

Primjena mikrosatelitskih (SSR) markera u identifikaciji - utvrđivanju sinonima za sorte Topol i Beretinjok (*Vitis vinifera* L.)

Darko PREINER, Silvio ŠIMON, Edi MALETIĆ, Ivan PEJIĆ

Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska,
(e-mail: dpreiner@agr.hr)

Sažetak

Sorte vinove loze često imaju više imena (sinonima), pa bez sustavnog istraživanja nije moguće pouzdano utvrditi njihov stvarni broj. Iz tog su razloga primke u kolekciji autohtonih sorata Beretinjok s otoka Visa te Topol s otoka Paga smatrane različitim sortama, a razlog je njihova relativno mala rasprostranjenost, te prostorna izoliranost. Tijekom primarne ampelografske analize klasičnom metodom, putem OIV deskriptora uočena je fenotipska sličnost između tih dviju sorata, te je pretpostavljeno da se radi o sinonimima. Iz tog je razloga provedena genetička identifikacija uz pomoć mikrosatelitskih, SSR markera, koja je dokazala da su Beretinjok i Topol sinonimi za isti genotip.

Ključne riječi: vinova loza, autohtone sorte, Topol, Beretinjok, SSR

Application of Microsatellite (SSR) Markers for Identification – Determination of Synonyms Topol and Beretinjok (*Vitis vinifera* L.)

Abstract

Grapevine varieties often have more than one name (synonyms) and without systematic research it is impossible to determine their actual number. Collection accessions Beretinjok from island Vis and Topol from island Hvar are, because of their small distribution, and isolation, considered to be two different varieties. During ampelographic analyses phenotypic similarity was noticed between them and it was assumed that they are synonyms. Based on that microsatellite (SSR) analyze was conducted and this assumption was confirmed.

Key words: *Vitis vinifera*, native cultivars, Topol, Beretinjok, SSR

Uvod

Vinogradarstvo je jedna od najvažnijih grana poljoprivrede u Hrvatskoj. Posljednjih godina dolazi do promjene trendova u vinogradarstvu i na svjetskom tržištu vina. Moderni potrošači vina sve više cijene autohtonost vina, tj. sorte od koje je ono proizvedeno, pa se sve se više ulaže u inventarizaciju i revitalizaciju autohtonog sortimenta vinove loze.

U vinogradarskoj regiji Primorska Hrvatska autohtoni kultivari zauzimaju 80 % svih površina pod vinogradima. U sjevernom dijelu mediteranske hrvatske (Istra) ima oko 30-40 % introduciranih kultivara, a u južnom dijelu (Dalmacija) autohtoni kultivari čine gotovo 90 % vinograda. Kao posljedica toga najveća

genotipska raznolikost trenutačno je prisutna u Dalmaciji (Pejić i sur., 2000). Višestoljetni uzgoj, te izoliranost pojedinih vinogorja na tom području, posebno otoka, rezultirala je postojanjem više imena (sinonima) za istu sortu, ali u nekim slučajevima i korištenjem istog imena za različite genotipove (homonimi). Korištenjem samo imena sorata, bez sustavnog proučavanja i opisivanja, nije moguće pouzdano utvrditi stvarni broj autohtonih sorata vinove loze u Republici Hrvatskoj.

Sorta koja se na otoku Visu naziva Beretinjok, te sorta koja se uzgaja na otoku Pagu pod imenom Topol jedan je od slučajeva gdje se zbog razlika koje sorte mogu očitovati u različitim okolinskim uvjetima, unatoč fenotipskoj sličnosti nije sa sigurnošću moglo utvrditi da li se radi o jednoj ili dvije različite sorte. Unatoč trenutno vrlo maloj rasprostranjenosti tih sorata na područjima gdje se uzgajaju važno je istražiti njihov kvalitativni potencijal, a prije takvog istraživanja koje bi pokazalo koji im je stvarni gospodarski potencijal, nužno je provesti i odgovarajuću identifikaciju genotipa. Uzgojem sorata u istom nasadu smanjuju se fenotipske razlike koje inače mogu biti značajne kod evaluacije na različitim agroekološkim položajima, te je moguća njihova objektivnija usporedba.

Međutim, poznato je kako određene promjene fenotipa unutar sorte mogu nastati i kao posljedica djelovanja nekih drugih čimbenika (primjerice različite viroze ili pojava mutacija), a za pouzdane rezultate ampelografske identifikacije potrebno je provesti višegodišnja praćenja. Stoga se za pouzdano utvrđivanje genotipa sorte sve više koriste mikrosatelitski (SSR) markeri (Maletić i sur. 1999). Mikrosatelitski lokusi nasljeđuju se kodominantno te su pogodni za istraživanje sinonima i roditeljstva (Bowers i sur. 1997.; Bowers i sur., 1999b.; Pejić i sur., 2000.; Piljac i sur., 2002.; Maletić i sur., 2003.).

Materijali i metode

Na temelju ranijih ampelografskih opažanja i osnovne ampelografske deskripcije provedene u sklopu znanstvenog projekta "Ampelografska i genetička evaluacija autohtonih sorata vinove loze" postavljena je hipoteza da su sorte Topol, s otoka Paga, i Beretinjok s otoka Visa, istovjetne, tj. da su njihova imena sinonimi za istu sortu. U skladu s ovom hipotezom, našim istraživanjem željeli smo ispitati navedene pretpostavke primjenom ampelografskih (OIV) deskriptora te mikrosatelitskih (SSR) markera.

Obje sorte posađene su u Kolekciji hrvatskih autohtonih sorata vinove loze na pokušalištu Agronomskog fakulteta u Jazbini. U kolekciji je svaka sorta zastupljena s pet trsova, koji su činili uzorak za identifikaciju putem OIV deskriptora. Ova metoda se sastoji od ukupno 135 različitih deskriptora, od kojih smo odabrali njih 27, najprikladnijih za razlikovanje sorata, jer opisuju najstabilnija fenotipska svojstva.

Uzorci lišća koje je korišteno za ekstrakciju DNA sorata Topol i Beretinjok uzeti su u proljeće 2005. iz kolekcije hrvatskih autohtonih sorata na pokušalištu agronomskog fakulteta „Jazbina“ u Zagrebu. Uzeti uzorci lišća su liofilizirani i pohranjeni na - 80 °C. Izolacija DNA iz tkiva listova izvršena je po metodi Doyle & Doyle (1990.). Za SSR analizu korišteno je 11 mikrosatelitskih markera: VVS2 (Thomas i Scott 1993), VVMD5, (Bowers i sur. 1996), VVMD21, VVMD25, VVMD27, VVMD-28, VVMD-31, VVMD-32 (Bowers i sur. 1999), ssrVrZAG62, ssrVrZAG79 i ssrVrZAG-83 (Sefc et al. 1999).

PCR reakcije provedene su prema ranije korištenom protokolu (Benjak i sur., 2005). Produkti PCR reakcija vizualizirani su upotrebom SPREADEX gelova i SYBR Gold boje. Korištenjem UV transiluminatora i Polaroid MP4+ kamere fotografirani su gelovi i konačno očitavanje duljina fragmenata analiziranih genotipova na pojedinim SSR lokusima izvršena su usporedbom sa fragmentima poznatih duljina koji su korišteni kao standardi prilikom elektroforeze.

Rezultati i rasprava

U tablici 1 prikazani su rezultati OIV deskriptora primijenjenih na sortama Topol i Beretinjok u Kolekciji hrvatskih autohtonih sorata vinove loze u Jazbini.

Kao što je vidljivo u tablici 1, OIV deskripcijom dobiveni su rezultati koji upućuju na veliku sličnost između ispitivanih fenotipskih karakteristika kod Topola i Beretinjoka. Međutim nađene su i određene razlike, kao što je slučaj kod deskriptora OIV-003, OIV-004, OIV-053, OIV-075 koje nismo mogli sa sigurnošću pripisati utjecaju okoline ili utjecaju genotipa.

U tablici 2 prikazani su rezultati analize mikrosatelitskih markera. Na svih 11 ispitivanih lokusa, sorte Topol i Beretinjok imaju identičan profil. Sefc. i sur. (2000) navode da kumulativna vjerojatnost da se pojavi

identičan genotip na 9 analiziranih lokusa, a da se pri tome radi o različitoj sorti, iznosi 10^{-7} do 10^{-9} , dok se korištenjem 11 SSR lokusa ta vjerojatnost još dodatno smanjuje.

Zaključak

Preliminarnom i primarnom ampelografskom analizom utvrđena je visoka sličnost sorata, ali nije se moglo sa sigurnošću potvrditi da se radi o istom genotipu. Na temelju analize profila mikrosatelitskih markera utvrđeno je da sorte Beretinjok i Topol imaju istovjetan genetski profil na 11 analiziranih mikrosatelitskih lokusa. Ovo implicira sa vrlo visokom statističkom vjerojatnošću da su ove dva uzorka nastala od istog ishodišnog genotipa (početne biljke).

Time je potvrđena pretpostavka temeljena na ampelografskim opažanjima i OIV deskriptorima da se radi o sinonimima, odnosno istoj sorti sa dva različita imena.

Tablica 1: Rezultati primjene OIV deskriptora na sortama Topol i Beretinjok u Kolekciji hrvatskih autohtonih sorata vinove loze u Jazbini, 2004 godine.

OIV-kod	Svojstvo	Topol	Beretinjok
OIV-001	Oblik vrha mladice	7	7
OIV-003	Intenzitet antocijanskog obojenja vunastih dlačica vrha	5	7
OIV-004	Gustoća vunastih dlačica vrha	7	9
OIV-006	Položaj mladice	5	5
OIV-007	Boja dorzalne strane internodija	2	1
OIV-008	Boja ventralne strane nodija	1	2
OIV-015-1	Distribucija antocijanskog obojenja na ljuskastim listićima pupa	5	5
OIV-015-2	Intenzitet antocijanskog obojenja na ljuskastim listićima pupa	5	5
OIV-016	Raspored vitica na mladici	1	1
OIV-051	Boja lica lista	3	3
OIV-053	Gustoća vunastih dlačica između žila na naličju lista	7	9
OIV-067	Oblik plojke	2	2
OIV-068	Broj isječaka	2	2
OIV-070	Antocijanska obojenost glavnih žila na naličju	1	1
OIV-072	Naboranost plojke	7	7
OIV-074	Presjek plojke	3	1
OIV-075	Mjehuravost lica plojke	9	5
OIV-076	Oblik zubaca	3	2
OIV-079	Stupanj otvorenosti sinusa peteljke	2	2
OIV-080	Oblik baze sinusa peteljke	2	2
OIV-081-1	Prisutnost zubaca u sinusu peteljke	1	1
OIV-081-2	Sinus peteljke ograničen žilama	1	1
OIV-083-2	Prisutnost zubaca na bazi gornjih postranih sinusa	1	1
OIV-084	Gustoća vunastih dlačica između glavnih žila na naličju	5	3
OIV-087	Gustoća čekinjastih dlačica na glavnim žilama (na naličju)	5	3
OIV-151	Spol cvata	3	3
OIV-155	Rodnost bazalnih pupova (1.-3. pup)	1	1

Tablica 2. Genetski profili analiziranih sorata

Lokus	Beretinjok		Topol	
ssrVrZAG-62	189	201	189	201
ssrVrZAG-79	243	259	243	259
ssrVrZAG-83	197	197	197	197
VVMD-5	232	232	232	232
VVMD-21	243	249	243	249
VVMD-25	245	259	245	259
VVMD-27	181	185	181	185
VVMD-28	239	249	239	249
VVMD-31	204	212	204	212
VVMD-32	259	273	259	273
VVS-2	143	145	143	145

Literatura

- Benjak, A., Ercisli, S., Vokurka, A., Maletić, E., Pejić, I. (2005). Genetic relationships among grapevine cultivars native to Croatia, Greece and Turkey. *Vitis* 44(2): 73-77
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani R., Meredith, C.P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39:628-633
- Bowers, J.E., Meredith, C.P. (1997). The parentage of a classic wine grape, Cabernet sauvignon. *Nature Gen* 16: 84-87
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Meredith, C.P. (1999). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *American Journal of Enology and Viticulture*. 50(3): 243-246
- Bowers, J.E., Boursiquot, J.M., This, P., Chu, K., Johannson, H., Meredith, C.P. (1999b). Historical genetics : the parentage of Chardonnay, Gamay and other wine grapes of northeastern France. *Science* 285 : 1562-1565.5.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15
- Maletić, E., Sefc, K.M., Steinkellner, H., Karoglan-Kontić, J., Pejić, I. (1999). Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and detection of synonymous cultivars in neighboring regions. *Vitis* 38(2):79-83
- Maletić, E., Pejić, I., Karoglan-Kontić, J., Piljac, J., Dangl, G., Vokurka, A., Lacombe, T., Mirošević, N., Meredith, C.P. (2003). The identification of Zinfandel on the Dalmatian coast of Croatia. *Proc. VIIIth IC on Grape*. Eds: E. Hajdu & É.Borbás. *Acta Hort* 603, ISHS 2003: 251-254
- OIV 2001. Code des caracteres descriptifs des varietes et especes de vitis. Paris
- Pejić, I., Mirošević, N., Maletić, E., Piljac J., Meredith, C.P. (2000). Relatedness of cultivars Plavac Mali, Zinfandel and Primitivo (*Vitis vinifera* L.). *Agriculturae Conspectus Scientificus* 65(1): 21-25
- Piljac, J., Maletić, E., Kontić, J.K., Dangl, G.S., Pejić, I., Mirošević, N., Meredith, C.P. (2002). The percentage of Pošip bijeli, a major white wine cultivar of Croatia. *Vitis* 41 (2):83-87
- Sefc, K. M., Steinkellner, H., Wagner, H.W., Glössl, J., Regner, F. (1997). Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *Vitis* (36.) 179-183
- Sefc K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J., Steinkellner, H. (1999). Identification of microsatellite sequences in *vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *vitis* species. *Genome* (42.)1-7
- Sefc, K.M., Lopez, M.S., Lefort, F., Bottam, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Ibanez, J., Pejić, I., Wagner, H.W., Glossl, J., Steinkellner, H. (2000.) Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. (100.) 498-505
- Sefc, K.M., Lefort, F., Grando, M.S., Scott, K.D., Steinkellner, H., Thomas, M.R. (2001). Microsatellite markers for grapevine: A State Of The Art. *Molecular Biology & Biotechnology of Grapevine*: 407-438
- Thomas, M.R., Scott, N.S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* (86.) 985-990

sa2008_0901