končnem volumnu 10 µl. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 5 µl raztopine DNA s koncentracijo 4 ng/µl, torej smo v reakcijo dali 20 ng matrične DNA vinske trte. DNA smo nato dodali še 5 µl mixa, ki je bil sestavljen po naslednjem receptu: 1,95 µl dH<sub>2</sub>O (destilirane vode), 1 µl 10x koncentriranega PCR pufra, 0,2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µl mešanice deoksinukleotidov s koncentracijo 10 mM (dNTP), 0,5 µl vsakega začetnega oligonukleotida s koncentracijo 10 µM in 0,05 µl encima *Taq* DNA polimeraze s koncentracijo 5 enot/µl. Končni koncentracijski parametri PCR reakcije so bili naslednji: 20 ng matrične DNA, 1x PCR puffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM koncentracija dNTP, 0,5 µM koncentracija vsakega začetnega oligonukleotida in 0,25 enote encima *Taq* DNA polimeraze. Mix smo pripravili za vse vzorce skupaj s prebitkom 5-ih vzorcev in nato od njega odpipetirali 5 µl mixa za vsak vzorec. Na ta način smo dosegli enotne reakcijske pogoje med vsemi vzorci. Vzorce smo nato zopet centrifugirali za kratek čas in jih nato postavili v PCR napravo za pomnoževanje DNA (ciklični termostat). Sledilo je pomnoževanje po parametrih, ki so predstavljeni v naslednjem poglavju.

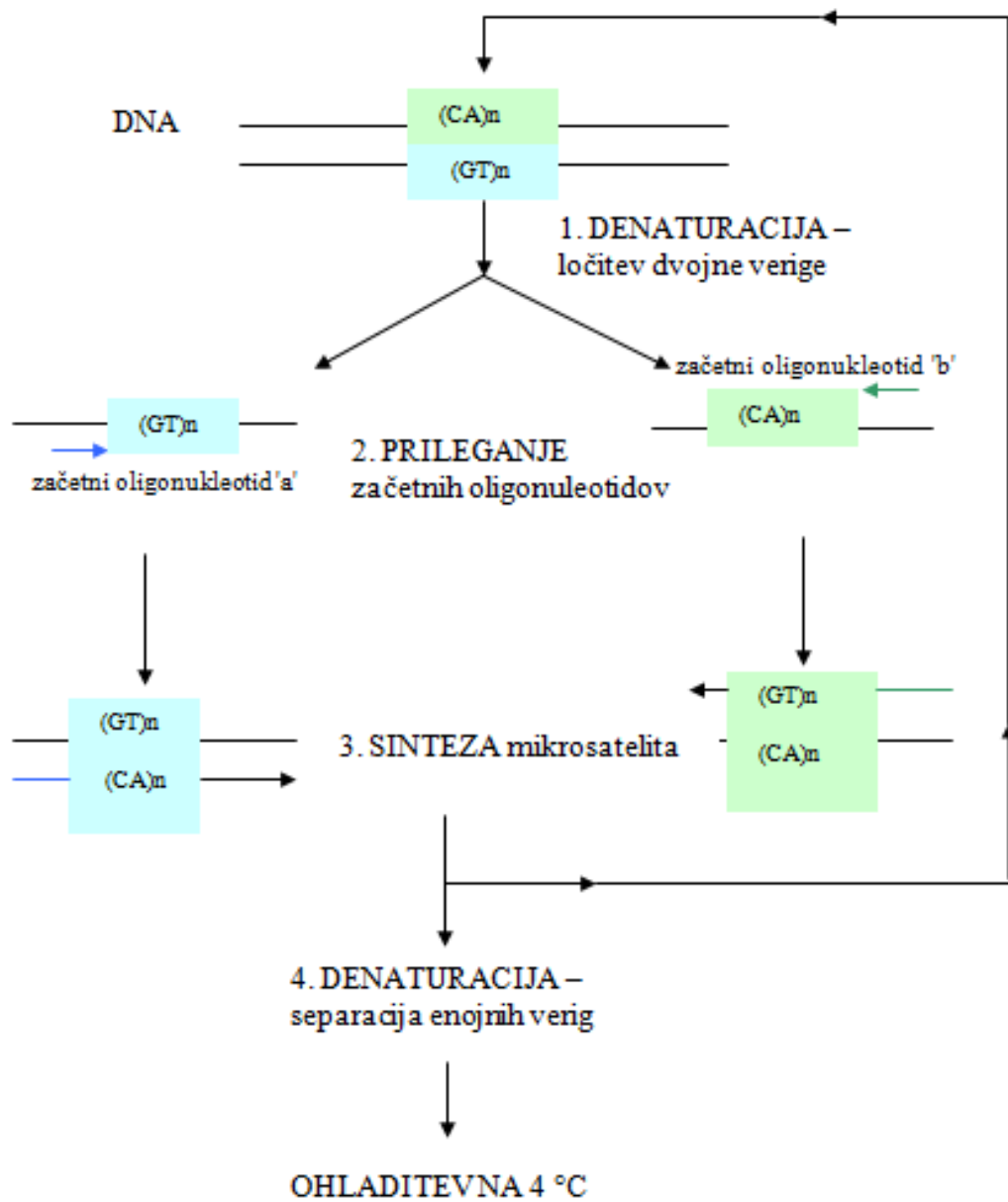
### 3.2.5 Namnoževanje mikrosatelitskih lokusov v PCR

Vsak lokus smo pomnoževali pri temperaturi prilagajanja, ki naj bi bila po teoretičnem izračunu sestave para začetnih oligonukleotidov, po podatkih iz literature in po izkušnjah laboratorija Katedre optimalna. Vzorce smo pomnoževali pri pogojih, ki so predstavljeni v preglednici 6, v treh različnih PCR napravah, ki so na voljo na Katedri. Med njimi ni opaznih razlik v delovanju, zato lahko pri pomnoževanju izberemo katerokoli PCR napravo (Applied Biosystems 9700, Applied Biosystems 2720 ali Biometra T-gradient).

Preglednica 6: Optimizirani pogoji verižne reakcije s polimerazo (PCR) za posamezen lokus uporabljen pri genotipizaciji vzorcev 'Merlot'

Lokus	Število ciklov pomnoževanja	Denaturacija		Prileganje začetnih oligonukleotidov		Sinteza DNA	
		T(°C)	Čas(s)	T(°C)	Čas(s)	T(°C)	Čas(s)
		VVS2	26	94	30	50	30
VVMD7	35	94	30	56	30	72	90
VVMD25	40	94	30	52	30	72	90
VVMD32	40	94	30	50	30	72	90
VVMD27	40	94	30	50	30	72	90
VVMD5	40	94	30	52	30	72	90
VrZAG62	30	94	30	52	30	72	90
VrZAG79	35	94	30	50	30	72	90

Pri denaturaciji in sintezi DNA fragmentov nismo spreminjali temperature in časa trajanja. Najpogosteje smo spreminjali temperaturo prilagajanja začetnih oligonukleotidov, medtem ko je bil čas trajanja nespremenjen. Temperatura in čas trajanja sta odvisni od baze sestave, dolžine in koncentracije začetnih oligonukleotidov. Potek enega cikla reakcije PCR je prikazan na sliki 4. Danes je na voljo več računalniških programov za izračunavanje temperature prilagajanja, ki naj bi bila nekaj stopinj celzija pod temperaturo talilne temperature začetnih oligonukleotidov.



Slika 4: Potek cikla PCR reakcije, primer pomnoževanja mikrosatelitnega lokusa (Kozjak, 2001)



### 3.2.6 Ločevanje PCR produktov

#### 3.2.6.1 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza

Za ločevanje PCR produktov (mikrosatelitov) smo uporabili ALFexpress II napravo (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska). Elektroforeza je potekala na vertikalno nameščeni kratki gelski kaseti. Gelska kasete je sestavljena iz spodnje termo plošče in zgornje navadne steklene plošče. Pred vlivanjem gela (8 % poliakrilamidni gel, sestavljen iz mešanice akrilamida in bisakrilamida v razmerju 19:1 in 7 M uree) v kaseto smo obe plošči dobro očistili z alkoholom in na zgornji del termo plošče nanесли 0,5 ml raztopine bindsilana [0,3 %  $\gamma$ -metakiloosipropil-trimetoksisilana, pripravljene v raztopini 95 % etanola in 2,5 % očetne kisline], da pri polimerizaciji gela dobimo stabilne žepke za vnos vzorcev, ki so pritrjeni na ploščo. Razmak med ploščama je bil 0,5 mm, kar ustreza debelini steklenih distančnikov ('spacer'). Distančniki so narejeni iz posebnega stekla, da lahko skozi njih prehaja laserski žarek, ki je nujno potreben za fluorescentno detekcijo. Po pripravi plošč in sestavljanju gelske kasete smo vlili gel (8 % denaturacijski poliakrilamidni gel, 19:1 razmerje akrilamid in bisakrilamid, 7 M urea in UV iniciator) in vstavili glavnik za žepke za 40 vzorcev. Polimerizacija gela je potekala z osvetljevanjem z UV lučjo 12 min.

Po končani polimerizaciji smo gelsko kaseto očistili in vstavili v napravo ALFexpress II in priključili termoploščo na termostatiran obtok vode. Kontrola temperature gela in same elektroforeze poteka s pomočjo kroženja vode v termo plošči. Ob zgornjem in spodnjem delu plošč se nahajata posodi v katere smo vlili mešanico 400 ml 5x TBE pufra [225 mM Tris, 225 mM borna kislina, 5 mM EDTA] in 1600 ml destilirane vode. Končna, delovna raztopina elektroforetskega pufra je torej bila 1x TBE [45 mM Tris, 45 mM borna kislina in 1 mM EDTA].

Pomnoženim PCR vzorcem smo pred nanosom na gel dodali 10  $\mu$ l nanašalnega barvila (Dextran blue v koncentraciji 10 mg/ml raztopljen v formamidu). Tik pred nanosom smo vzorce najprej centrifugirali in nato denaturirali 4 min pri 94 °C. Po denaturaciji smo jih takoj postavili na led, da smo preprečili nastanek sekundarnih struktur DNA. Vzorce smo tudi ves čas imeli zavarovane pred svetlobo, saj ta zmanjšuje jakost fluorescence. Ko je temperatura gela dosegla 55 °C smo nanесли vzorce. V vsak žepok polimeriziranega gela smo nanесли 5  $\mu$ l vzorca in dodali interni standard, kateri je omogočil poravnavo fragmentov enakih dolžin, saj med potekom elektroforezo lahko pride do odklona potovanja posameznih vzorcev. V prvi in zadnji žepok smo dodali tudi eksterni (dolžinski) standard 50-500 bp, ki je mešanica 10-ih DNA fragmentov znanih dolžin v območju od 50 do 500 bp v razmikih po 50 bp. Po končanem nanosu smo določili pogoje za elektroforezo (temperatura = 55 °C; napetost = 1500 V; tok = 60 mA; moč = 15 W). Elektroforeza je potekala 300 min oz. smo ustavili elektroforezo ročno prej v primeru, če smo potrdili, da smo detektirali že vse fragmente.

V času elektroforeze označeni fragmenti potujejo po gelu do območja proti koncu gela, kjer jih prestreže laserski žarek. Laserski žarek vzpodbudi molekulo CY5, ki je pritrjena na 5' koncu začetnega oligonukleotida (ekscitacija pri ~650 nm), ta pa začne oddajati svetlobo druge valovne dolžine (~670 nm) in to svetlobo emitira do fotodetektorjev, ki se nahajajo za ploščo. Signali se nato prenesejo do računalnika in krmilne programske opreme, kjer se prevedejo v kromatogram, ki ga vidimo na ekranu. Vrh krivulje predstavlja dolžino DNA fragmenta. Tako lahko vizualno opazujemo prehod fragmentov skozi območje laserskega žarka v obliki krivulje.

### 3.2.6.2 Interni in eksterni standard

DNA fragmente, pri katerih poznamo točno velikost oziroma dolžino, imenujemo dolžinski standardi. Ker vzorci po gelu potujejo nekoliko različno, bi brez fragmentov znanih dolžin lahko ocenili različne velikosti tudi pri vzorcih, ki so dejansko enakih dolžin. Temu problemu smo se izognili z dodajanjem internih standardov, medtem ko eksterni standardi služijo še za natančno določevanje dolžine v določenem dolžinskem območju. Vsaka standardna krivulja je izračunana iz referenčnih točk zunanjega standarda, ki določajo razmerje med časom potovanja in dolžino DNA molekule.

Eksterne standarde nanašamo samostojno brez vzorca v svoj žep. Če imamo nanosenih več zunanjih standardov bo standardna krivulja vzorcev izračunana kot tehtna sredina vseh standardnih fragmentov. Eksterni standard mora vsebovati vsaj dva fragmenta znanih dolžin. V našem primerju je eksterni standard sestavljalo 10 DNA fragmentov znanih dolžin v območju 50-500 bp.

Interne standarde nanesemo na gel skupaj z vzorci. Pri tem moramo paziti, da se dolžine fragmentov internih standardov ne prekrivajo s pričakovanimi dolžinami naših vzorcev. V našem primerju smo tako uporabili za analizirane lokuse naslednje interne standarde:

- lokus VVS2 interni standard 200 bp
- lokus VVMD7 interni standard 200 bp
- lokus VVMD25 interni standard 200 bp
- lokus VVMD32 interni standard 200 bp
- lokus VVMD27 interni standard 150 bp
- lokus VVMD5 interni standard 200 bp
- lokus VrZAG62 interni standard 150 bp
- lokus VrZAG79 interni standard 200 bp.

Za natančnejše določanje dolžin fragmentov na gelu sočasno uporabimo interne in eksterne standarde. Za pregledovanje rezultatov-kromatogramov smo uporabili računalniški program Allelocator 1.03 (Amersham Pharmacia Bitech, Uppsala, Švedska), ki prilagodi standardne krivulje za posamezni vzorec in tako nadomesti razlike v potovanju vzorcev zaradi razlik v gelu. Program omogoča tudi določevanje dolžin našim neznanim mikrosatelitnim alelom.

### 3.2.7 Določevanje dolžin mikrosatelitov

Po končani elektroforezi na ALFexpress napravi smo prenesli podane krivulje v računalniški program AlleleLocator1.03 (Amersham Pharmacia Biotech, Upssala, Švedska). Pri genotipizaciji smo najprej določili dolžine internih in eksternih standardov in poravnavali elektroferogram in izničili morebitne anomalije pri potovanju DNA fragmentov. Po vnosu teh podatkov dobimo točne velikosti vrhov krivulj fragmentov-alelov za analizirane mikrosatelitne lokuse. Nato smo naredili enostavno podatkovno bazo genotipov analiziranih vzorcev v Excel preglednici za vsak posamezen lokus.

Pri vrednotenju podatkov in določevanju smo si pomagali z javno dostopnimi podatkovnimi bazami mikrosatelitnih polimorfizmov vinske trte, v katerih so zajete dolžine pomembnejših lokusov (grška, italijanska in švicarska, dostopne na <http://gvd.biology.uoc.gr/gvd/index.htm>, <http://meteo.iasma.it/genetica/gmc.html>, <http://www1.unine.ch/svmd/?alpha=R>).

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZOLACIJA DNA

S CTAB metodo smo uspešno izolirali DNA vzorcev sorte 'Merlot' in izmerili koncentracijo s pomočjo fluorimetrije. DNA koncentracije so bile od 24 µg/ml do 1251 µg/ml, povprečna 475,6 µg/ml. Izmerjene koncentracije posameznih vzorcev so prikazane v preglednici 7.

Preglednica 7: S fluorimetrijo določene koncentracije DNA posameznih vzorcev vinske trte sorte 'Merlot'

ŠT. VZORCA	NASLOV PARCELE: lastnik; kraj; vrsta-trta (3vrsta, 3trta)	KONCENTRACIJA DNA (µg/ml)
1.	Božič Andrej, Zali breg 13 (3/3)	396
2.	Markučič Simon, Zali breg 6 (3/3)	257
3.	Marinič Miro, Zali breg 11 (3/3)	75
4.	Mikulin Milenka, Biljana 1 (3/3)	24
5.	Kristančič Jožef, Višnjevnik 39 (3/3)	58
6.	Polenčič Andrej, Senožeče 9 (3/3)	16
7.	Sirk Miloš, Drnovk 2 (3/3)	90
8.	Sirk Ivan, Višnjevnik 21 (3/3)	18
9.	Mužič Franc, Medana 7 (3/3)	129
10.	Kocina Vasilija, Medana 40,42 (3/3)	365
11.	Kocina Vasilija, Medana 40,42 (6/3)	312
12.	Gabrijelčič Barbara, Krasno 3 (3/3)	721
13.	Gabrijelčič Barbara, Krasno 3 (6/3)	104
14.	Skubin Roman, Medana (3/3)	344
15.	Mikolin Roman, Nova gorica (3/3)	364
16.	Medlešček Estera, Krasno 21a	1251
17.	Mikolin Iztok, Šolarca (3/3)	530
18.	Jakončič Silva, Vipolže (3/3)	425
19.	Marinič Silva, Biljana 42b (3/3)	112
20.	Benedetič Klemen, Oblanč (3/3)	708
21.	Kocina Adrijana, Vipolže 73b (3/3)	957
22.	Simčič Sergej, Vipolže 73a (3/3)	836
23.	Medvešček Estera, Roševi (3/3)	992
24.	Medvešček Estera, Roševi (3/3)	630
25.	Benedetič Klemen, Kočevo	964
26.	Benedetič Klemen, Kočevo (2 klon)	806
27.	Jakončič Uroš, Končevo (3/3)	940
28.	Jakončič Uroš, Pri bloku (3/3)	585
29.	Krapež Iztok, Pri bloku (3/3)	382
30.	Krapež Iztok, Pri bloku (6/3)	198
31.	Martinčič Iztok, Dol. Cerovo 44 (3/3)	485
32.	Martinčič Iztok, Dol. Cerovo 44 (6/3)	108

se nadaljuje

nadaljevanje

ŠT. VZORCA	NASLOV PARCELE: lastnik; kraj; vrsta-trta (3vrsta, 3trta)	KONCENTRACIJA DNA ( µg/ml )
33.	Srebernič Hilaris, Dol. Cerovo 23 (3/3)	276
34.	Skočaj Ivo, Vipolže 74 (3/3)	576
35.	Kristančič Egidij, Vipolže 99 (3/3)	738
	<b>Kromberk</b>	
36.	1. vrsta	432
37.	2. vrsta	336
38.	3. vrsta	635
39.	4. vrsta	227
40.	5. vrsta	382
41.	6. vrsta	515
42.	7. vrsta	342

## 4.2 GENOTIPIZACIJA

Uspešno smo pomnožili mikrosatelitne polimorfizme pri 39 analiziranih sorta vinske trte sorte 'Merlot' in pri osmih standardnih sortah na osmih mikrosatelitnih lokusih. Pri treh vzorcih nismo uspeli pomnožiti polimorfizmov kljub ponavljanju, zato smo te vzorce izločili iz nadaljnje analize. Predpostavljamo, da je bila pri teh vzorcih DNA slabe kakovosti. To so vzorci 5, 6 in 8 (Kristančič Jožef, Višnjevnik 39 (3/3), Polenčič Andrej, Senožeče 9 (3/3), Sirk Ivan, Višnjevnik 21 (3/3)).

### 4.2.1 Določanje dolžin mikrosatelitnih alelov

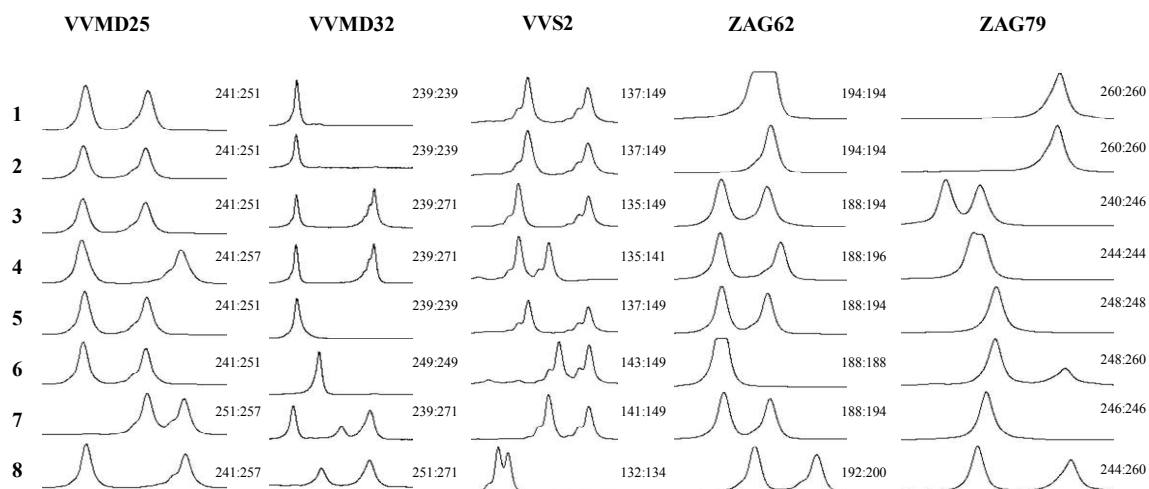
Dolžine alelov na posameznem lokusu smo določili z računalniškim programom AlleleLocator1.03. Izračun temelji na podlagi izračuna dolžine poti vzorcev v primerjavi s potjo internih in eksternih standardov. Zaradi natančnosti ALFexpress aparata in računalniškega programa so dolžine alelov izpisane z decimalnimi števili, kar pa lahko oteži določevanje dolžin. Ko zaokrožujemo po decimalnem sistemu na 0,5 baze, moramo biti previdni, ker se s tem poveča verjetnost napak, ki se izrazijo kot genetska variabilnost.

Pri analizi naših vzorcev smo izmerili naslednje dolžine alelov pri posameznih lokusih:

- Lokus VVS2: pomnožili smo sedem različnih alelov: 132, 134, 135, 137, 141, 143 in 149 bp. Od teh sedmih alelov jih je bilo vseh v standardnih osmih sortah, medtem ko smo pri 39 vzorcih 'Merlota' pomnožili štiri različne alele pri tem lokusu: 135, 137, 141, 149 bp. Standardni francoski 'Merlot' in slovenski vzorec sorte 'Merlot' sta imela pri tem lokusu alela 137 in 149 bp.
- Lokus VrZAG62: pomnožili smo pet različnih alelov: 188, 192, 194, 196 in 200 bp. Od teh petih alelov jih je bilo vseh pet v standardnih sortah, medtem ko smo pri 39 vzorcih 'Merlota' pomnožili tri različne alele pri tem lokusu: 188, 194, 196 bp. Standardna francoska sorta 'Merlot' in slovenski vzorec sorte 'Merlot' sta imela pri tem lokusu alel 194 bp.

- Lokus VrZAG79: pomnožili smo pet različnih alelov: 240, 244, 246, 248 in 260 bp. Od teh petih alelov je bilo vseh pet prisotnih v standardnih sortah, medtem ko smo pri 39 vzorcih 'Merlota' pomnožili dva različna alela pri tem lokusu: 244 in 260 bp. Standardni francoski 'Merlot' in slovenski vzorec sorte 'Merlot' sta imela pri tem lokusu alel 260 bp.
- Lokus VVMD5: pomnožili smo sedem različnih alelov: 224, 226, 230, 232, 234, 236 in 238 bp. Od teh sedmih alelov je bilo vseh sedem v standardnih sortah, medtem ko smo pri 39 vzorcih 'Merlota' pomnožili štiri različne alele pri tem lokusu: 224, 232, 234, 236 bp. Standardni francoski 'Merlot' in slovenski vzorec sorte 'Merlot' sta imela pri tem lokusu alela 224 in 234 bp.
- Lokus VVMD7: pomnožili smo pet različnih alelov: 239, 243, 247, 249 in 253 bp. Od teh petih alelov je bilo vseh pet prisotnih v standardnih sortah, medtem ko smo pri 39 vzorcih 'Merlota' pomnožili tri različne alele pri tem lokusu: 239, 243 in 247 bp. Standardni francoski 'Merlot' in slovenski vzorec sorte 'Merlot' sta imela pri tem lokusu alela 239 in 247 bp.
- Lokus VVMD25: pomnožili smo tri različne alele: 241, 251 in 257 bp. Od teh 3 alelov so bili vsi trije v standardnih sortah, medtem ko smo pri 39 vzorcih 'Merlota' pomnožili enake tri alele pri tem lokusu: 241, 251 in 257 bp. Standardni francoski 'Merlot' in slovenski vzorec sorte 'Merlot' sta imela pri tem lokusu alela 241 in 251 bp.
- Lokus VVMD27: pomnožili smo sedem različnih alelov: 176, 182, 186, 188, 190, 192 in 195 bp. Od teh sedmih alelov je bilo vseh sedem v standardnih sortah, medtem ko smo pri 39 vzorcih 'Merlota' pomnožili štiri različne alele pri tem lokusu: 182, 188, 190 in 192 bp. Standardni francoski 'Merlot' in slovenski vzorec sorte 'Merlot' sta imela pri tem lokusu tri alele 188, 190 in 192 bp. Odkrit polimorfizem pri tem lokusu je bil tudi povod za našo raziskavo, saj smo ravno pri tem lokusu odkrili razhajanje med standardno francosko sorto 'Merlot' in slovenskim vzorcem sorte 'Merlot'. Prvi ima dva alela 190 in 192, medtem ko je slovenski 'Merlot' imel dva alela dolžine 188 in 192 bp. Različna sta torej alelela 188 in 190 bp. Alel 188 bp smo odkrili še v 9-ih analiziranih vzorcih sorte 'Merlot' in sicer pri 3, 19, 27, 36, 37, 38, 39, 41 in 42 od tega jih je bilo kar 6 od 9-ih iz selekcijskega vinograda Kromberk.
- Lokus VVMD32: pomnožili smo štiri različne alele: 239, 249, 251 in 271 bp. Od teh štirih alelov so bili vsi štirje prisotni v standardnih sortah, medtem ko smo pri 39-ih vzorcih 'Merlota' pomnožili dva različna alela pri tem lokusu: 239 in 271 bp. Standardni francoski 'Merlot' in slovenski vzorec sorte 'Merlot' sta imela pri tem lokusu alel 239 bp.

Primer alelnih polimorfizmov za osem referenčnih vzorcev in pet analiziranih lokusov je prikazanih na sliki 5.



Slika 5: Primer polimorfizma osmih standardnih vzorcev sort vinske trte pri petih analiziranih mikrosatelitnih lokusih: VVMD25, VVMD32, VVS2, ZAG62 in ZAG79. Pri strani so pri vsakem kultivarju zapisani genotipi v obliki izmerjenih dolžin alelov, glej tudi preglednico 8. Sort vinske trte so naslednji: 1- Slovenski 'Merlot', ki je v predhodni analizi kazal mutacijo na mikrosatelitnem lokusu VVMD27, 2-standardni 'Merlot', pridobljen iz Francije, 3-'Modri pinot', 4-'Chardonnay', 5-'Cabernet sauvignon', 6-'Sultanina', 7-'Touriga nacional' in 8-'Barbera'

Preglednica 8: Alelni profili in genotipi analiziranih sort vinske trte pri osmih mikrosatelitnih lokusih, vzorci 1-8 so standardne sorte, ki se uporabljajo pri genotipizaciji in omogočajo primerjavo z javno dostopnimi bazami genotipskih podatkov (vzorec 1 je slovenski 'Merlot', pri katerem je bila odkrita mutacija pri lokusu VVMD27, vzorec 2 pa je standardna sorta 'Merlot' pridobljena iz Francije), sledi 39 vzorcev sorte 'Merlot' vzorčenih v tej nalogi

Ime	VVS2	VVS2	VrZAG 62	VrZAG 79	VrZAG 62	VrZAG 79	VrZAG 79	VVM D5	VVM D5	VVM D7	VVM D7	VVM D25	VVM D25	VVM D27	VVM D27	VVM D32	VVM D32
'Merlot' konsenzus	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	188+190	192	239	239
1-'Merlot'-SI	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239
2-'Merlot'-FRANCOSKI	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
3-'Modri pinot'	135	149	188	194	194	240	246	226	236	239	243	241	251	186	190	239	271
4-'Chardonnay'	135	141	188	196	196	244	244	232	236	239	243	241	257	182	190	239	271
5-'Cabernet sauvignon'	137	149	188	194	194	248	248	230	238	239	239	241	251	176	190	239	239
6-'Sultanine'	143	149	188	188	188	248	260	232	232	239	253	241	251	182	195	249	249
7-'Touriga nacional'	141	149	188	194	194	246	246	224	234	239	239	251	257	182	190	239	271
8-'Barbera'	132	134	192	200	194	244	260	224	224	249	253	241	257	186	190	251	271
1-Božič Andrej	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
2-Markučič Simon	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
3-Marinič Miro	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239
4-Mikulin Milenka	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
7-Sirk Miloš	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
9-Mužič Franc	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
10-Kocina Vasilija	135	141	188	196	194	244	244	232	236	239	243	241	257	182	190	239	271
11-Kocina Vasilija	135	141	188	196	194	244	244	232	236	239	243	241	257	182	190	239	271
12-Gabrijelič Barbara	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
13-Gabrijelič Barbara	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
14-Skubin Roman	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
15-Mikolin Roman	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
16-Medlešček Estera	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
17-Mikolin Iztok	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
18-Jakončič Silva	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239
19-Marinič Silva	137	149	194	194	194	np	np	np	np	239	247	241	251	188	192	239	239
20-Benedetič Klemen	137	149	194	194	194	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239

se nadaljuje



nadaljevanje

Ime	VVS2	VVS2	VrZAG	VrZAG	VrZAG	VrZAG	VrZAG	VrZAG	VrZAG	VVM	VVM	VVM	VVM	VVM	VVM	VVM	VVM	VVM	VVM
			62	62	79	79	79	D5	D5	D7	D7	D25	D25	D27	D27	D27	D32	D32	D32
21-Kocina Adrijana	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
22-Simčič Sergej	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
23-Medvešek Estera	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
24-Medvešek Estera	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
25-Benedetič Klemen	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
26-Benedetič Klemen (2 klon)	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
27-Jakončič Uroš	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239	239	239
28-Jakončič Uroš	135	141	188	196	244	244	244	232	236	239	247	241	257	182	190	239	271	271	271
29-Krapež Iztok	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
30-Krapež Iztok	137	149	np	np	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
31-Martinčič Iztok	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
32-Martinčič Iztok	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
33-Srebernič Hilaris	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
34-Skočaj Ivo	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
35-Kristiančič Egidij	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
36-1. vrsta, Kromberk	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239	239	239
37-2. vrsta, Kromberk	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239	239	239
38-3. vrsta, Kromberk	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239	239	239
39-4. vrsta, Kromberk	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239	239	239
40-5. vrsta, Kromberk	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	190	192	239	239	239	239
41-6. vrsta, Kromberk	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239	239	239
42-7. vrsta, Kromberk	137	149	194	194	260	260	260	224	234	239	247	241	251	188	192	239	239	239	239

np – ni podatka, pomnoževanje neuspešno kljub ponavljanju

#### 4.2.2 Genotipi analiziranih sort vinske trte

Napravili smo tudi analizo genotipov na posamezen lokus, ki je predstavljena v nadaljevanju. Genotipi so prikazani z dolžinami alelov, npr. francoska trta sorte 'Merlot' ima na lokusu VVS2 dva alela 137 in 149 bp, zato lahko njegov genotip prikažemo kot 137:149. Glej tudi preglednico 8.

- Lokus VVS2:

Pri osmih analiziranih referenčnih genotipih 'Merlot' SI, 'Merlot' FR, 'Modri pinot', 'Chardonnay', 'Cabernet sauvignon', 'Sultanina', 'Touriga nacional' in 'Barbera' smo pri tem lokusu odkrili šest različnih genotipov : slovenski, francoski 'Merlot' in 'Cabernet sauvignon' imajo enak genotip 137:149, 'Modri pinot' ima genotip 135:149, 'Chardonnay' 135:141, 'Sultanina' 143:149, 'Touriga nacional' 141:149 in 'Barbera' 132:134.

Med vzorčenimi slovenskimi trtami v nasadih 'Merlota' smo na tem lokusu zasledili prisotnost dveh različnih genotipov: genotip 135:141 pri vzorcih 10, 11 in 28, ter genotip 137:149 pri vseh ostalih vzorcih. Slednji genotip je bil enak genotipu slovenskega in francoskega 'Merlota'.

- Lokus VrZAG62:

Pri osmih referenčnih genotipih 'Merlot' SI, 'Merlot' FR, 'Modri pinot', 'Chardonnay', 'Cabernet sauvignon', 'Sultanina', 'Touriga nacional' in 'Barbera' smo pri tem lokusu odkrili pet različnih genotipov : slovenski in francoski 'Merlot' imata genotip 194:194 (se pravi da je 'Merlot' tukaj homozigoten), 'Modri pinot', 'Cabernet sauvignon' in 'Touriga nacional' imajo genotip 188:194, 'Chardonnay' 188:196, 'Sultanina' 188:188 in 'Barbera' 192:200.

Med vzorčenimi slovenskimi trtami v nasadih 'Merlota' smo na tem lokusu zasledili prisotnost dveh različnih genotipov: genotip 188:196 pri vzorcih 10, 11 in 28, ter genotip 194:194 pri vseh ostalih vzorcih. Slednji genotip je bil enak genotipu slovenskega in francoskega 'Merlota'.

- Lokus VrZAG79:

Pri osmih referenčnih genotipih 'Merlot' SI, 'Merlot' FR, 'Modri pinot', 'Chardonnay', 'Cabernet sauvignon', 'Sultanina', 'Touriga nacional' in 'Barbera' smo pri tem lokusu določili sedem različnih genotipov: slovenski in francoski 'Merlot' 260:260, 'Modri pinot' 240:246, 'Chardonnay' 244:244, 'Cabernet sauvignon' 248:248, 'Sultanina' 248:260, 'Touriga nacional' 246:246 in 'Barbera' 244:260.

Med vzorčenimi slovenskimi trtami v nasadih 'Merlota' smo na tem lokusu zasledili prisotnost dveh različnih genotipov: genotip 244:244 pri vzorcih 10, 11 in 28, ter genotip 260:260 pri vseh ostalih vzorcih. Slednji genotip je bil enak genotipu slovenskega in francoskega 'Merlota'.

- Lokus VVMD5:  
Pri osmih referenčnih genotipih 'Merlot' SI, 'Merlot' FR, 'Modri pinot', 'Chardonnay', 'Cabernet sauvignon', 'Sultanina', 'Touriga nacional' in 'Barbera' smo pri tem lokusu določili šest različnih genotipov: slovenski in francoski 'Merlot' ter 'Touriga nacional' imajo genotip 224:234, 'Modri pinot' 226:236, 'Chardonnay' 232:236, 'Cabernet sauvignon' 230:238, 'Sultanina' 232:232 in 'Barbera' 224:224. Med vzorčenimi trtami v nasadih 'Merlota' smo na tem lokusu zasledili prisotnost dveh različnih genotipov: genotip 232:236 pri vzorcih 10, 11 in 28, ter genotip 224:234 pri vseh ostalih vzorcih. Slednji genotip je bil enak genotipu slovenskega in francoskega 'Merlota'.
- Lokus VVMD7:  
Pri osmih referenčnih genotipih 'Merlot' SI, 'Merlot' FR, 'Modri pinot', 'Chardonnay', 'Cabernet sauvignon', 'Sultanina', 'Touriga nacional' in 'Barbera' smo pri lokusu VVMD7 določili pet različnih genotipov: slovenski in francoski 'Merlot' imata genotip 239:247, 'Modri pinot' in 'Chardonnay' 239:243, 'Cabernet sauvignon' in 'Touriga nacional' 239:239, 'Sultanina' 239:253 in 'Barbera' 249:253. Med vzorčenimi slovenskimi trtami v nasadih 'Merlota' smo na tem lokusu zasledili prisotnost dveh različnih genotipov: genotip 239:243 pri vzorcih 10, 11 in 28, ter genotip 239:247 pri vseh ostalih vzorcih. Slednji genotip je bil enak genotipu slovenskega in francoskega 'Merlota'.
- Lokus VVMD25:  
Pri osmih referenčnih genotipih 'Merlot' SI, 'Merlot' FR, 'Modri pinot', 'Chardonnay', 'Cabernet sauvignon', 'Sultanina', 'Touriga nacional' in 'Barbera' smo pri lokusu VVMD25 odkrili tri različne genotipe: slovenski in francoski 'Merlot', 'Modri pinot', 'Cabernet sauvignon' in 'Sultanina' imajo genotip 241:251, 'Chardonnay' in 'Barbera' imata genotip 241:257 in 'Touriga nacional' 251:257. Med vzorčenimi trtami v nasadih 'Merlota' smo na tem lokusu zasledili prisotnost dveh različnih genotipov: genotip 241:257 pri vzorcih 10, 11 in 28, ter genotip 241:251 pri vseh ostalih vzorcih. Slednji genotip je bil enak genotipu slovenskega in francoskega 'Merlota'.
- Lokus VVMD27:  
Pri tem lokusu smo predhodno odkrili razliko med francoskim standardnim vzorcem 'Merlota' in slovenskim vzorcem 'Merlota'. Pričujoč polimorfizem je bil tudi povod za to diplomsko delo. Pri osmih referenčnih genotipih 'Merlot' SI, 'Merlot' FR, 'Modri pinot', 'Chardonnay', 'Cabernet sauvignon', 'Sultanina', 'Touriga nacional' in 'Barbera' smo pri lokusu VVMD27 odkrili šest različnih genotipov: 'Merlot' SI 188:192, 'Merlot' FR 190:192, 'Modri pinot' in 'Barbera' imata genotip 186:190, 'Chardonnay' in 'Touriga nacional' 182:190, 'Cabernet sauvignon' 176:190 in 'Sultanina' 182:195.

Med vzorčenimi trtami v nasadih 'Merlota' smo na tem lokusu zasledili prisotnost treh različnih genotipov: genotip 182:190 pri vzorcih 10, 11 in 28, genotip 188:192 pri devetih vzorcih (3, 19, 27, 36, 37, 38, 39, 41, 42) ter genotip 190:192 pri vseh ostalih vzorcih. Slednji genotip je bil enak genotipu francoskega 'Merlota'.

- Lokus VVMD32:

Pri osmih referenčnih genotipih 'Merlot' SI, 'Merlot' FR, 'Modri pinot', 'Chardonnay', 'Cabernet sauvignon', 'Sultanina', 'Touriga nacional' in 'Barbera' smo pri lokusu VVMD32 potrdili štiri različne genotipe: slovenski in francoski 'Merlot' ter 'Cabernet sauvignon' imajo genotip 239:239 (so homozigoti), 'Modri pinot', 'Chardonnay' in 'Touriga nacional' imajo genotip 239:271, 'Sultanina' 249:249 in 'Barbera' 251:271.

Med vzorčenimi slovenskimi trtami v nasadih 'Merlota' smo na tem lokusu zasledili prisotnost dveh različnih genotipov: genotip 239:271 pri vzorcih 10, 11 in 28, ter genotip 239:239 pri vseh ostalih vzorcih. Slednji genotip je bil enak genotipu slovenskega in francoskega 'Merlota'.

#### 4.2.3 Identifikacija vzorcev 10, 11 in 28

Trije vzorci trt 10, 11 in 28 so na vseh lokusih kazali različne profile v primerjavi s sorto 'Merlot', medtem ko so vsi trije vzorci imeli identičen genotip. Torej lahko zaključimo, da gre za isto sorto, ki pa vsekakor ni 'Merlot' ali njegova mutacija, saj je razlika na vseh osmih lokusih prevelika za možnost mutanta. Po primerjavi profila z analiziranimi standardnimi sortami je bilo razvidno na vseh osmih lokusih, da imajo vzorci identični profil s standardno DNA sorte 'Chardonnay'. Torej gre v primerih vzorcev 10, 11 in 28 za sorto 'Chardonnay'. Verjetno je šlo ponovno saditev propadle trte v vinogradu 'Merlot' s sorto 'Chardonnay'.

Primerjave genotipov standardnih vzorcev 'Merlot', 'Chardonnay' in vzorcev 10, 11 in 28 so prikazani v preglednici 9.

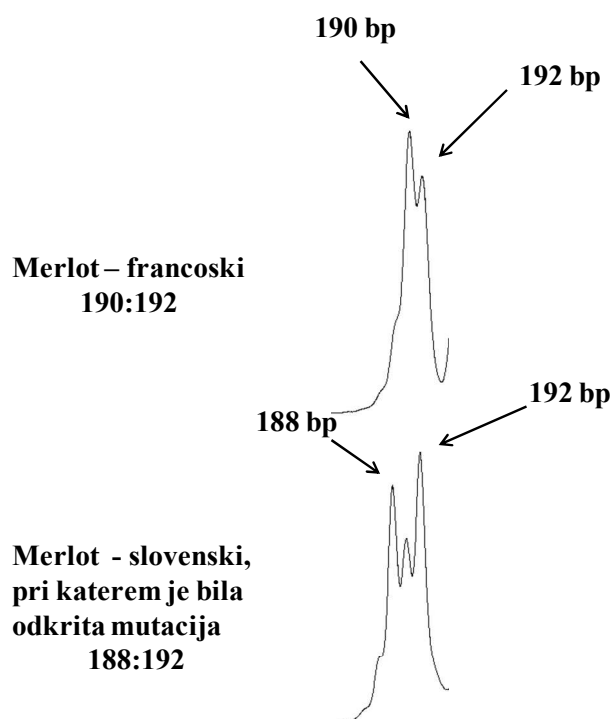
Preglednica 9: Primerjava genotipov med standardnimi sortami 'Merlot', 'Chardonnay' in izstopajočimi vzorci 10, 11 in 28

Lokus/Vzorec	'Merlot' SI	'Merlot' FR	'Chardonnay'	Vzorec 10	Vzorec 11	Vzorec 28
VVS2	137:149	137:149	135:141	135:141	135:141	135:141
VrZAG62	194:194	194:194	188:196	188:196	188:196	188:196
VrZAG79	260:260	260:260	244:244	244:244	244:244	244:244
VVMD5	224:234	224:234	232:236	232:236	232:236	232:236
VVMD7	239:247	239:247	239:243	239:243	239:243	239:243
VVMD25	241:251	241:251	241:257	241:257	241:257	241:257
VVMD27	188:192	190:192	182:190	182:190	182:190	182:190
VVMD32	239:239	239:239	239:271	239:271	239:271	239:271

#### 4.2.4 Polimorfizem sorte 'Merlot' pri lokusu VVMD27

Trte smo genotipizirali z osmimi mikrosatelitnimi markerji (VVS2, VrZAG62, VrZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27 in VVMD32). Po uspešni identifikaciji vzorcev 10, 11 in 28 in potrditvijo, da gre za sorto 'Chardonnay' lahko te tri vzorce izločimo iz nadaljnje analize. Torej je od 42-ih analiziranih trt 36 takih, ki so sorta 'Merlot'. Edino pri lokusu VVMD27 smo pri teh 36 trtah določili tri različne alele 188, 190 in 192 bp in dva različna genotipa-bolj pogost genotip 190:192 (to je hkrati tudi originalni genotip francoskega standarda) in manj pogost genotip 188:192. Genotip 188:192 je bil ugotovljen na 9-ih vzorcih trte 'Merlot', in sicer pri 3, 19, 27, 36, 37, 38, 39, 41, 42. Torej smo pri njih potrdili za lokus VVMD27 specifično mutacijo, ki rezultira v genotipu 188:192. Prisotnost mutacije smo potrdili v 25 % analiziranih vzorcih (9 od 36-ih).

Pri ostalih sedmih analiziranih lokusih smo pri vseh 36 trta sorte 'Merlot' ugotovili samo en genotip, kar kaže na veliko podobnost vzorcev in posledično, da je verjetno odkrita razlika lokusa VVMD27 posledica somatske mutacije. Odkriti polimorfizem pri vzorcih sorte 'Merlot' na lokusu VVMD27 je prikazan na sliki 6.



Slika 6: Odkrit polimorfizem pri vzorcih sorte 'Merlot' pri lokusu VVMD27. Pri standardni DNA 'Merlot' iz Francije razberemo genotip 192:190, medtem ko smo pri 9-ih vzorcih slovenskega 'Merlot' odkrili genotipom 192:188

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

CTAB metoda izolacije DNA je standardna metoda izolacije rastlinske DNA (Kump in sod., 1992). Tudi v našem primeru smo z njo uspešno izolirali DNA, ki je bila primerna za pomnoževanje v reakciji PCR. Izpad pomnoževanja smo zasledili pri treh vzorcih.

Kakovost reakcije PCR je odvisna od kakovosti, stabilnosti in koncentracije izhodiščno izolirane DNA, občutljivosti na temperaturni profil, od kakovosti in koncentracije *Taq* DNA polimeraze, koncentracije  $MgCl_2$  in koncentracije začetnih oligonukleotidov. Glavni namen naše naloge je bil pridobiti visoko specifične produkte z visokimi signali detekcije na ALFexpress napravi, kjer je detekcija potekala z laserjem. Ugotovili smo, da je poleg zahtev, ki jih določa vrsta začetnega oligonukleotida, med najpomembnejšimi dejavniki, ki vplivajo na uspešnost pomnoževanja v PCR reakciji, kakovost izolirane genomske DNA.

Glavni vzrok polimorfizma med posamezniki je sprememba v številu ponovitev osnovnega motiva mikrosatelita. Do variabilnosti pri mikrosatelitnih lokusih med posamezniki v večini primerov pride zaradi zdrsa DNA vijačnice in posledično nepravilnega parjenja med replikacijo DNA ter neučinkovitega DNA replikacijskega popravljalnega mehanizma. Nepravilno parjenje zdrsnjene vijačnice med DNA sintezo se pri mikrosatelitu kaže v nastanku ali izgubi ene ali več ponovitev, ker se ponovitve zlahka izvijejo iz vijačnice v obliki zank.

Stopnja polimorfizma posameznega mikrosatelita je navadno v povezavi z variabilnostjo tandemske ponovljivih enot mikrosatelitskega zaporedja, vendar pa je variabilnost v resnici veliko bolj kompleksna, še posebej, če govorimo o prekinjenih ali sestavljenih mikrosatelitih (Štajner, 2003).

Za mikrosatelite je znano, da je mutacijska stopnja med posameznimi lokusi različna in obstaja kar nekaj faktorjev, ki prispevajo k dognani raznolikosti dinamike razvoja: število ponovitev, nukleotidno zaporedje motiva ponovitve, dolžina ponovljive enote, obrobna regija, prekinitve v mikrosatelitu, stopnja rekombinacije, stopnja transkripcije itd. (Jakše, 2000).

Če primerjamo dolžine alelov pri vzorcih 10, 11 in 28 lahko vidimo, da smo na vseh lokusih dobili enak genetski profil, kot ga ima sorta 'Chardonnay'. Torej lahko zaključimo, da te tri vzorčne trte niso sorte 'Merlot', ampak sorte 'Chardonnay'. Vinogradi, v katerih smo vzorčili, so registrirani, kot vinogradi s sorto 'Merlot', zato lahko sklepamo, da so odstopanja teh vzorcev lahko posledica napak kot so zamenjava cepičev pri cepljenju in trgovanju ali napačno identificiranje izvorne trte, lahko pa tudi, da so propadle trte sorte 'Merlot' nadomestili z sajenjem trt sorte 'Chardonnay'.

Pri treh vzorcih nismo uspeli pomnožiti DNA, kljub ponavljanju PCR reakcije. Zato smo te vzorce izločili iz nadaljnje analize. Vzrok temu, bi lahko bila slabša kakovost izolirane DNA ali pa prisotnost kontaminantov.

Poleg identifikacije sort, ugotavljanja starševstva in genetskih razmerji med sortami ter potrjevanja sinonimov, postaja čedalje bolj pomembno tudi razlikovanje klonov (Forneck, 2005). To je eden izmed razlogov, da je veliko raziskav namenjenih iskanju ustreznega molekulskega markerja, ki bo omogočal zanesljivo razlikovanje klonov. Ker je klonska selekcija in potrjevanje klonov dolgotrajen postopek (pri nas traja 11 let), bi možnost razlikovanja pospešila postopek selekcije, na drugi strani pa omogočila prepoznavanje nepravilno označenih trsov za nadaljnjo namnoževanje. Uspešno razlikovanje bi imelo tudi vlogo pri zaščiti klonov in žlahtnjiteljskih pravic. Razlikovanje z ampelografskimi metodami ni vedno izvedljivo, ker se kloni velikokrat fenotipsko ne razlikujejo dovolj. Uspešno razlikovanje klonov je sortno pogojeno in odvisno od stopnje selekcioniranosti določene sorte.

Glede na mikrosatelitske alelne profile smo na lokusu VVMD27, vzorce lahko delili v dve skupini: 1) značilen genotip sorte 'Merlot', ki je identičen francoski sorti 'Merlot' z genotipom 190:192 in mutiran genotip 188:192. Mikrosatelitna variabilnost, ki jo detektiramo v večini primerov, nastaja v mejozi, tako pride v populaciji tudi do novih oblik alelov. Somatske mutacije so enako pogostne kot spolne, ampak se ne dedujejo, zato jih ponavadi ne vidimo. V našem primeru smo s polimorfizmom lokusa VVMD27 potrdili obstoj dveh različnih genotipov sorte 'Merlot' – značilnega 190:192 in mutiranega 188:192. Te mutacije ne moremo razložiti s spolnim ciklom, saj sorte vinske trte razmnožujemo izključno vegetativno. Torej lahko sklepamo, da se je zgodila brstna mutacija in je del celic rastnega vršička imel alel 188 bp. V prvi fazi je ponavadi tak vršiček himernega izvora in kaže tri alelni genotip, v našem primeru bi to bilo 188:190:192. Najpogosteje so mehanske poškodbe vzrok, da se ohrani samo en tip celic rastnega vršička (Riaz s sod., 2002). V primeru, da se ta očesa vzame za cepič ali potaknjenelec, se mutacija ohrani in prenaša naprej. Glede na to, da je kar 25 % analiziranih rastlin kazalo to mutacijo, sklepamo, da se je zgodila že pred časom in je zato prisotna v takem deležu v pridelovalnih in kolekcijskem vinogradu. Pojav himerizma je obravnavan tudi kot ena glavnih možnosti nastajanja razlik med kloni pri vinski trti (Hocquigny s sod., 2004).

V našem primeru sklepamo, da gre za brstno mutacijo, katera je bila ugotovljena na 9 vzorcih od 36-ih analiziranih. Gre za prvi opisani primer variabilnosti znotraj sorte 'Merlot'. Omenjena mutacija do sedaj še ni bila opisana, zato sklepamo, da je po vsej verjetnosti značilna za Primorsko vinorodno območje. Omenjeni polimorfizem bi lahko imel aplikativno vrednost pri zaščiti slovenske selekcije vinske trte sorte 'Merlot'.

S tem delom smo potrdili znotraj sortno variabilnost pri sorti 'Merlot', katera je bila ugotovljena z mikrosatelitnim markerjem. Kot zanimivost bi izpostavili to, da so v začetku

razvoja molekulskih markerjev predvidevali, da so mikrosateliti povsem neprimerni za razlikovanje klonov vinske trte, pa tudi drugih vegetativno množjenih rastlin, saj z njimi pokrivamo relativno majhen del genoma. Kasneje so pri vinski trti potrdili z mikrosateliti variabilnost pri mnogih sortah, kot je npr. 'Sivi pinot' (Hocquigny in sod., 2004), 'Modri pinot', 'Chardonnay' (Riaz in sod., 2002), pri sinonimnih sortah 'Black Currant' in 'Mavri Corinthiaki' (Ibanez in sod., 2000) in tudi pri sorti 'Pikolit' (Zulini in sod., 2005). V večini opisanih primerih so odkrili variabilnost na samo enem mikrosatelitnem lokusu. Klonska variabilnost je vsekakor tudi odraz stopnje selekcioniranosti klonskega materiala in heterogenosti izhodiščnega materiala za pridelavo klonov. Domnevajo, da ima tudi starost trte pomembno vlogo pri klonski variabilnosti, dobro opisan primer je sorta 'Modri pinot', ki je bila opisana že v rimskih spisih. Ravno pri njej je zabeleženo tudi veliko število klonov, ki smo jih tudi sposobni razlikovati (Riaz in sod., 2002). Zato je verjetnost klonske variabilnosti večja pri starih in regijsko omejenih sortah, ki niso šla skozi intenziven proces selekcije.

## 5.2 SKLEPI

V zastavljenem poskusu smo ugotovili razliko med referenčno francosko sorto 'Merlot' in slovenskimi vzorci iste sorte na mikrosatelitnem lokusu VVMD27. Z mikrosateliti smo potrdili znotraj sortno variabilnost. Mutacijo smo potrdili na devetih vzorcih od 36-ih analiziranih vzorcev sorte 'Merlot'. Sklepamo, da gre za brstno mutacijo mikrosatelitnega alela, katera bi bila lahko značilna za slovensko selekcijo sorte 'Merlot'.

Kot zanimivost lahko poudarimo, da kar šest od devetih vzorcev, na katerih smo odkrili mutacijo, prihaja iz kolekcijskega nasada Kromberk.

Pri treh vzorcih nismo uspeli pomnožiti polimorfizmov kljub ponavljanju. Zato smo te vzorce izločili iz nadaljnje analize. Razlog je v kakovosti izolirane DNA ali prisotnosti kontaminantov.

Dolžine mikrosatelitskih alelov so med laboratoriji primerljive, nekaj odstopanj je možno zaslediti zaradi različnih postopkov zaznavanja namnoženih markerjev, zato smo si pri interpretaciji lahko pomagali z javno dostopnimi bazami mikrosatelitnih genotipov vinske trte. (grška, italijanska in švicarska, dostopne na <http://gvd.biology.uoc.gr/gvd/index.htm>, <http://meteo.iasma.it/genetica/gmc.html>, <http://www1.unine.ch/svmd/?alpha=R>).



## 6 POVZETEK

Izmed sort, ki jih gojimo na Slovenskem, pomembno mesto v trsnem izboru zaseda tudi sorta 'Merlot'. Geografski izvor sorte 'Merlot' je sicer Francija, v Sloveniji pa jo najdemo samo v vinorodni deželi Primorska, kjer jo gojijo že več desetletij.

Z modernimi molekulskimi tehnikami je identifikacija in razlikovanje sort vinske trte postalo natančno in zanesljivo. V preteklosti so sorte vinske trte identificirali na podlagi opisa morfoloških lastnosti pomembnejših rastlinskih delov trte. Te metode so pomembne za opisovanje sort, vendar pod vplivom okolja pride pogosto do fenotipskih sprememb, zaradi katerih lahko pride do napak in posledično do nepravilnega poimenovanja sorte. Danes je identifikacija sorte možna s sledenjem genetskih lastnosti, ki so natančne in niso pod vplivom okolja. Za zanesljivo identifikacijo potrebujemo od okolja neodvisne, stabilne markerje. Zato smo se na podlagi raziskav na področju identifikacije vinske trte, odločili za mikrosatelitne markerje. Le-ti kažejo največjo informacijsko vrednost polimorfizma in so večinoma zelo variabilni. Sestavljeni so iz kratkih, tandemske ponovljivih motivov DNA, ki so prisotni pri večini organizmov.

V zadnjih letih pri nekaterih sortah vinske trte poročajo o odkriti klonski variabilnosti, kar je deloma posledica večje izbire markerjev, po drugi strani pa je klonska variabilnost odraz stopnje selekcioniranosti klonskega materiala in heterogenosti izhodiščnega materiala za selekcioniranje klonov. Zato je verjetnost klonske variabilnosti večja pri starih in lokalno gojenih sortah. Pri genetski analizi nekaterih sort vinske trte, gojenih v Sloveniji, je bilo ugotovljeno, da vzorčene trte sorta 'Merlot' pri enem mikrosatelitnem lokusu odstopa od referenčne trte iste sorte gojene v Franciji. To je redek primer identifikacije klonske variabilnosti z mikrosatelitnim markerjem. Namen našega dela je bil preučiti, ali je morda omenjena variabilnost značilna za slovensko klonsko selekcijo omenjene sorte. Iz tega razloga smo za analizo izbrali osem različnih mikrosatelitnih markerjev in vzorčili 42 trt sorte 'Merlot' v vinogradih in kolekcijskem nasadu v Kromberku. V analizo genotipizacije smo vključili še osem referenčnih sort zaradi lažje primerjave med raziskovalnimi skupinami in za primerjavo z javno dostopnimi bazami genotipov vinske trte. Določevanje genotipov z mikrosatelitnimi markerji je potekalo na napravi ALFexpress II, kjer je potekala detekcija pomnoženih mikrosatelitnih polimorfizmov s pomočjo lasersko vzpodbujene fluorescence. Pomnoževanje mikrosatelitov je potekalo v PCR z optimalnimi pogoji za vsak lokus. Dolžine alelov smo določili s programom AlleleLocator 1.03.

Kot zaključek raziskave lahko potrdimo našo delovno hipotezo, saj smo potrdili obstoj mutacije mikrosatelitnega alela v klonski selekciji. Devet trt sorte 'Merlot' od 36-ih analiziranih je imelo prisotno mutacijo lokusa VVMD27.

## 7 VIRI

- Bandelj Mavsar D. 2005. Analiza genetske variabilnosti oljke (*Olea europaea* L.) z molekulskimi markerji. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 116 str.
- Benedetič K. 2010. 'Slikovno gradivo.' . Vipolže (osebni vir, april 2010)
- Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39: 628-633
- Bowers J.E., Dangl G.S., Meredith C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50: 243-246
- Chambers G.K., MacAvoy E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126: 455-576
- Cipriani G., Frazza G., Peterlunger E., Testolin R. 1994. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. *Vitis*, 33: 211-215
- Filipetti I., Silvestroni O., Thomas M.R., Interieri C. 1999. Diversity assessment of seedlings from self-pollinated Sangiovese grapevines by ampelography and microsatellite DNA analysis. *Vitis*, 38, 2: 67-71
- Forneck A. 2005. Plant Breeding: Clonality – a concept for stability and variability during vegetative propagation. *Progress in Botany*, 66: 164-183
- Forneck A., Konardi J., Blaič R. 2003. A genetic variation analysis of *V. Vinifera* cv. Pinot noir. *Acta Horticulturae*, 603: 167-171
- Galet P. 1989. Cépages et vignobles de France. Tome II. L'ampélographie Française. Montpellier, Imprimerie Charles Déhan: 400 str.
- Grape Microsatellite Collection  
<http://meteo.iasma.it/genetica/gmc.html> (3.8.2010)
- Greek Vitis Database  
<http://gvd.biology.uoc.gr/gvd/index.htm> (3.8.2010)
- 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., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte. Ptuj, SVA Veritas: 177 str.
- Ibanez J., De Andres M.T., Borrego J. 2000. Allelic variation observed at one microsatellite locus between the two synonym cultivars Black Currant and Mavri Corinthiaki. *Vitis*, 39, 4: 173-174

- Jackson R. S. 2000. Wine science: principles, practice, perception. San Diego, Academic Press: 648 str.
- Jakše J. 2000. Vrednotenje genetske variabilnosti hmelja (*Humulus lupulus* L.) z mikrosatelitnimi markerji. Magistersko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 89 str.
- Kozjak P. 2001. Opis sorte Refošk (*Vitis vinifera* L.) z mikrosatelitnimi markerji. Magistersko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 94 str.
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 59: 63-66
- Lavrenčič P. 2006. Molekularni markerji pri severnoameriških in azijskih geografskih skupinah iz rodu *Vitis*. Seminarska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 29 str.
- Lopes M.S., Sefc K.M., Eiras Dias E., Steinkellner H., Laimer da Câmara Machado M., Câmara Machado A. 1999. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. Theoretical and Applied Genetics, 99: 733-739
- Nemanič J. 1999. Spoznajmo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 200 str.
- Pelsy F. 2010. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. Heredity, 104. 331-340
- Regner F., Wiedeck E., Stadelbauer A. 2000. Differentiation and identification of White Rieseling clones by genetics markers. Vitis, 39: 103-107
- Riaz S., Garrison K.E., Dangl G.S., Boursiqot J-M., Meredith C.P. 2002. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. Journal of American Society for Horticultural Sciences, 127, 4: 508-514
- Robinson J. 2006. The Oxford Companion to Wine, 3rd edn. Oxford University Press: USA
- Schöfling H., Stellmach G. 1993. Klon-Züchtung bei Weinreben in Deutschland. Waldkircher Verlag, Waldkirch: 107 str.
- Sefc K.M., Regner F., Glössl J., Steinkellner H. 1998. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. Vitis, 37: 15-20
- Sefc K.M., Regner F., Turetschek E., Glöss J., Steinkellner H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis species*. Genome, 42: 367-373
- Silvestroni O., Di Pietro D., Intrieri C., Vignani R., Filippetti I., Del Casino C., Scali M., Cresti M. 1997. Detection of genetic diversity among clones of cv. Fortana (*Vitis Vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. Vitis, 36, 3: 147-150

Siret R. B., Boursiquot J.M.; Merle, M.H.; Cabanis J.C.; This P. 2000. Towards the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. J. Agris. Food Chem., 48: 5035-5040.

Swiss Vitis Microsatellite Database

<http://www1.unine.ch/svmd/?alpha=R> (3.8.2010)

Škrgat T. 2009. Vpliv talnih lastnosti na rast in rodnost žlahtne vinske trte (*Vitis Vinifera* L.) sorte 'Refošk' v Slovenski Istri. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 40 str.

Štabuc R., Hauptman S., Škvarč A., Brdnik M., Maljevič J., Novak E., Vršič S. 2007. Slovenske trte in vina v Evropski uniji. V: 3. Slovenski vinogradniško – vinarski kongres. Maribor, 15 – 16. nov. 2007. Vršič S. (ur.). Maribor, Kmetijsko gozdarski zavod Maribor: 1-17

Štajner N. 2003. Razvoj novih mikrosatelitskih markerjev za genotipizacijo in gensko kartiranje hmelja (*Humulus lupulus* L. ). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 93 str.

Thomas M.R., Scott N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theoretical and Applied Genetics, 86: 985-990

This P., Dettweiler E. 2003. EU-Project Generes CT96 No81: European Vitis Database and Results Regarding the Use of a Common Set of Microsatellite Markers. Acta Horticulturae 603: VII International Conference on Grape Genetics and Breeding.: 59-66

Topolovec A. 1996. Predstavitev selekcijsko-trsničarskih središč in stanja pri selekciji vinske trte. Zbornik referatov: 1. slovenski vinogradniško-vinarski kongres, Portorož.: 322-325

Zulini L., Fabro E., Peterlunger E. 2005. Characterisation of the grapevine cultivar Picolit by means of morphological descriptors and molecular markers. Vitis, 44, 1: 35-38

## **ZAHVALA**

Za strokovno pomoč in koristne napotke pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju doc. dr. Jernej JAKŠETU in somentorju doc. dr. Denisu RUSJANU.

Iskreno se zahvaljujem staršem, ki sta mi omogočila študij, ter Štafanu, ki me je v času študija spodbujal in mi stal ob strani.

Za ves vložen trud in čas pri izvajanju biotehnoloških analiz v laboratoriju gre zahvala Nataši Hren.

Hvala tudi Ireni Benedetič za pomoč na terenu, ter dr. Nataši Štajner za posredovanje podatkov in informacij.

Zahvala gre tudi vsem prijateljem, sorodnikom in znancem, ki so na kakršen koli način pomagali pri izdelavi diplomskega dela.