Analiza unutarsortne varijabilnosti sorte Kleščec bijeli (V. vinifera L.) AFLP markerima

Kamenjak, Kruno

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:111538

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Kruno Kamenjak

Analiza unutarsortne varijabilnosti sorte Kleščec bijeli (*Vitis vinifera* L.) AFLP markerima

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET
Diplomski studij – Biljne znanosti

Kruno Kamenjak

Analiza unutarsortne varijabilnosti sorte Kleščec bijeli (*Vitis vinifera* L.) AFLP markerima

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Ivan Pejić

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____

s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc Ivan Pejić _____

2. Prof.dr.sc. Edi Maletić _____

3. Doc.dr.sc. Darko Preiner_____

SAŽETAK

Vinova loza višegodišnja je kultura koja se razmnožava vegetativno i trenutno na svijetu postoji nekoliko tisuća sorata. Sorta 'Kleščec bijeli' (*Vitis vinifera* L.) se uzgaja na ograničenim površinama na samo nekoliko lokacija među ostalim i u okolici Križevaca. U prošlosti je 'Kleščec bijeli' bio zapostavljen i pogrešno poistovjećivan s njemačkom sortom Knipperle to jest Ortlieber. Nedavno je otkriveno da je 'Kleščec bijeli' jedinstvenog genotipa i nova hrvatska autohtona sorta (Pejić i sur., 2013.) te je pokrenut projekt njezine revitalizacije, odnosno zdravstvene i genetičke selekcije klonskih kandidata. Dugogodišnjim vegetativnim razmnožavanjem unutar sorata vinove loze može doći do pojave spontanih mutacija koje ostaju fiksirane unutar genoma (Meneghetti i sur., 2012.). Odabir trsova koji svojim karakteristikama odstupaju od prosjeka sorte okosnica je klonske selekcije koja u kombinaciji s odabirom bezvirusnih trsova osigurava provjereni i sortno čisti sadni materijal. Cilj ovog rada je provesti analizu unutarsortne varijabilnosti bezvirusnih klonskih kandidata sorte 'Kleščec bijeli' koji su korišteni kao izvorni trsovi za podizanje matičnog nasada sorte. U istraživanju su korišteni mladi listovi 20 klonskih kandidata sorte 'Kleščec bijeli' čija je DNA izolirana nakon liofilizacije koristeći PeqGold Plant kit (Peqlab GmbH, Njemačka). Nakon toga napravljena je AFLP analiza sa 4 kombinacije početnica (Vos i sur. 1995.). Nakon PCR reakcija fragmenti su elektroforetski razdvojeni ABI 3130 genetičkim analizatorom i veličine fragmenata očitane su pomoću GeneMapper 4.0 softverskog paketa (AppliedBiosystems, SAD). Iz dobivenih veličina fragmenta napravljena je binarna matrica, izračunat "*Simple Matching*" koeficijent sličnosti i utvrđena razina unutarsortne varijabilnosti sorte 'Kleščec bijeli'.

Ključne riječi: Kleščec bijeli, klonovi, unutarsortna varijabilnost, AFLP

ABSTRACT

Grapevine is a perennial crop that is propagated vegetatively and currently there exists several thousands of varieties in the world. The variety ‘Kleščec bijeli’ (*Vitis vinifera* L.) is grown on limited areas in only several locations, among others around Križevci. In the past, ‘Kleščec bijeli’ has been neglected and considered to be a synonym with the German variety ‘Knipperle’ which is also known as ‘Ortlieber’. It was recently discovered that the variety ‘Kleščec bijeli’ is a unique genotype and can be considered as a new Croatian autochthonous variety (Pejić et al., 2013.) and a project was initiated to revitalize the variety using sanitary and genetic selection of clonal candidates. After many years of vegetative propagation within the grape varieties spontaneous mutations may occur and due to the nature of propagation they remain fixed in the genome (Meneghetti et al., 2012.). Selecting the vines whose characteristics deviate from the average of the variety is the backbone of clonal selection, which combined with the selection of virus-free vines provides verified and varietal purity of planting material. The aim of this study is to analyze the intravarietal variability of the clonal candidates of ‘Kleščec bijeli’, which are free from economically important viruses, and were used as mother vines for a mother block of the variety. In this study young leaves of 20 virus-free clonal candidates of ‘Kleščec bijeli’ were used. DNA was isolated after freeze-drying using the PeqGold Plant kit (Peqlab GmbH, Germany). AFLP analysis was performed using 4 primer combinations (Vos et al. 1995.). After the PCR reaction, fragments were separated electrophoretically using an ABI 3130 genetic analyzer and the fragment sizes were determined using a GeneMapper 4.0 software package (AppliedBiosystems, USA). Resulting fragment sizes were used for the construction of a binary matrix which was used for the calculation of a "Simple Matching" similarity coefficient which was used to evaluate the intravarietal variability of ‘Kleščec bijeli’.

Key words: Kleščec bijeli, clones, intravarietal variation, AFLP

SADRŽAJ:

1. UVOD 7
2. CILJ RADA 10
3. PREGLED LITERATURE 11
3.1. Kleščec bijeli 13
3.2. Uzroci unutarsortne varijabilnosti 14
3.3. Molekularni markeri 17
3.3.1. Lančana reakcija polimerazom (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) 17
3.3.2. AFLP markeri 19
3.4. Analize unutarsortne varijabilnosti vinove loze pomoću AFLP markera 21
4. MATERIJALI I METODE 23
4.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka za ekstrakciju DNA 24
4.2. DNA ekstrakcija 24
4.3. Provjera kvalitete i koncentracije DNA na agaroznom gelu 26
4.4. AFLP protokol 27
4.5. Očitavanje rezultata i stvaranje binarne matrice 30
4.6. *Simple matching* koeficijent 30
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA 31
5.1. AFLP analiza 31
6. RASPRAVA 34
7. ZAKLJUČAK 36
8. LITERATURA 37

1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je najznačajnija i najraširenija višegodišnja voćna vrsta u svijetu, prema podacima FAOSTAT-a iz 2013. godine zasađena je na oko 7,528 milijuna hektara u svijetu. Na području Republike Hrvatske prema službenim podacima Hrvatskog centra za poljoprivredu hranu i selo (HCPHS) loza se uzgaja na otprilike 35.000 ha. Vinova loza je domestificirana u razdoblju neolitika (6.000–5.000 g. pr. Kr.), te se smatra da potječe sa istočne obale Crnog mora, da bi se oko 4 000 g. pr. Kr. uzgoj vinove loze raširio dalje na područje Mezopotamije, Sirije i Egipta (Maletić i sur., 2008.).

Širokog je areala rasprostranjenosti i uzgoj vinove loze je moguć od 25° i 52° sjeverne geografske širine, te 30° i 45° južne geografske širine, izrazito je polimorfna vrsta te se procjenjuje da danas u svijetu postoji oko 10000 različitih genotipova tj. sorata vinove loze (Maletić i sur., 2008.).

Područje uzgoja vinove loze u Hrvatskoj spada pod utjecaj različitih klimatskih uvjeta: srednjoeuropski, istočni stepski, istočni visinski i mediteranski te shodno tome na našem uzgojnom području postoji širok spektar sorata vinove loze (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008.). Tako u rasadnicima Republike Hrvatske nalazimo 159 vinskih i stolnih sorti, te 30-ak podloga (HCPHS, 2013). Autohtone sorte vinove loze imaju vrlo značajnu ulogu u vinogradarstvu Republike Hrvatske i imaju tendenciju porasta u zasađenim površinama. Udio autohtonih sorata pri podizanju novih nasada se povećava, tj. u proizvodnji sadnog materijala koji je bio zastupljen sa 21,6% u 2004. godini i porastao je na 37,8% u 2010. godini (Andabaka i sur., 2011). U Hrvatskoj se trenutno provodi niz projekata vezanih uz genotipizaciju, revitalizaciju i klonsku selekciju autohtonih sorti vinove loze, a neki od njih su i završeni. Važnost ovih projekata ogleda se u činjenici da na tržištu nema dovoljno certificiranog sadnog materijala, a postoji veliki interes za uzgoj autohtonih sorti (Radiček, 2014.).

'Kleščec bijeli' je jedna od rijetkih autohtonih sorti kontinentalne Hrvatske koja je u procesu revitalizacije na području podregije Prigorje - Bilogora, vinogorje Kalnik, položaj Guščerovec. U Ampelografskom atlasu autori Mirošević i Turković (2003.) navode da je sorta 'Kleščec bijeli' najvjerojatnije stara, autohtona sorta sjeverozapadne Hrvatske, a što bi trebalo provjeriti suvremenim metodama ampelografske determinacije. Tokom povijesti 'Kleščec bijeli' se ne spominje pod tim imenom već je moguće pronaći zapise o sortama 'Beli Kleshiz', 'Kleshiz' i 'Drobni Kleshiz' koji su u biti sinonimi za jednu njemačku sortu naziva 'Ortlieber'. Na području

Republike Hrvatske prvi puta se 'Kleščec bijeli' spominje u Gospodarskim novinama (preteča Gospodarskog lista), u izvješćima Franza Trummera 1854. godine u 14. broju. Krajem 19. stoljeća, u Europu (Velika Britanija) je iz SAD-a introduciran trsov ušenac, poznatiji kao filoksera (*Daktulospharia vitifoliae* Fitch.) koji je tokom narednih godina poharao te uništio vinograde diljem Europe. Kako u to vrijeme nije bilo moguće suzbiti filokseru jer ona napada korijen vinove loze znanstvenici su se bezuspješno borili, a rješenje je tek kasnije pronađeno cijepljenjem na američke podloge koje su otporne na filokseru (Maletić i sur., 2008.). Nedugo nakon pojave filoksere u Velikoj Britaniji, javlja se i na području Hrvatske, te je sustavno uništila vinograde diljem Europe uključujući i 'Kleščec bijeli' (Kamenjak, 2009.). „Revitalizacija sorte 'Kleščec bijeli' na području koprivničko-križevačke županije“ je projekt pokrenut 2006. godine koji ima za cilj potpunu revitalizaciju navedene sorte. Pod okriljem tog projekta 'Kleščec bijeli' se nanovo sadi na području Kalničkog vinogorja. Projekt je financiran od strane Koprivničko-križevačke županije, grada Križevca i Hrvatske gospodarske komore. U sklopu projekta posađena su četiri eksperimentalna vinograda na različitim tipovima tala: koluvijalno, pseudoglej, lesivirano-pseudoglejno te umireni eolski pijesci.

Navedeni projekt je završio 2009. godine i istraživanja su nastavljena u novom projektu pod nazivom “Fitosanitarna i genetička selekcija klonskih kandidata sorte vinove loze “Kleščec bijeli“ (*Vitis vinifera* L.)“ 2013. godine.

Tijekom drugog projekta provedene su analize mikrosatelitskih DNA markera i potvrđeno je da je sorta 'Kleščec bijeli' autohtona sorta Kalničkog vinogorja te da se ne može poistovjećivati sa sortom Ortlieber jer ima potpuno različit genotip (Pejić i sur. 2013., Radiček 2014.). Višegodišnja istraživanja uključivala su ampelografska i ampelometrijska istraživanja te su omogućili daljnje umnažanje i gospodarsku valorizaciju sorte. Provedena je masovna klonska i zdravstvena selekcija koje su omogućile podizanje matičnog nasada plemki sorte 'Kleščec bijeli' (smještenog na pokušalištu Visokog gospodarskog učilišta u Križevcima) (slika 1.).

Slika 1. Matični nasad sorte 'Kleščec bijeli'
(izvor: Kruno Kamenjak)

Proizvodnja bezvirusnih certificiranih cijepova obavljena je na Institutu za vinovu lozu u Geisenheimu u Njemačkoj na način da su se selekcionirani pupovi sorte sa 64 klonskih kandidata (koji su ocijenjeni kao kvalitetniji) testirali na prisutnost virusa ELISA (*The enzyme-linked immunosorbent assay*) testom i 20 potpuno zdravih klonskih kandidata nacijepljeno je na visokokvalitetne bazne podloge koje sam Institut u Geisenheimu posjeduje i uzgaja. Na taj način ostvaren je osnovni uvjet za masovnije razmnožavanje i širenje ove sorte certificiranim sadnim materijalom (Kamenjak, 2013.).

2. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada je provesti analizu unutarsortne varijabilnosti bezvirusnih klonskih kandidata (n =20) sorte 'Kleščec bijeli'. Razina unutarsortne varijabilnosti biti će utvrđena korištenjem četiri kombinacije AFLP markera te će biti provedena *cluster* analiza na temelju matrice koeficijenata sličnosti.

3. PREGLED LITERATURE

Hrvatska se odlikuje velikim bogatstvom autohtonog sortimenta vinove loze koji trenutno broji oko 130 sorata (Maletić i sur., 2014.). Danas su, nažalost mnoge od njih dovedene na rub izumiranja. Kako se danas na globalnom svjetskom tržištu sve više traže i sve bolju cijenu postižu upravo specifični i autohtoni proizvodi, vina autohtonih sorata vinove loze jedan su od vrlo perspektivnih načina za izlazak hrvatskih vina na veliko svjetsko tržište. Neke od autohtonih sorata u prošlosti su bile vrlo cijenjene no zbog raznih razloga (pojave bolesti i štetnika podrijetlom iz Amerike; odabir i sadnja sorata sa visokim prinosima) gotovo su nestale iz proizvodnje. Danas ih uglavnom nalazimo sporadično, i u većini slučajeva u mješovitim nasadima. Premda se danas sve češće javlja interes proizvođača za uzgojem ovih sorata, jedna od velikih prepreka njihovoj revitalizaciji je i nedostatak (kvalitetnog) sadnog materijala odgovarajuće kategorije. Osobit problem predstavljaju sorte koje su vrlo uskog areala rasprostranjenosti i koje su se uzgajale lokalno, na malim vinogradarskim područjima, što je vrlo čest slučaj u području Primorske Hrvatske gdje se nalazi i većina autohtonih sorti Republike Hrvatske.

Tako na području regije Primorske Hrvatske možemo pronaći nekolicinu autohtonih sorti koje imaju veliku gospodarsku važnost: 'Malvazija istarska', 'Teran', 'Žlahtina', 'Babić', 'Pošip bijeli', 'Plavac mali', 'Maraština' i druge. Među navedenim sortama se ističe nekolicina kao što je 'Pošip bijeli' jer je njemu potvrđena nedvojbena autohtonost te da je on potomak sorti 'Bratkovine bijele' i 'Zlatarice blatske'. Zbog karakterističnosti uzgoja i podrijetla roditeljskih kultivara 'Pošip bijeli' ima uzak areal rasprostranjenosti te ga se može naći na otocima Korčuli, Mljetu i Lastovu.

'Malvazija istarska bijela' se smatra autohtonom sortom istarskog poluotoka no zbog samog imena Malvazija, postoji četrdesetak sorata s tim imenom, postoje pretpostavke o njezinu grčkom podrijetlu. Naposljetku genetička istraživanja nisu pokazala nikakvu srodnost sa kultivarima istog imena. Kultivar je iznimno bujan no zbog te karakteristike oplodnja je u pojedinim godinama slaba. Vino je osrednje kakvoće sa prepoznatljivim finim okusima i mirisima.

Na području Kontinentalne Hrvatske nema tako velik broj autohtonih sorti. U posljednje vrijeme povećan je broj projekata koji imaju za cilj inventarizaciju i identifikaciju sortimenta te su rezultirali otkrivanjem autohtonih sorti kao što su: 'Moslavac bijeli', 'Kraljevina', 'Škrlet', a i 'Kleščec bijeli'.

'Škrlet' je autohtoni kultivar Pokuplja koji je bio neopravdano zanemaren te se pronašao u situaciji istrebljenja sličnoj kao i 'Kleščec bijeli'. Nakon procesa revitalizacije areal

rasprostranjenosti se je povećao pa ga se može pronaći i na područjima Moslavine i Prigorja (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008.).

'Kraljevina' to jest kultivar 'Šiler', kako se naziva u kasnije izdanim knjigama (Maletić i sur., 2014.), se može pronaći u području sjeverozapadne Hrvatske (najviše u području Prigorja) koja je također najvjerojatnije hrvatska autohtona sorta. Odlike sorte su visoka i redovita rodnost što je iznimno bitno malim i srednjim proizvođačima koji posjeduju male te rascijepane površine jer može dati velike prinose. Ova sorta, kao i većina drugih, pokazuje značajne razlike ovisno o području uzgoja pa postoje varijacije u samom nazivu sorte kao što su: crvena, zelena ili mirisava 'Kraljevina'.

'Moslavac bijeli' se smatra autohtonom sortom sa područja Moslavine no to još nije sa sigurnošću potvrđeno. Sinonimi su mu Šipon u Sloveniji ili Furmint u Mađarskoj. Karakteristike ovog kultivara su vina zavidne kakvoće sa iznimno specifičnim nježnim aromama koje se dobivaju u povoljnim vegetacijskim godinama koji su posađeni na položajima koji pogoduju ovom kultivaru (Mirošević, Kontić, 2008.).

3.1. Kleščec bijeli

Sorta 'Kleščec bijeli' (sinonimi: Kleščec zeleni, Kleščec žuti, Belina drobna, Ortlieber gelber, Ortlieber grüner, Ortlieber weiser, Knipperlé, Räuschling i dr.) smatra se jednom od autohtonih sorti s područja podregije Prigorje – Bilogora, vinogorja Kalnik. Nekad je bila jedna od vodećih sorata na spomenutom području što je vidljivo iz brojnih starih zapisa (npr. Trummer, 1854.), te iz sjećanja starijih vinogradara. Propašću vinogradarstva uslijed napada filoksere i sadnjom novih vinograda sortama koje su imale bolje gospodarske karakteristike, sorta 'Kleščec bijeli' gotovo je nestala s ovog područja. Danas se može pronaći sporadično u starim i gotovo zapuštenim vinogradima, zahvaljujući vinogradarskim entuzijastima koji su odbijali krčiti svoj tradicionalno uzgojeni vinograd. Sorta ima više biotipova pod istim imenom (sitni, rani, žuti, zeleni), a vjerojatno neki od njih posjeduje potencijal za proizvodnju izvornog vrhunskog vina (Kamenjak, 2009.).

Radiček (1985.) u svom diplomskom radu ističe kako je 'Kleščec bijeli' sorta koja zaslužuje posebnu pažnju, te da od svih sorata kalničkog sortimenta daje najbolje rezultate. Navodi da količina nakupljenog šećera varira između 17% i 22%, a količina ukupnih kiselina izražena kao vinska kiselina iznosi 6–10 g/L. No, kao problem i razlog nešireња sorte navodi slab prinos, koji iznosi 6–10 t/ha.

Nakon prvih obnova vinograda početkom 20. stoljeća, 'Kleščec bijeli' se nanovo sadi na području Kalničkog vinogorja u sklopu projekta pod nazivom „Revitalizacija sorte Kleščec na području Koprivničko-križevačke županije“.

Pokretanjem projekta “Fitosanitarna i genetička selekcija klonskih kandidata sorte vinove loze “Kleščec bijeli“ (*Vitis vinifera* L.)“ (2013.), od strane Visokog gospodarskog učilišta u Križevcima, te u suradnji s Agronomskim fakultetom u Zagrebu, ponovno se aktualizira važnost ove potencijalno autohtone sorte. Cilj projekta je:

- serološkom metodom ELISA (*The enzyme-linked immunosorbent assay*) izdvojiti kandidate 'Kleščeca bijelog', negativne na prisustvo gospodarski važnih virusa
- provesti klonsku selekciju sorte 'Kleščec bijeli'
- napraviti genetičku i ampelografsku karakterizaciju ove sorte i potencijalnih klonova
- uvesti SSR profil 'Kleščeca bijelog' u međunarodne arhive sorata
- podići matični nasad ove sorte, u svrhu proizvodnje certificiranog sadnog materijala

Zahvaljujući navedenim projektima sorta 'Kleščec bijeli' dobila je status autohtone sorte te je podignut matični nasad loznih plemki sorte 'Kleščec bijeli' na prostorima Visokog gospodarskog učilišta u Križevcima. Status autohtonosti potvrđen je tijekom 2013. godine kada su uzeti uzorci na kojima je provedena SSR analiza (DNA *fingerprinting*, metoda mikrosatelita na 9 lokusa) za dokazivanje identiteta sorte. Genetički profil sorte uspoređen je sa međunarodnom bazom podataka (*European Vitis Database*) radi provjere sinonima i genetskih srodnika u ostalim domaćim i introduciranim sortama vinove loze. Rezultati su potvrdili autohtonost sorte 'Kleščeca bijelog', što je i objavljeno na međunarodnom kongresu oplemenjivača, sjemenara i rasadničara (Kamenjak, 2013., Pejić i sur. 2013.).

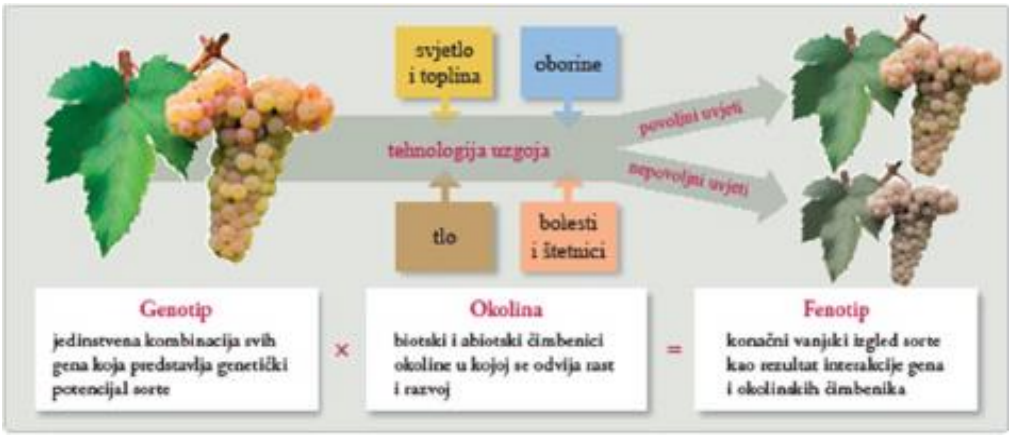
3.2. Uzroci unutarsortne varijabilnosti

Svojstvo je određena karakteristika fenotipa koja je uvjetovana genetičkim čimbenicima i čimbenicima okoline u kojoj se organizam razvija (slika 2.). Prema broju gena koji kontroliraju pojedina svojstva, razlikujemo kvalitativna i kvantitativna svojstva. Kvantitativna svojstva kontrolirana su većim brojem gena sa više genskih lokusa od kojih svaki daje doprinos u ekspresiji nekog svojstva. Fenotip svojstva koje su pod kontrolom ovakvih gena je suma njihovih pojedinačnih utjecaja i pod velikim je utjecajem čimbenika okoliša. Mnoga svojstva zanimljiva za voćarstvo i vinogradarstvo su kvantitativna: npr. otpornost prema bolestima, otpornost na nepovoljne okolinske utjecaje, sadržaj aromatskih i nutritivnih tvari u plodu, sadržaj šećera i kiselina kod vinove loze, visina prinosa i slično. Da bi se smanjio utjecaj okoline svi klonovi koji se istražuju se sade na isti položaj koji je po mogućnosti što uniformniji jer su u tom slučaju uvjeti okoliša su za sve klonove približno isti. Također izuzetno je bitno da je svaka sadnica prilikom sadnje slobodna od gospodarski važnih virusa i bolesti. Sorte vinove loze nastaju generativno (iz sjemena), a nakon nastanka izvorne majčinske biljke određene sorte, a kod koje su prepoznate (od strane čovjeka) određene pozitivne osobine koje želimo zadržati, njeno daljnje razmnožavanje provodi se vegetativnim putem (razmnožavanjem reznicama ili pupovima). Vegetativno razmnožavanje podrazumijeva genetički uniformno potomstvo. Vegetativnim razmnožavanjem vinove loze osigurava se prenošenje svojstava pojedine sorte iz generacije u generaciju, međutim u populaciji određene sorte s vremenom dolazi do pojave fenotipske varijabilnosti tj. moguće je pronaći jedinke koje odstupaju od ostatka populacije te sorte – odnosno pojavljuje se unutarsortna varijabilnost. Iz ovog proizlazi da bi sve jedinke neke populacije s obzirom na vegetativno

razmnožavanje trebale biti genetski identične no ipak se pojavljuju spontane mutacije kod pojedinih jedinki što rezultira sa većim ili manjim promjenama samog genotipa sorte. Za razliku od mutacija postoje i modifikacije koje se karakteriziraju kao promjene uzrokovane okolinskim uvjetima. Štoviše razlika u modifikacijama je što one dovode samo do prolaznih promjena koje nestaju isto kada nestane i uzrok koji ih je uzrokovao (okolina), dok su mutacije s druge strane nasljedne i nepovratne promjene svojstava (Maletić i sur., 2008.). Ovi mehanizmi mogu rezultirati određenim promjenama gospodarski važnih svojstava kod sorata vinove loze. Uobičajeno je da se takve promjene s aspekta klonske selekcije u pravilu dijele na pozitivne i na negativne. Preduvjet za razvoj unutarsortne varijabilnosti jest dugotrajno vegetativno razmnožavanje neke sorte. Na taj način se unutar neke sorte akumuliraju mutacije.

Pojava unutarsortne varijabilnosti je rezultat sukcesivnih rijetkih događaja- mutacija gena ili genoma. Mutacije su nasljedne promjene u strukturi DNA lanca, najčešće se manifestiraju kao zamjene parova baza u originalnom DNA lancu ili umetanju tj. brisanju pojedinih dijelova DNA lanca. Prirodne mutacije se događaju kao posljedica djelovanja prirodnih kemijskih ili fizičkih agenasa koji dovode do oštećenja ili obnavljanja DNA lanca tijekom mirovanja ili pak tijekom diobe stanice, a inducirane mutacije su namjerno izazvane korištenjem određenih mutagena koji mogu biti različiti kemijski ili fizikalni agensi. Također kao izvori mutacija mogu biti i kimere i somaklonovi koji se pojavljuju u tehnikama *in vitro* kulture biljnog tkiva te genetičko inženjerstvo (Maletić i sur., 2008.).

Sama mutacija mora se dogoditi u stanicama koje su ili će tek postati dio meristemskog tkiva mladice. Naposljetku, mutirano meristemsko tkivo u pupu mora preživjeti zimsku rezidbu, a na kraju mladica izrasla iz mutiranog pupa mora biti odabrana za daljnju vegetativnu reprodukciju. Postojeća unutarsortna genetska varijabilnost je rezultat kombinacije genetskih i ljudskih učinaka (Pelsy, 2010.).



Slika 2. Fenotip (vanjski izgled sorte) je rezultat interakcije gena i čimbenika okoline (izvor: Maletić i sur., 2008.)

Klonska selekcija u poboljšanju proizvodnih osobina sorata vinove loze temelji se upravo na izdvajanju jedinki (trsova) iz proizvodnih nasada kod kojih je došlo do pozitivnih promjena nekog od gospodarski važnih svojstava. Klonska selekcija je postupak kojim se tijekom više godina prati određena sorta kako bi se pronašli trsovi najboljih karakteristika pojedine sorte koji su ujedno i potencijalni pozitivni mutant i mogu poboljšati karakteristike sorte. Razlikujemo dvije vrste klonske selekcije: masovnu klonsku selekciju (pozitivna i negativna) te individualnu klonsku selekciju. Masovna pozitivna selekcija jedan je od načina očuvanja korisne unutarsortne varijabilnosti, a u kombinaciji sa zdravstvenom selekcijom i razmnožavanjem samo trsova slobodnih od gospodarski štetnih i zakonom propisanih virusa eliminira se njihovo daljnje širenje. Ujedno je genetska varijabilnost koja je obuhvaćena masovnom pozitivnom selekcijom najbolja osnova za provođenje individualne klonske selekcije, tj. izdvajanje klonova (Preiner, 2012.).

Unatoč tome što se izostanak sustavne klonske selekcije smatra kao jedna od mogućih strategija u očuvanju unutarsortne varijabilnosti, ona donosi niz problema u vinogradarskoj praksi kao što su loše i neujednačene proizvodne osobine nasada podignutih neselektiranim materijalom, visok stupanj zaraze gospodarski štetnim virozama, te daljnje nekontrolirano širenje viroza na nova područja.

3.3. Molekularni markeri

Iako je potencijal uporabe markera vezanih za gene u programima oplemenjivanja bio poznat desetljećima, njihovo korištenje bilo je onemogućeno nepostojanjem same tehnologije. Tehnološki napreci u molekularnoj biologiji omogućili su genetsku analizu kompleksnih svojstava, a time i analizu biljnog materijala na molekularnoj razini tj. identifikaciju i primjenu molekularnih markera u oplemenjivanju bilja. Molekularni markeri su fragmenti DNA, odnosno DNA sekvence s poznatom lokacijom na kromosomu koje se mogu sastojati od jednog ili više parova baza. Postoje brojne vrste molekularnih markera kao što su RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) markeri te markeri zasnovani na PCR (*Polymorphic Chain Reaction*) reakciji: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA's,* AFLP *(Amplified Fragment Lenght Polymorphism),* SSR *(Simple Sequence Repeats*) i drugi koji se razlikuju u mnogim karakteristikama (metoda primjene, broj markera koji se mogu identificirati odjednom u nekom genomu i drugo). Molekularni markeri omogućili su izradu genetskih mapa za niz ekonomski značajnih biljnih kultura te samim time i primjenu u postupcima selekcije potpomognute markerima (Marjanović-Jeromela i sur., 2007.).

Molekularni markeri mogu biti kategorizirati kao dominantni ili kodominantni, ovisno o tome da li mogu razlikovati homozigotno od heterozigotnog stanja lokusa. Dominantni markeri u pravilu omogućuju analizu mnogih lokusa odjednom, kao na primjer RAPD i AFLP tehnike. Početnica koji amplificira dominantan marker može amplificirati mnoge lokuse u jednom uzorku DNA pomoću jedne PCR reakcije. Kodominantni markeri najčešće mogu analizirati samo jedan lokus po reakciji.

Kako bi molekularni marker bio koristan u biotehnologiji mora imati određene karakteristike (Fernandez i sur., 2010.) odnosno mora biti polimorfan i ponovljiv, poželjno da je kodominantan te da su analize brze, efikasne i jeftine.

3.3.1. Lančana reakcija polimerazom (*Polymerase Chain Reaction,* PCR)

Lančana reakcija polimerazom, ili skraćeno PCR je biokemijska tehnika, primijenjena u molekularnoj biologiji u svrhu amplifikacije (višestrukog umnožavanja) određene regije ili regija DNA *in vitro*. Kroz nekoliko desetaka ciklusa moguće je generirati milijune istovjetnih kopija jedne regije DNA, koje su točno određene početnicama (eng. *primer)*. Početnica je kratka jednolančana sekvenca sastavljena od 10–25 baza, komplementarna dijelu DNA ispitivanog organizma. Početnicama je određena regija umnažanja DNA. Razlikujemo *forward* početnice

*(*vežu se na lanac DNA smjera 3' - 5') i *reverse* početnice (vežu se na lanac DNA smjera 5' – 3'). Metoda je razvijena 1983. godine od strane Amerikanca Kery Mullis-a, za što je nagrađen Nobelovom nagradom za kemiju 1993. godine.

Tehnika se sastoji od 3 glavna koraka:

1. Denaturacija– razdvajanje dvostruke DNA pri temperaturi od 95°C, što se događa na početku svakog ciklusa
2. Nalijeganje početnica (primera) na komplementarno mjesto, na početnoj molekuli DNA, pri temperaturi 50-55°C (ovisi o vrsti početnica)
3. Produljenje– ekstenzija dijela DNA od početnice u smjeru stvaranja novog lanca DNA, pri temperaturi od 72°C

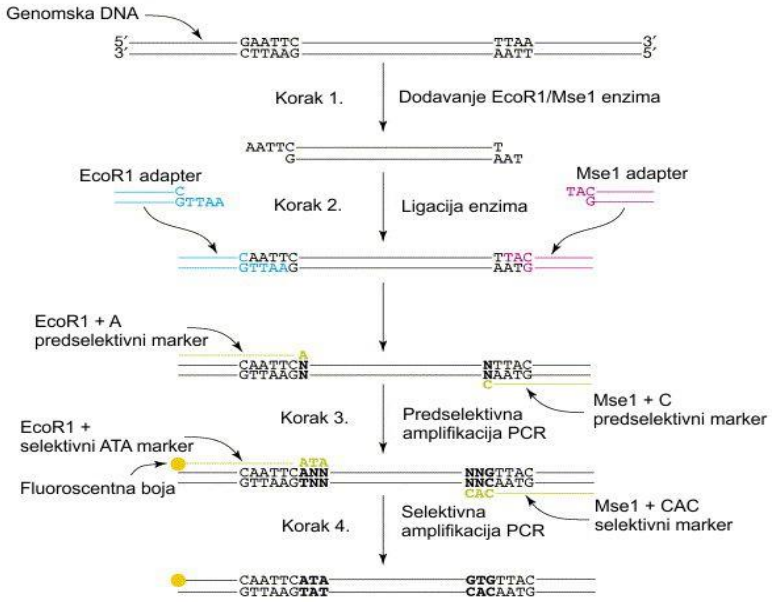
Cijeli ciklus traje nekoliko minuta, a najčešće se ponavlja u 25–40 ciklusa. Cijela reakcija odvija se u tubicama malog volumena (najčešće 0,2 ml), u specijalnom uređaju (*thermocycler*-u), koji je posebno programiran za ovu namjenu. Cjelokupna PCR reakcija traje 3–4 sata.

Za odvijanje PCR reakcije potrebno je nekoliko komponenti u točno određenoj koncentraciji:

- Pufer za PCR u kojem se odvija reakcija
- 4 različita deoksiribonukleozid trifosfata- dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- $MgCl_2$ (magnezijev klorid)
- Početnice (*forward i reverse*)
- DNA (koja služi kao predložak (kalup)
- TAQ polimeraza (DNA polimeraza dobivena iz bakterije *Thermus Aquaticus*)

3.3.2. AFLP markeri

AFLP tehnika se temelji na selektivnoj PCR amplifikaciji restrikcijskih fragmenata koji su dobiveni rezanjem ukupne genomske DNA pomoću najčešće dva restrikcijska enzima. Tehnika AFLP (*Amplified Fragment Lenght Polymorphism*) se zasniva na detekciji izrezanih dijelova DNA molekula, koji su naknadno umnoženi lančanom reakcijom polimeraze (PCR), odnosno predstavlja kombinaciju RFLP-a (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) i RAPD-a (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). PCR amplifikacija restrikcijskih fragmenata postiže se korištenjem adaptera koji naliježu na restrikcijska mjesta te omogućuju sljepljivanje primera (početnica). Za uspješnu analizu metodom AFLP potrebna je visoka čistoća izolirane DNA jer zaostali polisaharidi mogu spriječiti potpunu digestiju (rezanje) DNA i time uzrokovati pogrešne rezultate. Selektivna amplifikacija se postiže korištenjem početnica koji se lijepe na restrikcijske fragmente, te se na taj način amplificiraju samo oni fragmenti u kojima početnice odgovaraju (komplementarne su) nukleotidima na krajnjim restrikcijskim mjestima. Koristeći ovu metodu, setovi restrikcijskih fragmenata mogu se vizualizirati pomoću PCR-a bez potrebnog znanja nukleotidnog slijeda u samim genomima. Metoda omogućuje specifičnu amplifikaciju velikog broja restrikcijskih fragmenata odjednom. Broj fragmenata koji se mogu istovremeno analizirati, međutim, ovisi o razlučivosti sustava detekcije. Uobičajeno se može analizirati od 50-100 restrikcijskih fragmenta. Tako da sama AFLP tehnika omogućava vrlo moćnu DNA "*fingerprinting*" tehniku za DNA bilo kakvog podrijetla ili složenosti (Vos i sur., 1995.).



Slika 3. AFLP protokol (izvor: www.cell.com)

Sukladno navedenom protokol AFLP-a se sastoji od četiri glavne faze (slika 3.):

1. Restrikcija molekula DNA endonukleazama, spajanje (ligacija) krajeva izrezanih fragmenata DNA oligonukleotidnim adapterima
2. Predselektivna amplifikacija (predamplifikacija)
3. Selektivna amplifikacija
4. Razdvajanje amplificiranih fragmenata DNA fragmenata nakon selektivne amplifikacije kapilarnom elektroforezom

3.4. Analize unutarsortne varijabilnosti vinove loze pomoću AFLP markera

Cervera i suradnici (1998.) su pomoću AFLP markera analizirali 67 primki iz kolekcije sorata španjolske regije Rioja. Koristili su dvije kombinacije početnica koje su amplificirale 116 i 104 markera. Udio polimorfnih markera bio je 49,1% odnosno 64 i 44 prema kombinaciji početnica. Osim uspješnog razlikovanja sorata utvrđen je i polimorfizam između primki iste sorte.

Benjak i suradnici (2006.) su analizirali klonove grupe Pinot-a (62 klona Pinot-a crnog, šest klonova Pinot blanc-a i četiri klona Pinot gris-a) pomoću AFLP markera. Uspoređivali su tri metode DNA ekstrakcije i dva različita protokola AFLP-a i utvrdili da se molekularni fenotipovi istih uzoraka, upotrebom istih početnica razlikuju s obzirom na metodu DNA ekstrakcije. Ukupno su između klonova detektirali 38 polimorfnih markera, ali su svi oni bili pod utjecajem metode ekstrakcije.

Baranek i suradnici (2009.) su analizirali genetske promjene u genomu sorata Riesling i Müller Thurgau pomoću AFLP markera. Za analize su koristili *in vitro* biljke i *in vitro* biljke izložene termoterapiji. Prosječni polimorfizam između *in vitro* somaklonova bio je 2,1% (32,5) i 1,7% (21,5) za Riesling i Müller Thurgau, a nakon termoterapije 2,1% (32) i 1,3% (17,3).

Stajner i suradnici (2009.) su analizirali AFLP i S-SAP tehnikama 14 klonova Syrah-a i 22 klona Malbec-a. Koristili su devet kombinacija početnica AFLP i detektirali ukupno 411 marker. Prosječno je detektirano 45,7 markera po kombinaciji početnica, a razina polimorfizma između klonova bila je 33,82% za klonove Syrah-a odnosno 63,88% za klonove Malbec-a. Za S-SAP analizu koristili su vineLTR2 početnicu koju su kombinirali sa sedam različitih Mse1 početnica i ukupno detektirali 296 markera. Korelacija između setova podataka AFLP i S-SAP bila je 0,58.

Cretazzo i suradnici (2010.) su analizirali autohtone sorte vinove loze otoka Mallorce. U istraživanje je bilo uključeno 29 klonskih kandidata sorte Callet, 29 kandidata sorte Manto Negro i 30 kandidata sorte Moll. Za potvrdu pripadnosti sorti prvo su koristili 20 SSR lokusa. Nakon toga su koristili dodatnih 13 SSR lokusa koji su pokazali potencijal za identifikaciju klonova te po tri kombinacije početnica za AFLP, M-AFLP i SAMPL metode. Multilokusnim molekularnim tehnikama amplificirana su ukupno 902 markera, 361 AFLP marker, 290 M-AFLP i 251 SAMPL marker. Polimorfizam pojedinog sustava markera, ovisno o sorti kretao se između 26,93% do 73,66%. Kod svih ispitivanih sorata (Callet, Manto Negro, i Moll) najmanji stupanj polimorfizma detektiran je pomoću AFLP-a (28,77%, 31,25%, 26,93%). Veći stupanj je detektiran pomoću

SAMPL-a (52,79%, 49,26%, 54,35%), a najveći stupanj pomoću M-AFLP-a (67,40%, 73,41%, 79,66%).

Anhalt i suradnici (2011.) su pomoću 10 kombinacija AFLP početnica analizirali 86 klonova Rieslinga (Rizlinga rajnskog). Od ukupno 305 amplificiranih fragmenta njih 135 je bilo polimorfno između klonova. S obzirom na kombinaciju početnica broj polimorfnih markera je varirao od 7 do 28 polimorfnih markera. Razina pogreške i ponovljenim analizama bila je od 0 do 0,7%. Većina klonova uključenih u analizu imala je samo jednu ili dvije mutacije, a pojedini klonovi su imali visok stupanj mutacije. Ovo dokazuje da je genom vinove loze dinamičan i da se mutacije najčešće događaju na pojedinačnim lokusima, međutim nije potvrdilo teoriju akumulacije mutacija.

Meneghetti i suradnici (2011.) su predložili strategiju istraživanja za procjenu unutarsortne varijabilnosti vinove loze. U prvom koraku pomoću SSR markera provjerava se pripadnost sorti, a u drugom pomoću AFLP, SAMPL, M-AFLP i ISSR markera se utvrđuje razina unutarsortne varijabilnosti, identifikacija pojedinih klonova i biotipova kao i međusobna povezanost morfoloških i molekularnih podataka ili pak molekularnih podataka s geografskim porijeklom uzorka.

Meneghetti i suradnici (2012.) su ispitivali varijabilnost unutar i između sorata grupe Malvasia. U istraživanje je bilo uključeno deset sorata: Malvazija istarska, Malvasia delle Lipari, Malvasia bianca di Candia, Malvasia di Candia Aromatica, Malvasia del Lazio, Malvasia bianca lunga (Malvasia del Chianti), Malvasia nera di Brindisi/Lecce, Malvasia di Casorzo, Malvasia di Schierano i Malvasia nera di Bolzano. Unutarsortnu varijabilnost su testirali samo za sortu Malvazija istarska tako što su u istraživanje uključili 22 uzorka iz Republike Hrvatske i osam uzoraka iz Italije, selekcioniranih od strane tri različite institucije. Svi uzorci imali su isti SSR profil i pripadali su istoj sorti, a unutarsortna varijabilnost analizirana je pomoću AFLP, SAMPL i M-AFLP markera koristeći 16 kombinacija početnica po sustavu markera. Ukupno su detektirali 1.754 ponovljiva markera od čega je 682 bilo AFLP markera, 597 SAMPL i 475 M-AFLP-a. Razina polimorfnosti bila je 70,1% (1.231 marker), 308 AFLP, 302 SAMPL i 321 M-AFLP. Uspješno su razdvojili sve ispitivane klonove Istarske malvazije.

4. MATERIJALI I METODE

Uzorkovanje za potrebe ovog istraživanja obavljena su 29.04.2015. godine uzimanjem mladih listova sa 20 uzoraka klonskih kandidata sorte 'Kleščec bijeli'. Uzorci biljnog tkiva (tablica 1.) sakupljeni su iz vinograda Dragutina Kamenjaka dipl. ing., sa položaja Cerovec, u blizini Križevaca (podregija Prigorje – Bilogora, vinogorje Kalnik) gdje je provedena selekcija matičnih trsova u postupku masovne klonske selekcije (slika 4.).

Slika 4. Nasad 'Kleščeca bijelog', položaj Cerovec

Tablica 1. Prikaz klonskih kandidata 'Kleščeca bijelog' koji su korišteni u istraživanju

Broj klona	Broj klona
K5	K70
K13	K84
K17	K85
K21	K88
K23	K99
K30	K118
K39	K141
K51	K155
K57	K181
K68	K184

4.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka za ekstrakciju DNA

Mladi listovi su pogodniji za ekstrakciju DNA od starijeg lišća, jer sadrže manje polifenolnih spojeva i polisaharida te nema odumirajućih područja u kojima su mrtve stanice, ni lezija koje nastaju uslijed odumiranja stanica, te općenito ne sadrže tvari koje mogu inhibirati ekstrakciju DNA, a samim time i PCR reakciju. Uz već spomenute aspekte koje ometaju ekstrakciju DNA, stariji listovi sadrže manje koncentracije DNA što također može otežati PCR reakciju. Mladi listovi koji su sakupljeni za uzorke su stavljeni u označene papirnate kuverte obložene papirnatim ručnicima kako se isti ne bi isušili.

Sakupljeni uzorci su stavljeni na sušenje 08.05.2015 godine u liofilizator (Christ beta 1–8 LD, SciQuip, Velika Britanija) na temperaturu od -20°C. Proces sušenja trajao je 72 sata. Osušeni biljni materijal svakog uzorka odvagnut je u količini od 20 mg u Eppendorf tube volumena 2,0 ml, a zajedno sa biljnim materijalom stavljene su dvije čelične kuglice promjera 3 mm. Biljni materijal je usitnjen pomoću mlina (Retsch MM400, Retsch, Njemačka) koji pravocrtno trese tube tijekom 30 sekundi pri frekvenciji od 30 titraja u sekundi. Rezultat usitnjavanja je ujednačeno sitan prah.

4.2. DNA ekstrakcija

Osušeni i usitnjeni biljni materijal svakog uzorka ekstrahiran je uz pomoć komercijalnog kita "*peqGOLD plant DNA mini kit*" tvrtke Peqlab (Erlangen, Njemačka).

Postupak izolacije DNA *peqGOLD Plant DNA Mini kit*-a tvrtke Peqlab obavlja se u sljedećim koracima:

1. Homogenizacija biljnog materijala i liza stanica
    - Na 20 mg usitnjenog i osušenog praha (biljnog materijala) dodano je 400 µl lizirajućeg pufera "PL1" i 15 µl Rnaze A
    - Smjesa je homogenizirana vorteksiranjem
    - Tubice su stavljene na inkubaciju u vodenu kupelj na 65°C tokom 30 minuta uz povremeno mućkanje tuba
    - U tubice se dodaje 100 µl lizirajućeg pufera "PL2" uz miješanje uvlačenjem i izvlačenjem sadržaja pipetom (pipetiranjem)
    - Tubice se ponovo stavljaju na inkubaciju hlađenjem na ledu u trajanju od 5 minuta

- Slijedi centrifugiranje na maksimalnoj brzini (14.000 okretaja/min) u trajanju od 10 minuta
- Dobiveni supernatant (tekuća frakcija ostala nakon centrifugiranja) se prenosi na *Microfilter* membranu uz korištenje novih tuba za prikupljanje filtrirane frakcije
- Ponovo se centrifugira na 8.000 okretaja/min u trajanju jedne minute

2. Vezanje DNA na *PerfectBind DNA* membranu
    - Dodaje se pola volumena (cca 225 µl) pufera za vezanje "*Binding buffer*" (vezivnog pufera) i miješa se pipetiranjem u novim tubama u kojima se nalaze filtrirane frakcije
    - Kompletni volumen tuba se prenosi na *PerfectBind* DNA membranu
    - Ponovo se centrifugira na 8.000 okretaja/min tokom jedne minute
    - Filtrirane frakcije se izlijevaju i premještaju na *PerfectBind* DNA membrane u novu tubu

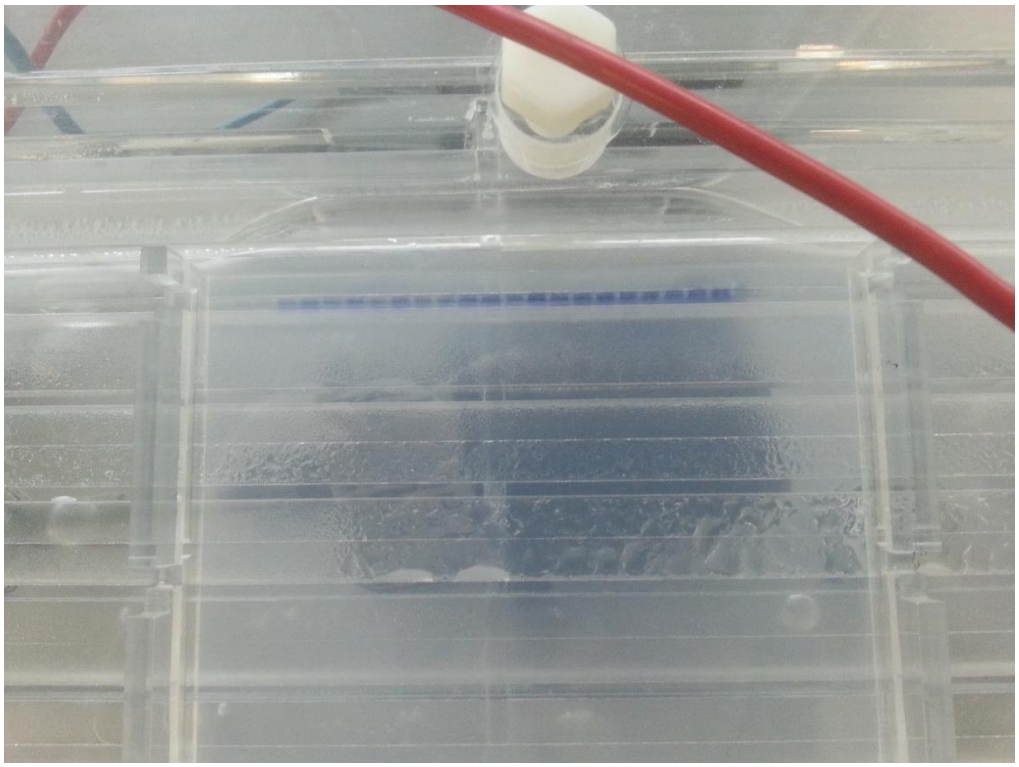
3. Pročišćavanje DNA
    - U tube se dodaje 650 µl pufera za ispiranje "*Wash Buffer*" kojem je dodano 1,5 volumena stopostotnog etanola
    - Potom slijedi centrifugiranje na 8.000 okretaja/min tokom jedne minute zbog postizanja što bolje homogenizacije
    - Prethodna dva koraka se ponavljaju
    - *PerfectBind* DNA membrane se prosušuju centrifugiranjem pri 8.000 okretaja/min u trajanju od dvije minute

4. Otapanje DNA
    - *PerfectBind* DNA membrane se prebacuju u tubu volumena 1,5 ml
    - U tube se dodaje 100 µl pufera za ispiranje "*Elution Buffer"* te se tube stavljaju na inkubaciju pri sobnoj temperaturi na 2 minute
    - Slijedi centrifugiranje na 4 500 okretaja/min tijekom jedne minute
    - Prethodna dva koraka se ponavljaju

4.3. Provjera kvalitete i koncentracije DNA na agaroznom gelu

Kvaliteta i kvantiteta izolirane DNA može se odrediti vizualizacijom DNA na agaroznom gelu. Kvaliteta i koncentracija izolirane DNA klonskih kandidata 'Kleščeca bijelog' provjerena je elektroforezom (“Sea 2000“, Elchrom Scientific, Švicarska) u 0,8% agaroznom gelu u 1X TBE puferu sa dodatkom *GelRed* (Olerup, Austrija) boje za nukleinske kiseline. Pipetiranjem i miješanjem DNA u količini 1,5 µl u koji se dodaje 8 µl indikatora bromfenol plavi pune se jažice (ulazna mjesta za uzorke) na agaroznom gelu. Elektroforeza je provedena pri jačini istosmjerne struje od 10 V/cm u trajanju 10 minuta

Gel je nakon elektroforeze osvjetljen ultraljubičastom svjetlošću pomoću transiluminatora (Geldoc XR, BioRad, SAD). Transiluminator sadrži i digitalnu kameru koja je povezana sa računalom koje automatsko dobiva slike od vizualizacijskog sustava. Prema jačini signala u gelu podešavaju se parametri ekspozicije fotografije. Na slici 5. prikazan je gel sa uzorcima 'Kleščeca bijelog' nakon ekstrakcije DNA.



Slika 5. Agarozni gel sa uzorcima 'Kleščeca bijelog' prije postupka elektroforeze (izvor: Kruno Kamenjak)

4.4. AFLP protokol

AFLP metoda razvijena je od strane Vos i suradnika (1995.) i sastoji se od više sukcesivnih koraka: a) cijepanje genomske DNA restrikcijskim enzimima, b) ligacije oligonukleotidnih adaptera, c) predselektivnog i d) selektivnog umnažanja restrikcijskih ulomaka. Umnoženi dijelovi DNA se elektroforetski razdvoje nekom od tehnika (gelovi, kapilarna elektroforeza,...) te se očitaju njihove veličine. Polimorfizmi koje ova metoda detektira uzrokovani su točkastim mutacijama na mjestima restrikcije ili na dodatnim nukleotidima u selektivnim početnicama ili pojavom insercija/delecija unutar restrikcijskih ulomaka (Šatović 1999).

Restrikcija otprilike 1 µg genomske DNA provodi se u ukupnom volumenu od 50 µl korištenjem restrikcijskih enzima EcoR1 (New England Biolabs) kojemu je karakteristično mjesto prepoznavanja određeno sa šest baza (CGTTAA)(tzv. *"rare cutter*") i Mse1 (TACG)(New England Biolabs) kojemu je karakteristično mjesto prepoznavanja određeno sa četiri baze (tzv. "*frequent cutter*") u puferskom mediju sastavljenom od 10 mM TRIS-HAc, 10 mM MgAc, 50 mM KAc i 5 mM DTT (tablica 2.). Svaki enzim je korišten u količini od 1 U (jedinica koncentracije), a restrikcija je trajala dva sata na temperaturi od 37°C.

Tablica 2. Reagensi i njihove količine korištene za restrikciju DNA

Reagens	Količina
H_2O	17,2 µl
NaCl 0,5 M	2 µl
BSA 10x (1g/l)	0,2 mg/l
Mse1 enzim	0,1 U/µl
EcoR1 enzim	0,5 U/µl
DNA uzorka	20 µl

U restrikcijsku otopinu se zatim dodaje 10 µl smjese koja sadrži 5 pmol-a EcoR1 adaptera i 50 pmol-a Mse1 adaptera, uz 1 U T4 DNA ligaze (Roche), 1,2 mM ATP i puferski sustav sastavljen od 10 mM TRIS- HAc, 10 mM MgAc, 50 mM KAc i 5 mM DTT (tablica 3.). Nakon toga slijedi inkubacija u trajanju od dva sata na temperaturi od 37°C.

Tablica 3. Reagensi i njihove količine korištene za ligaciju

Reagens	Količina
H_2O	11,3 µl
Mse1 adapter (50 pmol/µl= 50 µM)	1 pmol/µl
EcoR1 adapter (5 pmol/µl= 5µM)	1 pmol/µl
10mM ATP	0,1 mM/µl
T4 DNA ligaza	0,1 U/µl
T4 DNA ligaza pufer 10X	1,5 µl

Adapteri se sastoje od dvaju međusobno homolognih primera u njihovom srednjem dijelu, dok su baze na krajevima primera homologne sa specifičnim sljedovima baza (tzv. "*sticky ends*") na krajevima restrikcijskih fragmenata nastalima u restrikciji. EcoR1-adapter sastoji se od dva primera slijeda 5'-CTCGTAGACTGCGTACC i CATCTGACGCATGGTTAA-5, a Mse1-adapter od primera 5'-GACGATGAGTCCTGAG i TACTCAGGACTCAT-5.

Predamplifikacija je provedena u volumenu od 50 µl čiju su 1/10 sačinjavali restrikcijski fragmenti na koje se ligacijom dodao adapter, u puferskom sustavu 20 mM Tris-HCl, 2,5 mM $MgCl_2$ i 50 mM KCl, uz 0,2 mM svakog dNTP-a, 1,25 U Taq-polimeraze (Invitrogen) i po 75 µM/µl svakog predamplifikacijskog primera. Izabrani primeri su komplementarni sa EcoR1 i Mse1 adapterima, a jedna dodatna selektivna baza omogućuje amplifikaciju 1/16 restrikcijskih fragmenata (tablica 4.).

Tablica 4. Reagensi i njihove količine korištene za predamplifikaciju

Reagens	Količina
H_2O	8,5 µl
PCR pufer 10X	2,0 µl
$MgCl_2$	0,6 µl
10 mM dNTP-ovi	2,0 mM/µl
Mse1 predselektivni adapter	1,0 µM/µl
EcoR1 predselektivni adapter	1,0 µM/µl
TaQ polimeraza (5U/µl)	0,1 µl

Predamplifikacija se odvijala po temperaturnom režimu: 92°C/60s., 60°C/30s., 72°C/60s u ponavljanjima od 25 puta. Produkti predamplifikacije razrijedili su se u omjeru 1:10 i kao takvi su korišteni u selektivnoj amplifikaciji.

Selektivna amplifikacija se odvijala u volumenu od 20 µl (u 1/4 ovog volumena je prethodno razrijeđen produkt predamplifikacije) puferskog sastava 20 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl2 i 50 mM KCl, uz 0,2 mM svakog dNTP-a, 0,4 U Taq-polimeraze (Invitrogen), 5 µM/µl E+3 primera i 30 µM/µl neobilježenog M+3 primera. "E+3" i "M+3" primeri imaju istu sekvencu kao i primeri korišteni u predamplifikaciji (tablica 5.), s tim da imaju po tri selektivne baze što omogućuje daljnju selektivnu amplifikaciju samo 1/256 svih fragmenata iz predamplifikacije. Temperatura nalijeganja primera na 65°C se u slijedećih 11 ciklusa postupno smanjuje za 0,7°C u svakom ciklusu. Sljedeća 24 ciklusa odvijala su se pri temperaturi nalijeganja primera od 56°C, dok su ostali temperaturni parametri ostali nepromijenjeni (94°C/30s., 56°C/30s., 72°C/.60s., u ponavljanjima od 24 puta).

Tablica 5. Reagensi i njihove količine korištene u selektivnoj amplifikaciji

Reagens	Količina
H_2O	8,5 µl
PCR pufer 10X	2,0 µl
$MgCl_2$	0,6 µl
10 mM dNTP-ovi	2,0 mM/µl
Mse1 selektivni adapter	1,0 µM/µl
EcoR1 selektivni adapter	1,0 µM/µl
TaQ polimeraza (5U/µl)	1,0 µl

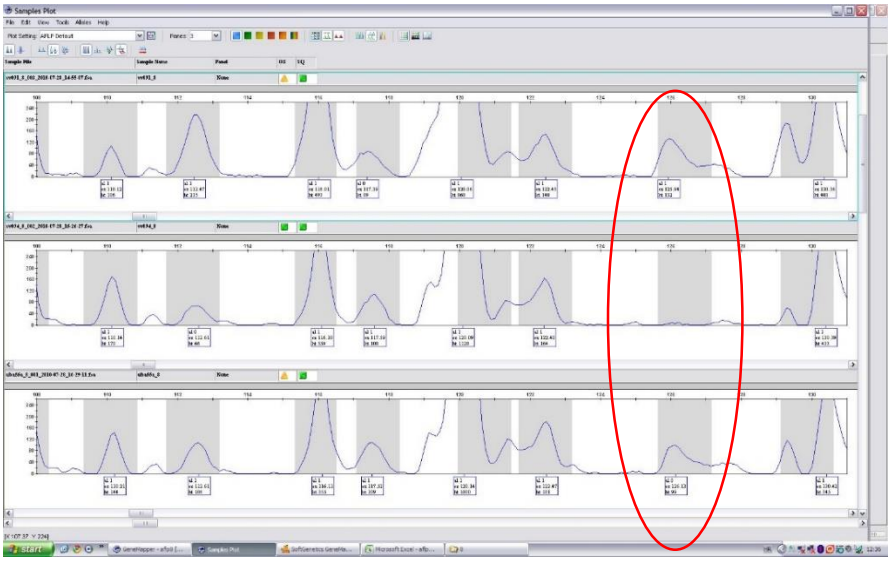
U ovom istraživanju korišteno je četiri kombinacija početnica: E37/M40, E37/M42, E38/M40, E38/M42. Sekvence korištenih početnica prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Sekvence početnica korištene u ovom istraživanju

Početnica	Vrsta početnice	Sekvenca
E37	EcoR1	5'-GACTGCGTACCAATTC**ACG**-3'
E38		5'-GACTGCGTACCAATTC**ACT**-3'
M40	Mse1	5'-GATGAGTCCTGAGTAA**AGC**-3'
M42		5'-GATGAGTCCTGAGTAA**AGT**-3'

4.5. Očitavanje rezultata i stvaranje binarne matrice

Elektroforeza i vizualizacija AFLP fragmenata napravljena je korištenjem četverokapilarnog genetičkog analizatora ABI 3130 Genetic Analyzera (Applied Biosystems, SAD). Detekcija DNA-fragmenata bazirana je na principu fluorescencije. Jedan mikrolitar produkta selektivne amplifikacije je pomiješana sa 0,5 µl internog standarda (GeneScan 500 size standard) i 8,5µl Hi-Di formamida. Određivanje veličine amplificiranih fragmenata provedeno je pomoću GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, SAD) programskog paketa i detekcija polimorfizama prikazana je na slici 6.



Slika 6. Očitavanje veličina amplificiranih fragmenata i detekcija polimorfizma kod klonskih kandidata 'Kleščeca bijelog'

4.6. *Simple matching* koeficijent

Nakon vizualizacije fragmenata u obliku pikova i utvrđivanja njihove veličine konstruira se binarna matrica gdje se prisutnost amplificiranih fragmenta označava sa vrijednosti 1, a odsutnost iste kao 0. Genetska sličnost između klonova sorte 'Kleščec bijeli' utvrđena je korištenjem "*Simple matching*" (SM) koeficijenta prema formuli:

$$SM_{ij}=m_{ij}/n_{ij}$$

- SM_{ij}- mjera genetske sličnosti između genotipa
- m_{ij}- broj poklapanja istovjetnog stanja na datom lokusu između genotipova *i j*
- n_{ij}- ukupni broj mogućih usporedbi između genotipova *i j*

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

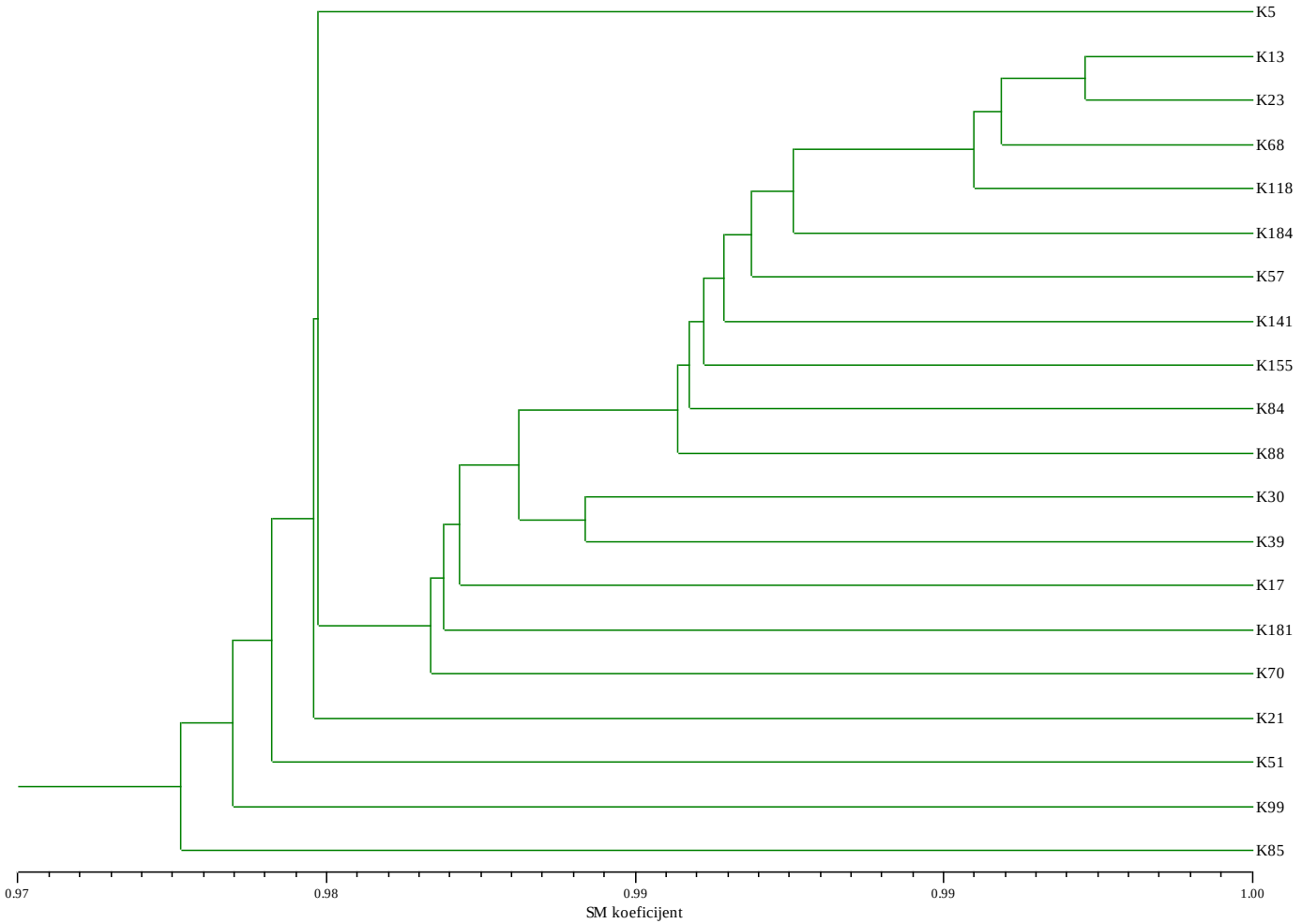
5.1. AFLP analiza

U AFLP analizi korištenjem četiri kombinacije početnica ukupno je amplificirano 296 fragmenata. Unutar fragmenata njih 257 je bilo monomorfno (prisutno kod svih ispitivanih klonova), a 39 polimorfno. Broj amplificiranih, monomorfnih i polimorfnih fragmenata po kombinaciji početnica prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Prikaz amplificiranih fragmenata 'Kleščeca bijelog' po pojedinim kombinacijama markera

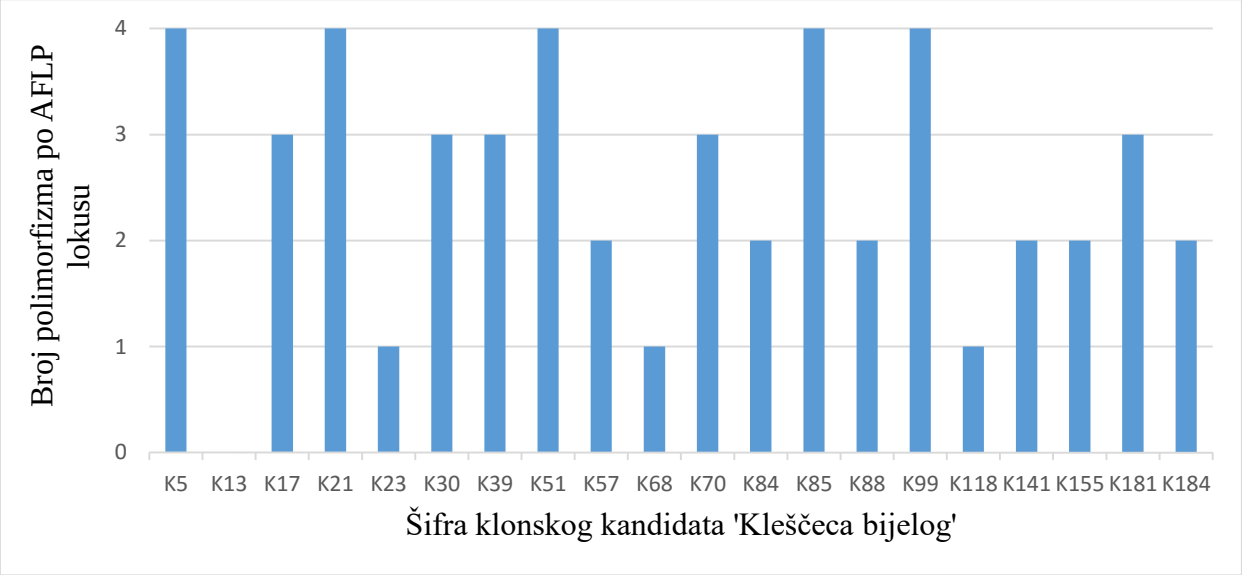
Kombinacija markera	Broj ukupno amplificiranih fragmenata	Polimorfni fragmenti	Monomorfni fragmenti
E37/M40	52	9	43
E37/M42	72	6	66
E38/M40	88	13	75
E38/M42	84	11	73
Ukupno	296	39	257

Elektroforegrami su očitani u binarnu matricu na temelju koje je izračunat *Simple Matching* koeficijent sličnosti i pomoću UPGMA algoritma je napravljena *cluster* analiza (graf 1.).



Graf 1. SM koeficijent i UPGMA klasteriranje 'Kleščeca bijelog' na temelju rezultata AFLP analize

Da bi se utvrdile pojedinačne razlike između klonskih kandidata napravljena je i analiza pojave polimorfizma unutar svakog pojedinog klona i prikazana je u grafikonu 2. Utvrđeno je da prosječan broj polimorfizama po klonskom kandidatu 'Kleščeca bijelog' iznosi 2,4. Broj klonova koji su ispod prosjeka po broju polimorfizma su K13 (koji nema niti jedan detektirani polimorfizam), K23, K68, K118 sa po jednim polimorfizmom, klonovi K57, K84, K88, K141, K155, K184 sa po dva polimorfizma što je ukupan broj od 10 klonova ispod prosjeka. Iznad prosjeka su K5, K21, K51, K85 i K99 sa po četiri polimorfizma i klonovi K17, K30, K39, K70 te K181 sa po tri polimorfizma.



Graf 2. Prikaz broja polimorfizma po pojedinom analiziranom klonskom kandidatu 'Kleščeca bijelog'

6. RASPRAVA

Tehnika AFLP (*Amplified Fragment Lenght Polymorphism*) se zasniva na identifikaciji izrezanih dijelova DNA molekula pomoću dva tipa restrikcijskih enzima, koji su umnoženi lančanom reakcijom polimeraze (PCR), odnosno predstavlja kombinaciju RFLP-a (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) i RAPD-a (*Random Amplification of Polymorphic DNA*'s). Veliku prednost koju AFLP ima u odnosu na slične tehnike DNA markera je što se može primijeniti na bilo koji organizam bez prethodnog znanja o njegovoj sekvenci odnosno genomu. Nedostatak metode je što s druge strane zahtijeva visoku čistoću izolirane DNA jer zaostali polisaharidi mogu spriječiti potpunu digestiju DNA i time uzrokovati pogrešne rezultate (Šimon, 2012.). U istraživanju provedenom na 'Kleščecu bijelom' korištena su po dva AFLP markera od EcoR1 restrikcijskog enzima (E37, E38) te dva Mse1 restrikcijskih enzima (M40, M42) što kombiniranjem daje četiri različite kombinacije AFLP markera: E37/M40, E37/M42, E38/M40, E38/M42. Ukupno je amplificirano 296 fragmenata. od kojih je 257 bilo monomorfno, a 39 polimorfno odnosno njih 13,18%. *Cluster* analiza pomoću UPGMA algoritma pokazala je da je najmanja sličnost između klonskih kandidata 'Kleščeca bijelog' 97,8% pri čemu se odvaja klonski kandidat K84 od svih ostalih 19. Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa sličnim istraživanjima na klonovima sorata vinove loze. Blaich i suradnici (2007.) su analizirajući 70 klonova Pinota crnog utvrdili genetsku sličnost između njih na razini 99%, a čak 17 klonova sorte je imalo potpuno identičan profil.

U sličnom istraživanju koje je također proveo Fanizza i suradnici (2005.) jedan od ciljeva je bio utvrditi jesu li sorte Primitivo, Zinfandel i Crljenak kaštelanski iste sorte. Nakon provedene AFLP analize, koristeći 50 različitih primer kombinacija, rezultat je bio 2.928 različitih AFLP markera od kojih je većina (2.919) opet bila monomorfna i njih samo 9 polimorfnih. U njihovoj analizi udio polimorfnih markera je bio 0,3% dok je u našoj analizi udio polimorfnih markera bio ipak znatno veći (13,1%). U zaključku istraživanja potvrđeno je da su istraživane sorte ista varijacija to jest klonovi jednog kultivara uzevši u obzir da postoje manje razlike koje su produkt različitih oblika mutacija.

Anhalt i suradnici (2011.) primjenom AFLP markera kod 86 klonova Rajnskog rizlinga i korištenjem 10 kombinacija početnica unatoč velikom broju polimorfnih fragmenata (135 od ukupno 305 očitanih) nisu mogli utvrditi polimorfizam specifičan za pojedini klon. Razlog tome je vjerojatno prevelik broj analiziranih klonova sa premalim brojem kombinacija početnica.

Unatoč tome dobili su rezultate koji svrstavaju (klasteriraju) većinu analiziranih klonova u jednu grupu sa izuzetkom par klonova. U njihovom istraživanju broj polimorfnih mutacija po pojedinom klonu je istovjetan sa brojem mutacija u istraživanju 'Kleščeca bijelog'.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i analiza, može se zaključiti sljedeće:

1. Korištenjem AFLP metode DNA markera i četiri kombinacije početnica amplificirano je ukupno 296 fragmenata od kojih je 39 polimorfnih a 257 monomorfnih i uspješno su razdvojeni svi klonski kandidati 'Kleščeca bijelog'.
2. Polimorfizam unutar pojedinog klonskog kandidata kretao se od nula do četiri polimorfna fragmenta pri čemu K13 nije imao niti jedan polimorfizam, njih tri (K23, K68, K118) je imalo po jedan polimorfizam, 6 klonova (K57, K84, K88, K141, K155, K184) je imalo po dva polimorfizma, pet klonova (K17, K30, K39, K70 te K181)je imalo po tri polimorfizma a klonovi sa četiri polimorfizma su K5, K21, K51, K85 i K99.
3. Najmanja sličnost između klonskih kandidata 'Kleščeca bijelog' iznosi 97,5% i odvaja klonski kandidat K85 od svih ostalih. Nadalje najveću razliku od ostalih klonova poslije klona K85 ima klon K99 sa 97,7%. Poslije njega najmanju sličnost sa ostalim klonovima ima klon K51 sa 97,8% sličnosti. Klon K21 je sljedeći po sličnosti sa ostalim klonovima sa koeficijentom od 98% sličnosti. Nakon navedenih klonova dolazi do podijele između klona K5 koji je različit od svih ostalih klonova koji nisu bili navedeni.
4. Zaključno sa dobivenim rezultatima iz istraživanja može se reći da su pojedini klonovi uspješno identificirani i razdvojeni te je napravljena *cluster* analiza (kojoj je prethodila AFLP analiza) na kojoj se mogu vidjeti razlike između analiziranih klonova 'Kleščeca bijelog'.
5. Osim uspješne identifikacije pojedinih klonova, razina uočene genetske divergentnosti klonova pomoću AFLP markera može poslužiti i kao polazište za provjeru razlika vinogradarskih svojstava u budućem postupku individualne klonske selekcije.

8. LITERATURA

1. Andabaka Ž., Stupić D., Marković Z., Preiner D. (2011) Novi trendovi u proizvodnji sadnog materijala autohtonih sorata vinove loze u Hrvatskoj, Glasnik zaštite bilja 34 (1): 46-56

2. Anhalt U.C.M., Martinez S.C., Ruhl E., Forneck A. (2011.) Dynamic grapevine clones-an AFLP-marker study of the *Vitis vinifera* cultivar Riesling comprising 86 clones, Tree Genetics & Genomes 7(4), 739-746

3. Baranek M., Raddova J., Krizan B., Pidra M. (2009.) Genetic changes in grapevine genomes after stress induced by in vitro cultivation, thermotherapy and virus infection, as revealed by AFLP, Genetics and Molecular Biology 32(4), 834-839

4. Blaich R., Konradi J., Rühl E., Forneck A. (2007.) Assessing Genetic Variation among Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Clones with AFLP Markers. American Journal of Enology and Viticulture 58(4), 526-529

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

6. Cretazzo E., Meneghetti S., De Andres M.T., Gaforio L., Frare E., Cifre J. (2010.) Clone differentiation and varietal identification by means of SSR, AFLP, SAML and M-AFLP in order to assess the clonal selection of grapevine: the case study of Manto Negro, Callet and Moll, autochtonous cultivars of Majorca, Annals of Applied Biology 17, 213-227

7. Fanizza G., Chaabane R., Ricciardi L., Resta P. (2003.) Analysis of a spontaneous mutant and selected clones of cv. Italia (*Vitis vinifera*) by AFLP markers, Vitis 42 (1), 27–30

8. Fanizza G., Lamaj F., Resta P., Riccardi L., Savino V. (2005). Grapevine cvs Primitivo, Zinfandel and Crljenak kastelanski: Molecular analysis by AFLP, Vitis 44 (3): 147-148

9. Fernandez H., Kumar A., Angeles Revilla M. (2010.) Working with Ferns: Issues and Applications, Springer (Spain): 208-230

10. Hrvatski centar za poljoprivredu hranu i selo <http://www.hcphs.hr/> pristupljeno 15. rujna 2015.

11. Kamenjak D. (1987.) Ampelografske karakteristike sorte Kleščec na kalničkom vinogorju: diplomski rad; voditelj Nikola Mirošević

12. Kamenjak D. (2009.) Završno izvješće projekta „Revitalizacija sorte Kleščec na području Koprivničko-križevačke županije“

13. Kamenjak D. (2013.) Godišnje izvješće za 2013. godinu o tijeku istraživanja i provođenju druge faze projekta "Podizanje matičnog nasada plemki sorte Kleščec“

14. Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008.) Vinova loza, Školska knjiga, Zagreb

15. Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J., Preiner D., Šimon S., Husnjak S., Andabala Ž., Stupić D., Marković Z., Žulj Mihaljević M. (2014.) Sorte vinove loze Hrvatskog Primorja, Centar za brdsko-planinsku poljoprivredu Primorsko goranske županije, Ravna Gora

16. Marjanović-Jeromela A., Marinković R., Mitrović P. (2007) "Oplemenjivanje uljane repice (*Brassica napus* L.)", Zbornik Radova-A Periodical of Scientific Research on Field & Vegetable Crops 43

17. Meneghetti S., Calo A., Bavaresco L. (2011.) A Strategy to Investigate the Intravarietal Genetic Variability in *Vitis vinifera* L. for Clones and Biotypes Identification and to Correlate Molecular Profiles with Morphological Traits or Geographic Origins, Molecular Biotechnology, online first

18. Meneghetti S., Poljuha D., Frare E., Costacurta A., Morreale G., Bavaresco L., Calo A. (2012.) Inter and Intra-Varietal Genetic Variability in Malvasia Cultivars, Molecular Biotechnology 50, 189-199

19. Meudt, H. M., Clarke, A. C. (2007.) Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances, Trends in Plant Science 12(3), 106-117

20. Mirošević N. i Turković Z. (2003.) Ampelografski atlas. Golden marketing Tehnička knjiga, Zagreb

21. Mirošević N. i Karoglan Kontić J. (2008.) Vinogradarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb

22. Mirošević N. i Turković Z. (2009.) Ampelografski atlas. Golden marketing, Zagreb

23. Pejić I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplik V., Castiglioni P., Taramino G., Motto M. (1996.) Comparative analysis of genetic similarity among maize inbreed lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs, Theoretical and Applied Genetics 97, 1248-1255

24. Pejić I., Šimon S., Žulj Mihaljević M., Vončina D., Preiner D., Radiček L., Mišetić M., Kamenjak D. (2013.) Kleščec – "nova" Hrvatska autohtona sorta, Oplemenjivanje bilja, sjemenarstvo i rasadničarstvo, Zbornik sažetaka, Sv. Martin na Muri

25. Pelsy, F. (2010.) Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties, Heredity 104, 331-340

26. Preiner D. (2012.) Učinkovitost masovne pozitivne selekcije unutar populacija autohtonih sorata vinove loze (*V. Vinifera* L.) u Dalmaciji, Doktorski rad, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

27. Radiček Z., (1985.) Vinogradarstvo kalničkog vinogorja i neka ampelografska istraživanja starih sorata, diplomski rad; voditelj Rudolf Bišof

28. Rohlf F.J. (2005.) NTSys-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1e, Exeter Software, Setauket, NY

29. ScienceDirect < http://www.sciencedirect.com/>, Pristupljeno 20.09.2015.

30. Stajner N., Jakse J., Javornik B., Masuelli R.W., Martinez L.E. (2009.) Highly variable AFLP and S-Sap markers for the identification of 'Malbec' and 'Syrah' clones, Vitis 48(3), 145-150.

31. Šatović Z. (1999) Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. Sjemenarstvo 16(1-2): 73-95

32. Šimon S. (2012.) Detekcija unutarsortne genetske varijabilnosti kod vinove loze (*Vitis vinifera* L.), doktorski rad; mentor Ivan Pejić

33. Trummer F. (1854.) Gospodarske novine br. 14

34. Trummer F. (1862.) Gospodarski list br. 44

35. Trummer F. (1871.) Gospodarski list br. 42

36. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Fritjers A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995.) AFLP: a new concept for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Research 23, 4407-4414

ŽIVOTOPIS AUTORA

Osobni podaci:

Ime i prezime: Kruno Kamenjak
Datum rođenja: 08.12.1988.
Mjesto rođenja: Koprivnica
Adresa: Kalnička ulica 82, 48260 Križevci
e-mail: kkamenjak@gmail.com

Obrazovanje:

1994.- 2002. Osnovna škola 'Ljudevita Modeca', Križevci
2002.- 2006. Gimnazija 'Ivana Zakmardija Dijankovečkog', Križevci
2010.- 2013. 'Visoko Gospodarsko Učilište', Križevci
2013.- 2015. 'Agronomski Fakultet u Zagrebu', Zagreb

Posebne vještine i dostignuća:

- Aktivno znanje dva strana jezika u jeziku i pismu (engleski jezik, njemački jezik)
- Sposobnost rada na računalu
- Vozačka dozvola B kategorije
- Stručna praksa preddiplomskog studija obavljena u Portugalu