Analiza unutarsortne varijabilnosti vinove loze upotrebom retrotranspozonskih biljega

Rajič, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:151795

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jelena Rajič

Analiza unutarsortne varijabilnosti vinove loze upotrebom retrotranspozonskih biljega

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom prof. dr. sc. Višnje Besendorfer, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Prof. dr. sc. Višnji Besendorfer, voditeljici rada, zahvaljujem na susretljivosti, savjetima i na kritičkom čitanju rada.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Nenadu Malenici na pomoći i podršci tijekom izrade rada, na ukazanom povjerenju, pruženim savjetima i na kritičkom čitanju rada.

Prof. dr. sc. Ivanu Pejiću, te Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku, biometriku i eksperimentiranje Agronomskog fakulteta zahvaljujem na savjetima i proslijeđenim materijalima.

Svim profesorima, docentima i asistentima Zavoda za molekularnu biologiju zahvaljujem na svim lijepim riječima i dobronamjernim savjetima.

Veliko hvala mojim prijateljima na beskrajnoj potpori tijekom studiranja i na mnoštvu nezaboravnih trenutaka iz naših studentskih dana.

Najveće hvala mojim roditeljima i braći na bezgraničnoj ljubavi i podršci koju mi pružaju

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

ANALIZA UNUTARSORTNE VARIJABILNOSTI VINOVE LOZE UPOTREBOM RETROTRANSPOZONSKIH BILJEGA

Jelena Rajič

Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju,

Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska

Vinova loza (*Vitis vinifera sp.*) jedna je od najvažnijih voćnih kultura zastupljena s oko 10 000 sorti, a unutar kojih razlikujemo brojne klonove. Klonska selekcija vinove loze izdvaja one klonove koji pokazuju značajna odstupanja u fenotipu, a posljedica su nekih genetičkih promjena između tih klonova. Moguća objašnjenja za varijabilnost klonova su: poliklonalno porijeklo sorti, infekcije patogenima, somatske mutacije, epigenetičke promjene i kimerizam. U ovom radu pomoću tehnika IRAP i REMAP istražena je unutarsortna varijabilnost klonova hrvatske autohtone sorte Plavac mali, kao i genetička osnova promjene boje kožice u Plavcu malom sivom. Navedene tehnike koriste se retrotranspozonskim insercijama kao izvorom DNA polimorfizama. Obje se temelje na lančanoj reakciji polimerazom (PCR) za umnažanje mjesta ugradnje retrotranspozona u genomskoj DNA. Detektirani polimorfizmi mogli bi se koristiti za razvoj DNA biljega u svrhu rane identifikacije klonova s korisnim/superiornim agronomskim svojstvima. Istraživanje je pokazalo relativno mali broj polimorfizama među klonovima, koji su se samo djelomično mogli dovesti u vezu s njihovom iskazanom fenotipskom raznolikosti. Međutim, upotrebljene tehnike su se pokazale kao brz, jednostavan i pouzdan način za preliminarno razlikovanje sorti vinove loze.

(55 stranice, 23 slike, 16 tablica, 70 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: vinova loza, retrotranspozoni, IRAP, REMAP

Voditelj: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer

Pomoćni voditelj: Dr. sc. Nenad Malenica

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Doc. dr. sc. Damjan Franjević, Prof. dr. sc. Ivan Pejić

Rad prihvaćen: 30.6.2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

ANALYSIS OF GRAPEVINE INTRAVARIETAL POLYMORPHISM USING RETROTRANSPONE-BASED MARKERS

Grapevine (*Vitis vinifera sp.*) is one of the most important fruit cultures represented with approximately 10 000 different varieties which are constituted of numerous clones. Clonal selection of grapevine singles out those clones that show significant deviations in phenotype, resulting from some genetic changes between these clones. Possible explanations of clonal variability are the following: polyclonal origin of cultivars, phatogen infections, somatic mutations, epigenetics and chimerism. In this work we studied clonal variation of the Croatian autochthonous cultivar Plavac mali by REMAP and IRAP techniques as well as genetic basis of skin color changes in Plavac mali sivi. These techniques use insertions of retrotransposons as a source of DNA polymorphisms. Both are based on polymerase chain reaction (PCR), which is used for amplification retrotransposon insertion sites in genomic DNA. Detected polymorphisms could be used for developing DNA markers for early identification of clones with useful / superior agronomic traits. A relatively small number of polymorphisms are detect between the clones, which could only partially be correlated with their expressed phenotypic variation. However, applied techniques have proven to be fast, easy and cheap way to preliminary distinguish grape varieties.

(55 pages, 23 figures, 16 tables, 70 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: grapevine, retrotransposons, IRAP, REMAP

Supervisor: Dr. Višnja Besendorfer, Associate Professor

Assistant: Dr. Nenad Malenica

Reviewers: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Associate Professor; Dr. Damjan Franjević; Dr. Ivan Pejić, Associate Professor

Thesis accepted: 30.6.2010.

Sadržaj

1 **UVOD** 1
1.1 Vinova loza 1
1.2 Klonska selekcija vinove loze 2
1.2.1 Mehanizmi nastanka klonske varijabilnosti 3
1.3 Molekularni biljezi 4
1.3.1 Vrste molekularnih biljega 5
1.4 Retrotranspozoni 7
1.4.1 Retrotranspozoni u vinovoj lozi 8
1.5 Vrste molekularnih biljega temeljene na retrotranspozonima 10
1.6 Cilj istraživanja 13
2 **MATERIJAL I METODE** 14
2.1 Materijal 14
2.2 Metode 16
2.2.1 Izolacija genomske DNA iz listova vinove loze 16
2.2.2 Lančana reakcija polimerazom (PCR) 16
2.2.3 Elektroforeza 24
2.2.4 Taloženje amplikona CAPS s etanolom 25
2.2.5 Digestija pročišćenih amplikona CAPS 26
3 **REZULTATI** 27
3.1 Izolacija DNA i optimizacija PCR-a 27
3.2 Polimorfizmi dobiveni metodom IRAP sa skupinom početnica I 30
3.3 Polimorfizmi dobiveni metodom IRAP sa skupinom početnica II 34

3.4 Polimorfizmi dobiveni metodom IRAP na sortama Crljenak kaštelanski, Primitivo i Zinfandel 36
3.5 Genotipizacija klona Plavac mali sivi upotrebom retrotranspozona *Gret1* i metode CAPS 38
3.5.1 Retrotranspozon *Gret1* 38
3.5.2 Rezultati amplifikacije s Caps 10 i Caps 20 40
4 **RASPRAVA** 44
5 **ZAKLJUČCI** 48
6 **LITERATURA** 49

1 UVOD

1.1 Vinova loza

Vinova loza (*Vitis vinifera sp.*) jedna je od najvažnijih voćnih kultura zastupljena brojnim sortama (oko 10 000) rasprostranjenim u Europi, Aziji, Sjevernoj i Srednjoj Americi te u sjevernom djelu Južne Amerike. Ljudi su divlje sorte vinove loze koristili još u paleolitiku, a njezino pripitomljavanje započelo je u neolitiku (8 500 - 4 000 godina prije Krista) što je bilo usko povezano s otkrićem vina (McGovern 2003). Genetička srodnost između divlje i kultivirane vinove loze još nije potpuno riješena. Divlje populacije (koje se i danas mogu naći u malim izoliranim staništima) čine dvodomne biljke. Pripitomljavanjem su selektirane jednodomne biljke s dvospolnim cvjetovima, kao i veličina grozda i bobica, što je rezultiralo većim prinosom, i većim postotkom šećera bitnim za fermentaciju (Zohary i Spiegel-Roy 1975).

Kultivirana vinova loza spada u porodicu *Vitaceae* kojoj pripadaju višegodišnje drvenaste ili zeljaste povijuše, ili grmovi sa stabljikom nalik povijušama. Sve do nedavno porodica *Vitaceae* je sa porodicama *Rhamnaceae* i *Leaceae* bila uključena u red *Rhamnales*. Međutim, filogenetska istraživanja na osnovi kloroplastne DNA potvrdila su tek povezanost *Vitaceae* sa *Leaceae* te pokazala zapravo njihovu udaljenost od reda *Rhamnales*, a bliskost sa redom *Rosales* (Gerrath i sur. 1998).

Unutar porodice *Vitaceae* koja ima pentamerne cvjetove i 2n = 40 kromosoma, rod *Ampelopsis* je najstariji, a rod *Vitis* je sa podrodovima *Euvitis* (2n = 38) i *Muscadinia* (2n = 40) najmlađi (Ingrouille i sur. 2002). *Muscadinia* danas ima samo tri poznate vrste koje su rasprostranjene isključivo na jugoistoku SAD-a (tijekom kvartara značajno se smanjila njezina dotadašnja rasprostranjenost). *Euvitis* ima oko 70 vrsta koje se protežu uglavnom u umjerenoj zoni cijele sjeverne hemisfere, gotovo podjednako zastupljene u Americi i Aziji. Samo vrsta *V. vinifera* L. (kasnije podjeljena na podvrste *V. vinifera* ssp. *sativa*, kultivirana vinova loza, i *V. vinifera* ssp. *silvestris*, divlja loza) potječe iz Euroazije, a djelovanjem čovjeka raširila se globalno (Bailey 1934). Smatra se da su spomenute vrste nastale uglavnom u kvartaru kada su velike populacije bile razdvojene ledenim površinama, a opstanak malih

populacija bio je u azilima. Takva izolacija i različiti okolišni uvjeti azila pružili su idealne uvjete za specijaciju (Bouquet i sur. 2007).

Velika osjetljivost vrste *V. vinifera* na brojne štetnike i patogene ograničila je njezino područje uzgoja, a broj različitih sorti širom svijeta procjenjen je na oko 10 000 (Alleweldt i Dettweiler 1994). Međutim, poznato je da iste sorte mogu imati različita imena (sinonimi), a različite sorte ista imena (homonimi). Konačno stanje se ne zna, ali se metodama molekularne biologije ubrzano radi na razrješavanju spomenutog problema. Opće je prihvaćeno da je realna brojka pravilno identificiranih sorti u svijetu oko 5 000, a od njih se samo nekoliko stotina koristi za komercijalnu proizvodnju vina (Truel i sur. 1980). Metode klasične ampelografije (grč. *ampelos* - vinova loza; *graphos* - opisivati), discipline koja se bavi opisom i razlikovanjem sorti vinove loze na temelju morfoloških parametara, danas su gotovo u potpunosti zamijenjene upotrebom molekularnih biljega (Maletić i sur. 2008).

1.2 Klonska selekcija vinove loze

Unutar svake sorte vinove loze razlikuju se brojni klonovi koji najčešće pokazuju homogene ampelografske karakteristike. Klonska selekcija temelji se na vegetativnom razmnožavanju što bi trebalo osigurati genotipsku i fenotipsku uniformnost unutar populacije potomaka koji potječu od zajedničkog pretka. Oni bi u uglavnom trebali biti genetički identični osim po sporadičnim mutacijama (Forneck 2005). No, varijacije su često veće od očekivanog. Bez obzira na navedeno, razmnožavanje vegetativnim klonovima omogućilo je zadržavanje identiteta sorti (Thomas i Scott 1993), ali i ograničilo njihovo poboljšavanje (tj. poboljšavanje njihovih genotipova) samo na one strategije koje ne uključuju konvencionalno križanje.

Klonska selekcija vinove loze provodi se na klonovima koji pokazuju razlike u fenotipu, a koje su posljedica genetičkih varijacija između tih klonova. Klonska selekcija usredotočuje se na one mutacije koje mijenjaju fenotipske značajke od agronomskog interesa (Mullins i sur. 1992).

1.2.1 Mehanizmi nastanka klonske varijabilnosti

Moguća objašnjenja za varijabilnost klonova su: **poliklonalno porijeklo sorti, infekcije patogenima, somatske mutacije, epigenetičke promjene i kimerizam.**

Poliklonske sorte potječu od različitih potomaka istih roditelja, a koji su fenotipski jako slični. "Poliklonovi" se u genotipskom pogledu smatraju drugačijim od klonova zato što svaka skupina u poliklonalnoj populaciji potječe od različitog hibridizacijskog događaja (Silvestroni i sur. 1997).

Od patogenih infekcija, povećanju fenotipske varijabilnosti, najviše pridonose virusne bolesti. To se očituje u slučajevima kada virus ne izaziva drastične simptome bolesti na biljci, nego samo neznatne, ali još uvijek mjerljive promjene fenotipa. Tijekom klonske selekcije to onda može dovesti do odabira lažnih kandidata (Walter i Martelli 1998).

Epigenetika uključuje promjene u ekspresiji gena bez promijena u DNA slijedu. Njena molekularna osnova je kompleksna, a glavni mehanizmi su metilacija, remodeliranje kromatina i RNA interferencija. Različiti vidovi epigenetičke kontrole ekspresije gena u biljci mogu biti potaknuti stresom što je bitno za vinovu lozu s obzirom na njezino učestalo izlaganje stresu prilikom redovitog podrezivanja i vegetativnog razmnožavanja, te primjene kulture tkiva za njezino razmnožavanje (Duncan 1997). Stresu pridonose i različiti vremenski uvjeti tijekom godine. Tehnika MSAP (*Methyl-Sensitive Amplified length Polymorphism*), izvedenica AFLP-a (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), pokazala se učinkovitom za procjenu kvalitativnih razlika u stupnju DNA metilacije među klonovima vinove loze (Imazio i sur. 2002).

Kimere imaju specifične fenotipove zbog kombinacije genetički različitih staničnih slojeva koji formiraju tuniku vegetacijskog vrška stabljike (Thompson i Olmo 1963). Prve kimere su zabilježene još sredinom devetnaestog stoljeća kao crveni i bijeli grozdovi sorte Pinot crni koji se pojavljuju na jednom trsu. Genetičke razlike u slojevima stanica su najčešće posljedica somatskih mutacija nastalih tijekom uobičajene stanične diobe (Hocquigny i sur. 2004).

U kontekstu klonske varijabilnosti, somatske mutacije se odnose na razlike u nukleotidnom slijedu DNA među klonovima. Najčešće se pojavljuju na lokusima s visokom stopom mutacija, kao npr. na mikrosatelitnim slijedovima, a također im pridonose i

transpozoni – pokretni genetički elementi (Arencibia i sur. 2005). Somatske mutacije su relativno rijetke i uvijek nastaju lokalno u višestaničnom organizmu, tj. događaju se povremeno u pojedinačnim stanicama. Jedino ako su pogođene meristemke stanice, mutacije će biti u svim tkivima i organima koji se razviju iz tih stanica (D' Amato 1977).

Moguće je da se određene fenotipske razlike među klonovima pojave samo nakon akumulacije više specifičnih mutacija, dok svaka pojedinačno nema neki značajan utjecaj na fenotip. Tako je praktički unutarsortna varijabilnost uvijek prisutna. Međutim, do danas nisu razvijene metode koje bi omogućile identifikaciju svih mutacija u danom genomu. Najučinkovitije metode, ispitane kod vinove loze, koje se koriste kod analize unutarsortne varijabilnosti su SSR (*Simple Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), S-SAP (*Sequence-Specific Amplified Polymorphism*) i varijacije ovih metoda. Sve imaju određena ograničenja u otkrivanju polimorfizama i omogućuju samo njihovu relativnu kvantifikaciju (Cervera i sur. 2002; Zulini i sur. 2005).

Problem identificiranja svih polimorfizama između dva srodna genoma mogao bi se uskoro riješiti sve učinkovitijim i jeftinijim sekvenciranjem cijelih genoma pojedinačnih biljaka/klonova. Do danas su objavljena dva članka koja daju potpuni DNA slijed genoma vinove loze, cv. Pinot crni (Jaillon i sur. 2007; Velasco i sur. 2007). Time je stvoren temelj za buduću bioinformatičku analizu varijabilnosti između klonova određene sorte vinove loze.

Identifikacija varijabilnosti među klonovima ovisi o veličini uzorka i izabranom sistemu molekularnih biljega.

1.3 Molekularni biljezi

Molekularni biljeg predstavlja slijed nekleotida koji odgovara točno određenoj fizičkoj lokaciji u genomu. On mora biti dovoljno polimorfan da bi se mogao pratiti njegov obrazac nasljeđivanja između srodnika (Tanksley 1983). Molekularni biljezi se danas primjenjuju u kombinaciji s morfološkim biljezima koji su ograničeni na samo mali broj svojstava. Carl Lineus je koristio broj i raspored spolnih organa biljaka za određivanje njihovog sistematskog srodstva, a koristi se i morfologija lista, izdanka i ploda. Osim toga ekspresija morfoloških

biljega može ovisiti o okolišnim uvjetima, a i oni sami pokazuju nizak stupanj polimorfnosti (Aradhya i sur. 2003).

Morfološki biljezi se također kombiniraju i s biokemijskim biljezima, naročito izoenzimima. Izoenzimi su različiti strukturni oblici jednog te istog enzima koji imaju gotovo identičnu funkciju, ali se neznatno razlikuju u sastavu aminokiselina i mogu se lako razlučiti elektroforezom (Liao 1997). Nedostaci su opet slični: ograničen broj takvih enzima kao i utjecaj okoliša na njihovu ekpresiju.

Nakon izoenzima razvijene su različite vrste DNA biljega, a najčešće korišteni su: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) i odnedavno SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*).

1.3.1 Vrste molekularnih biljega

Među prvima je korištena metoda **RFLP** (Botstein i sur. 1980.) koji detektira razlike u obrascu pojavljivanja restrikcijskih mjesta u molekuli DNA. Osnovni koraci u RFLP analizi su ekstrakcija DNA, digestija restrikcijskim endonukleazama i hibridizacija specifičnih sondi (hibridizacija po Southern-u, engl. *Southern blotting*). Zbog razlike u DNA slijedu dolazi do gubitka ili stvaranja novog restrikcijskog mjesta što daje veći ili manji broj restrikcijskih fragmenata. Ovom vrstom biljega moguće je razlikovati homozigotna od heterozigotnih alelnih stanja tj. biljezi RFLP su kodominantni.

Razvoj PCR-a (*Polymerase Chain Reaction*) otvorio je nove mogućnosti za otkrivanje DNA polimorfizama (Mullis i sur. 1986). Po prvi puta se bilo koja regija u genomu mogla zasebno umnožiti i analizirati. Kloniranje ili izolacija velikih količina čiste genomske DNA više nije bila potrebna.

Metoda **CAPS** (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) se javlja kao PCR izvedenica RFLP-a. Hibridizacija po Southern-u više nije potrebna, a iskorištavaju se prednosti PCR-a za bržu analizu. Umnožavaju se oni dijelovi genoma za koje se zna da imaju polimorfna restrikcijska mjesta te se dobiveni PCR produkti potom cijepaju restrikcijskim enzimima (Cox i Lehrach 1991). Biljezi CAPS su kodominantni.

Metoda **RAPD** (Welsh i McClelland 1990.) koristi PCR za umnožavanje genomske DNA upotrebljavajući proizvoljne/nasumične početnice od desetak nukleotida s niskim temperaturama prianjanja/nalijeganja (*annealing*). Polimorfizmi nastaju zbog supstitucije parova baza ili inesercija odnosno delecija koje uzrokuju promjene u mjestu vezanja početnice pa ne dolazi ni do umnožavanja što se vidi kao odsustvo specifičnog RAPD fragmenta na gelu. Metoda RAPD pruža mogućnost istovremenog detektiranja gotovo neograničenog broja biljega u genomu i omogućava uočavanje visoke razine polimorfizama čak i među vrstama u kojima se uz pomoć izoenzima i metode RFLP ne dobivaju polimorfizmi. Međutim, nedostatak RAPD biljega jest da su dominantni pa pružaju manje informacija, a osim toga značajna je njihova nespecifičnost i relativno nepouzdana reproducibilnost.

Važna metoda temeljena na PCR-u je i **AFLP** (Vos i sur. 1995.). Ona uključuje cijepanje genomske DNA s dva restrikcijska enzima (u pravilu *Eco* RI i *Mse*I) i ligaciju dvolančanih adaptera za krajeve dobivenih restrikcijskih fragmenata. Takvi se fragmenti zatim umnožavaju uz pomoć dviju početnica koje su u potpunosti komplementarne adapteru i restrikcijskom mjestu, osim što su na svom 3' kraju produžene dodatnim "selektivnim" nukleotidima. Potom slijedi elektroforeza umnoženih fragmenata na denaturirajućem poliakrilamidnom gelu i vizualizacija uz pomoć autoradiografije ili bojanja srebrom. Prednost AFLP-a je što može razlikovati heterozigotne i homozigotne genotipove prema intenzitetu umnoženih fragmenata.

Za detekciju **SSR**-a ili mikrosatelita također se koriste prednosti PCR tehnologije. Mikrosateliti su uzastopna ponavljanja DNA slijedova koji se sastoje od 2 do 6 parova baza. Polimorfizmi su vidljivi kao promjene u broju ponavljajućih jedinica koje mogu nastati proklizavanjem DNA polimeraze (Schlotterer i Tautz 1992). Kodominantnost i visoka razina polimorfizama glavne su prednosti mikrosatelita kao molekularnih biljega (Wünsch i Hormaza 2002). Također, visoka reproducibilnost ovih biljega u odnosu na druge omogućava pouzdanu razmjenu i standardizaciju protokola među laboratorijima. Za vinovu lozu razvijen je set od 6 standardnih mikrosatelitnih biljega (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 i Vr ZAG79) temeljenih na referentnim sortama koji olakšavaju uspoređivanje (This i sur. 2004). Tih 6 SSR lokusa dovoljno je za pouzdanu identifikaciju bilo koje sorte vinove loze. Međutim, postoje i nedostaci koji se očituju u vidu tehničkih problema, poput PCR artefakata, a unatoč velikom broju mikrosatelitnih lokusa, broj onih informativnih često je prenizak.

Neke od novijih metoda molekularnih biljega temelje se na sekvencama pokretnih genetičkih elemenata.

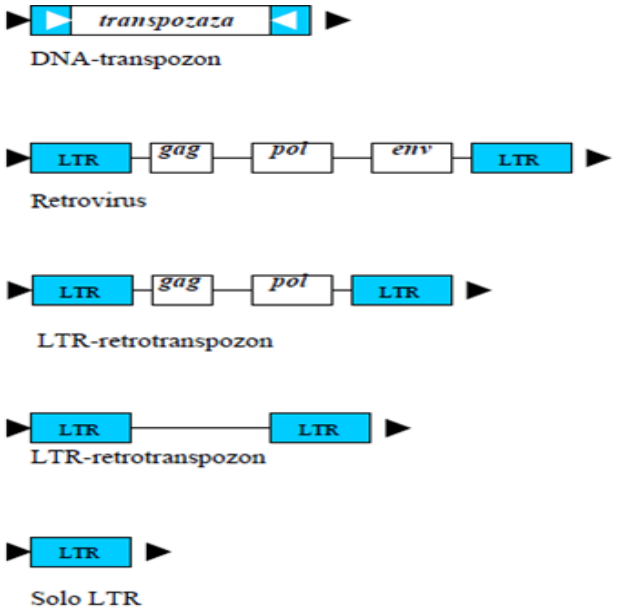
1.4 Retrotranspozoni

Retrotranspozoni zajedno s transpozonima čine dva razreda pokretnih genetičkih elementa, a to su sljedovi molekule DNA koji mogu mijenjati svoje mjesto u genomu. Sastoje se od nekoliko stotina pa do preko deset tisuća parova nukleotida. Obično su raspršeni u genomu, a njihov broj varira od nekoliko kopija do preko milijun kopija, ovisno o tipu elementa i vrsti organizma. U nekih organizama obuhvaćaju i do 90% genomske DNA (Flavell 1986). Kod vinove loze oko 41% genoma zauzimaju retrotranspozoni (Tomkins i sur. 2001).

Dva navedena tipa pokretnih genetičkih elemenata razlikuju se obzirom na mehanizam transpozicije. Transpozoni se uglavnom premještaju izrezivanjem iz jednog i ugradnjom u neko drugo mjesto u genomu, a retrotranspozoni se premještaju posredno - reverznom transkripcijom RNA nastaju nove dvolančane DNA-kopije retroelementa koje se ponovo nasumično ugrađuju u genom (Kumar i Bennetzen 1999). Posljedice aktivnosti pokretnih genetičkih elemenata za dotični genom obično ovise o mjestu ugradnje. Ugradnja u kodirajuće regije genoma može inaktivirati gene, a ugradnjom u promotorske regije gena mogu modificirati njihovu ekspresiju. Tako ugradnja retrotranspozona *Gret*-1 u promotor gena *VvmybA1* kod vinove loze ima za posljedicu njegovu inaktivaciju te kao rezultat izostanak sinetze antocijanina i time nastanak bijelih sorti grožđa (Kobayashi i sur. 2004).

Najzastupljeniji tip retrotranspozona su tzv. LTR-retrotranspozoni zastupljeni porodicama Ty1-*copia* i Ty3-*gipsy* (Friesen i sur. 2001). Sadrže nekoliko gena i duge ponavljajuće slijedove nukleotida na krajevima (LTR, *Long Terminal Repeat*). Geni (glavni su *gag* i *pol*) kodiraju isključivo proteine (strukturni protein, proteazu, integrazu, reverznu transkriptazu i RNazu H) koji su potrebni za umnožavanje retrotranspozona i ugradnju novih kopija u genom, a LTR-ovi sadrže regije odgovorne za početak i završetak transkripcije. Svojom strukturom i životnim ciklusom LTR-retrotranspozoni podsjećaju na retroviruse (Frankel i Young 1998). Osnovna razlika između njih je u genu čiji produkt omogućuje retrovirusima izlazak iz stanice i ulazak u drugu stanicu (slika 1.1), a koji retrotranspozoni nemaju.

Postoje i tzv. pojedinačni ili "solo" LTR-ovi. Pojedinačni LTR-ovi obično nastaju intrakromosomskom homolognom rekombinacijom između dva LTR-a istog retrotranspozona. Kako su LTR-ovi u istoj orjentaciji, homolognom rekombinacijom se izrezuje središnji dio elementa i jedan LTR, a u genomu ostaje samo pojedinačni "solo" LTR (Shirasu i sur. 2000). Retrotranspozoni bez LTR krajeva su retropozoni koji se dijele u dva tipa: LINE (*long interspersed nuclear elements*) i SINE (*short interspersed nuclear elements*).



Slika 1.1. Shematski prikaz strukture pokretnih genetičkih elemenata. Crni trokuti označavaju udvostručenje slijeda nukleotida genomske DNA u koji se element ugradio; bijeli pravokutnici predstavljaju kodirajuće regije, a plavi ponavljajuće slijedove nukleotida na krajevima elementa (LTR, *Long Terminal Repeat*).

1.4.1 Retrotranspozoni u vinovoj lozi

Gret 1 (*Grape Retrotransposon 1*) je prvi u potpunosti karakteriziran retrotranspozon u vinovoj lozi. Pripada Ty3-*gipsy* porodici LTR-retrotranspozona, a otkriven je istraživanjem mutacije u genu *VvmybA1* (Kobayashi i sur. 2004).

Prije sekvenciranja cijelog genoma loze opisan je još djelomičan slijed retrotranspozona *Vine1* ugrađen u *Adhr* gen (Verriès i sur. 2000) te retrotranspozon *Tvv*1 (*Transposon Vitis Vinifera 1*; Pelsy i Merdinoglu 2002) koji pripadaju *Ty1-copia* porodici retrotranspozona. Dobivanjem potpunog genomskog slijeda vinove loze (Jaillon i sur. 2007; Velasco i sur. 2007) omogućena je *in silico* karakterizacija retrotranspozona u lozi. Kombiniranjem dvaju pristupa: metode temeljene na PCR-u za izolaciju RnaseH-LTR

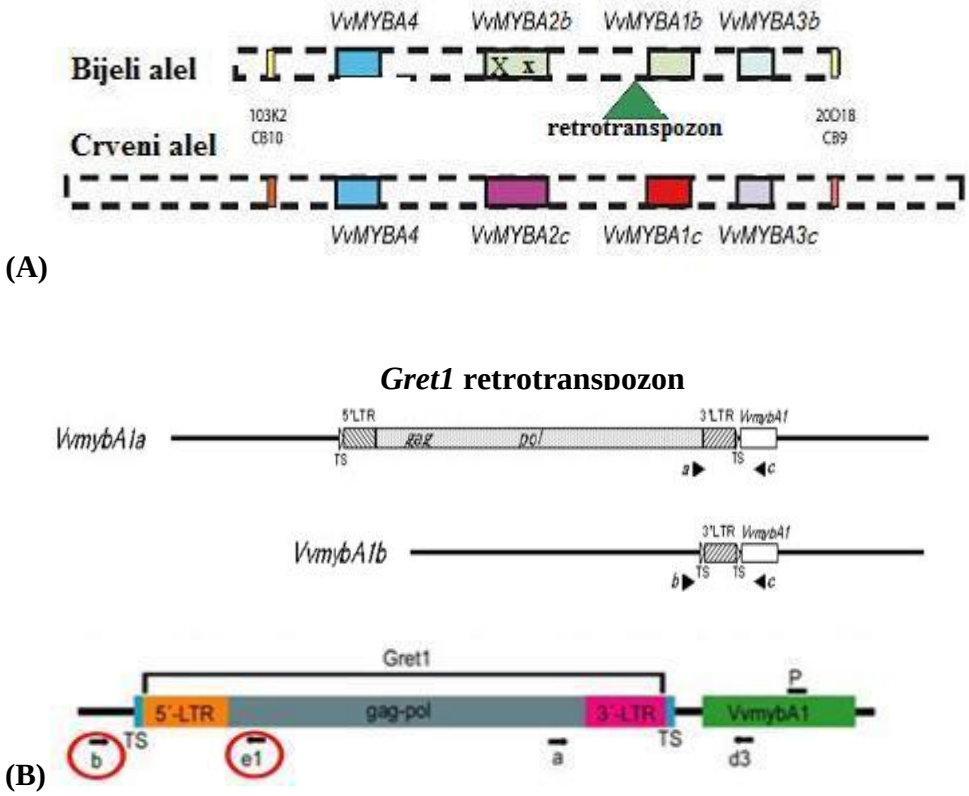
slijedova i računalno temeljene potrage za sličnim sljedovima otkriveno je deset porodica novih *Ty-copia* nazvanih *Gentil, Edel, Huben, Rangen, Brand, Crement, Gans, Kastel, Noble* i *Winz* (Moisy i sur. 2008).

Iako pripadaju različitim retrotranspozonskim porodicama, *Gret1* i *Vine-1* izolirani su iz promotorskih regija ili u kodirajućem slijedu što je upućivalo na to da retrotranspozoni kod vinove loze mogu imati značajnu ulogu u ekspresiji gena i pridonijeti fenotipskoj raznolikosti. Tako je ustanovljena povezanost retrotranspozona *Gret1* sa bojom kožice grožđa. Boja je posljedica nakupljanja antocijanina u staničnim slojevima kožice bobica, a UFGT (UDP glukoza-flavonoid 3-*o*-glukozil transferaza) je ključni enzim kod tog procesa (Ford i sur.1998). Crne i crvene sorte pokazuju ekspresiju gena UFGT, dok ju bijele ne pokazuju (Boss i sur. 1996). Međutim, nije zabilježeno postojanje razlike ni u promotoru ni u kodirajućem slijedu tog gena između obojenih i bijelih sorti vinove loze (Kobayashi i sur. 2001).

Kao presudna, ustanovljena je mutacija uzrokovana ugradnjom upravo *Gret1* retrotranspozona u *VvmybA1* gen koji kodira transkripcijski faktor MYB odgovoran za pozitivnu regulaciju gena UFGT (Lijavetsky i sur. 2006).

Ovaj mutacijski događaj prisutan je u većini bijelih sorti u svijetu i čvrsto je povezan s bijelim fenotipom bobica kada je prisutan u homozigotnom stanju (This i sur. 2007). Ponovno uspostavljanje ekspresije *VvmybA1* gena zabilježeno je "reverzijom", tj. izrezivanjem ugrađenog retrotranspozona *Gret1* (homolognom rekombinacijom između njegovih LTR krajeva) kod bijelo obojene sorte Italia što je rezultiralo nastankom njenog crveno obojenog klona Ruby Okuyama (Kobayashi 2005).

Također, kod većine bijelih sorti grožđa uz navedenu mutaciju gena *VvmybA1*, istovremeno su prisutne i dvije mutacije u kodirajućoj regiji gena *VvmybA2*. Taj gen smješten je u neposrednoj blizini gena *VvmybA1* te isto pozitivno regulira biosintezu antocijanina (Walker i sur. 2007). Kodominantni biljezi CAPS smješteni s obje strane lokusa VvMYB (103K2CB10 i 20D18CB9) koriste se kod molekularne analize boje bobice (slika 1.2).



Slika 1.2. Shematski prikaz strukture lokusa VvMYB; (A) plavi pravokutnici označavaju sljedove koji su isti u oba alela; crveni i ljubičasti pravokutnik predstavljaju „crvenu“ varijantu alela, a zeleni „bijelu“ varijantu alela koja u lokusu A1 ima ugrađen retrotranspozon, a lokus A2 ima dvije mutacije (točkastu (X) i preuranjeni stop kodon (x); Walker i sur. 2007). (B) gen *VvmybA1*: sa i bez ugrađenog retrotranspozona *Gret 1*(crno-bijelo) i prikazom mjesta vezanja *Gret1* početnica a, b, c i e1 (Kobayashi i sur. 2004)

1.5 Vrste molekularnih biljega temeljene na retrotranspozonima

Zbog velike zastupljenosti retroelemenata u genomima i njihove mogućnosti stvaranja novih kopija i ponovne ugradnje u genom, predložena je njihova upotreba kao molekularnih biljega (Amar i Hirochika 2001). Glavne metode koje retrotranspozonske insercije koriste kao molekularne biljege su: S-SAP (S-SAP, *Sequence–Specific Amplified Polymorphism*), IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplification Polymorphism*), REMAP (*Retrotransposon-Microsatelitte Amplification Polymorphism*) i RBIP (*Retrotransposon-Based Insertional Polymorphism*) (slika 2.1.). Sve koriste PCR za umnažanje mjesta ugradnje retrotranspozona u genomskoj DNA. Jedna početnica odgovara LTR-u retrotranspozona (njegovom dijelu koji karakterizira određenu porodicu retrotranspozana) i orijentirana je 3' krajem prema mjestu ugradnje, a druga je specifična za svaku od navedenih metoda.

S-SAP prva je opisana retrotranspozonska metoda nalik AFLP-u gdje je jedna početnica homologna retrotranspozonu ječma BARE-1, a druga adapteru vezanom za restrikcijsko mjesto (Waugh i sur. 1997). Tehnika se kasnije primijenila i na druge retrotranspozone, kao i na velik broj drugih biljnih vrsta.

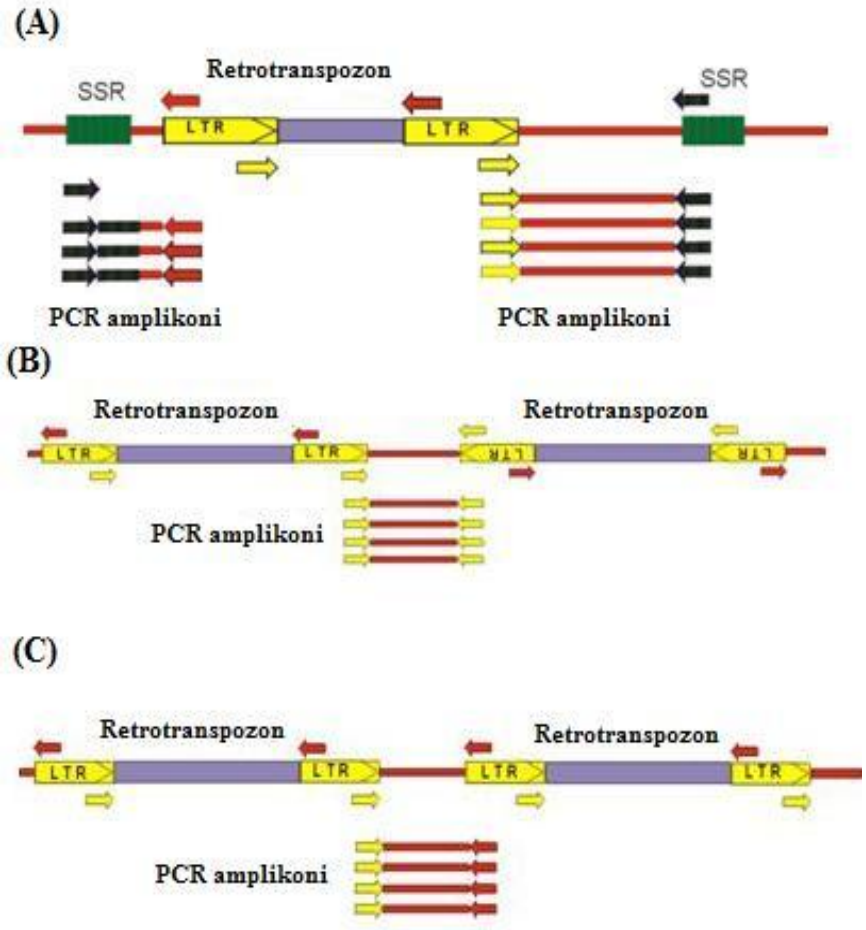
Metode IRAP i REMAP se javljaju kao jednostavnije s obzirom da kod njih nisu potrebne restrikcijska digestija i ligacija adaptera, a produkti se mogu razlučivati i na agaroznom gelu standardnom elektroforezom.

Metoda **IRAP** otkriva polimorfizme uzrokovane retrotranspozonskim insercijama, umnažanjem DNA fragmenata koji se nalazi između dva retroelementa (Kalendar i sur. 1999). Provodi se korištenjem jedne početnice homologne 5' ili 3' kraju LTR-a (orijentirane od LTR-a prema genomskoj regiji), ili pomoću dviju početnica koje mogu biti iz iste ili dviju različitih retrotranspozonskih porodica (Slika 1.3 B i C). Nastali PCR produkti rezultat su umnožavanja stotina ili tisuća ciljnih mjesta u genomu. Kompleksnost dobivenog uzorka fragmenata ovisi o zastupljenosti retrotranspozona u proučavanom genomu (odraz je veličine genoma), učestalosti ugradnje i veličini retrotranspozonske porodice odabrane za analizu. Mnogi produkti neće biti umnoženi do mjerljivih razina niti razlučeni na gelu pa je dobiveni uzorak/obrazac fragmenata samo dio od ukupnog broja potencijalnih ciljnih mjesta. Produkti postignuti kombinacijom dviju početnica zbog toga ne predstavljaju prosti zbroj amplikona dobivenih sa svakom početnicom zasebno. U slučaju maksimalne raspršenosti retrotranspozona, tehnikom IRAP bi se dobili ili preveliki produkti za precizno razlučivanje na gelu ili se uopće ne bi mogli dobiti zbog ograničenja polimeraze (udaljenost dvaju retrotranspozona koju ona mora umnožiti bi bila prevelika). Međutim, IRAP je uspješno primijenjen na svim proučavanim vrstama jer se retrotranspozoni nakupljaju zajedno u "ponavljajućim morima" okružujući "genomske otoke" (White i sur. 1994).

Metoda **REMAP** je slična IRAP-u, ali kod nje jedna od početnica odgovara nekom mikrosatelitnom ponavljanju koji na svom 3' kraju sadrži jedan ili više sidrišnih nukleotida (Slika 1.3 A). Inače, dijelovi genoma prisutni između dva mikrosatelita također se mogu umnažati na način srodan IRAP-u tehnikom ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*). Kod REMAP tehnike sidrišni nukleotidi na 3' kraju početnice sprječavaju proklizavanje početnice sa jednostavnih ponavljanja, a sprječavaju i detektiranje promjena u broju ponavljanja. Kako REMAP koristi početnice koje se primjenjuju i kod ISSR i IRAP metode može se zaključiti da će mikrosatelitne početnice dati ISSR produkte, a isto tako LTR početnice IRAP produkte. Međutim, u praksi to je rijetko slučaj. Pretpostavlja se da razlog tome leži u kombinaciji

čimbenika koji uključuju genomsku strukturu i kompeticiju među PCR reakcijama (Provan i sur. 1999).

Za razliku od do sada navedenih metoda koje istovremeno otkrivaju višestruka i anonimna mjesta insercije retrotranspozona, metoda **RBIP** (Flavell i sur. 1998) tipizira jedan lokus (Slika 1.2). Potrebno je poznavati jedinstvene sljedove koji okružuju mjesto ugradnje određenog retrotranspozona. Dvije početnice odgovaraju sljedovima DNA oko tog mjesta ugradnje, a treća retrotraspozonu (najčešće LTR djelu) i orijentirana je prema jednoj od prvih dviju početnica. Dvije početnice specifične za sljedove DNA koji omeđuju retrotranspozon, umnožiti će samo izvorni lokus. Lokus s ugrađenim retrotranspozonom ne može se umnožiti zbog prevelike duljine većine retrotranspozona. On će se umnožiti u drugoj PCR rekciji kombinacijom početnice koje odgovara retrotranspozonu i one usmjerene prema njoj. Budući da se može odrediti i lokus koji sadrži retrotranspozon, kao i onaj bez njega, omogućeno je otkrivanje heterozigotnih alelnih stanja što je bitno za određivanje rodoslovlja.



Slika 1.3. Shematski prikaz metoda REMAP (A) i IRAP s jednom (B) i dvije različite početnice (C). Crne strelice označavaju mikrosatelitne početnice; žute strelice predstavljaju uzvodne (forward), a crvene nizvodne (reverse) retrotranspozonske početnice (Schulman 2007).

1.6 Cilj istraživanja

Ovim istraživanjem željelo se pomoću metoda IRAP i REMAP istražiti unutarsortnu varijabilnost klonova hrvatske autohtone sorte Plavac mali. Pretpostavka je da bi otkrivanje DNA polimorfizama među klonovima bilo povezano i sa varijabilnošću agronomski važnih svojstava te bi omogućilo predselekciju genetski divergentnih klonskih kandidata i racionalizaciju klasične klonske selekcije u poljskim uvjetima. Također, na primjeru klona Plavca malog sivog, željela se istražiti genetička osnova promijene boje kožice na bobicama.

2 MATERIJAL I METODE

2.1 Materijal

Genotipovi uključeni u ovo istraživanje predstavljaju klonska potomstva individualnih trsova koji su selekcionirani u cijelom uzgojnom području Plavca malog (Tablica 2.1). Svi genotipovi su razdvojeni na temelju fenotipskih razlika na originalnim lokacijama (*in situ*) (Tablica 2.2.).

Tablica 2.1. Klonski kandidati sorte Plavac mali iz kolekcijskog vinograda Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša iz Splita (Zdunić 2010).

Šifra plavca	Područje uzorkovanja	Šifra plavca	Područje uzorkovanja
1. ob-004	Šolta	17. ob-213	Vis/ Milna
2. ob-092	Korčula/ Smokvica	18. ob-214	Vis/ Milna
3. ob-011	Hvar/ Sv Nedjelja	19. ob-219	Vis/ Karvovac
4. ob-012	Hvar/ Sv Nedjelja	20. ob-220	Vis/ Karvovac
5. ob-018	Hvar/ Sv Nedjelja	21. ob-225	Kaštel Lukšić
6. ob-019	Hvar/ Ivan Dolac	22. ob-228	Kaštel Lukšić
7. ob-052	Pelješac/ G. Vrućica	23. ob-229	Kaštel Lukšić
8. ob-059	Pelješac/ Mokalo	24. ob-257	Brač/ Murvica
9. ob-066	Pelješac/ Dingač	25. ob-258	Brač/ Murvica
10. ob-071	Pelješac/ Trstenik	26. ob-262	Brač/ Murvica
11. ob-088	Korčula/ Lumbarda	27. ob-267	Brač/ Murvica
12. ob-091	Korčula/ Lumbarda	28. ob-268	Brač/ Murvica
13. ob-097	Korčula/ Blato	29. ob-271	Pelješac/ Trstenik
14. ob-099	Korčula/ Blato	30. ob-273	Brač/ Murvica
15. ob-100	Korčula/ Blato	31. ob-277	Brač/ Murvica
16. ob-202	Vrgorac	32. ob-286	Brač/ Postira

Tablica 2.2 Klonski kandidati sorte Plavac mali razvrstani po fenotipskim kategorijama

Urod		**Zrelost**		**Veličina bobice**		**Zbijenost grozda**	
Slabo rodni	Rodni	Rani	Kasni	Sitni	Krupni	Rastresiti	Zbijeni
ob-271	ob-097	ob-018	ob-004	ob-229	ob-202	ob-012	ob-100
ob-268	ob-091	ob-219	ob-286	ob-258	ob-267	ob-092	ob-019
ob-219	ob-004	ob-228	ob-277	ob-012	ob-099	ob-004	ob-066
ob-262	ob-019	ob-267	ob-088	ob-273	ob-052	ob-257	ob-225
ob-071	ob-099	ob-268	ob-059	ob-214	ob-220	ob-213	ob-011

Tablica 2.3 Autohtone hrvatske sorte vinove loze (*Vitis vinifera spp*.vinifera) iz kolekcijskog vinograda Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu korištene u istraživanju.

Sorta	**Područje uzorkovanja**
Crljenak kaštelanski	Jazbina/Zagreb
Dobričić	Jazbina/Zagreb
Plavac mali	Jazbina/Zagreb
Plavac mali sivi	Jazbina/Zagreb
Škrlet	Jazbina/Zagreb

Tablica 2.4 Međunarodne sorte vinove loze (*Vitis vinifera spp*.vinifera) iz kolekcijskog vinograda Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu korištene u istraživanju.

Sorta	**Područje uzorkovanja**
Pinot bijeli	Jazbina/Zagreb
Pinot crni	Jazbina/Zagreb
Pinot sivi	Jazbina/Zagreb
Primitivo	Jazbina/Zagreb
Zinfandel	Jazbina/Zagreb

2.2 Metode

2.2.1 Izolacija genomske DNA iz listova vinove loze

Listovi se smrznu u tekućem dušiku i smrve u fini prah uz pomoć tarionika i tučka prethodno ohlađenima u tekućem dušiku. Prah se, špatulom ohlađenom tekućim dušikom, prenese u isto tako također ohlađenu plastičnu mikroepruvetu i doda se 400µl pufera PL1 za lizu. Smjesa se promiješa na vibrirajućoj miješalici (votreks) i doda se 10µl otopine RNaze te se inkubira 20 minuta na 65°C. Tijekom inkubacije suspenzija se nekoliko puta lagano promiješa okretanjem i nakon toga se prebaci u NucleoSpin® Filter kolonu smještenu u odgovarajuću mikroepruvetu i centrifugira dvije minute na 11000 rpm. Kolona se baci, a u čisti filtrat se doda 450µl pufera PC za vezanje i homogenizira se pipetiranjem. Otopina se prebaci u kolonu NucleoSpin® Plant II (Machery-Nagel) koja je postavljena u mikroeprvetu za skupljanje i centrifugira se jednu minutu na 11000 rpm. Filtrat se baci, a kolona ispere sa 400µl pufera PW1 za ispiranje. Ponovo se centrifugira jednu minutu na 11000 rpm i baci filtrat. Isto se ponovlja sa 700µl pufera PW2 za ispiranje te se za potpuno sušenje membrane dodaje novih 200µl pufera PW2 i centrifugira dvije minute na 11000 rpm-a. Kolona NucleoSpin® Plant II se smjesti u novu mikroepruvetu i doda se 50µl pufera PE ugrijanog na 70°C. Kolona se inkubira 5 minuta na 70°C te se potom centrifugira jednu minutu na 11000 rpm da se DNA ispere. Taj korak se ponovi još jednom s novih 50µl pufera PE.

2.2.2 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Prisutnost polimorfizama u genomima pojedinih sorti odnosno klonova vinove loze utvrđivana je lančanom reakcijom polimerazom (PCR, *polymerase chain reaction*) koristeći specifične početnice za određeni retrotranspozonski slijed i genomsku DNA pojedine sorte/klona kao kalup.

2.2.2.1 Metode REMAP i IRAP

Umnažanje mjesta insercije retrotranspozona metodom IRAP provodi se u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 20 µl koja sadržava: 2µl 10 x PCR pufera (100 mM Tris-HCl

(pH 8.3) i 500 mM KCl, Applied Biosystems), 2,4µl 25 mM $MgCl_2$, 1µl 2 mM smjese dNTP-a, 0,1µl Taq polimeraze (GoTaq® Promega, 5 U/µl), 2 µl 2µM specifičnih početnica, 0,6µl DMSO-a, 2µl genomske DNA (2.5ng/µl) i dH_2O. Program umnažanja započinje denaturacijom 4 min. na 94°C, nastavlja se s 35 ciklusa koji se sastoje od: denaturacije 40 s na 94°C, prianjanje/nalijeganje početnica za homologne sljedove 40 s na izračunatoj temperaturi za određenu početnicu (prema formuli: Tm-5°C; tablice 2.5, 2.6 i 2.7) i produljivanja lanca 3 min. na 72°C, a završno produljivanje lanca je 5 min. na 72°C. Za neke parove početnica s različitom temperaturom taljenja (Tm), temperatura prijanjanja/nalijeganja određena je slobodnom procjenom (tablica 2.8).

Tablica 2.5. Početnice korištene u metodi IRAP, skupina I (Moisy i sur. 2008.) i njihove temperature taljenja (Tm)

Početnice	**Tm (C°)**
*Gret1*LTR-reverse (5'CGTGTTTCCCAGAGGGAGGGGTCCCTAC3')	78,3
*Gret1*LTR-forward (5'CAACTAATTTATATTCCTCTCTCTAACCA3')	60,9
*Tvv1*LTR-reverse (5'TCAGCCTACAAGAAAGGAAA3')	62,6
*Tvv1*LTR-forward (5'TTCTCCAAATACCTTTGTTGA3')	62
*Vine1*LTR-reverse (5'TCAAAATTCAAATTCCAGCA3')	63,2
*Vine1*LTR-forward (5'TTCATCAATAAAAATAGTTC3')	62,9
*Pedel*LTR-reverse (5'TCTCCCATTAAAAAGCCATG3')	61,4
*Pedel*LTR-forward	57,1

(5’CGAACCACGTAAATACTGTC3’)	
*Pgans*LTR-reverse (5’CTAAGAATGGGAAAGAATGA3’)	55,8
*Pgans*LTR-forward (5’TCCTTGTATCATTCTTTCCC3’)	58
*Phuben*LTR-reverse (5’GCCTCAATCTTTCCCTAATA3’)	57,3
*Phuben*LTR-forward (5’TTTTGCTCTCTGTGTATATG3’)	52,7
*Pgentil*LTR-reverse (5’CATTCCTAATATCTCAACAC3’)	50,9
*Pgentil*LTR-forward (5’CTGTACATGACGAATGAAA3’)	54,2
*Pnoble*LTR-reverse (5’ATATCCTAATGATCTCTCC3’)	51,1
*Pnoble*LTR-forward (5’GAGAGAATCAAGCTAGATTG3’)	53,1

Tablica 2.6. Početnice korištene u metodi IRAP, skupina II (Benjak i sur., neobjavljeno) i njihove temperature taljenja (Tm)

Početnice	**Tm (C°)**
Početnica1 (5'TGGACACGAATCAGCTGAGAC3')	59,8
Početnica4 (5'TACCTTCCCGATAAGTAACCTGACC3')	61,4
Početnica7 (5'TGCCGCTGCTAGGGACGAATCA3')	69,8
Početnica9 (5'CAGCTGAGACACCAATTGGGCATGAA3)	70,6
Početnica25 (5'AATCAAGGAGCACCAGCTGGAC3')	63,6
Početnica27 (5'CATCCCAGAGTTCGACCCTAGAGC3')	65,2
Početnica43 (5'CATGAATCAGCTGAGACACCAA3')	59,7

Tablica 2.7. Mikrosatlitne početnice korištene u metodi REMAP (Pereira i sur. 2005.) i njihove temperature taljenja (Tm)

Početnice	**Tm (C°)**
Microsat-GA (5'GAGAGAGAGAGAGAGAGAC3')	48,5
Microsat-CT (5'CTCTCTCTCTCTCTCTCTG3')	49,9

Tablica 2.8. Kombinacije početnica i njihove temperature prijanjanja/nalijeganja (Ta) korištene u IRAP i REMAP reakcijama

Kombinacija početnica	**Ta (C°)**
Vine1 LTR-reverse i *Vine1* LTR-forward	63
*Pgansl*LTR-reverse i *Pedel*LTR-reverse	50
*Pgentil*LTR-reverse i *Pedel*LTR-forward	47
*Phuben*LTR-reverse i *Pedel*LTR-reverse	52
*Gret1*LTR-R i *Microsat*-GA	61
*Tvv1*LTR-R i *Microsat*-GA	55,8
*Vine1*LTR-R i *Microsat*-GA	55,8
*Pedel*LTR-R I *Microsat*-GA	55,8
*Pgans*LTR-R i *Microsat*-GA	52
*Phuben*LTR-R i *Microsat*-GA	52

Tablica 2.9. Sastav PCR reakcije u IRAP i REMAP analizama

Komponenta	**Volumen u reakciji (µl)**	**Konačna koncentracja**
DNA (2.5 ng/µl)	2	0,25 ng/µl
PCR pufer (10x)	2	1x
$MgCl_2$ (25 mM)	2,4	3 mM
dNTP (2mM)	1	0,1 mM
Početnice (2mM)	2	0,2 mM
DMSO	0,6	3%
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,1	0,025 U/µl
dH_2O	do 20	
Ukupno	20	

Tablica 2.10. PCR program za IRAP i REMAP

Korak PCR-a	**Temperatura i trajanje**	
Predenaturacija	94°C, 4 min	
Denaturacija	94°C, 40 s	35 x
Prianjanje početnica	Ta*°C, 40 s	
Elongacija/sinteza	72°C, 3 min	
Završna elongacija/sinteza	72°C, 5min	

* ovisno o početnici/paru početnica

Reakcijska smjesa, kao i program umnažanja, za PCR kod REMAP metode bili su isti kao prethodno opisani.

2.2.2.2 Metoda RBIP

Reakcijska smjesa (ukupnog volumena 20µl) u slučaju RBIP analize sadržavala je 2µl 10 x PCR pufera s $MgCl_2$ (Applied Biosystesms), 1µl 2mM smjese dNTP-a, 0,2µl Taq polimeraze (GoTaq® Promega, 5 U/µl,), 2µl 2µM specifičnih početnica (GRET a, GRET b, GRET c i GRET e1 u kombinacijama GRET a i c, b i c, b i e1) i 1µl genomske DNA (20 ng/µl). Program umnažanja započinje denaturacijom 5 min. na 95°C, nastavlja se s 35 ciklusa koji se sastoje od: denaturacije 30 s na 94°C, prianjanja početnica 30 s na 60°C i produljivanja lanca 90 s na 72°C, a završno produljivanje lanca je 2 min. na 72°C.

Tablica 2.11. Početnice korištene u RBIP analizi (Kobayashi i sur. 2004) i njihove temperature taljenja

Početnice	**Tm (C°)**
Gret a (5'AAAAAGGGGGGCAATGTAGGGACCC3')	69
Gret b (5'GGACGTTAAAAAATGGTTGCACGTG3')	64
Gret c (5'GAACCTCCTTTTTGAAGTGGTGACT3')	64
Gret e1 (5'GTCTTTCGCTTGCCAACTGT3')	64,3

Tablica 2.12. Sastav PCR reakcije uRBIP analizi

Komponenta	**Volumen u reakciji (µl)**	**Konačna koncentracja**
DNA (20 ng/µl)	1	1 ng/µl
PCR pufer s $MgCl_2$ (10x)	2	1x
dNTP (2mM)	1	0,1 mM
Početnice (2mM)	2	0,2 mM
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,2	0,05 U/µl
dH_2O	do 20	
Ukupno	20	

Tablica 2.13. PCR program za RBIP

Korak PCR-a	**Temperatura i trajanje**	
Predenaturacija	95°C, 5 min	
Denaturacija	94°C, 30 s	35 x
Prianjanje početnica	60°C, 30 s	
Elongacija/sinteza	72°C, 90 s	
Završna elongacija/sinteza	72°C, 2 min	

2.2.2.3 Metoda CAPS

PCR u slučaju CAPS analize provedi se u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 50 µl koja sadržava: 5µl 10 x pufera (Applied Biosystesms), 6µl 25mM $MgCl_2$, 5µl 2mM smjese dNTP-a, 0,5µl Taq polimeraze (AmpliTaq® Gold Applied Biosystesms, 5 U/µl), 5µl 2µM specifičnih početnica (CAPS 10 F i R odnosno CAPS 20 F i R), 2,5µl genomske DNA (20 ng/µl) i dH_2O. Program umnažanja prilikom CAPS analize započinje denturacijom 4 min. na

94°C, nastavlja se s 35 ciklusa koji su se sastoje od: denaturacije 30 s na 94°C, prianjanja početnica 30 s na 64,2 °C za CAPS 10 početnice, odnosno na 56,6°C za CAPS 20 početnice i produljivanja lanaca 1 min. na 72°C, a završno produljivanje lanca je 2 min. na 72°C. Najpovoljnije temperature za prianjanja početnica određene su uz pomoć gradijenta PCR-a (gradijent je postavljen s najnižom temperaturom 55°C i najvišom 65°C).

Tablica 2.14 Početnice korištene u CAPS analizi (Walker i sur. 2007) i njihove temperature taljenja

Početnice	**Tm (C°)**
CAPS 10 (103K2CB10)-reverse (5'ACCCTTCAAGAGAAGAGATCAAG3')	61,6
CAPS 10 (103K2CB10)-forward (5'AGTGTCATTCATCCACATTCG3')	62,4
CAPS 20 (20D18CB9)-reverse (5'ATGACCTTGTCCCACCAAAA3')	64,1
CAPS 20 (20D18CB9)-forward (5'GATGACCAAACTGCCACTGA3')	63,8

Tablica 2.15. Sastav PCR reakcije uCAPS analizi

Komponenta	**Volumen u reakciji (µl)**	**Konačna koncentracja**
DNA (20 ng/µl)	2,5	1 ng/µl
PCR pufer (10x)	5	1x
$MgCl_2$ (25mM)	6	3
dNTP (2mM)	5	0,5 mM
Početnice	5	0,5 mM
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,5	0,05 U/µl
dH_2O	do 20	
Ukupno	50	

Tablica 2.16. PCR program za CAPS

Korak PCR-a	**Temperatura i trajanje**	
Predenaturacija	95°C, 5 min	
Denaturacija	94°C, 30 s	35 x
Prianjanje početnica	*Ta°C, 30 s	
Elongacija/sinteza	72°C, 90 s	
Završna elongacija/sinteza	72°C, 2 min	

* za CAPS 10 početnice 64,2, a CAPS 20 početnice 56,6

2.2.3 Elektroforeza

Za provjeru uspješnosti izolacije genomske DNA korišten je 1,5% agarozni gel, pripremljen dodatkom 1,35g agaroze (Sigma, Njemačka) u 90 ml otopine pufera 1 x TAE. Otopina se zagrijava, uz povremeno miješanje, sve dok se sva agaroza u potpunosti ne otopi. Nakon što se temperatura spusti na oko 50°C, doda se 4,5µl etidij-bromida (Sigma, Njemačka) koncentracije 10mg/ml. U pripremljeni nosač za gel otopina se izlije i pričeka da se gel stvrdne. Gel se postavi u kadicu za elektroforezu (Biorad) i nadopuni puferom 1 x TAE do malo iznad površine gela. Po 5µl uzorka se pomješa s 2µl boje za nanošenje na gel i 5µl vode te se nanosi u jažice gela. Uz uzorke nanosi se i 5µl biljega λ/*Hind*III. Elektroforeza se provodi u istosmjernom električnom polju, jakosti 90V sve dok boja bromfenol plavo ne pređe polovinu gela. Fragmenti na gelu vizualiziraju se pomoću UV-transiluminatora (UVITEC).

Za provjeru PCR-reakcija upotrebljavali su se mali 1%-tni testni gelovi pripremljeni otapanjem 0,3g agaroze u 30ml 1 x TAE pufera i dodatkom 3µl boje Syber Safe (Invitrogen, SAD) koncentracije 10mg/µl po hlađenju gela na oko 50°C. Za fino razdvajanje fragmenata korišteni su se veliki 1,7% gelovi (2,635g agaroze otopljeno u 155ml pufera TAE) koji su naknadno bojani 30 minuta u otopini etidij bromida (12,5µl etidij bromida koncentracije 10mg/ml razrijeđeno u 250ml pufera 1 x TAE) i odbojavani 10 minuta u dH_2O ili su bojani 45 minuta u otopini Syber Gold (Invitrogen, SAD), pripremljenoj dodatkom 5µl Syber Gold-a koncentracije 10mg/ul u 50ml pufera 1 x TAE, i odbojavani 60 minuta u dH_2O. Uz PCR uzorke na gel se nanosi 2µl biljega (DNA ljestve 100-10000 pb, Fermentas).

Pufer za elektroforezu 5x TBE, 1000 ml: 54 g Tris baze i 27,5g borne kiseline otopi se u manjem volumenu dH_2O od potrebnog, zatim se doda 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), te nadopuni s dH_2O do 1000 mL.

Pufer za elektroforezu 50 x TAE, 1000 ml: 242 g Tris baze otopi se u manjem volumenu dH_2O od potrebnog, zatim se doda 57,1 ml 17,4 M ledene octene kiseline i 200 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), te nadopuni s dH_2O do 1000 ml.

Otopina za nanošenje uzoraka na gel 6x LB (loading buffer), 10ml: 1,5g bromfenol plavog i 1,5g ksilen cijanola otopi se u manjem volumenu vode od potrebnog i doda se 3ml glicerola i 100µl 0,5 M EDTA (pH 8.0) te nadopuni vodom do 10ml.

Biljeg λ/*Hind*III, 0,5µl: u 83,3 µl otopine λ DNA koncentracije 0,3µg/µl doda se 10µl pufera R, 3µl enzima *Hind*III i 3,7µl dH_2O (do ukupnog volumena od 100µl) te se ostavi na prekonoćnoj inkubaciji na 37°C. Prije provjere uspješnosti restrikcijske razgradnje na agaroznom gelu doda se 83,3 µl boje LB za nanošenje na gel i 316,7µl vode (ukupni volumen 500µl).

2.2.4 Taloženje amplikona CAPS s etanolom

PCR amplikon od 50 µl razrijedi se vodom do ukupnog volumena od 100µl. Doda se 10µl 3M natrij acetata (1/10 volumena) i dvostruki volumen 96% etanola (110µl). Sve se resuspendira i inkubira 30 minuta na -20°C. Nakon inkubacije centrifugira se na maksimalnoj brzini (13000 rpm) 20 minuta pri 4°C. Pazeći da se ne uznemiri talog DNA, supernatant se ukloni uz pomoć nastavka pipete pričvršćenog za vakuum sisaljku. Doda se 1ml 70% etanola, ostavi 5 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugira 5 minuta na 13000 rpm-a. Ponovo se ukloni supernatant i otvorene mikroepruvete se ostave na sobnoj temperature da ispare ostaci tekućine. Osušeni talog DNA otopi se u 20µl dH_2O. Dodatno koncentriranje uzoraka na željeni volumen postiže se upotrebom *SpeedVac*-a (uređaj za brzo sušenje DNA uzoraka u vakuumu).

3 M natrijev acetat, 100 ml: 40,8 $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ otopi se u oko 90 ml dH_2O. Otopina se titrira s ledenom octenom kiselinom do pH 5,2 i nadopuni vodom do 100 ml.

70%-tni C_2H_5OH, 100mL: 72,9 mL 96%-tnog etanola nadopuni se s dH_2O do volumena 100 ml.

2.2.5 Digestija pročišćenih amplikona CAPS

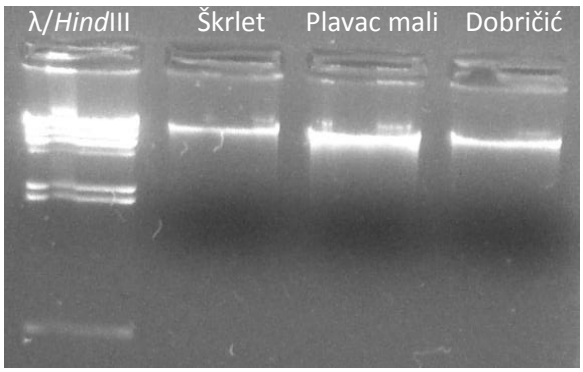
U 19 µl produkta CAPS 20 reakcije doda se 0,4µl enzima *Dde*I, 2,2 µl pufera H (Roche) i 0,4 µl dH_2O te se 2 sata ostavi na inkubaciji na 37°C. U isti volumen CAPS 10 reakcije se dodaje 1 µl *Taq*I enzima, 2,3 µl pufera 10xH i 0,7 µl dH_2O i stavi se 2 sata na 65°C u PCR uređaj (Thermal Cycler, Applied Biosystems).

3 REZULTATI

3.1 Izolacija DNA i optimizacija PCR-a

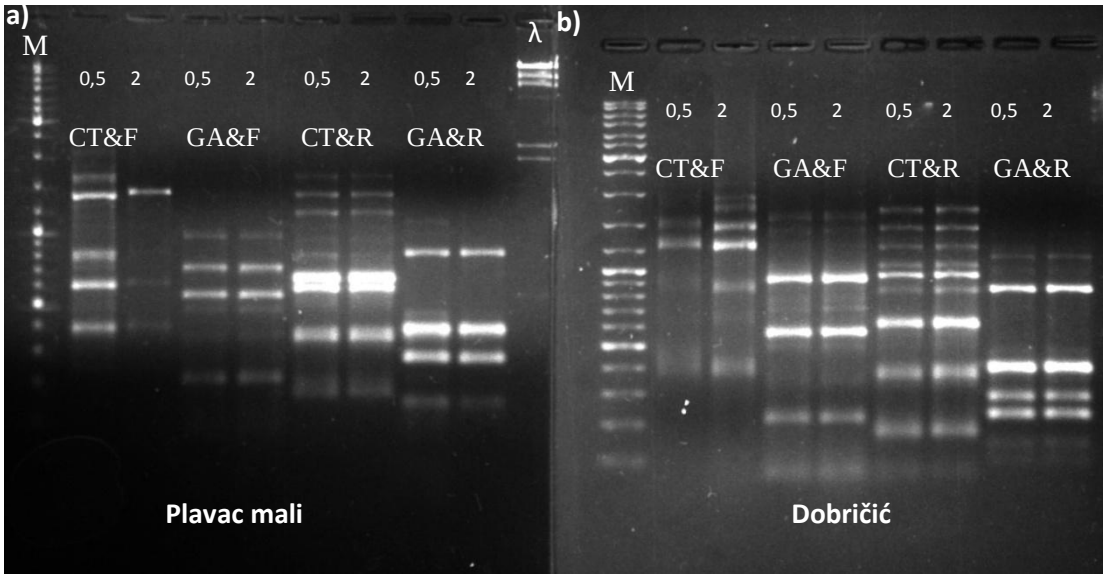
Osnovni preduvjet za dobivanje pouzdanih rezultate koji uključuju polimorfizme DNA slijeda je dobra kvaliteta i čistoća izolirane genomske DNA. Izolacija je napravljena korištenjem komercijalnog kompleta reagensa za izdvajanje DNA iz biljnog materijala. Prethodno usitnjavanje lisnog tkiva smrznutog u tekućem dušiku rađeno je uz pomoć tarionika i tučka ili homogenizatora. Pristup s homogenizatorom pokazao se kao manje učinkovit, najvjerojatnije stoga što materijal nije bio toliko dobro usitnjen kao korištenjem tarionika i tučka.

Koncentracija izolirane genomske DNA određivana je usporedbom s DNA λ faga poznate koncentracije (50 ng/µl) (slika 3.1).



Slika 3.1. Procjena koncentracije genomske DNA izolirane iz sorti vinove loze. Procjenjena koncentracija: Škrlet 20 ng/µl, Plavac mali 40ng/µl i Dobričić 20ng/µl. Količina genomske DNA nanesene na gel iznosila je 5 µl. Korišteni biljeg: λ/*Hind*III.

Zatim je provedena optimizacija uvjeta lančane reakcije polimerazom (PCR) obzirom na količine pojedinih komponenti/sastojaka PCR reakcije. Prvo su provedeni eksperimenti za utvrđivanje optimalne količine kalupa potrebnog za reakciju. Gel elektroforezom produkata PCR reakcije (REMAP) u kojoj je korištena količina genomske DNA bila 0,5µl (20ng/µl) odnosno 2µl, pokazalo se da je manja količina DNA dovoljna, a u nekim slučajevima i bolja (slika 3.2).



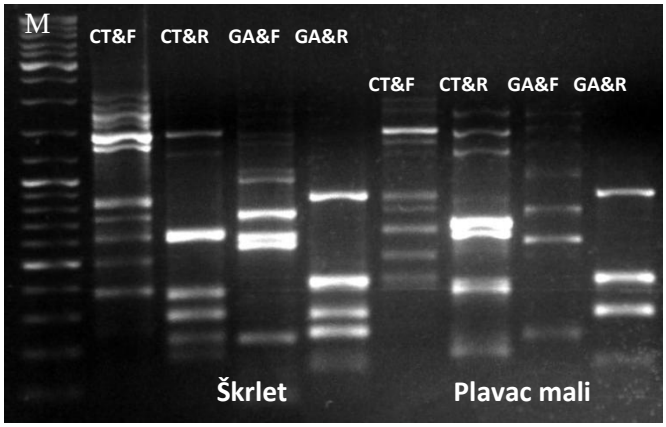
Slika 3.2. Elektroforetsko razdvajenje produkata REMAP reakcije dobivenih umnažanjem genomske DNA sorti a) Plavac mali i b) Dobričić s retrotranspozonskim *Gret1*LTR-R (oznaka R na slici) i *Gret1*LTR-F (oznaka F) i mikrosatelitnim (GA i CT) početnicama. 0,5 i 2 predstavljaju količinu genomske DNA, 0,5µl odnosno 2µl (20 ng/µl). Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10 000 pb

Na slici je vidljivo da svaka pojedina kombinacija početnica daje svoj specifični obrazac fragmenata. Usporedbom obrazaca dobivenih korištenjem iste kombinacije početnica, a različite količine kalupa, vidi se da su oni identični osim djelomično po svom intenzitetu. Također, obrasci dobiveni istim početnicama, a s drugačijim kalupima (genomskom DNA različitih sorti Plavca malog odnosno Dobričića) međusobno se razlikuju.

Cilj daljnjih analiza bio je utvrđivanje važnosti količine magnezija, dNTP-a i polimeraze na reproducibilnost rezultata. Provedene su REMAP reakcije sa sniženim količinama tih komponenti. Magnezij se pokazao kao bitan čimbenik te je njegov manjak (umjesto 3 mM korištena je 1,5 mM otopina) uvelike snizio prinos reakcije. Dvostruko manja količina dNTP-a nije značajnije utjecala na reakciju te je ustanovljeno da se mogu dobiti podjednako dobri rezultati i s minimalnom količinom dNTP-a u količini 1 µl (konačna koncentracija 0,1 mM). Eksperimenti za utvrđivanje najniže potrebne količine Taq polimeraze pokazali su da njena količina od 0,2µl (0,05 U/µl) daje jednaki prinos reakcije kao i količina 0.5 µl (0,125 U/ µl).

Budući da se kao kalup za PCR reakcije upotrebljava genomska DNA te da su izračunate temperature prianjanja početnica relativno niske, bez obzira što su svi eksperimentalni parametri optimizirani, postojala je opasnost od umnožavanja nespecifičnih

fragmenata. Ustanovljeno je da neki spojevi, npr. TMA (tetrametilamonijak), DMSO (dimetil sulfoksid) i formamid mogu poboljšati učinkovitost i specifičnost PCR reakcije na način da snižavaju temperaturu taljenja DNA čime olakšavaju prianjanje početnica i pomažu polimerazi pri umnožavanju kroz područja sekundarne strukture zavojnice DNA (Kovarova i Draber 2000). Korišten je DMSO u preporučenoj 3%-tnoj koncentraciji za maksimalnu specifičnost (slika 3.2 a). Smanjivanjem njegove koncentracije na 1% pokazalo se da DMSO ne utječe na reproducibilnost rezultata te je mala razlika uočena samo u intenzitetu pojedinih fragmenata, ali ne i njihovom ukupnom broju odnosno obrascu na gelu (slika 3.2 a i slika 3.3 b). Isti uvjeti korišteni su i za optimizacju IRAP reakcija.

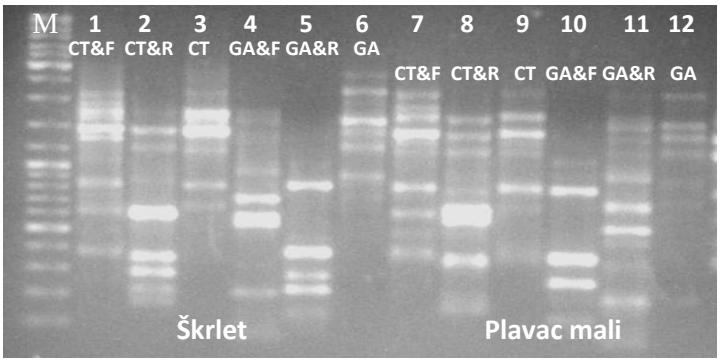


Slika 3.3. Elektroforetsko razdvajanje produkata REMAP reakcije sa smanjenom količinom DMSO-a dobivenih umnažanjem genomske DNA sorti a) Škrlet i b) Plavac mali s retrotranspozonskim Gret/LTR-R (oznaka R na slici) i Gret/LTR-F (oznaka F) i mikrosatelitnim (GA i CT) početnicama. Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10 000 pb.

Pregledom obrazaca fragmenata u REMAP reakcijama zapaženo je da su oni specifični za svaki par početnica te da isti par početnica daje drugačiji obrazac ovisno o sorti upotrebljenoj za kalup. Tako je ovim eksperimentima, osim optimizacije sistema, ustanovljeno da se različite sorte vinove loze međusobno mogu jednostavno razlikovati pomoću metode REMAP.

Također, osim klasične REMAP reakcije, koja uključuje mikrosatelitne i retrotranspozonske početnice, provedena je i PCR reakcija u kojoj su korištene samo mikrosatelitne početnice (tzv. ISSR metoda, slika 3.4 - jažice 3, 6, 9 i 12) kao kontrola koja pokazuje koji je udio fragmenata u REMAP reakciji posljedica amplifikacije između različitih

SSR-ova. Iz slike 3.4 jasno se vidi da obrazac fragmenata REMAP reakcije ne sadrži sve fragmente ISSR reakcije. Time je pokazano da REMAP reakcija, iako koristi iste početnice kao i u metodama ISSR i IRAP (samo retrotranspozonske početnice), nije samo jednostavni zbroj istih. Produkti nastali korištenjem obiju početnica zajedno pokazuju nove fragmente u odnosu na one dobivene reakcijama gdje su početnice upotrebljavane pojedinačno.



Slika 3.4. Elektroforetsko razdvajanje produkata REMAP reakcije dobivenih umnažanjem genomske DNA sorti Škrlet i Plavac s retrotranspozonskim Gret/LTR-R (oznaka R na slici) i Gret/LTR-F (oznaka F) i mikrosatelitnim (CT i GA) početnicama (REMAP reakcija) te ISSR reakcije koja koristi samo mikrosatelitne početnice (CT i GA). Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10 000 pb.

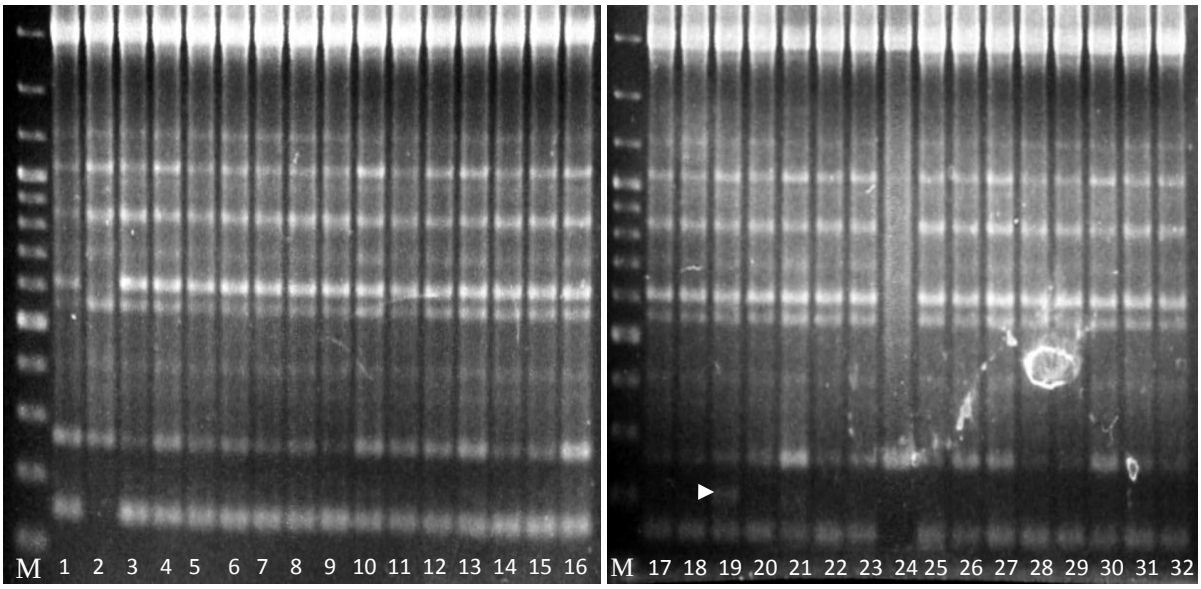
U navedenim REMAP reakcijama optimizacije, za sve korištene parove početnica, temperatura prianjanja/nalijeganja (Ta) iznosila je 45°C. Provedena je reakcija s identičnim uvjetima kao na slici 3.2 u kojoj je jedino Ta povišena na 50°C. Međusobnom usporedbom obrazaca pokazano je da temperatura prianjanja/nalijeganja ne utječe na specifičnost nego samo djelomično na intenzitet dobivenih fragmenata (nije prikazano).

3.2 Polimorfizmi dobiveni metodom IRAP sa skupinom početnica I

Analiza unutarsortne varijabilnosti vinove loze rađena je IRAP tehnikom na klonskom potomstvu sorte Plavac mali. Izabrana su 32 fenotipski međusobno različita klona (tablica 2.2). Pokušali su se utvrditi polimorfizmi u njihovoj DNA koji bi mogli biti odgovorni za izraženu fenotipsku raznolikost ili koji bi bili specifični za pojedini klon.

Prvi eksperimenti izvedeni su s početnicama dizajniranim prema prvootkrivenim retrotranspozonima: *Gret1*, *Tvv1* i *Vine1*. U ovim eksperimenatima zapažen je općenito mali broj polimorfizama. Veliki broj polimorfizama pokazali su samo klonovi ob-004 i ob-092. Međutim, usporednom SSR analizom (Zdunić 2010), utvrđeno je da su oni krivo svrstani među klonove Plavca malog. Naime, genotip klona ob-004 razlikuje se od standardnog genotipa Plavca malog u pet od devet lokusa, dok se klon ob-092 razlikuje u osam od devet lokusa. Utvrđeno je da je klon ob-092 identičan sorti Glavinuša, dok klon ob-004 ne dijeli identičan SSR genotip niti s jednom hrvatskom sortom u SSR bazi podataka Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku, biometriku i eksperimentiranje Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Međutim, opažanjem vezanim za uzorke ob-004 i ob-092 ustanovili smo da IRAP može služiti kao dobar, brz i jeftin alat za preliminarno razlikovanje sorti vinove loze jednako kao i REMAP.

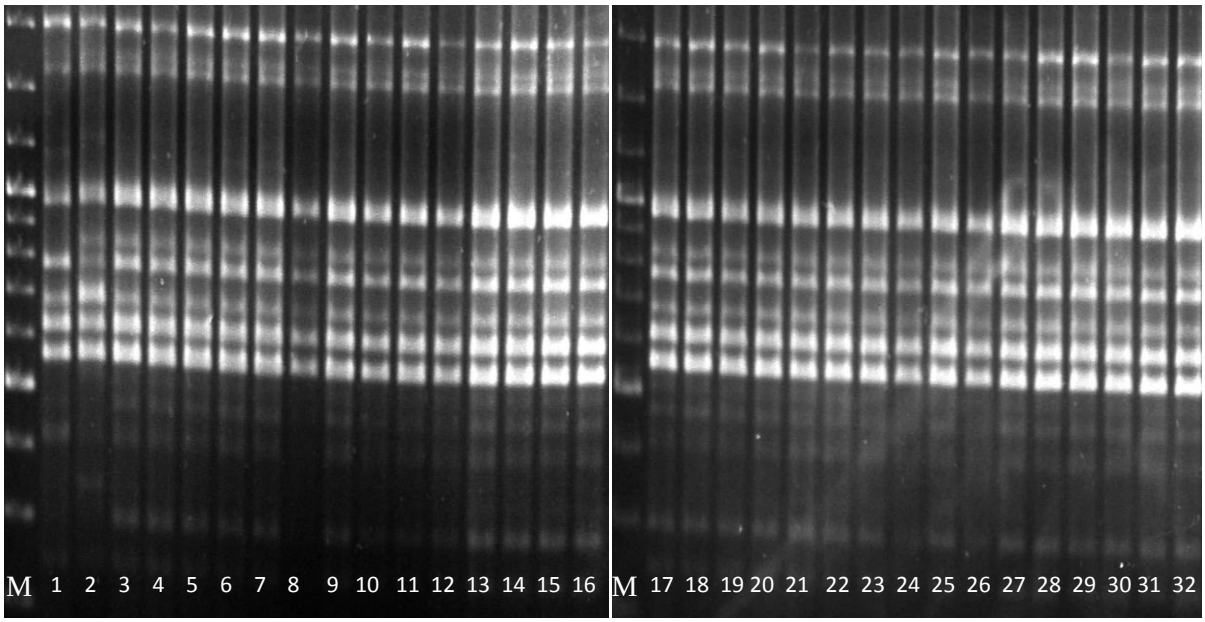
Kod određivanja DNA varijabilnosti ostalih/pravih klonova s *Gret1* i *Tvv1* početnicama nisu uočeni polimorfizmi koji bi poduprli njihovu iskazanu fenotipsku raznolikost (rezultati nisu prikazani). Samo u reakciji s *Vine1* početnicama (*Vine1* LTR-reverse i *Vine1* LTR-forward) uočen je polimorfan fragment od 200 pb kod klona ob-219 (19) (slika 3.5). Nakon uočenog polimorfizma, provedeno je ponavljanje IRAP reakcije za taj klon – tzv. tehnička replika. Međutim, ponovljena reakcija nije reproducirala dobiveni polimorfizam. Važno je napomenuti da je osim takve tehničke replike, gdje se kao kalup koristi isti izolat genomske DNA, potrebno napraviti i tzv. biološku repliku u kojoj se kao PCR kalup koristi novoizolirana DNA odgovarajućeg klona. U slučaju reproducibilnosti određenog polimorfizma pristupa se njegovom kloniranju u T/A plazmidni vektor te određivanju DNA slijeda sekvenciranjem.



3.5. Elektroforetsko razdvajanje produkata IRAP reakcije dobivenih umnažanjem genomske DNA klonova Plavca malog s početnicama *Vine1* LTR-reverse i *Vine1* LTR-forward. Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10 000 pb. Polimorfni fragment označen je strelicom. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na podatke u tablici 2.1.

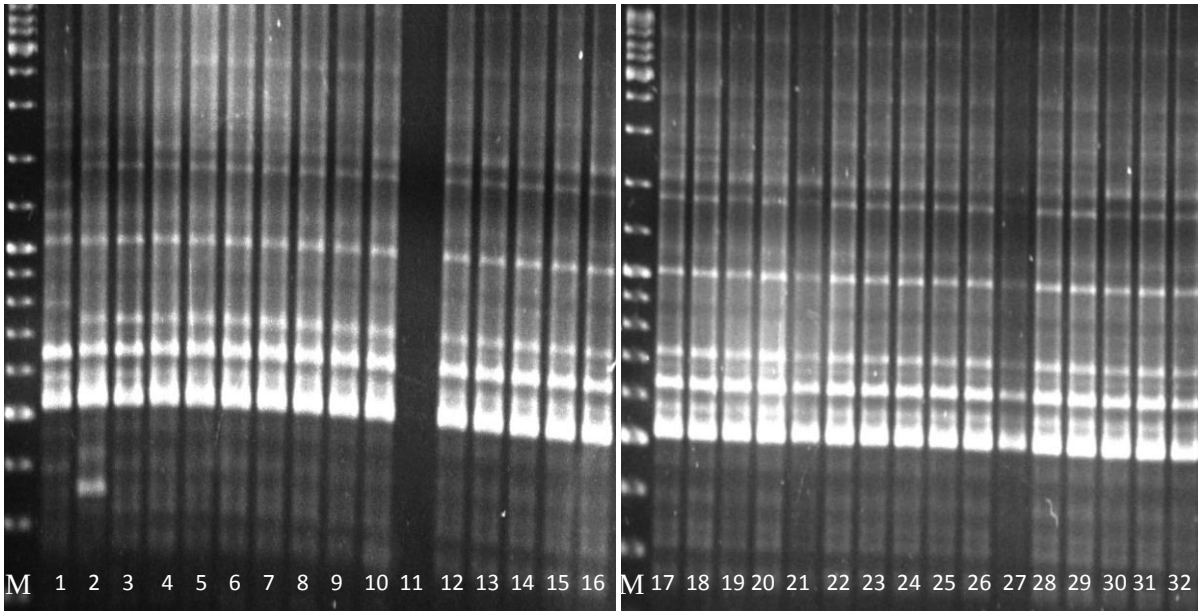
Kako su Moisy i sur. (2008), uz tri postojeće retrotranspozonske porodice u vinovoj lozi, okarakterizirali i deset novih *Ty 1/ copia* porodica (*Gentil*, *Edel*, *Huben*, *Rangen*, *Brand*, *Crement*, *Gans*, *Kastel*, *Noble* i *Winz*) omogućena je opsežnija analiza eventualnih polimorfizama nastalih retrotranspozonskim ugradnjama. Uz *Gret1*, *Tvv1* i *Vine1* parove početnica koristilo se još 5 parova početnica dizajniranih na osnovi novootkrivenih retrotranspozona: *Gentil*, *Edel*, *Huben*, *Gans* i *Noble*. Korištenjem 8 parova početnica moguće je ukupno provesti 120 različitih IRAP rekacija s dvije različite početnice i 16 reakcija s pojedinačnim početnicama. Testirano je sveukupno 10 kombinacija s dvije početnice koje pripadaju različitim retrotranspozonskim porodicama. Ovdje su prikazane one kombinacije koje su dale najveći broj različitih fragmenata.

Na slici 3.6 prikazani su produkti IRAP reakcija s početnicama dizajniranim na osnovi retrotranspozona *Gans* (*Pgansl*LTR-reverse) i retrotranspozona *Edel* (*Pedel*LTR-reverse. Umnoženi su fragmenti veličina od 2 kb do 300 pb. Polimorfizmi su uočeni samo kod uzoraka ob-004 (1) i ob-092 (2) za koje je ustanovljeno da ne pripadaju sorti Plavac mali što je još jednom potvrđuje učinkovito razlikovanje sorti IRAP tehnikom. Kod preostalih 30 klonova polimorfizmi nisu uočeni.



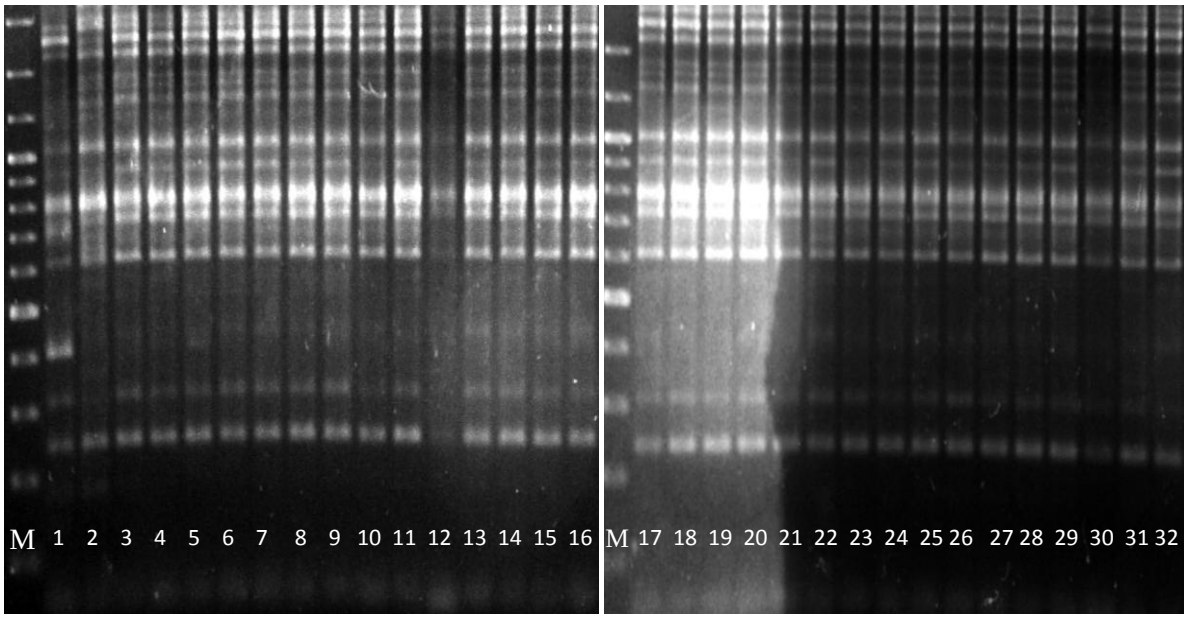
Slika 3.6. Elektroforetsko razdvajanje produkata IRAP reakcije dobivenih umnažanjem genomske DNA klonova Plavca malog s početnicama *Pgansl*LTR-reverse i *Pedel*LTR-reverse. Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10000 pb. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na podatke u tablici 2.1.

Kombinacijom početnica *Pgentil*LTR-reverse i *Pedel*LTR-forward umnoženi su fragmenti u rasponu od 2,5 kb do 200 pb (slika 3.7). Osim kod uzoraka ob-004 (1) i ob-092 (2) koji nisu klonovi Plavca malog, polimorfni fragmenti nisu uočeni.



Slika 3.7. Elektroforetsko razdvajanje produkata IRAP reakcije dobivenih umnažanjem genomske DNA klonova Plavca malog s početnicama *Pgentil*LTR-reverse i *Pedel*LTR-forward. Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10000 pb. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na podatke u tablici 2.1.

U reakciji gdje su korištene početnice *Phuben*LTR-reverse i *Pedel*LTR-reverse umnoženi su fragmenti u rasponu od 2,5 kb do 200 pb (slika 3.8). Među klonovima Plavca malog nisu uočeni polimorfizmi. Oni su uočljivi jedino kod uzoraka ob-004 (1) i ob-092 (2) koji pripadaju drugim sortama.

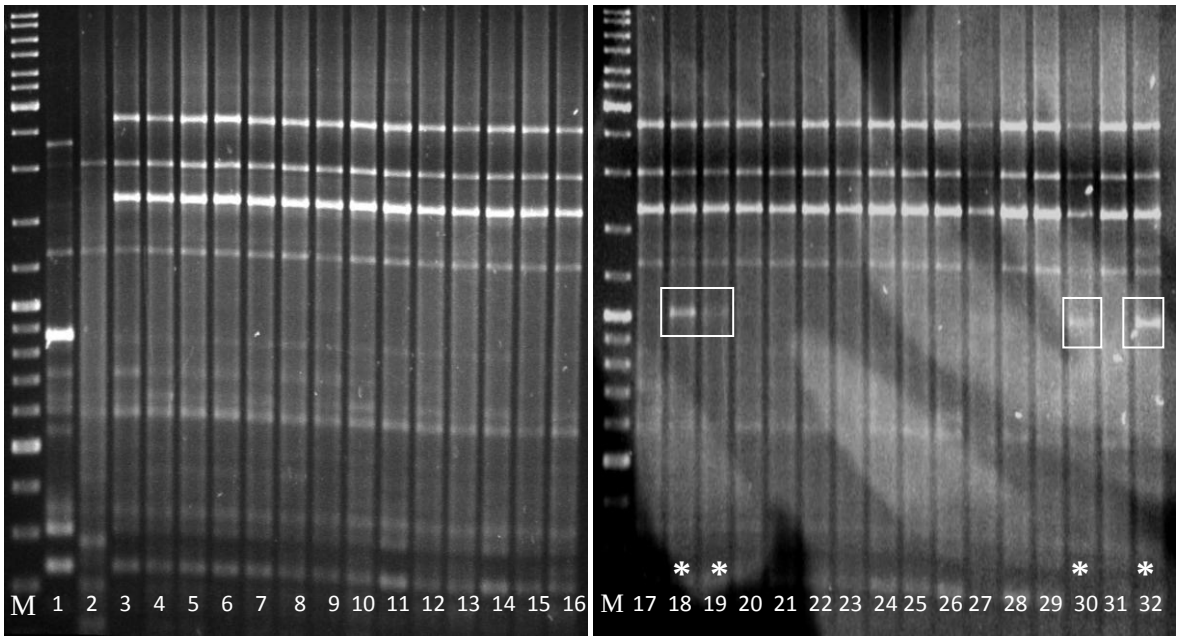


Slika 3.8. Elektroforetsko razdvajanje produkata IRAP reakcije dobivenih umnažanjem genomske DNA klonova Plavca malog s početnicama *Phuben*LTR-reverse i *Pedel*LTR-reverse. Korišteni biljeg: (M) DNA ljestve 100-10 000 pb. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na podatke u tablici 2.1.

3.3 Polimorfizmi dobiveni metodom IRAP sa skupinom početnica II

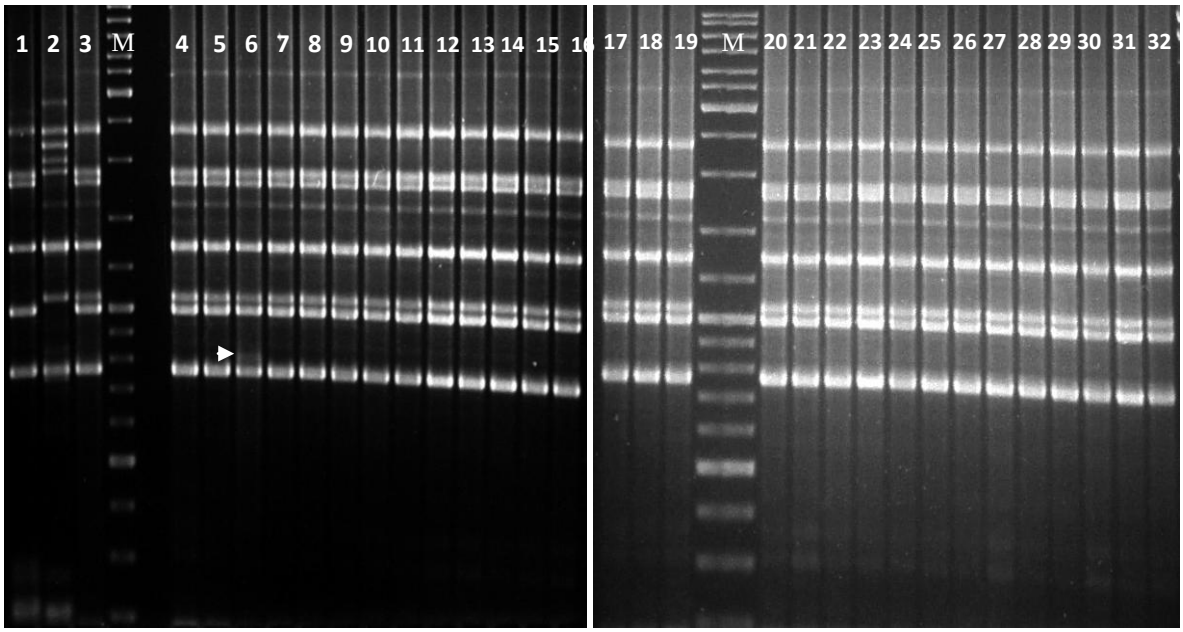
Na odabranim klonovima sorte Plavac mali (tablica 2.2) izvedene su IRAP reakcije i s početnicama dobivenim analizom *in silico* pomoću univerzalnih sekvenci LTR retrotranspozona. Od približno 4200 postojećih LTR sekvenci dizajnirane su 53 početnice (Benjak i sur., neobjavljeno). Odabrano ih je 7, početnice: 1, 4, 7, 9, 25, 27 i 43. S njima je, osim sedam reakcija s pojedinačnim početnicama, moguće provesti i dvadeset jednu IRAP reakciju s dvije različite retrotranspozonske početnice. Provedeno je ukupno sedam reakcija s pojedinačnim početnicama. Također, i korištenjem tih početnica dobiven je općenito mali broj polimorfizama među navedenim klonovima, ali kao i sa setom početnica II, kod uzoraka ob-004 i ob-092 uočen je veći broj polimorfizama.

U reakciji s početnicom 7 dobiven je isti polimorfni fragment kod 4 klona, veličina polimorfnog fragmenta je oko 1 kb (slika 3.9). Klonovi ob-277 (30) i ob-286 (32) pripadaju kasno zrijućim, dok je ob-219 (19) rano zrijući klon. Klon ob-214 (18) ne pripada grupi klonova svrstanim u spomenutu fenotipsku kategoriju po zriobi nego po krupnoći (tablica 2.2). Time što se pronađeni plimorfizam, u 3 od 4 slučaja, javlja kod onih klonova koji su fenotipski vezani za proces zriobe, otvara se pitanje da li između polimorfizma i spomenutog fenotipa postoji uzročno posljedična veza. U planu je kloniranje i sekvenciranje sva 4 polimorfna fragmenta.



Slika 3.9. Elektroforetsko razdvajanje produkata IRAP reakcije dobivenih umnažanjem genomske DNA klonova Plavca malog s početnicom 7. Polimorfni fragmenti su uokvireni. Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10 000 pb. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na podatke u tablici 2.1.

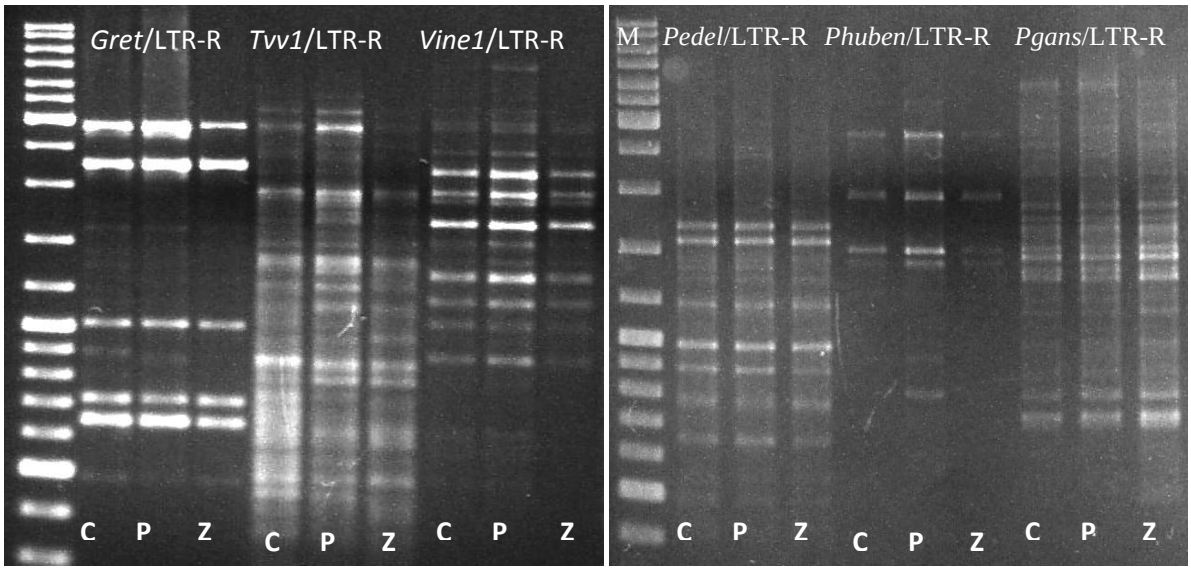
IRAP reakcijom s početnicom 27 (slika 3.10) uočen je jedan polimorfni fragment veličine 800 pb i to kod klona ob-019 (6) različitog od ranije spomenutih klonova s iskazanim polimorfizmom, koji pripada u fenotipsku skupinu po urodu i zbijenosti. Kod uzoraka ob-004 i ob-092 vidi se velik broj plimorfizama, što još jednom reproducira svojstvo biljega IRAP u brzom preliminarnom razlikovanju sorti.



Slika 3.10. Elektroforetsko razdvajanje produkata IRAP reakcije dobivenih umnažanjem genomske DNA klonova Plavca malog s početnicom 27. Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10 000 pb. Polimorfni fragment označen je strelicom. Brojevi kojima su označene jažice odnose se na podatke u tablici 2.1.

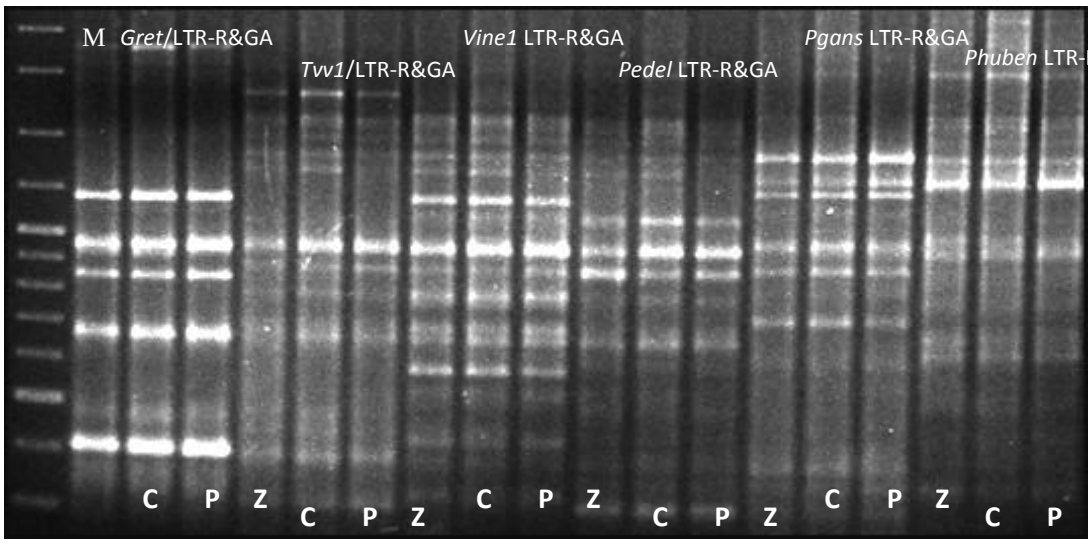
3.4 Polimorfizmi dobiveni metodom IRAP na sortama Crljenak kaštelanski, Primitivo i Zinfandel

Budući da se klonovi Plavca malog nisu mogli razlikovati metodom IRAP korištenjem odabranih početnica, pokušao se isti pristup primijeniti na skupinu klonova za koje se zna da su nakon određene točke u vremenu imali odvojenu povijest vegetativnog razmnožavanja. Odličan primjer takvih „starih“ klonova, za koje se dugo smatralo da su različite sorte, predstavljaju Crljenak kaštelanski, Primitivo i Zinfandel (Maletić i sur.. 2003; Maletić i sur. 2004). Pretpostavljeno je da je svaki od navedenih klonova tijekom vremena mogao akumulirati nezavisne transpozicijske događaje. U svjetlu te pretpostavke, provedeno je 6 IRAP rekacija s pojedinačnim početnicama temeljenim na retrotranspozonskim porodicama *Gret1*, *Tvv1*, *Vine1*, *Edel*, *Huben* i *Gans* (slika 3.11).



Slika 3.11. Elektroforetsko razdvajenje produkata IRAP reakcije s početnicama *Gret1*LTR-R, *Tvv1*LTR-R, *Vine1*LTR-R, *Pedel*LTR-R, *Phuben*LTR-R i *Pgans*LTR-R i genomskom DNA sorti Crljenak kaštelanski (C), Primitivo (P) i Zinfandel (Z). Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10 000 pb.

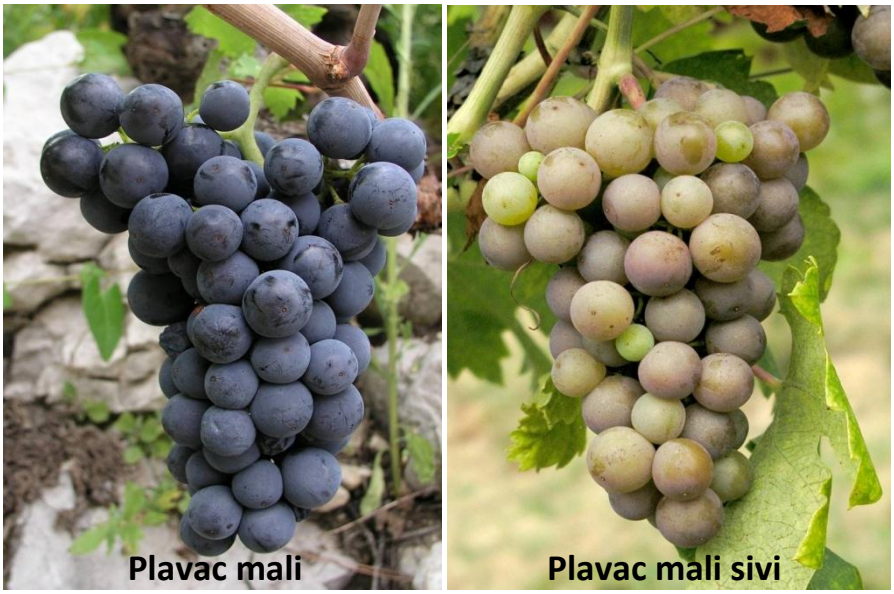
Amplificirani su fragmenti veličina od 4 kb do 400 pb i ustanovljeno je da nema umnoženih polimorfnih fragmenta među tri navedena klonovima niti s jednom korištenom retrotranspozonskom početnicom. Na navedenim trima klonovima provedeno je i 6 REMAP reakcija koje su na kolekciji klonova sorte Plavac mali rađene od strane suradnika s Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Reakcije REMAP provedene su korištenjem 6 prethodno navedenih početnica upotrebljenih kod IRAP-a (slika 3.11) u kombinaciji sa mikrosatelitnom početnicom *Microsat*-GA (slika 3.12).



Slika 3.12. Elektroforetsko razdvajanje produkata REMAP reakcije s retrotranspozonskim početnicama *Gret1*LTR-R, *Tvv1*LTR-R, *Vine1*LTR-R, *Pedel*LTR-R, *Pgans*LTR-R i *Phuben*LTR-R u kombinaciji s mikorsatelitnom početnicom *Microsat*-GA uz korištenje genomske DNA sorti Crljenak kaštelanski (C), Primitivo (P) i Zinfandel (Z). Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10 000 pb.

Umnoženi su fragmenti veličine od 2 kb do 300 pb. Ipak, niti REMAP analizom među tim klonovima nisu ustanovljeni očigledni polimorfizmi, barem ne uz razinu detekcije i razlučivosti koju pruža korišteni agarozni gel i način bojanja.

3.5 Genotipizacija klona Plavac mali sivi upotrebom retrotranspozona *Gret1* i metode CAPS



Slika 3.13 Karakteristična fenotipska razlika u boji kožice klonova Plavac mali i Plavac mali sivi

Klon Plavac mali sivi nije bio obuhvaćen u grupi od 32 analizirana klona, a predstavlja fenotipski najočitiji primjer unutarsortne varijabilnosti Plavca malog. Istraživanjem lokusa *Vvmyb,* ključnog za boju kožice bobica grožđa, pokušalo se ući u trag eventualnim DNA polimorfizmima odgovorrnim za razliku u boji kožice između Plavca malog i Plavca malog sivog.

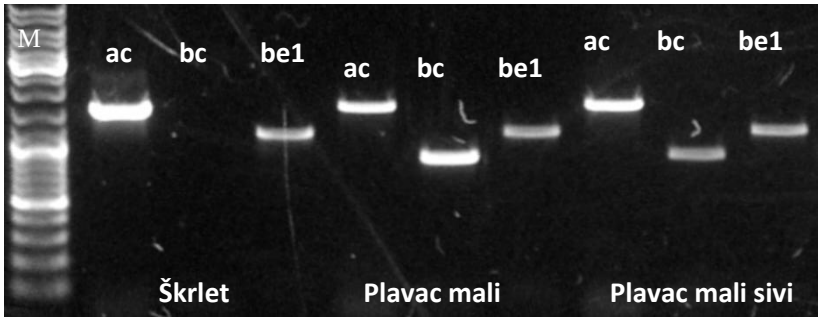
3.5.1 Retrotranspozon *Gret1*

Budući da je ugradnja retrotranspozona *Gret1* uzvodno od gena *VvmybA1* jedan od presudnih događaja za izostanak sinteze antocijanina i time za različitu obojenost kožice grožđa, metodom RBIP pokušalo se ustanoviti da li je navedena mutacija uzrok i različite obojenosti

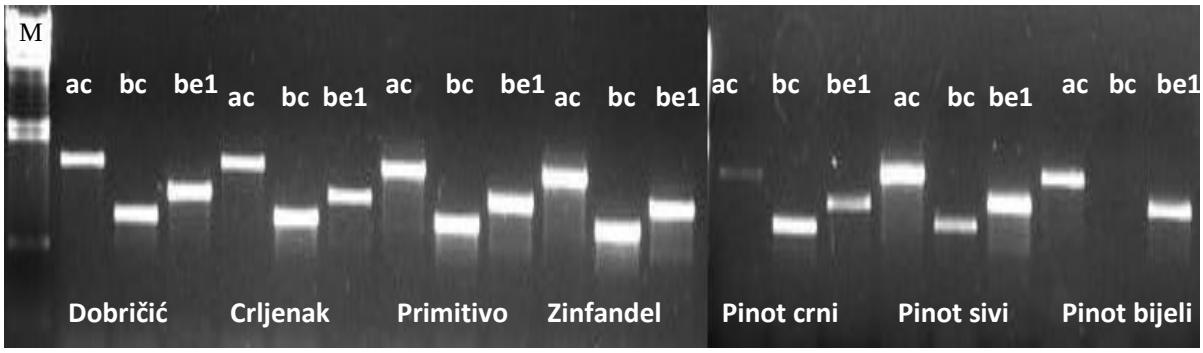
kožice kod identičnih sorti Crljenak, Primitivo, Zinfandel; sorti Škrlet, Dobričić, Pinot crni i njegovih klonova Pinot sivi i Pinot bijeli te Plavca malog i Plavca malog sivog.

Za tu analizu korištene su početnice Gret a, b, c i e1 (slika 1.2 b). Početnicama a i c umnožava se 3' LTR kraj *Gret1* retrotranspozona dok s*e* početnicama b i e1 umnožava njegov 5' LTR kraj. Uz to, s njima se umnoži i dio alela *VvmybA1*. Kombinacija b i c početnica umnožava genomski fragment ako *Gret1* nije ugrađen (*VvmybA1b* alel) ili je izrezan homolognom rekombinacijom svojih LTR krajeva pri čemu ostane samo pojedinačni/"solo" LTR. Početnice a i c daju fragment veličine 1,7 kb, b i e1 početnice umnažaju fragment veličine 1,1 kb, dok kombinacijom početnica b i c nastaje fragment čija veličina iznosi 0,85 kb.

Na slici 3.14 vidi se da Plavac mali i Plavac mali sivi imaju identičan obrazac elektroforetskih fragmenata, gdje se vidi da se amplificiraju sekvence oko 3' i 5' LTR-a što ukazuje da je u *VvmybA1* lokus najvjerojatnije ugrađen cjeloviti *Gret1* retroelement. Iz navedenog se može izvući zaključak da fenotip Plavca malog sivog nije posljedica *Gret1* polimorfizma u navedenom lokusu. Nedostatak fragmenta koji se dobiva kombincijom početnica b i c kod bijele sorte Škrlet upućuje na to da ona, očekivano, ne sadrži alel bez *Gret1* retrotranspozona-*VvmybA1b*. Isto vrijedi i za Pinot bijeli (slika 3.15). Ostale sorte prikazane na slici 3.15 izabrane su zbog svog srodstvenog odnosa s Plavcem malim. Plavac mali potomak je sorata Dobričić i Crljenak (Maletić i sur. 2004), a Crljenak je istovjetan sortama Zinfandel i Primitivo. One pokazuju amplikone kod svih kombinacija početnica što znači da su heterozigotne - sadrže alele *VvmybA1a* i *VvmybA1b*.

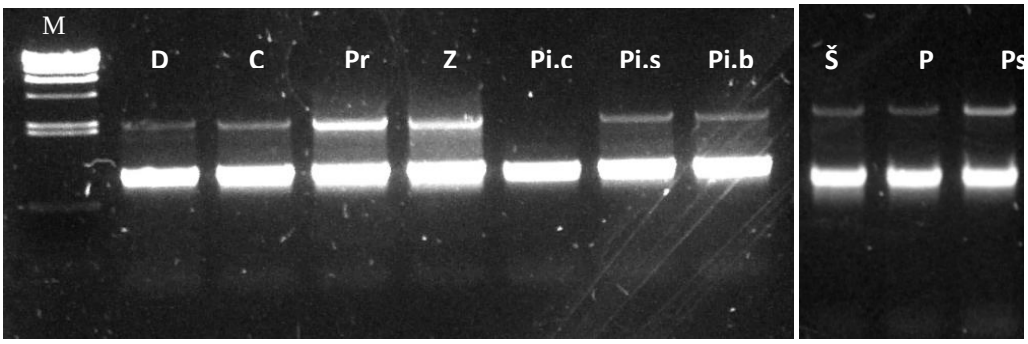


Slika 3.14. Elektroforetsko razdvajanje produkata RBIP reakcije provedene s kombinacijom početnica ac (umaža 3' LTR retrotranspoona), bc (umnaža intaktni *VvmybA1* lokus) i be1 (umaža 5' LTR retrotranspozona) kod sorti Škrlet, Plavac mali i Plavac mali sivi. Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10000 pb.



Slika 3.15. Elektroforetsko razdvajanje produkata RBIP reakcije provedene s kombinacijom početnica ac, bc i be1 kod sorti Dobričić, Crljenak, Primitivo, Zinfandel, Pinot crni, Pinot sivi i Pinot bijeli. Korišteni biljeg (M): λ/*Hind*III.

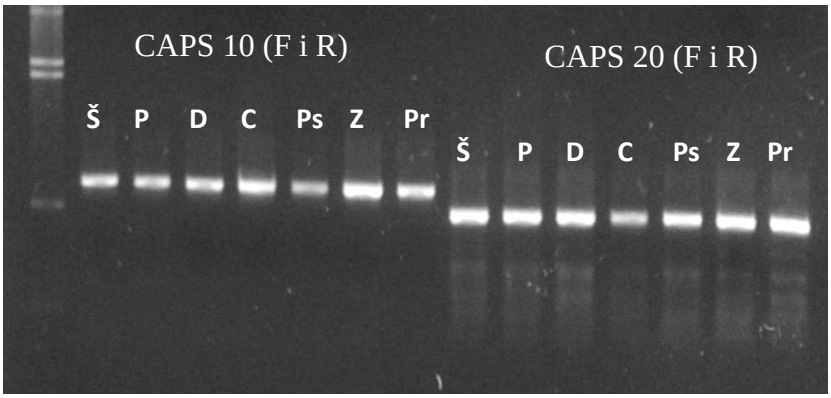
Neočekivano, kod testiranja a, b, c i e1 početnica amplikoni su dobiveni i korištenjem kombinacije početnica a i e1 (slika 3.16) što je teoretski nemoguće. Da se istraži je li riječ o artefaktu ili specifičnom amplikonu, prikazani fragmenti će u daljnjem istraživanju biti pročišćeni i sekvencirani.



Slika 3.16. Elektroforetsko razdvajanje produkata RBIP reakcije s početnicama Gret a i e1 kod sorti Dobričić (D), Crljenak (C), Primitivo (Pr), Zinfandel (Z), Pinot crni (Pi.c), Pinot sivi (Pi.s), Pinot bijeli (Pi.b), Škrlet (Š), Plavac mali (P) i Plavac mali sivi (Ps). Korišteni biljeg (M): λ/*Hind*III.

3.5.2 Rezultati amplifikacije s Caps 10 i Caps 20

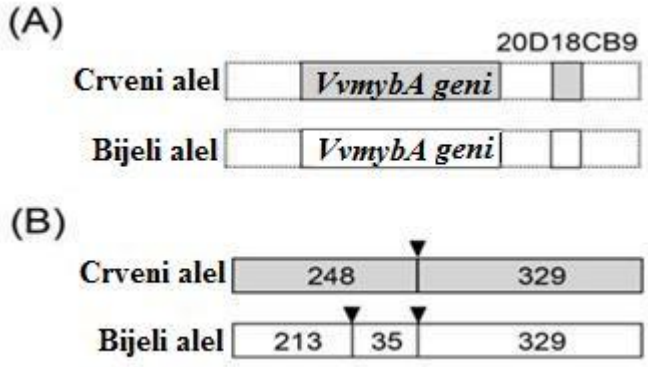
Kod analize metodom CAPS prvo su pomoću lančane reakcije polimerazom s početnicama CAPS 10 F i R te CAPS 20 F i R umnoženi odgovarajući fragmenti koji omeđuju VvMYB lokus odgovornom za boju kožice grožđa (slike 3.17).



Slika 3.17. Elektroforetsko razdvajanje produkata CAPS reakcije s početnicama CAPS 10 (F i R) i CAPS 20 (F i R) kod sorti Škrlet (Š), Plavac mali (P), Dobričić (D), Crljenak (C), Plavac mali sivi (Ps), Zinfandel (Z) i Primitivo (Pr). Korišteni biljeg: λ/*Hind*III.

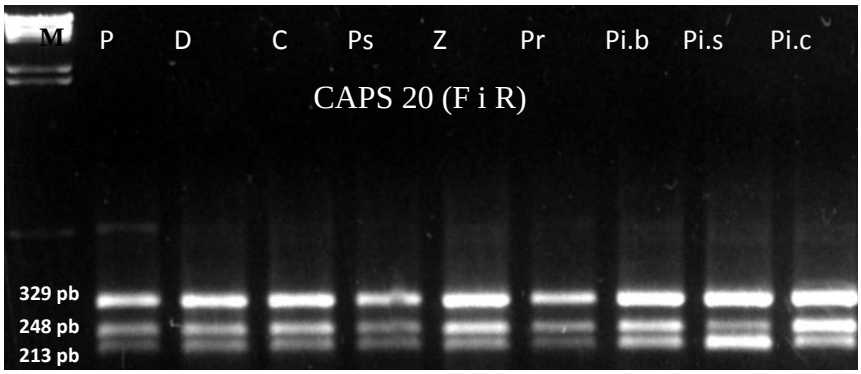
S početnicama CAPS 10 F i R dobiveni su fragmenti veličine 0,75 kb, dok su početnicama CAPS 20 F i R umnoženi fragmenti veličine oko 0,55 kb.

Restrikcijom digestijom produkata nastalih umnožavanjem s CAPS 20 početnicama očekuju se fragmenti veličine 329 i 248 pb za crveni alel, a bijeli alel ima dodatno restrikcijsko mjesto koje se nalazi u navedenom fragmentu od 248 pb, zbog kojeg nastaju fragmenti veličina 213 i 35 pb (slika 3.18).



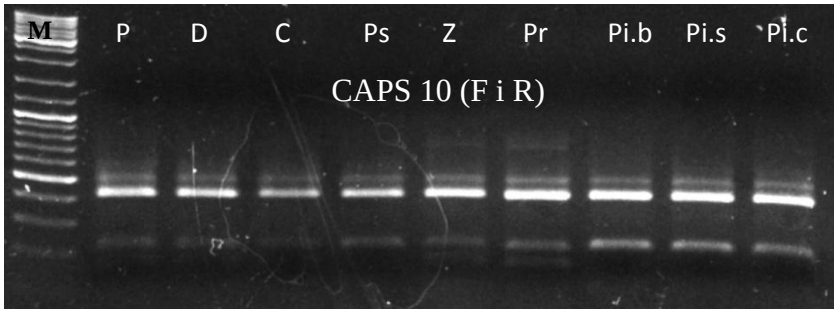
Slika 3.18. (A) Shematski prikaz lokusa *VvmybA* i CAPS 20 markera (20D18CB9). (B) Shematski prikaz produkata umnoženih lančanom reakcijom polimerazom s CAPS 20 početnicama. Strelicama su označena restrikcijska mjesta za enzim *Dde*I. Navedene su predviđene veličine fragmenata u pb (Furiya i sur. 2009).

Budući da su kod svih uzoraka na slici 3.19 digestijom dobivena 3 fragmenta (fragment od 35 pb je premali da bi se mogao detektirati na korištenom gelu) zaključujemo da nema homozigota za crvenu boju. Među korištenim uzorcima nisu uočeni drugi polimorfizmi.



Slika 3.19. Elektroforetsko razdvajanje produkata digestije CAPS reakcija s CAPS 20 (F i R) početnicama kod sorti Plavac mali (P), Dobričić (D), Crljnak (C), Plavac mali-sivi (Ps), Zinfandel (Z), Primitivo (Pr), Pinot bijeli (Pi.b.), Pinot sivi (Pi.s.) i Pinot crni (Pi.c.). Korišteni biljeg (M): λ/*Hind*III.

Kao produkti digestije reakcije s CAPS 10 početnicama dobivena su tri fragmenta (slika 3.20) veličina 500, 420 i 220 pb kod Plavca malog sivog i klonova Pinot-a, dok je kod Plavca malog, Dobričića, Crljenka, Zinfandela i Primitiva uočen i fragment od 200 pb baza.



Slika 3.20. Elektroforetsko razdvajanje produkata digestije CAPS reakcija s CAPS 10 (F i R) početnicama kod sorti Plavac mali (P), Dobričić (D), Crljnak (C), Plavac mali sivi (Ps), Zinfandel (Z), Primitivo (Pr), Pinot bijeli (Pi.b), Pinot sivi (Pi.s) i Pinot crni (Pi.c) Korišteni biljeg (M): DNA ljestve 100-10000 pb.

Produkti digestije reakcije s CAPS 10 početnicama, dobiveni kod klonova Plavac mali i Plavac mali sivi provjereni su dodatno bojanjem s osjetljivijom Syber gold bojom (nije prikazano). Međutim, tom analizom je pokazano da obrazac Plavca malog sivog također sadrži 4 fragmenta kao i onaj Plavca malog. Njegov fragment od 200 pb nešto je slabijeg intenziteta i stoga nije bio uočljiv na gelu bojanom etidij bromidom. Potrebne su replike i daljnja istraživanja da bi se potvrdile primjećene razlike te ustanovilo jesu li one možebitni uzrok različitom fenotipu Plavca malog i Plavca malog sivog.

4 RASPRAVA

Uz pomoć IRAP i REMAP sustava molekularnih biljega istaživani su polimorfizmi u DNA koji bi mogli biti odgovorni za izraženu fenotipsku raznolikost i/ili koji bi bili specifični za pojedini klon Plavca malog - najvažnije crne sorte vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u Hrvatskoj. Oba sustava umnažaju mjesta ugradnje retrotranspozona u genomskoj DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR), a svaka korištena kombinacija početnica pri tom daje svoj specifični obrazac fragmenata (Kalendar i sur. 1999). Usporedbom obrazaca fragmenata dobivenih istom kombinacijom početnica na uzorcima (klonovima) iste sorte, a s variranim količinama pojednih komponenti PCR reakcije prilikom optimizacije uvjeta, ustanovljeno je da su oni identični osim po svom intenzitetu. Iskazana reproducibilnost dobivenih obrazaca fragmenata određuje IRAP i REMAP kao specifične i pouzdane tehnike.

U navedenim eksperimentima PCR optimizacije, kao kalup korištena je genomska DNA različitih hrvatkih autohtonih sorti. Primjećeno je da se obrasci fragmenata dobiveni istim početnicama uvelike razlikuju obzirom na kalup/sortu. Time je pokazano da osim mikorosatelitnih/SSR biljega (This i sur. 2004.) i sustavi temeljeni na retrotranspozonskim sekvencama imaju potencijal služiti kao dobar alat za brzo i jeftino međusobno razlikovanje sorti vinove loze (D'Onofrio i sur. 2010). Za razmjenu podataka između laboratorija bilo bi potrebno definirati standardne obrasce fragmenata za svaku sortu prema kojima bi se mogla raditi usporedba što bi omogućilo određivanje sorte čiji je identitet nepoznat.

S druge strane isti sustav retrotranspozonskih biljega, korišten na različitim klonovima sorte Plavac mali dao je iznenađujuće mali broj polimorfizama koji se nisu mogli dovesti u vezu s njihovom fenotipom ili koji bi bili specifični za pojedini klon. Najveći broj polimorfnih fragmenta uočen je jedino kod klonova ob004 i ob092 za koje je naknadnom SSR analizom utvrđeno da ne pripadaju sorti Plavac mali (identitet ob-004 je nepoznat, a ob-092 pripada sorti Glavinuša; Zdunić 2010) čime je dodatno potvrđena učinkovitost razlikovanja sorti IRAP tehnikom. Kod njih se najinformativnijom pokazala IRAP reakcija s početnicom 7 (Benjak i sur., neobjavljeno) gdje je za 4 klona uočen polimorfizam, od kojih su 3 fenotipski povezana pa će se provesti sekvenciranje polimorfnih fragmenata radi utvrđivanja uzročno posljedične veze. Metodama IRAP i REMAP analizirana je i skupina klonova Crljenak, Primitivo i Zinfandel za koje se zna da su nakon određene točke u vremenu imali odvojenu povijest vegetativnog razmnožavanja. Iako je za pretpostaviti da je svaki od navedenih

klonova tijekom vremena uslijed vegetativnog razmnožavanja akumulirao nezavisne transpozicijske događaje, ni među njima nisu uočeni polimorfni fragmenti. Moguće je da se polimorfizmi kriju u fragmentima slabijeg intenziteta koji se ne mogu uočiti zbog ograničenja u razlučivosti agaroznih gelova bojanih etidij-bromidom. Za provjeru navedene pretpostavke bilo bi potrebno upotrijebiti osjetljivije metode detekcije fragmenata npr. poput boje SYBR® Gold (deset puta osjetljivija od etidij bromida) ili bi se fragmente moglo detektirati korištenjem fluorescentno obilježnih početnica i razdvojiti kapilarnim elektroforezom na uređaju za sekvenciranje DNA (npr. ABI 3130 Genetic Analyzer). Potonja metoda omogućila bi detekciju fragmenata koji su tijekom IRAP ili REMAP reakcije relativno slabo umoženi, a potencijalno su polimorfni.

U slučaju svakog dobivenog polimorfizama obavezno se moraju provesti dvije vrste replika: (1) tehnička - s istim DNA izolatom, i (2) biološka - s genomskom DNA ponovo izoliranom iz istog uzorka (klona). Ukoliko bi došlo do potvrde određenog polimorfizma kroz navedene replike, pristupilo bi se njegovom kloniranju u plazmidni vektor te sekvenciranju. Ako se niti jednim od navedenih sustava ne bi uspjeli detektirati polimorfizmi između fenotipski divergentnih klonova, to bi značilo da odabrani par početnica nije dobar i trebalo bi pokušati nove kombinacije početnica dizajniranih na osnovi retrotranspozonskih porodica. Radi preciznijeg uvida u aktivnost retrotranspozonskih porodica procjenjeno je vrijeme njihove insercije (Moisy i sur. 2008) usporedbom 5’ i 3’ LTR slijedova kod svake od porodica retrotranspozona koje su se koristile kao početnice skupine 1. Na temelju točkastih mutacija između LTR-ova pokazano je da je većina cjelovitih kopija retrotranspozona ugrađena u svoje genomske lokuse tijekom posljednjih 2 milijuna godina. Jedna četvrtina od ukupnog broja cjelovitih retrotranspozona imali su identične LTR-ove, što znači da su u svoje lokuse ugrađeni (bilo kada) tijekom posljednih 200 000 godina. Valja napomenuti da je starost naših klonova maksimalno nekoliko stotina godina i da su polimorfne retrotranspozonske insercije morale nastati razmjerno nedavno.

Od ostalih pristupa temeljenih na drugim elementima genoma pozitivni rezultati prilikom detekcije unutarsortne varijabilnosti postignuti su metodom AFLP (Cervera i sur. 1998; Scott i sur. 2000; Imazio i sur. 2002). Metoda S-SAP koja je kombinacija metoda AFLP i IRAP pokazala se učinkovitom kod razlikovanja klonova sorte Traminer, ali ne i kod klonova sorte Pinot (Labra i sur. 2004). Njome se postiže puno veći broj fragmenata nego metodama IRAP i REMAP (Syed i Flawel 2006) pa se povećava šansa i za „hvatanje“ polimorfnih fragmenata. Međutim, metode AFLP i S-SAP također pokazuju lošu

reproducibilnost, a puno su kompleksnije i zahtjevnije za izvođenje u odnosu na IRAP i REMAP.

Klon Plavac mali sivi nije bio obuhvaćen u grupi klonova analiziranih metodama IRAP i REMAP, a predstavlja fenotipski najočitiji primjer unutarsortne varijabilnosti Plavca malog. Pokušalo se ući u trag eventualnim DNA polimorfizmima odgovornima za njegov drugačiji fenotip analiziranjem lokusa *Vvmyb*, ključnog za boju kožice bobica grožđa. Dokazano je da ugradnja retrotranspozona *Gret1* u promotorsku regiju gena *VvmybA1* kod vinove loze ima za posljedicu njegovu inaktivaciju i time izostanak sinetze antocijanina i bijelu obojenost grožđa (Kobayashi i sur. 2004). Analizom spomenutog lokusa metodom RBIP dobiven je identičan obrazac elektroforetskih fragmenata kod Plavca malog i Plavca malog sivog (oba klona su heterozigoti obzirom na ugrađeni *Gret1* retrotranspozon) iz čega se može zaključiti da njihova različita obojenost nije direktna posljedica eventualnog *Gret1* polimorfizma. Plavac mali i Plavac mali sivi analizirani su na 15 SSR lokusa i uvijek su imali identičan genotip što potvrđuje da su monozogotnog porijekla, tj. da su vegetativni potomci jedne iste početne biljke nastale generativnom oplodnjom. Prilikom testiranja početnica za navedenu metodu RBIP neočekivano je dobiven i amplikon korištenjem početnica a i e1 (slika 1.2.). Isti amplikon dobiven je kod oba klona Plavca malog i drugih testiranih sorti. Ukoliko nije riječ o artefaktu, a to se može provjeriti sekvenciranjem, taj rezultat bi mogao ukazivati da je došlo do rearanžmana u tom dijelu genoma.

Niti analizom s biljezima CAPS nije nedvosmisleno ustanovljen polimorfizam, ali je s njima kao i prethodno s početnicama RBIP, pokazano da su oba klona heterozigotna. Produkti dobiveni restrikcijskom digestijom reakcije s CAPS 10 početnicama razlikovali su se kod Plavca malog i Plavca malog sivog. Međutim, osjetljivijom Syber gold bojom pokazano je da oba klona sadrže iste fragmente, s jedinom razlikom što fragment koji nije bio uočljiv na gelu bojanom etidij bromidom ima slabiji intenzitet. Konačni način da ustanovimo eventualni polimorfizam u CAPS amplikonima je njihovo sekvenciranje.

Kod sorte Pinot crni usporednom analizom na 50 mikrosatelitnih lokusa utvrđeni su polimorfizmi među klonovima, točnije kod njegovog sivog klona. Polimorfizam se manifestira u vidu pojavljivanja trećeg alela. Zaključeno je da ima kimernu meristemsku strukturu u kojoj se nalaze genetički različiti slojevi, L1 i L2 (Hocquigny i sur. 2004). U slučaju mutanata sorte Cabarnet Sauvignon, njegov sivi klon Malian nastaje delecijama u lokusu za boju crvenog alela L2 stanica pa taj sloj poprima bijeli fenotip. Za bijeli mutanat koji nastaje od Malian-a, pokazalo se da je posljedica staničnog rearnžmana u kojem L2 stanice zamjenjuju L1 stanice (Walker i sur. 2006). Međutim, navedeni rearanžman nije uzrok

uočene promjene boje kod bijelih mutanta Pinot-a sivog (Furiya i sur. 2009). U svjetlu tih rezultata moglo bi se istražiti da li i Plavac mali sivi ima trialelnu strukturu istih mikrosatelitnih lokusa korištenih za Pinot sivi. Također bilo bi moguće mikroskopski ispitati građu kožice Plavca malog sivog i ekspresiju antocijana u slojevima L1 i L2.

5 ZAKLJUČCI

- Optimizirani su uvjeti za tehnike IRAP i REMAP te je pri tom pokazana reproducibilnost postignutih obrazaca fragmenata na uzorcima iste sorte, što ove tehnike čini specifičnim i pouzdanim.

- Metode IRAP i REMAP pokazale su se kao dobar, brz i jeftin alat za preliminarno razlikovanje sorata vinove loze

- Među klonovima hrvatske autohtone sorte Plavac mali, kao i na starim klonovima iste sorte različitog imena Crljenak, Primitivo i Zinfandel metodom IRAP dobiven je mali broj polimorfizama koji se nisu mogli dovesti u vezu s njihovom fenotipskom raznolikošću ili koji bi bili specifični za pojedini klon

- Plavac mali sivi je heterozigot obzirom na ugradnju *Gret1* retrotranspozona u lokus *VvmybA1* kao i s obzirom na biljege CAPS koji omeđuju lokus za boju kožice vinove loze; polimorfizam se vjerojatno nalazi u kimernoj prirodi staničnih slojeva kožice bobe.

6 LITERATURA

1. Alleweldt G. i Dettweiler E. (1994): The genetic resources of Vitis:world list of grapevine collections, drugo izdanje Geilweilerhof, Siebeldingen.
2. Amar K. i Hirochika H. (2001): Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. Trends in Plant Sci. 6: 127-133.
3. Aradhya M.K., Dangl G.S., Prins B.H., Boursiquot J.M., Walker A.M., Meredith C.P., Simon C.J. (2003): Genetic structure and differentiation in cultivated grape Vitis vinifera L. Genet Res (Camb) 81: 179-192.
4. Arencibia A.D., Carmona E., Pèrez G., Vinagre F., Hemerly A.S., Santana I. (2005): Identification and characterization of hypervariable sequences within the *Saccharum* complex. Plant Sci 169: 478-486.
5. Bailey L.H. (1934): The species of grapes peculiar to North America. Gentes Herb 3: 154–244.
6. Boss P.K., Davies C.,Robinson S.P. (1996): Analysis of the exprssion of anthocyanin pathway gene in developing *Vitis vinifera* L. Cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. Plant Physiol. 111: 1059-1066.
7. Botstein D., White R.L., Skolnick M.H., Davis R.W. (1980): Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32: 314-31.
8. Bouquet A., Torregrosa T., Iocco P. i Thomas M. R. (2007): Grapes. U: Kole C., Hall T.C. (ur.) A Compendium of Transgenic crop Plants. Volumen 4., Wiley-Blackwell, Oxford, U.K.
9. Cervera M.T., Cabezas J.A., Sancha J.C., Martinez de Toda F., Martinez-Zapater J.M. (1998): Application of AFLPsto the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. gnetic resources, a case study with accessions from Rioja (Spain). Theor Appl Genet 97: 51-59.
10. Cervera M.T., Cabezas J.A., Rodriguez-Torres I., Chavez J., Cabello F., Martinez-Zapater J.M. (2002): Varietal diversity within grapevine accessions of cv. Tempranillo. Vitis 41: 33-36.

11. Cox R.L. i Lehrach H. (1991): Genome mapping: PCR basedmeiotic and somaticcell hybrid analysis. BioEssays 13: 193-198.

12. D'Amato F. (1977): Role of somatic mutations in the evolution of higher plants. Caryologia. 50: 1-15.

13. D'Onofrio C., De Lorenzis G., Giordani T., Natali L., Cavallini A., Scalabrelli G. (2010): Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. Tree Genetics & Genomes 6: 451–466.

14. Duncan R.R. (1997): Tissue culture-induced variation and crop improvement. Adv Agron 58: 201-240.

15. Flavell A.J., Knox M.R., Pearce S.R., Ellis T.H.N. (1998): Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. Plant J 16: 643–650.

16. Flavell R.B. (1986): Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. Philo Trans R Soc of Lond B Biol Sci 312: 227–242.

17. Forneck A. (2005): Plant Breeding: Clonality – A concept for stability and variability during vegetative propagation. U: Esser, U. L. K., Beyschlag, W, Murata, J. (ur.) Progress in Botany. Springer Berlin Heidelberg, Germany, str. 165-183.

18. Ford C.M., Boss P.K., Høj P.B. (1998): Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarly serve to glucosylate anthocyanindins *in vivo*. J Biol Chem 273: 9224-9233.

19. Frankel A.D. i Young J.A. (1998): HIV-1 Fifteen proteins and an RNA. Annu Rev Biochem 67: 1–25.

20. Franks T., Botta R., Thomas M.R. (2002): Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. Theor Appl Genet 104: 192-199.

21. Friesen N., Brandes A., Heslop-Harrison J.S. (2001): Diversity, originand distribution of retrotransposons (gypsy and copia) in Conifers. Mol Biol Evol 18: 1176–1188.

22. Furiya T., Suzuki S., Tamotsu S., Sueta T., Takayanagi T. (2009): Molecular characterization of a bud sport of a Pinot gris bearing white berries. Am J Enol Vitic 60(1): 66-73.

23. Gerrath J., Lacroix C., Posluszny U. (1998): Phyllotaxis in the Vitaceae. World ScientiWc, Singapore, str. 89–107.

24. 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.

25. Imazio S., Labra M., Grassi F., Winfield M., Bardini M., Scienza A. (2002): Molecular tools for clone identification: the case of grapevine cultivar Traminer. Plant Breed 121: 531-535.

26. Jaillon O. i suradnici (2007): The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature 27:449(7161):463-7.

27. Kalendar R.i Schulman A. H. (2007): IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. Nature protocols 5: 2478-2484.

28. Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A.H. (1999): IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor Appl Genet 98: 704–711.

29. Kobayashi S., Ishimaru M., Ding C.K., Yakushiji H., Goto N. (2001): Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. Plant Sci 160: 543-550.

30. Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. (2004): Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science 304: 982.

31. Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. (2005): Association of *VvmybA1* gene expression with antocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. J Hort Sci 74: 196-203.

32. Kovarova M. i Draber P. (2000): New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. Nucleic Acids Res 28(13):E70.

33. Labra M., Imazio S., Grassi F., Rossoni M., Sala F. (2004): *Vine*-1 retrotransposon-based sequence-specific amplified polymorphism for *Vitis vinifera* L. Genotyping. Plant Breeding 123: 180-185.

34. Liao X. R., Zhu X. C., He P.C. (1997): Application of seed protein components in cluster analysis of Chinese *Vitis* Plants. J Hort Sci 72: 109-115.

35. Lijavetzky i sur. (2006): Molecular genetics of berry colour variation in table grape. Mol Genet Genomics 276: 427-435.

36. Maletic E., Pejic I., Karlogan K. J., Piljac J., Dangl G., Vokurka A., Lacombe T., Mirosevic N., Merdith, C. (2003): The identification of Zinfandel on the Dalmatian coast of Croatia. Acta Hort 603: 251-254.

37. Maletic E., Pejic I., Karlogan K. J., Piljac J., Dangl G., Vokurka A., Lacombe T., Mirosevic N., Merdith, C. (2004): Zinfandel, Dobricic and Plavac mali: the genetic relationship among three cultivars of the Dalmatian coast of Croatia. Am J Enol Vitic 55(2): 174-180.

38. Maletić E., Karlogan K.J., Pejić I. (2008): Vinova loza – ampelografija, ekologija, oplemenjivanje. Školska knjiga, Zagreb.

39. McGovern P.E. (2003): Ancient wine: the search for the origins of viticulture. Princeton University Press, Princeton.

40. Moisy C., Garrison K.E., Meredith C.P. i Pelsy F. (2008): Cgaracterization of ten novel Ty1/copia-like retrotransposons families of the grapevine genome. BMC Genomics 9: 469.

41. Mullins M.G., Bouquet A., Williams L.E. (1992): Biology of the grapevine. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne.

42. Mullis K.B., Fallona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic ampiication of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51: 263-73.

43. Pelsy F. i Merdinoglu D. (2002): Complete sequence of *Tvv1*, a family of *Ty1 copia*-like retrotransposons of *Vitis vinifera* L., reconstituted by chromosome walking. Theor Appl Genet 105: 614-621.

44. Pereira H.S., Barão A., Delgado M., Morais-Cecílio L., Viegas W. (2005): Genomic analysis of *Grapevine Retrotransposon 1* (*Gret1*) in *Vitis vinifera*. Theor Appl Genet 111: 871-878.

45. Provan J., Thomas W.T.B., Forester B.P., Powell W. (1999): Copia -SSR: A simple marker technique which can be used on total genomic DNA. Genome 42: 363–366.

46. Schlotterer C. i Tautz D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Res 20: 211-215.

47. Schulman A. H. (2007): Molecular markers to asses genetic diversity. Euphytica 158: 313-321.

48. Scott K.D., Abblet E.M., Lee L.S., Henry R.J. (2000): AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. Euphytica 113: 245-249.

49. Shirasu K., Schulman A.H., Lahaye T., Schulze-Lefert P. (2000): A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. Genome Res 10: 908–915.

50. Silvestroni O., Pietro D., Intrieri C., Vignani R. (1997): Detection of genetic diversity among clones of cv. Fortana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. Vitis 36: 147-150.

51. Syad N.H. i Flawell A.J. (2006): Sequence-specific amplification polymorphisms (SSAPs): a multi locus approach for analyzing transposon insertions. Nature Protocols 1(6): 2746-2752.

52. Tanksley S.D. (1983): Molecular markers in plant breeding. Plant Mol Biol Rep 1: 3–8.

53. This P. i sur. (2004): Development of a standard set of microsatellite reference alles for identification of grape cultivars. Theor Appl Genet 109: 1448-1458.

54. This P., Lacombe T., Cadle-Davidson M., Owens C.L. (2007): Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in domestication gene *VvmybA1*. Theor Appl Genet 114: 723-730.

55. Thomas M.R. i Scott N.S. (1993): Microsatellite repeatsin grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequenced-tagged sites (STSs). Theor Appl Genet 86: 985-990.

56. Thompson M.M. i Olmo H.P. (1963): Cytohistological studies of cytochimeric and tetraploid grapes. Am J Bot 50: 901-906.

57. Tomkins J.P. i suradnici (2001): Grape (Vitis vinifera L) BAC library construction, preliminary STS analysis, and identification of clones associated with flavonoid and stilbene biosynthesis. Am J Enol Vitic 52: 287–291.

58. Truel P., Rennes C., Domergue P. (1980): Identification in collections of grapevines. U: Third international symposium on grape breeding. Department of Viticulture and Enology University of California, Davis, CA, str. 78–86.

59. Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D.A., Cestaro A. i suradnici (2007): A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine variety. PLoS Onne 2(12): e1326.

60. Verriès C., Bès C., This P., Tesnièr C. (2000): Cloning and characterization of Vine-1, a LTR retrotransposon-like element in *Vitis vinifera* L., and other *Vitis* species. Genome 43: 366-376.

61. Walker A.R., Lee E., Robinson S.P. (2006): Two grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignonbearing pale-coloured berries, are the resut of deletion of two regulatory genes. Plan Mol Biol 62: 623-635.

62. Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.A.J., Thomas M.R., Robinson S.P. (2007): White grape arose through mutation of two similar and adjecent regulatory genes. Plant J 49: 772-785.

63. Walter B., Martelli G.P. (1998): Considerations on grapevine selection and certification. Vitis 37: 87-90.

64. Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A.,Thomas B.B., Powell W. (1997): Genetic distribution of BARE -1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Mol Gen Genet 253: 687–694.

65. Welsh J. i McClelland M. (1990.): Fingerprinting genomesusing PCR with arbitrary prmers. Nucleic Acids Res 18: 7123-8.

66. White S. E., Habers L., Wessler S.R. (1994): Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes. A role for *copia*-lie elements in the evolution of gene structure and expression. Proc Natl Acad Sci USA 91: 11792-11796.

67. Wüsch A. i Hormaza J.I. (2002): Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. Euphytica 125: 59-67.

68. Zdunić G. (2010): Genetska i ampelografska karakterizacija sorte Plavac mali (*Vitis vinifera* L.). Doktorska disertacija, Agronomskki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

69. Zohary D. i Spiegl-Roy P. (1975): Beginnings of fruit growing in the old world. Science 187: 319-327.

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