

Maja Žulj Mihaljević<sup>1</sup>, Ulrike C.M. Anhalt<sup>2</sup>,  
Martina Ramljak<sup>3</sup>, Astrid Forneck<sup>4</sup>, Pejić I.<sup>5</sup>

Znanstveni rad

## Detekcija unutar-sortne varijabilnosti nekih sorti vinove loze S-SAP molekularnim markerima

### Sažetak

Genetska unutar-sortna varijabilnost temelji se na pretpostavci da tijekom vremena dolazi do pojave spontanijih mutacija u genomu sorte koje zbog vegetativnog načina razmnožavanja ostaju fiksirane. Svaka informacija o unutar-sortnoj varijabilnosti može biti od velike važnosti prije odluke o tome koje trsove zadržati nakon provjere zdravstvenog statusa te može pružiti uvid u homogenost populacije i potencijal klonske selekcije. U ovom istraživanju korišten je sustav markera temeljen na retrotranspozonomima – modificirana S-SAP metoda koja je u prijašnjim istraživanjima pokazala potencijal za razlikovanje klonova. Korišten biljni materijal vinove loze sastojao se od 22 primke dviju različitih sorti: Zlatarice blatske bijele i Glavinuše. S-SAP metoda provedena je sa 6 različitih kombinacija početnica. Ovom metodom uspješno su razlikovane obje sorte, a detektirane su i razlike među pojedinim jedinkama. Stupanj polimorfizma, iako analize nisu rađene na certificiranom klonskom materijalu, u skladu je sa sličnim istraživanjima rađenim na certificiranom materijalu. Početnica F100 je detektirala najviše razlika i može se preporučiti u daljnjim istraživanjima. Dobiveni rezultati pružaju smjernice prilikom daljnje propagacije i revitalizacije.

**Ključne riječi:** klon, unutar-sortna varijabilnost, retrotranspozoni, molekularni markeri, S-SAP

### Uvod

Uvođenje poznatih europskih sorata vinove loze rezultirao je, kako u Hrvatskoj tako i u drugim zemljama, erozijom domaće germoplazme. Unatoč činjenici da neke autohtone sorte vrlo često daju izvrsna vina, nedovoljno su iskorištene prvenstveno zbog manjka kvalitetnog materijala za razmnožavanje i nedovoljnog znanja o njihovoj uspješnosti u različitim sredinama (Maletić i sur., 1999). Stoga, nesumnjivo je da ovakav trend utječe na osiromašenje nacionalnih sortimenata i potiče nestanak mnogih rijetkih sorata. Zbog toga se u mnogim zemljama provode mjere zaštite i gospodarske revitalizacije autohtonih sorata.

Sorta se sastoji od niza klonova dobivenih vegetativnim razmnožavanjem odabranog trsa uzgojenog iz jednog sjemenjaka. Jednom nastala, sorta se dalje vegetativno razmnožava, a rezultat su klonovi istovjetni matičnoj biljci. Fenotipske razlike između klonova se ipak pojavljuju i mogu biti posljedica ne samo okolinskih faktora već i somatskih mutacija u genomu, nakupljenih tijekom više ciklusa vegetativnog razmnožavanja. U tim slučajevima, sorta obuhvaća nekoliko različitih populacija klonova koje dijele slične fenotipske karakteristike (Carimi i sur., 2011). Unutar-sortna varijabilnost, odnosno promjene koje se dalje nasljedno prenose, uzrokovane su mutacijama tj. promjenom DNA molekule (Karlson, 1988). Mutacije manjeg učinka, koje rezultiraju pozitivnim morfološkim i fiziološkim promjenama i fertilnim biljkama temelj su prirodne evolucije i izvor za klonsku selekciju, tj. razvitak novih genotipova – klonova koji mogu doprinijeti sigurnijoj i isplativoj proizvodnji (Maletić i sur. 2008).

<sup>1</sup> Maja Žulj Mihaljević, dipl.ing.agr, Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, e-mail: mzulj@agr.hr  
<sup>2</sup> dr.sc. Ulrike C.M. Anhalt, Department of Crop Sciences, Division of Viticulture and Pomology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria  
<sup>3</sup> Martina Ramljak, mag.ing.agr.  
<sup>4</sup> prof.dr.sc. Astrid Forneck Department of Crop Sciences, Division of Viticulture and Pomology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria  
<sup>5</sup> prof.dr.sc. Ivan Pejić Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb

Shodno tome, znanstvena zajednica teži razvitku sustava molekularnih markera za identifikaciju i karakterizaciju klonova kako bi shvatila genomske (evolucijske) mehanizme koji bi objasnili pojavu i prijenos mutacija (Wegscheider i sur., 2009). Ipak, iako se mnogi sustavi molekularnih DNA markera koriste za razlikovanje sorata, samo neki imaju mogućnost razlikovanja klonova, a S-SAP retrotranspozonski markeri se neki od njih. Transpozicijski elementi su fragmenti DNA koji se mogu umetati u nova kromosomska mjesta i često napraviti svoje duplicirane kopije u tom procesu. Kao pokretni elementi, transpozoni mogu utjecati na promjenu strukture gena i preraspodjelu cijelog genoma te su kao takvi jedan izvor mutacija koji vodi do klonske varijabilnosti (Benjak i sur., 2009). Većina radova na transpozicijskim elementima usmjereni su na retrotranspozone koji se šire „izreži i zalijepi“ mehanizmom zbog toga što njihovo umnažanje može biti pokrenuto stresom i okolišnim čimbenicima kao što su oštećenja ili otežani klimatski uvjeti (Grandbastien, 1998). Također, jedan od stresova koji može pokrenuti „gibanja retrotranspozona“ je i vegetativno razmnožavanje. Njihovo kretanje, ukoliko su njime pogođeni geni i regulatorni čimbenici, može imati velike posljedice na strukturu i funkciju gena (Biémont i Vieira, 2006). Budući da je vinova loza višegodišnja biljka koja je izložena stresovima tijekom dugog vegetacijskog perioda, kao što su presađivanje, rezidba, napad patogena ili ultraljubičasto zračenje, retrotranspozoni doprinose plastičnosti genoma vinove loze.

Dosad su na hrvatskim autohtonim sortama S-SAP analizu proveli Šimon (2012.) i Žulj Mihaljević i sur. (2015.). U sklopu ovog istraživanja analizirane su sorte Zlatarica blatska bijela i Glavinuša crna. Populacija sorte Zlatarice blatske je izrazito mala i proširena gotovo isključivo na otoku Korčuli pa joj se danas populacija procjenjuje na samo nekoliko stotina trsova. Međutim, prema iskustvima starijih vinogradara i oskudnim literaturnim podacima, gospodarski potencijal Zlatarice blatske vrlo je visok te svakako može stati uz bok najkvalitetnijim bijelim dalmatinskim sortama (Maletić i sur. 2015). Sorta Glavinuša (sinonimi Okatac, Glavinka, Slakarinc, Crljenac) danas nema veliku gospodarsku važnost i uzgaja se na vrlo malim površinama. Istraživački projekti provedeni s ciljem revitalizacije uzgoja kaštelanskih sorata potvrdili su da sorta ima visok enološki potencijal te zaslužuje širenje na veće proizvodne površine i izvan matičnoga područja. Uz proizvodnju kvalitetnih vina redovite berbe, sorta je osobito pogodna za proizvodnju prošeka, a ima vrijednost i kao zobatica. Iako se zanimanje za uzgoj ove sorte posljednjih godina povećalo te ju lokalni proizvođači razmnožavaju cijepljenjem na stalnome mjestu, njezina je populacija još uvijek mala, a problem daljnjem širenju predstavlja i visok stupanj zaraženosti virusima (Maletić i sur. 2015).

Cilj ovog rada bio je testirati unutar-sortnu varijabilnost pomoću S-SAP molekularnih markera tj. procijeniti stopu mutacija kod odabranih rijetkih autohtonih sorti vinove loze koje dosad nisu bile podvrgnute klonskoj selekciji. Dobiveni rezultati trebali bi pružiti uvid u homogenost populacija ispitivanih sorti i prikladnost same metode.

## Materijali i metode

Biljni materijal vinove loze za ovo istraživanje uzorkovan je na otoku Korčuli i na splitskom području unutar SEE-ERA.net Plus projekta (*“Preservation and establishment of true-to-type and virus free material of endangered grapevine cultivars in Croatia and Montenegro”*). U DNA analizi korištene su 22 primke: 13 primki Zlatarice blatske i 9 primki Glavinuše (Tablica 1). Prethodno je analizom mikosatelita utvrđena njihova pripadnost sorti (Žulj Mihaljević i sur. 2015). Uzorci lista Zlatarice blatske bijele i Glavinuše prikupljeni su u rujnu 2010, na samom početku projekta. DNA je izolirana pomoću DNA EZNA SP Plant DNA Kit (Omega

Bio-tek), prema uputama proizvođača. Procjena količine i kvalitete izolirane DNA provedena je pomoć spektrofotometra NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Navedenim uzorcima pridružene su i tri kontrole (pozitivne kontrole: dva klona Pinot-a: 18 GM i P Entav te negativna kontrola - voda).

**Tablica 1.** Popis uzoraka korištenih u istraživanju i njihova pripadnost sorti

R.br.	Šifra uzorka	Sorta
1	SEE 250	Zlatarica blatska b.
2	SEE 251	Zlatarica blatska b.
3	SEE 252	Zlatarica blatska b.
4	SEE 253	Zlatarica blatska b.
5	SEE 254	Zlatarica blatska b.
6	SEE 255	Zlatarica blatska b.
7	SEE 256	Zlatarica blatska b.
8	SEE 257	Zlatarica blatska b.
9	SEE 258	Zlatarica blatska b.
10	SEE 98	Glavinuša
11	SEE 99	Glavinuša
12	SEE 102	Glavinuša
13	SEE 103	Glavinuša
14	SEE 105	Glavinuša
15	SEE 106	Glavinuša
16	SEE 107	Glavinuša
17	SEE 108	Glavinuša
18	SEE 109	Glavinuša
19	SEE 110	Glavinuša
20	SEE 111	Glavinuša
21	SEE 112	Glavinuša
22	SEE 260	Glavinuša

S-SAP-analiza provedena je prema protokolu Wegscheider i sur. (2009). Za restrikciju molekula DNA korišten je *Msel* restrikcijski enzim (Fermentas). Amplificirano je ukupno šest kombinacija početnica: F0100 i M22, M24 i M27, F0103 i M27, F0104 i M27, te F0105 i M27 čije su sekvence prikazane u Wegscheider i sur. (2009). Korištene univerzalne retrotranspozonske početnice (oznaka F) fluorescentno su obilježene s IRDye® 700 ili IRDye® 800. Elektroforeza i vizualizacija je provedena na automatiziranom LI-COR NEN 4300 DNA sekvenceru (LI-COR Biosciences, Bad Hamburg, Njemačka). Vizualizacija i očitavanje fragmenata provedeni su u programu Saga<sup>MX</sup>.

Amplificirani polimorfni S-SAP fragmenti analizirani su kao dominantni markeri. Temeljem slika gelova napravljene su binarne matrice pri čemu je prisutnost amplificiranog fragmenta određene duljine označena kao 1, a odsutnost kao 0 (izostanak fragmenta na istoj poziciji).

Detektirani polimorfni fragmenti smatrani su posljedicom mutacija u regijama nalijeganja početnica ili u promjenama restrikcijskih mjesta. Zasebno su zabilježene i pobrojane specifične i nespecifične mutacije. Specifičnim mutacijama podrazumijevaju se situacije kada se prisutnost/odsutnost fragmenta detektira kod samo jednog klona. Pod

nespecifičnim mutacijama podrazumijevaju se fragmenti koji se pojavljuju kod više od jednog klona neke sorte. Ukupni polimorfni fragmenti rezultat su zbroja nespecifičnih i specifičnih mutacija. Genetska sličnost između jedinki analiziranih sorata izračunata je korištenjem *Simple Matching* (SM) koeficijenta. Prosječna genetska udaljenost dobivena je uprosječivanjem genetskih udaljenosti svih klonova unutar jedne sorte. Na osnovu SM vrijednosti, pomoću UPGMA algoritma i NTSYS-pc programa (Rohlf, 2005.), potprogramskog paketa SAHN, provedena je klaster analiza, a skupine proizašle iz hijerarhijskog grupiranja prikazane su u obliku dendrograma.

## Rezultati i rasprava

Broj detektiranih markera po sortama prikazan je u Tablici 2. Na temelju šest kombinacija početnica detektirano je ukupno 139 fragmenta različite molekulske mase, a od toga ih je 15 bilo polimornih što u relativnom odnosu čini 10,79% polimorfizma. Wegscheider i sur. (2009) detektirali su sličan stupanj polimorfizma na dvije sorte - 8,8%, ali na temelju čak 30 kombinacija početnica, a svoje su ispitivanje također provodili na dvije sorte. Žulj Mihaljević i sur. (2015) analizirajući pet različitih sorata, na 16 kombinacija početnica, dobili su 28,89 % polimorfizma.

**Tablica 2.** Broj detektiranih markera po sortama

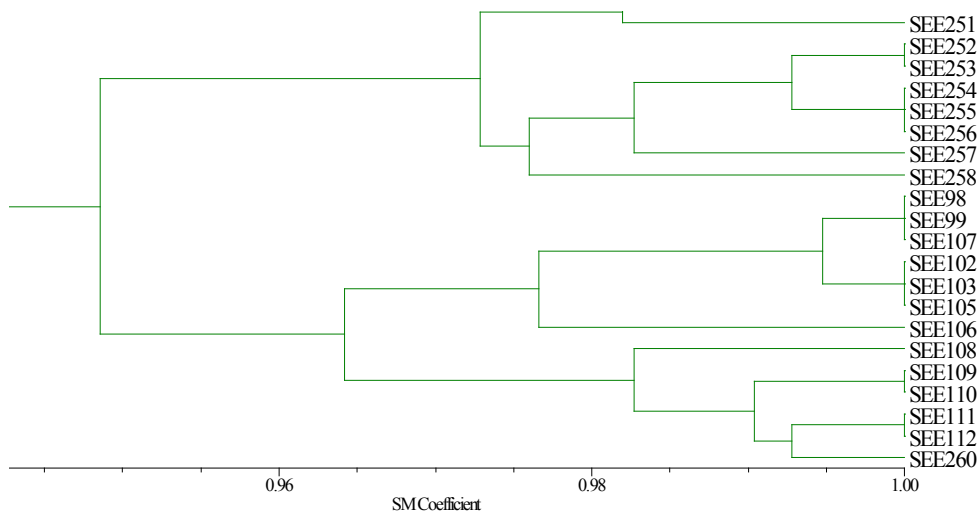
Ime sorte	Zlatarica blatska b.	Glavinuša
<b>Broj uzoraka</b>	9	13
<b>Ukupni polimorfni fragmenti</b>	8	7
<b>Nespecifične mutacije</b>	3	6
<b>Specifične mutacije</b>	5	1
<b>Ukupno detektiranih fragmenata</b>	139	133
<b>% polimornih fragmenata</b>	5,76	5,26
<b>Ukupno polimornih fragmenata</b>	15	
<b>Ukupno fragmenata</b>	139	

Međutim, s aspekta proučavanja unutar sorte varijabilnosti puno je važniji postotak polimornih fragmenata koji je za obje sorte bio sličan: 5,26% za Glavinušu i 5,76% za Zlataricu blatsku. Wegscheider i sur. (2009) u ispitivanju 5 klonova Pinot-a dobili su 4,8% polimornih markera. Šimon (2012) je u svom istraživanju klonova Plavca malog i Škrleta korištenjem 6 kombinacija početnica dobio polimorfizam od 3,06% za klonove Plavca malog, a za klonove Škrleta bijelog 2,59%. Iako su u navedenom istraživanju korišteni klonski kandidati izabrani na temelju fenotipskih, fenoloških i/ili kvalitativnih razlika, dobivena razina polimorfizma bila je manja nego u ovom istraživanju. Dakako, potrebno je naglasiti da pravilna usporedba polimorfizma između istraživanja podrazumijeva i istu kombinaciju upotrijebljenih početnica. Također, sukladno Žulj Mihaljević i sur. (2015), kod Glavinuše je uočena veća pojavnost nespecifičnih mutacija, dok je kod Zlatarice blatske detektiran veći broj specifičnih mutacija koje se pojavljuju samo kod jednog genotipa.

Pregledom pojave polimornih fragmenata po kombinacijama početnica uočeno je da je najpolimornija kombinacija bila F0100-M22 koja je zaslužna za 60% svih polimornih fragmenata (podaci nisu prikazani). U isto vrijeme kombinacija F0104-M27 i F0105-M27 nisu rezultirale niti jednim amplificiranim polimornim fragmentom. Wegscheider i sur. (2009)

također su F0100 početnicom, u kombinaciji s različitim *Mse*I početnicama, dobili najviše polimorfnih fragmenata. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s njihovim rezultatima, a sam izbor kombinacija početnica temeljen je upravo na iskustvu navedenih autora (ne kao rezultat vlastitog *primer screeninga*). Ovakve razlike u količini informacija početnica mogu biti očekivane jer F0 početnice potječu od različitih grupa biljnih retrotranspozona.

Dendrogram nam pomaže u vizualizaciji genetske sličnosti stvarajući grupe jedinki prema genetskoj sličnosti, a iz dotičnog se može uočiti (Slika 1) da je S-SAP metoda uspješno razdvojila i razlikovala obje sorte. Prosječna genetska sličnost Glavinuše iznosila je 97,52%, a Zlatarica blatska bijele 98,14%. Genetička sličnost analiziranih jedinki kretala se u rasponu od 0,919, za par jedinki SEE-99 i SEE 250, do maksimalne vrijednosti 1 koju su imale sve one jedinke koje S-SAP metoda nije mogla razlikovati.



**Slika 1.** UPGMA dendrogram temeljen na SM koeficijentu sličnosti

Sama S-SAP metoda smanjenje broja amplificiranih fragmenata postiže ciljanjem različitih grupa biljnih retrotranspozona, za razliku od metode AFLP koja ravnomjernije po genomu „pretražuje“ različitosti među jedinkama. Međutim, u ovoj su analizi korištene univerzalne početnice, a ne početnice za retrotranspozone specifične za vinovu lozu poput *Vine1LTR1* i *Vine1LTR2* (Labra i sur., 2004, Štajner i sur., 2009) gdje su navedeni autori dobili stopu polimorfizma od 10,34% i 47,95% za klonove Syrah-a odnosno 79,39% za klonove Malbec-a i uspješno su razlikovali sve analizirane klonove. Kao početni biljni materijal nisu korišteni selekcionirani i registrirani klonovi, a sam cilj istraživanja bio je donekle obrnut od sličnih radova. Naime, cilj nije bio riješiti pitanje je li klonove (koji su dokazano međusobno različiti) moguće razlikovati na genetičkom nivou S-SAP metodom, već je li na temelju S-SAP metode moguće procijeniti razinu unutar sorte varijabilnosti i pomoću nje predvidjeti potencijal uzorkovanih trsova kao klonskih kandidata u klasičnoj klonskoj selekciji tj. u kojem bi smjeru napredovala daljnja manipulacija selektiranih trsova. Navedeno se ponajprije odnosi na odluku o zadržavanju materijala koji se pokazao kao neslobodan od virusa i koji bi, u normalnim okolnostima, bio izostavljen iz daljnje propagacije.

## Zaključak

Dobiveni rezultati ukazuju na to da je korištena S-SAP metoda uspješno razlikovala obje sorte te da je detektirala i klonske razlike među analiziranim jedinkama. Univerzalna retrotranspozonska početnica F0100 pokazala je najveći stupanj varijabilnosti. Iako je razina polimorfizma dobivena kombinacijama početnica u ovom i sličnim istraživanjima bila zadovoljavajuća, umjesto univerzalnih retrotranspozonskih početnica bilo bi uputno koristiti specifične retrotranspozone poput *Vine 1*LTR jer se stupanj polimorfizma u usporedbi s ovim istraživanjem pokazao veći. Detektirana genetička divergentnost sugerira na to da analizirani uzorci nisu bili genetički homogeni pa će dobiveni rezultati nakon usporedbe s podacima o zdravstvenom statusu trsova Zlatarice blatske bijele i Glavinuše pomoći u odluci o daljnjoj propagaciji pojedinih klonova navedenih sorata.

## Literatura

- Benjak, A., Boue, S., Forneck, A., Casacuberta, M. J. (2009.) Recent amplification and impact of MITEs on the genome of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Genome. Biol. Evol.* 1:75-84.
- Biémont, C., Vieira, C. (2006). Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521–524.
- Carimi, F., Mercati, F., De Michele, R., Carola Fiore, M., Riccardi, P., Sunseri, F. (2011) Intra-varietal genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar 'Nero d'Avola' as revealed by microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58, 967-975.
- E.Z.N.A. SP Plant DNA Kit, (2012.) E.Z.N.A. SP Plant DNA Mini Kit Protocol –Dried Samples. Manual Revision: September 2012, OMEGA Bio-tek.
- Grandbastien M-A (1998.) Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science* 3(5):181–187.
- Karlson, P. (1988.) Biokemija, Školska knjiga, Zagreb
- 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.
- Maletić, E., Sefc, M. K., 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):79-8.
- Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. (2008.) Vinova loza. Školska knjiga, Zagreb
- Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I.; Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Stupić, D., Andabaka, Ž., Marković, Z., Šimon, S., Žulj Mihaljević, M., Ilijaš, I., Marković, D. 2015: Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb
- Rohlf, F.J. (2005.) NTSys-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 2.1e. Exeter Software, Setauket, NY
- Simon, S., (2012.) Detekcija unutarstortne genetske varijabilnosti kod vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Doktorski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Štajner, 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.
- Wegscheider, E., Benjak, A., Forneck, A. (2009.) Clonal Variation in Pinot noir Revealed by S-SAP Involving Universal Retrotransposon-Based Sequences. *American Journal of Enology and Viticulture* 60(1):104-109.
- Žulj Mihaljević, M., Anhalt, U.C.M., Rühl E., Tomić Mugoša, M., Maraš V., Forneck, A.; Zdunić, G., Preiner, D., Pejić, I. (2015) Cultivar Identity, Intravarietal Variation, and Health Status of Native Grapevine Varieties in Croatia and Montenegro *American Journal of Enology and Viticulture* 66(4): 531-541.

## S-SAP molecular marker-based detection of interspecific variability among grape cultivars

### Summary

*Intra-varietal variability is based on the assumption that during the time spontaneous mutations occur in the varieties genome and stay fixed because of vegetative propagation. Any kind of information about intra-varietal variability could be of importance before making a decision which vines to keep after verification of their health status and could provide an insight into homogeneity of the population and into the potential of the clonal selection. In this study a retrotransposon based marker system was used – a modified S-SAP method which, in previous studies, showed the potential for differentiating clones. Collected grapevine plant material consisted of 22 accessions representing two Croatian varieties: Zlatarica blatska bijela and Glavinuša. S-SAP method was performed using 6 different primer combinations. This method successfully differentiated both varieties and also detected some clonal differences among tested accessions. Although the analyses were not done on certified clonal material, level of polymorphism was similar to those in similar studies using certified clones. The use of universal retrotransposon primer F100 resulted in most observed polymorphism. Obtained results provide guidelines for further propagation and revitalization.*

**Keywords:** clone, intra-varietal variability, retrotransposons, molecular markers, S-SAP