

Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Ana Hranilović

Analiza polimorfizma transkripcijskih faktora vinove loze CBF1 i CBF4 povezanih s reakcijom na abiotički stres suše

Zagreb, 2013.

Ovaj rad je izrađen u sklopu studentske prakse u okviru programa Erasmus u timu DAVEM (Diversity and Adaptation of Grapevine and Mediterranean Species), UMR (Joint Research Unit) AGAP (Genetic Improvement and Adaptation of Mediterranean and Tropical Plants), INRA (French National Institute of Agriculture Research), Montpellier u koordinaciji s PhD HDR Patriceom Thisom i pod vodstvom prof.dr.sc. Ivana Pejića predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012.-2013.

Popis kratica:

CBF – *C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding factor*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*, deoksiribonukleinska kiselina

RNA – *Ribonucleic Acid*, ribonukleinska kiselina

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*, pojedinačni nukleotidni polimorfizam

INDEL – *insertions/deletions*, insercije/delecije

EST – *Expressed Sequence Tag*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*, lančana reakcija polimerazom

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

bp – *base pair*, par baza

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Vinova loza.....	1
1.1.1. Botanička pripadnost.....	1
1.1.2. Porijeklo i širenje vrste.....	1
1.1.3. Današnje stanje.....	2
1.2. Istraživanja genetike vinove loze	3
1.2.1. SNP markeri i njihova primjena u analizi gena kandidata	4
1.3. Vinova loza u uvjetima suše	5
1.3.1. Transkripcijski faktori vinove loze CBF1 i CBF4	6
2. Opći i specifični ciljevi istraživanja.....	7
3. Materijal i metode	8
3.1. Biljni materijal.....	8
3.1.1. Uzorkovanje biljnog materijala	11
3.1.2. Priprema lisnog tkiva i ekstrakcija DNA	11
3.2. Sekvence gena kandidata i dizajn početnica.....	12
3.3. Laboratorijska analiza gena kandidata	12
3.3.1. Amplifikacija lančanom reakcijom polimerazom (PCR).....	12
3.3.2. Provjera PCR amplifikacije na agaroznom gelu	13
3.3.3. Pročišćavanje PCR produkata	13
3.3.4. Sekvenciranje PCR produkata.....	13
3.4. Računalna analiza podataka.....	14
3.4.1. Obrada sekvenci u Staden Package softveru.....	14
3.4.2. Analiza polimorfizma softverom SNiPlay	14
3.4.3. Konstrukcija filogenetskog stabla	17
4. Rezultati	18
4.1. Preuzimanje sekvenci CBF1 i CBF4 iz baze podataka i amplifikacija lančanom reakcijom polimerazom	18
4.1.1. CBF1	18
4.1.2. CBF4	18
4.2. Obrada sekvenci gena CBF4	19
4.2.1. Veličina i kvaliteta dobivenih sekvenci	19

4.2.2.	Detektirani polimorfizam	21
4.2.3.	Lokalizacija i učinak polimorfizma.....	24
4.2.4.	Parametri diverziteta	26
4.2.5.	<i>Median – joining</i> (MJ) filogenetska mreža i UPGMA filogenetsko stablo.....	27
5.	Rasprava.....	30
6.	Zaključci	33
7.	Zahvale.....	34
8.	Popis literature	35
9.	Sažetak	40
10.	Summary	41

1. Uvod

1.1. Vinova loza

1.1.1. Botanička pripadnost

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) najrasprostranjenija je i gospodarski najvažnija višegodišnja voćna kultura koja se uzgaja na svim kontinentima izuzev Antarktike (Maletić i sur., 2008). Botanički se svrstava u porodicu lozica (*Vitaceae* Juss.), koja pripada redu *Rhamnales* u razredu dvosupnica (*Magnoliatae, Dicotyledonae*) i pododjeljku kritosjemenjača (*Magnoliophytina, Angiospermae*). Porodica *Vitaceae* objedinjuje 10 rodova od kojih je za vinogradarsku praksu i znanost najznačajniji rod *Vitis*. Od okvirno 60 vrsta roda *Vitis*, većina ih u većoj ili manjoj mjeri primjenu nalazi u oplemenjivačkom radu, kako za dobivanje podloga, tako i za oplemenjivanje na otpornost na biotske i abiotske stresove. U proizvodnji vina gotovo se isključivo koristi *Vitis vinifera* subsp. *sativa*, domicilna vrsta euroazijskog kontinenta, koja je domesticirana iz populacije šumske loze, *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (Levadoux 1956.), divljeg pretka uz kojeg i danas koegzistira na šumskim staništima duž Mediterana ili uz obale rijeka i jezera.

1.1.2. Porijeklo i širenje vrste

Arheološki i paleobotanički dokazi upućuju da je do primarne domestikacije vinove loze, usko vezane uz početak proizvodnje vina, došlo u periodu neolitika (6000. – 5000. p.n.e.) uz istočne obale Crnog mora na području Transkavkazja, odakle se najprije proširila dolinom Jordana, do Egipta i Mezopotamije (McGovern 2003.). Kasniju ekspanziju preuzimaju prvenstveno Grci i Rimljani, a u trenutku raspada Rimskog carstva loza se već uzgajala na gotovo svim europskim lokacijama gdje je to i danas slučaj (McGovern 2003.) Na Daleki istok vinova loza je prenesena već u 2. stoljeću nove ere, dok se s vremenom počinje širiti i u takozvane zemlje Novog svijeta; na američki kontinent već od 16. stoljeća nadalje, a

u značajnijoj mjeri nešto kasnije i u Južnoafričku Republiku, Novi Zeland i Australiju te Sjevernu Afriku (This i sur., 2006.).

Međutim, divergentnost sorti različitog geografskog porijekla sugerira na dodatnu domestikaciju unutar areala rasprostranjenosti divlje loze, kao i doprinos populacija divlje loze u kreiranju bioraznolikosti kultivirane (Mullins i sur., 1992). Razlike su najprije opažene na morfološkoj razini i mogu se sažeti klasifikacijom prema Negrulju (1936.) kojom su sorte podijeljene u osnovne tri skupine, a koja je u skladu i s najnovijim genetičkim studijama (Arroyo – Garcia i sur., 2006., Bacilieri i sur., 2013.). Skupinu *occidentalis* sačinjavaju sorte malih grozdova porijeklom iz Zapadne i Centralne Europe, *orientalis* sorte velikih grozdova istočnog Mediterana i centralne Azije, dok *pontica* objedinjuje intermedijarne fenotipove crnomorskog, panonskog i balkanskog područja

1.1.3. Današnje stanje

S obzirom na dugu povijest uzgoja i rasprostranjenost diljem svijeta, vinova loza je izrazito polimorfna vrsta. Ima značaj vodeće voćne kulture s godišnjom proizvodnjom od oko 69.6 milijuna tona (FAOSTAT2013, <http://faostat.fao.org/>). Temelj vinogradarske proizvodnje predstavljaju sorte plemenite loze, populacije nastale selekcijom od strane čovjeka koje se odlikuje nizom specifičnih bioloških i gospodarski važnih karakteristika zadržanih i nakon reprodukcije po kojima se razlikuju od drugih sorti.

Procjene o broju sorti vinove loze kreću se od 6000 – 10000 (Galet, 2000.); u proizvodnim nasadima nalazi ih se okvirno 2000, dok se gospodarski značajnim smatra svega dvjestotinjak (Maletić i sur., 2008.). Shodno tome, većina sorti egzistira isključivo u kolekcijama vinove loze (http://www.vitaceae.org/index.php/Grape_Germplasm_Resources) s ciljem očuvanja germplazme i prevencije genetičke erozije. Značaj pronalaze u kreiranju novog sortimenta i analizi nastanka postojećeg, kao i u temeljnim istraživanjima biologije i evolucije vrste kroz molekularne, genetičke, genomske i populacijske studije.

S druge strane, divlja loza jest ugrožena biljna vrsta, iščezla na mnogim prirodnim staništima prvenstveno radi osjetljivosti na filokseru i kriptogramske bolesti introducirane iz Amerike u drugoj polovici 19. stoljeća, kao i zbog smanjena prirodnog habitata (Arrigo i Arnold, 2007.). Jedinke divlje loze identificirane su diljem nekoliko europskih i

sjevernoafričkih zemalja (Arroyo – Garcia i sur., 2006.). Znanstvene aktivnosti inventarizacije nastavljaju se i na ostalim potencijalnim staništima, otežane prisutnošću feralnih oblika kultivirane loze i spontano izniklih hibrida. Daljnja istraživanja vrše se s ciljem detaljnijeg uvida u domestikaciju i evoluciju vrste. Naime, kao što je ustanovljeno kod kukuruza (Wright i sur., 2005.), usporedbom razine genetičkog diverziteta divlje i kultivirane forme moguće je odrediti regije genoma koje su prošle snažnu selekciju tijekom domestikacije te identificirati gene koje kontroliraju dotična svojstva (This i sur., 2006.). Bitno je naime napomenuti da je tijekom domestikacije vinove loze došlo je do značajnih promjena u biologiji i fiziologiji vrste. Prijelaz iz diecijske u monoecijsku formu, s pretežno hermafroditnim tipom cvijeta, povećanje grozda i bobica, kao i mogućnost nakupljanja većih količina sladora, samo su neke od razlika kultivirane loze u odnosu na divljeg pretka koje su dovele do povećane kvalitete grožđa kao sirovine za proizvodnju vina, u vidu osiguravanja stabilnijih i većih prinosa i bolje fermentacije (This i sur., 2006.).

1.2. Istraživanja genetike vinove loze

Zbog kulturološkog i gospodarskog značaja vrste, genetička istraživanja vinove loze posljednjih su desetljeća značajno uznapredovala. *Vitis vinifera* L. je diploidna vrsta s 19 parova kromosoma ($2n=38$) relativno malog genoma (475 – 500 Mb), približno četiri puta većeg od uročnjaka, *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000.) i podjednake u odnosu na rižu, *Oryza sativa* (Yu i sur., 2002.) i topolu, *Populus trichocarpa* (Tuscan i sur., 2006.). Nakon navedenih vrsta ovo je četvrta angiosperma sekvenciranog genoma, druga stablašica, no ujedno i prva kultivirana voćna vrsta, a zbog svega navedenog često se ističe potencijal vinove loze kao model organizma drvenastih voćnih kultura.

Genomi dvaju genotipova vinove loze u potpunosti su sekvencirani; 2007. godine talijansko – francuski konzorcij¹ dovršava sekvencu gotovo homozigotnog genotipa PN40024, dobivenog kroz nekoliko sukcesivnih ciklusa samooplodnje kultivara Pinot noir radi olakšavanja sekvenciranja (Jaillon i sur., 2007.). Nedugo zatim, Velasco i sur. (2007.)

¹ The French–Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization

objavljaju sekvencu genoma heterozigotnog klonu Pinot noir ENTAV 115, što je omogućilo primarni uvid u polimorfizam na razini čitavog genoma komparacijom s referentnom PN40024 sekvencom.

Ove spoznaje ubrzale su genetička istraživanja vrste i pred brojnim DNA markerima u širokoj primjeni primat dale SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) markerima.

1.2.1. SNP markeri i njihova primjena u analizi gena kandidata

Pojedinačni nukleotidni polimorfizam (SNP) podrazumijeva varijaciju u DNA sekvenci, pri kojoj je jedna nukleotidna baza zamijenjena drugom bazom. Uz insercije i delecije (INDEL; *insertions/deletions*) SNP-i predstavljaju najučestaliji oblik polimorfizma DNA sekvence (Rafalski, 2002.). Kodominantni genetički SNP markeri primjenu nalaze za različite svrhe: identifikaciju kultivara, konstrukciju genetskih mapa, procjenu genetske raznolikosti, detekciju povezanosti genotipa s fenotipom kao i selekciju potpomognutu markerima (*Marker assisted selection*, MAS) (Martínez-Zapater i sur., 2010.). Genotipiziranje je omogućeno korištenjem seta od 48 odabranih SNP-a, informativnih u podjednakoj razini kao 15 mikrosatelitskih lokusa (Ljavetzky i sur., 2007.). Koriste se i u analizi i kvantifikaciji neravnoteže vezanosti (*linkage disequilibrium*) (Ljavetzky i sur., 2007., Le Cunff i sur., 2008.).

Identifikacija gena u genomu vinove loze, najprije temeljena na EST informacijama (*expressed sequence tag*), a kasnije na sekvenci genoma, uz progresivnu validaciju njihove biološke funkcije, omogućila je analizu gena kandidata (*candidate genes*). Ovo je metoda genetske asocijacijske studije (*association study*) pri kojoj se ispituje povezanost varijacije odabranog gena poznate funkcije s postojećom fenotipskom varijabilnošću (Zhu i Zhao, 2007.). Suprotno tome, cjelogenomskom asocijacijskom studijom (*genome wide association*, GWA) zajednička genetička varijacija fenotipskih varijanti detektira se diljem čitavog genoma (Atwell i sur., 2010.).

Resekvenciranje gena kandidata i analiza polimorfizma dovela je do značajnih spoznaja o genetičkoj regulaciji pojedinih obilježja, odnosno o njihovoj evoluciji i selekciji

unutar vrste. Emanuelli i sur. (2010.) istražili su varijacije u genu VvDXS (povezanom s muškatnom aromom bobice) kod muškatnih, aromatičnih i neutralnih sorti te dokazali tri SNP-a svojstvena isključivo za sorte muškatne arome. Fournier-Level i sur. (2010.) rasvijetlili su vezu Myb gena (zaslužni za pigment bobice) i varijacije kod sorti različite boje kože.

1.3. Vinova loza u uvjetima suše

Vinova loza je voćna kultura koja se generalno odlikuje relativno visokom otpornošću na sušu. Štoviše, dokazano je da nedostatak vode u određenim fenološkim fazama može povoljno utjecati na polifenolni sastav bobica (Roby i sur., 2004.) i senzorna svojstva vina (Chapman i sur., 2005.), kao posljedicama suprimiranog vegetativnog rasta i smanjene veličine bobice, što dovodi koncentraciji poželjnih tvari. Ipak, suša može ugroziti proizvodnju grožđa, ali i promijeniti dosadašnji uzgojni areal loze, napose u semiaridnim regijama kao što je mediteranska, gdje se u kontekstu klimatskih promjena predviđa dodatno smanjenje oborina uz povećanje temperatura (IPCC, <http://www.ipcc.ch/>). Problemu manjka vode može se doskočiti navodnjavanjem, što dugoročno gledano uzrokuje zaslanjivanje tla (Flowers i Yeo, 1995.), koje uz sušu također predstavlja značajni vid osmotskog stresa biljke.

Brojna istraživanja provedena su u svrhu rasvijetljavanja genetičke osnove fizioloških i biokemijskih odgovora biljke u uvjetima suše. Otpornost na sušu je kompleksno svojstvo kontrolirano velikim brojem lokusa, a kod vinove je loze detektirano više od 2000 gena, brojnost čijih se transkripta mijenja uslijed sušnih uvjeta (Cramer i sur., 2007., Cramer, 2010.).

Načelno sagledavano, centralnu regulatornu ulogu u biljci tijekom vodnog stresa ima fitohormon ABA (*abscisic acid*, abscizinska kiselina). Pod utjecajem ove signalne molekule dolazi do smanjenja transpiracije zatvaranjem puči, a time i intenziteta fotosinteze (Davies i Zhang, 1991). Pojačana sinteza RuBisCo aktivaze, aktivatora fotosinteze, jedan je od najranijih odgovora biljke na stres u svrhu kompenzacije za zatvorene puči učinkovitijim iskorištenjem molekule CO₂ (Cramer i sur., 2007.). Na molekularnoj razini, ABA regulira transkripciju gena, sintezu proteina, transport iona i određenih organskih molekula te sintezu važnih agensa koji sprječavaju dehidraciju i fotoinhibiciju (Yang i sur., 2006., Seki i sur.,

2007.). U vinovoj lozi do sada je identificiran velik broj gena čiju ekspresiju uslijed osmotskog stresa inducira ABA, kao i receptori na koje se molekula veže prethodno njihovoj aktivaciji (Boneh i sur., 2012.). Nadalje, tijekom nedostatka vode smanjena je brojnost transkripata gotovo svih gena vezanih za sintezu proteina (Cramer, 2010.), što je u skladu sa reduciranim vegetativnim rastom biljke. Dolazi do pojačanog nakupljanja različitih osmolita kao što su prolin, glukoza i malat, koji održavaju turgor biljke i omogućavaju normalan metabolizam, uz zaštitu od oksidativnog stresa uzrokovanog reaktivnim oblicima kisika, tzv. ROS (Cramer i sur., 2007.). Od nedavno, i kod vinove loze istražuje se funkcija kratkih molekula RNA (microRNA, miRNA) u povećanju otpornosti na abiotički stres, uključujući sušu (Li i sur., 2008., Mica i sur., 2009.). Reakcija biljke na stres često počinje aktivacijom određenih gena transkripcijskim faktorima, proteinima koji vezanjem na specifičnu DNA sekvencu kontroliraju transkripciju DNA u mRNA, ovisno ili neovisno o molekuli ABA (Wang i sur., 2003.). Povećanje broja transkripata regulatora iz porodice CBF/BREB, NAC, Myb, ERF i drugih dokazano je i kod vinove loze (Cramer i sur., 2007.).

1.3.1. Transkripcijski faktori vinove loze CBF1 i CBF4

Transkripcijski faktori iz porodice CBF/DREB (*C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding factor*) otkriveni su u vrsti *Arabidopsis thaliana*, s funkcijom stimulacije transkripcije gena na kojih se vežu uslijed niskih temperatura i vodnog stresa (Stockinger i sur., 1997.). Promotori gena koje aktiviraju sadrže očuvani motiv CCGAC unutar elementa CRT (*C-repeat*: TGGCCGAC) ili DRE (*dehydration-responsive element*: TACCGACAT) (Stockinger i sur., 1997., Liu i sur., 1998.). Aktiviraju velik broj gena koji uzrokuju biokemijske i fiziološke promjene kao što su povećanje udjela topivih proteina, promjene lipidnih membrana i akumulacija osmoregulacijskih molekula (Wang i sur., 2003.).

S vremenom je potvrđena njihova prisutnost u svim do sada istraživanim višim biljkama i ekspresija potaknuta hladnoćom, salinitetom ili sušom kao vidovima osmotskog stresa (Xiao i sur., 2008.).

U vinovoj su lozi identificirana četiri CBF/DREB transkripcijska faktora, a međusobno se razlikuju u tkivu za koje su specifični i vremenu aktivacije uslijed stresa (Xiao

i sur., 2006., Xiao i sur., 2008.). Nadalje, ustanovljeno je da su transgene biljke uročnjaka (*A. thaliana*) s ugrađenim *Vitis* CBF1 i CBF4 genima pokazale povećanu otpornost na niske temperature i na vodni stres, s time da je CBF1 uvjetovao veću otpornost na sušu u odnosu na CBF4, a CBF4 veću otpornost na hladnoću u odnosu na CBF1 (Siddiqua i Nassuth, 2011.) Povećan broj njihovih transkripta potvrđen je u biljci vinove loze u uvjetima suše kroz nekoliko istraživanja (Xiao i sur., 2006., Cramer i sur., 2007.).

2. Opći i specifični ciljevi istraživanja

Na temelju literaturnih navoda, transkripcijski faktori vinove loze CBF1 i CBF4 odabrani su kao geni kandidati zbog povezanosti s reakcijom na abiotički stres u vidu hladnoće, saliniteta i suše (Xiao i sur., 2006., Cramer i sur., 2007., Siddiqua i Nassuth, 2011.). Za resequenciranje navedenih gena odabrano je 96 uzoraka vinove loze. Uključeni su predstavnici divlje i kultivirane loze, a sorte kultivirane loze podijeljene su u tri poduzorka odabrana obzirom na otpornost na sušu. Cilj je bio analizirati polimorfizam istraživane regije detekcijom SNP-a i INDEL-a te utvrditi je li odabrana regija zahvaćena selekcijom koja bi mogla biti povezana s boljom adaptacijom biljke na uvjete stresa. U svrhu toga, usporediti će se parametri diverziteta divlje i kultivirane podvrste, kao i dvije skupine sorata vinove loze s najvećom otpornošću na sušu.

3. Materijal i metode

3.1. Biljni materijal

Sorte i predstavnici divljih populacija vinove loze korišteni u ovome istraživanju održavani su u kolekciji germplazme vinove loze i njenih srodnika „Domaine de Vassal” (34340 Marseillan Plage, Francuska). Analizirano je 15 genotipova divlje loze, *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*, vegetativnih potomstva jedinki loza, porijeklom iz 10 zemalja (Tablica 1.) i 81 genotip kultivirane loze, *Vitis vinifera* subsp. *sativa* (Tablica 2.). Prema podacima o primkama kolekcije (http://bioweb.ensam.inra.fr/collections_vigne/), uvrštene sorte vinove loze potječu iz 27 zemalja, a s obzirom na otpornost prema suši podijeljene su u 3 skupine na temelju višegodišnjih ampelografskih istraživanja. Sorte najotpornije na sušu svrstane su u skupinu suša_1, srednje otporne u skupinu suša_2, dok su najmanje otporne u skupini suša_3 (Boursiquot, osobna komunikacija).

Tablica 1. Analizirani genotipovi divlje loze (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*).

Kod	Ime	Zemlja porijekla
LAMBH	Lambrusque Béni Hassan S9 Ind 4	Maroko
LAMS1	Lambrusque Sejnene 1	Tunis
LAMG2	Lambrusque Grésigne 2	Francuska
LAMB31	Lambrusque Bidassoa 31	Francuska
VSTPS	Teulere pied sauvage	Francuska
VSMAN26	Vitis silvestris Mandeuire 26	Francuska
LAMPSL	Lambrusque PSL 13	Francuska
VSCB	Croix Blanchard	Francuska
VSS3	Vigne sauvage suisse 3	Švicarska
VSMON2	V. silvestris Montagnella 2	Italija
LAMUNZ	Lambrusque Ul'any nad Zitavou A55	Slovačka
VSSE	Vitis sylvestris SE 2-7 Sevilla femelle	Španjolska
VSPAU	Vigne de Pausanias	Grčka
VSPRT	V. sylvestris Portugal 110304 (3) male	Portugal
VSR5	Sylvestris du Ruisseau des Singes - Blida	Alžir

Tablica 2. Analizirane sorte kultivirane loze (*Vitis vinifera* subsp. *sativa*) uvrštene u tri skupine ovisno o reakciji otpornosti na sušu. Prema namjeni kultivacije, dijele se na vinske (V), stolne (S) i dvonamjenske (VS).

Otpornost na Sušu	Kod	Sorta	Zemlja porijekla	Namjena kultivacije
suša_1	TOR	Torrontès riojano	Argentina	V
	QUEB	Quebranta	Peru	V
	NMOL	Negra mole	Portugal	V
	MIS	Mission	Španjolska	V
	AIR	Airén	Španjolska	VS
	PXIM	Pedro Ximenez	Španjolska	V
	ZAL	Zalema	Španjolska	V
	BOB	Bobal	Španjolska	V
	TAF	Taferielt	Maroko	VS
	BAO	Bezoul el Aouda	Maroko	S
	ABA	Ahmeur bou Ahmeur	Alžir	S
	MAY	Mayorquin	Alžir	VS
	NAV	Nave	Tunis	V
	TUR	Turki	Tunis	S
	PLDR	Plant droit	Francuska	VS
	LST	Listan	Francuska	VS
	TERB	Terret blanc	Francuska	V
	CIN	Cinsaut	Francuska	VS
	GRE	Grenache	Francuska	V
	AGL	Aglanico	Italija	V
	MTPUL	Montepulciano	Italija	V
	NEG	Negro amaro	Italija	V
	PM	Plavac Mali	Hrvatska	V
	MAV	Mavrodaphni	Grčka	V
	CN	Corinthe noir	Grčka	S
	SVT	Savvatiano	Grčka	V
	MDR	Mandilaria	Grčka	V
	KTS	Kotsiphali	Grčka	V
	MALX	Muscat d'Alexandrie	Grčka	VS
	KYP	Kypreiko	Grčka	V
	KS	Kalecik siyahi	Turska	V
	OKUZ	Öküzgözü	Turska	S
	NAR	Narince	Turska	V
	CHB	Chaouch blanc	Turska	S
	CHICH	Chirvan chakhi	Azerbajdžan	V
	SATB	Sateni bely	Armenija	V
	AK	Assouad karech	Libanon	V
	MAR	Marawi	Izrael	VS
	AHD	Ahmar Derani	Sirija	S
	YUMB	Yumalak belyi	Uzbekistan	VS
TUTI	Tuia-tiche	Uzbekistan	S	
SOK	Sourkhak kitabsky	Tadžikistan	S	
SAH	Sahebi	Afganistan	S	
AKAL	A Kalatchel	Iran	VS	
RAZ	Raziki	Jemen	V	

suša_2	SYR	Syrah	Francuska	V
	UGNB	Ugni blanc	Francuska	VS
	GOB	Gouais blanc	Francuska	V
	SUL	Sultanina	Grčka	S
	RUZ	Ruževina	Hrvatska	VS
	GRK	Grk	Hrvatska	V
	VUG	Vugava	Hrvatska	VS
	ZIL	Žilavka	BIH	V
	RKT	Rkatsiteli	Gruzija	V
	ANSH	Anab-e-Shabi	Indija	S
	PPUT	Pinger putao	Kina	S
suša_3	ALV	Alvarinho	Portugal	V
	LOU	Loureiro	Portugal	V
	VINH	Vinhão	Portugal	V
	AZL	Azal	Portugal	V
	TREIX	Treixadura	Španjolska	V
	PTMN	Petit Manseng	Francuska	V
	SAVB	Savagnin blanc	Francuska	V
	GAM	Gamay	Francuska	V
	PTVR	Petit Verdot	Francuska	V
	TAN	Tannat	Francuska	V
	MER	Merlot	Francuska	V
	MOUR	Mourvèdre	Francuska	V
	MAN	Mancin	Francuska	V
	COU	Courbu	Francuska	V
	PRTB	Portugais bleu	Francuska	VS
	MOL	Molette	Francuska	V
	POU	Poulsard	Francuska	V
	CHA	Chasselas	Francuska	VS
	PN	Pinot noir 40024	Francuska	V
	LSOR	Lambrusco di Sorbara	Italija	V
	NEB	Nebbiolo	Italija	V
	LMAES	Lambrusco Maestri	Italija	V
PRO	Prosecco	Italija	V	
GRI	Grignolino	Italija	V	
ARV	Arvine	Švicarska	V	

3.1.1. Uzorkovanje biljnog materijala

Uzorkovanje je provedeno u „Domaine de Vassal” 3.svibnja 2012, u tijeku rane faze vegetacije. Stariji listovi vinove loze obiluju sekundarnim metabolitima (polifenolima i polisaharidima), koji otežavaju ekstrakciju DNA i inhibiraju PCR reakciju i, u odnosu na mlade, sadrže manji broj stanica po jedinici mase. Kako bi se ekstrahirala DNA zadovoljavajuće kvalitete i kvantitete, uzorkovani su najmlađi potpuno razvijeni listovi. Lisni isječki približnog promjera 15 mm sakupljeni su u stalak s 96 mikrotubica označenih odgovarajućim kodom navedenim u Tablicama 1 i 2.

3.1.2. Priprema lisnog tkiva i ekstrakcija DNA

Biljni materijal podvrgnut je liofilizaciji u trajanju od 24 sata pri podtlaku od 0.370 mbar na temperaturi od -55°C. Po dodatku jedne metalne kuglice promjera 3 mm u svaku mikrotubicu, suho tkivo je fino usitnjeno pomoću uređaja (Qiagen Mixer Mill MM 300, Qiagen, Hilden, Germany) pravocrtnim tresenjem stalka tijekom 2 minute na frekvenciji od 20 Hz.

Ekstrakcija DNA provedena je pomoću komercijalno dostupnog *Qiagen DNeasy 96 Plant Kit*-a (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputama proizvođača. Ovaj kit omogućuje simultanu ekstrakciju 96 uzoraka biljne DNA na principu vezanja DNA na silikatne *DNeasy* membrane. Tijekom protokola najprije dolazi do lize fino usitnjenog biljnog materijala dodatkom lizirajućeg pufera te usitnjavanja molekula RNA djelovanjem RNaze. Proteini i polisaharidi se potom talože, a dobiveni precipitat i stanični ostatci odstranjuju centrifugiranjem. Filtriranoj frakciji dodaje se pufer koji sadrži etanol i omogućuje vezanje DNA na membranu *Dneasy*, dok se preostali kontaminati uklanjaju puferom za pročišćavanje. U finalnom koraku, pročišćena DNA vezana za membranu otapa se puferom niske koncentracije soli u kojem se ujedno i pohranjuje.

3.2. Sekvence gena kandidata i dizajn početnica

Sekvence transkripcijskih faktora VvCBF1 (AY390372) i VvCBF4 (DQ497624) preuzete su iz GenBank baze podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) i locirane na genomu vinove loze (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>). Primer3 on-line softver (<http://simgene.com/Primer3>) korišten je uz standardne postavke za dizajn početnica, kako bi se omogućila amplifikacija ciljanih gena s okolnim regijama od okvirno 100 parova baza na 5' i 3' kraju. Specifičnost početnica unutar genoma vinove loze provjerena je BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) programom, koji služi za usporedbu određenih sekvenci (http://www.genoscope.cns.fr/cgi-bin/blast_server/projet_ML/blast.pl). Pozicije gena na genomu vinove loze i nukleotidni slijed dizajniranih početnica prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Pozicija istraživanih gena kandidata na genomu vinove loze i početnice dizajnirane u svrhu njihove PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifikacije

Gen	Pozicija na genomu	„Forward primer”	„Reverse primer”
CBF1	chr6: 19216516..19217622	agggttcaatccttacttcattct	caaaaagggttcactcagc
CBF4	chr16: 15813713..15814830	ggcctctaaaggcatttg	ttccaagcgggtgattaagg

3.3. Laboratorijska analiza gena kandidata

3.3.1. Amplifikacija lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

CBF1 i CBF4 geni amplificirani su PCR-om sa specifičnim početnicama izvedenim u ukupnom volumenu od 25 μ L sadržavajući 20 ng DNA, 1U Taq polimeraze (Qiagen, Hilden), 0.2 mM dNTP-a, 10 pmol *forward* i *reverse* početnica i 1.25 mM MgCl₂ u 1X PCR puferu (Qiagen, Hilden).

Nakon početne denaturacije u trajanju od 2 min pri 95°C, slijedi 35 ciklusa izmjenične denaturacije (1 min pri 94°C), nalijeganja početnica (1 min pri 58°C) i elongacije (2 min pri

72°C) te finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 6 minuta u uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Perkin- Elmer, Norwalk, CT, USA).

3.3.2. Provjera PCR amplifikacije na agaroznom gelu

Amplifikacija je provjerena elektroforezom na 1.5%-tnom agaroznom gelu u TAE puferu pripremljenog otapanjem 6g agaroze u 400 mL pufera. Kao standard veličine korišten je 1kb O'GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific, USA). Nakon elektroforeze pod naponom od 100 V u trajanju od 2 sata, bojanje je vršeno u kupki etidium bromida (1µg/mL) tijekom 30 minuta. PCR produkti promatrani su i fotografirani pod ultraljubičastom svjetlošću transiluminatora (Bio-Rad).

3.3.3. Pročišćavanje PCR produkata

Pročišćavanje je provedeno koristeći komercijalni preparat *Agencourt AMPure* (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) prema protokolu proizvođača. *Agencourt AMPure* sadrži magnetske kuglice (*magnetic bead*) koje vežu PCR produkte veće od 100 parova baza i omogućuju eliminaciju kontaminanata kao što su soli, neintegrirani nukleotidi, višak početnica i enzima.

3.3.4. Sekvenciranje PCR produkata

Za određivanje slijeda nukleotida gena kandidata korištena je Sangerova „dideoksi” metodom. Pročišćeni PCR produkti amplificirani su pomoću *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit*-a (Applied Biosystems, Foster City, USA). U reakciji sekvenciranja koristi se samo jedna početnica (*forward* ili *reverse*), a ukoliko se koriste dvije reakcije, svaka s pojednom *forward* i *reverse* početnicom, tada se povećava ukupna veličina sekvenciranog fragmenta. U volumenu od 10 µL, kao kalup je dodano 5 µL PCR produkata, 3.2 pmol pojedine početnice i komponente iz kita: 2X pufer i *BigDye* miks koji sadržava Taq polimerazu, dNTP i fluorescentne ddNTP.

Specifičan program amplifikacije izvršen u uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) započinje denaturacijom na 92°C tijekom 5 minuta. Narednih 60 ciklusa izmjenjuju se denaturacija pri 92°C tijekom 30 sekundi i nalijeganje početnice pri 56°C tijekom 20 sekundi. Elongacija traje 4 minute i 30 sekundi na 72°C.

Produkti amplifikacije pročišćeni su principom vezanja na magnetske kuglice u otopini *Agencourt CleanSEQ* (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) prema standardnom protokolu. Elektroforeza je izvršena u 16-kapilarnom sekvenceru ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.4. Računalna analiza podataka

3.4.1. Obrada sekvenci u *Staden Package* softveru

Dobivene sekvence obrađene su koristeći softver *Staden Package 2.0.0b7* (Staden, 2000.), program koji omogućuje združivanje (*assembling*) i analizu DNA sekvenci. Korištena su dva alata ovog programa: *pregap4* – grafičko sučelje u kojem je izvršena priprema podataka te *gap4*. U potonjem je nakon poravnavanja sekvenci izvršena validacija očitavanja u svrhu korekcije ili potvrđivanja potencijalnog polimorfizma u sekvencama (SNP i INDEL). Najučestalija baza na određenoj poziciji prikazana je kao „consensus”, uz vizualno označene nukleotide koji se razlikuju od konsenzusa, insercije i delecije te heterozigotne pozicije. Heterozigoti su karakterizirani prisustvom dvaju šiljaka (*peak*) na jednoj poziciji, približno upola manjeg u odnosu na isti šiljak homozigota.

Nakon provjere sekvenci, kreiran je izlazni dokument u .txt formatu (DUMP opcija), pogodan za daljnje statističke analize.

3.4.2. Analiza polimorfizma softverom *SNiPlay*

Statistička analiza izvršena je on-line softverom *SNiPlay* (Dereeper i sur., 2011.), koji objedinjuje nekoliko programa i algoritama za analizu SNP-a.

3.4.2.1. Lokalizacija i osnovna karakterizacija polimorfizma transkripcijskog faktora vinove loze CBF4

Amplificirani fragment najprije je lokaliziran na genomu vinove loze uz pomoć BLAST-a. Kako bi se karakterizirao polimorfizam, sagledana je karakterizacija i osnovna statistika za svaki pojedini polimorfizam. Ispitane su frekvencije polimorfizama i udio pojedinih genetičkih varijanti. Nakon toga je određivanjem pozicije na genomu i varijacije polimorfnog mjesta te usporedbom s referentnim genomom vinove loze procijenjen učinak pojedinog SNP-a ili INDEL-a, kao i eventualne promjene koje oni izazivaju.

3.4.2.2. Određivanje parametara diverziteta

Parametri diverziteta (*EggLib* program) utvrđeni su zasebno za *Vitis vinifera* subsp. *sativa* i *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*, što je omogućilo komparaciju dviju podvrsta. Za *Vitis vinifera* subsp. *sativa* analizirane su i uspoređene dvije skupine sorata: najotpornijih na sušu (suša_1) i najmanje otpornih na sušu (suša_3), uz izostavljanje intermedijarnog fenotipa (suša_2). Korišteni su sljedeći parametri diverziteta:

a) Nukleotidni diverzitet, π (*nucleotide diversity*)

Nukleotidni diverzitet (Nei i Li, 1979.) je mjera stupnja polimorfizma unutar populacije, definirana kao prosječan broj nukleotidnih razlika dviju DNA sekvenci nasumično odabranih iz uzorka.

Izražen je formulom:

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij} = 2 * \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{i-1} x_i x_j \pi_{ij}$$

pri čemu su x_i i x_j frekvencije sekvence i odnosno j ; π_{ij} broj nukleotidnih razlika na danoj poziciji sekvence i i j ; n broj sekvenci.

b) Theta Watterson estimator (θ)

Theta Watterson estimator (Watterson, 1975.) u populacijskoj genetici služi za procjenu stope mutacija u populaciji. Drugim riječima, Theta Watterson predstavlja omjer opaženog nukleotidnog polimorfizma u odnosu na veličinu uzorka:

$$\hat{\theta}_w = \frac{K}{a_n}, \quad a_n = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$$

gdje su K broj segregirajućih mjesta (SNP i INDEL), a n broj uzorka

a) Tajimin D (*Tajima's D*)

Tajimin D (Tajima, 1989.) je statistički test kojim je moguće ispitati neutralnost mutacija, odnosno razlikovati sekvence DNA koje su nastale spontano (neutralne mutacije) od sekvenci nastalih uslijed selekcije. Temeljna na parametrima π i θ , D vrijednost može biti negativna, približno jednaka ili jednaka nuli te pozitivna. Pozitivna ili negativna D vrijednost ukazuju na odstupanje od neutralnog modela, odnosno prisutnost svojevrsne selekcije. D vrijednost je negativna u slučaju suviška polimorfizma ili visoke ili niske frekvencije te nedostatka polimorfizma srednje frekvencije. Navedeno može biti uzrokovano negativnom selekcijom (*purifying selection* – selektivno uklanjanje štetnih alela) ili porastom veličine populacije. Pozitivna D vrijednost znak je manjka polimorfizma niske i visoke frekvencije, uslijed ravnotežne selekcije (*balancing selection* – aktivno održavanje genetičke varijacije u populacijama) ili smanjenja populacije, vezana i uz učinak uskog grla (*bottleneck effect*).

b) Fiksacijski indeks F_{ST} (Hudson)

Fiksacijski indeks F_{ST} (Hudson i sur., 1992.) je mjera stupnja genetičke diferencijacije populacije, dobivena komparacijom genetičke varijabilnosti unutar i između populacija. F_{ST} vrijednost varira između 0 i 1, pri čemu 0 implicira potpunu panmiksiju (sve jedinke pripadaju istoj populaciji), dok 1 sugerira da je varijacija posljedica genetske strukture same populacije, pri čemu dvije populacije ne dijele diverzitet (potpuno su diferencirane).

Izračunava se prema formuli:

$$F_{ST} = 1 - H_w \div H_b$$

pri čemu je H_w prosječni broj razlika između sekvenci unutar iste populacije, a H_b prosječan broj razlika između sekvenci dviju različitih populacija.

3.4.2.3. Konstrukcija *Median – joining* (MJ) filogenetske mreže

SNiPlay omogućuje analizu i određivanje haplotipova, točno određenih slijedova sekvenci u vidu SNP varijacije. Integriranim algoritmima najprije su rekonstruirani haplotipovi (*Gevalt* program), a potom je izrađena filogenetska mreža (*Haplophyle* program) *Median – joining* (Bandelt i sur., 1999.) za skupinu sorata *Vitis vinifera* subsp. *sativa* koje su najotpornije na sušu.

3.4.3. Konstrukcija filogenetskog stabla

Filogenetsko stablo izrađeno je u programu NTSYS v 2.1s (Rohlf, 2000.) na temelju binarne matrice izvedene iz osnovnih molekularnih podataka, tj. SNP profila sorata. Diceov koeficijent (Dice, 1945., Nei i Li, 1979.) korišten je za izračun genetske udaljenosti, a algoritam UPMGA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) za klaster analizu.

4. Rezultati

4.1. Preuzimanje sekvenci CBF1 i CBF4 iz baze podataka i amplifikacija lančanom reakcijom polimerazom

Nakon preuzimanja sekvenci transkripcijskih faktora CBF1 i CBF4 iz baze podataka utvrđeno je sljedeće. CBF1 je smješten na 6. kromosomu (chr6:19216516..19217622), veličine je 1107 bp (*base pairs*; parovi baza), sastoji se 3 egzona (473, 183 i 142 bp) te 2 introna (99 i 210 bp), s transkriptom duljine 798 bp. CBF4 (chr16:15813713..15814830) se nalazi na 16. kromosomu, veličine 1118 bp, s 4 egzona (254, 16, 166, 101 bp) i 3 introna (149, 58, 374 bp), transkripta dugačkog 537 bp. Provjerom dostupnih informacija o EST-ima (*expressed sequence tag*) ustanovljeno je da su transkripti obaju gena detektirani prilikom reakcije vinove loze na abiotski stres.

Nakon što je BLAST-om utvrđeno da su dizajnirane početnice specifične, odnosno da se vežu na samo jedno mjesto unutar genoma, provedena je PCR amplifikacija na 96 uzoraka loze (Tablice 2.).

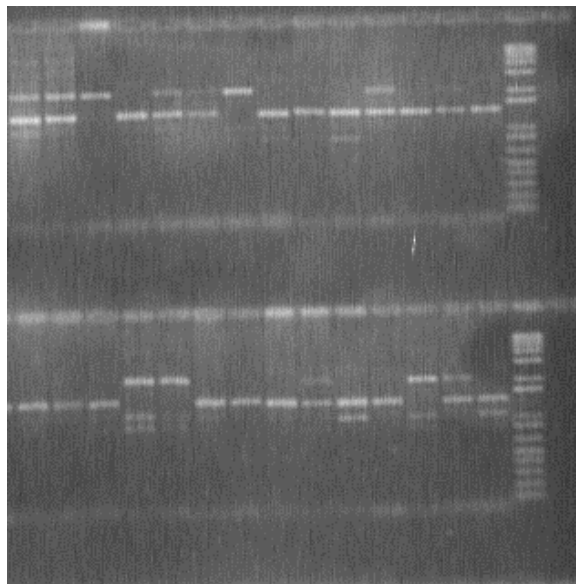
4.1.1. CBF1

Amplifikacijom CBF1 transkripcijskog faktora došlo je do umnažanja više od jednog fragmenta DNA kod 45.8% uzoraka, što je vidljivo na agaroznom gelu (Slika1.) kroz pojavnost više od jedne crtice (*band*). Pošto je to bio slučaj i nakon pokušaja optimizacije uvjeta PCR reakcije (viša temperatura nalijeganja, manja količina DNA), CBF1 je isključen iz daljnjeg eksperimenta.

4.1.2. CBF4

CBF4 transkripcijski faktor uspješno je amplificiran kod ukupno 94 od početnih 96 uzoraka (97.91%), što je ustanovljeno provjerom na agaroznom gelu. Reakcija nije uspjela za

uzorke SAH i BOB. Na gelu je također potvrđena odgovarajuća veličina produkta amplifikacije komparacijom sa standardom veličine (*DNA ladder*). Stoga se pristupilo daljnjim fazama eksperimenta.

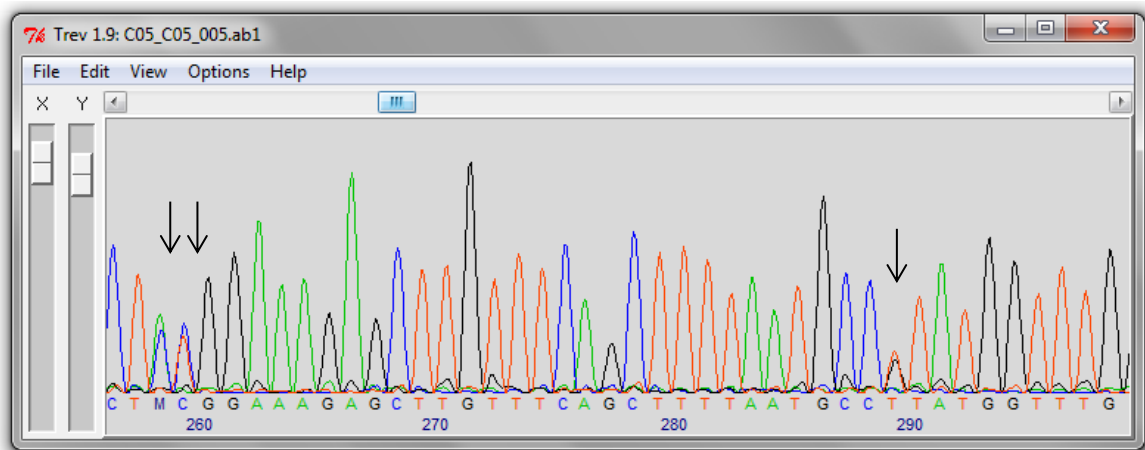


Slika 1. Dio agaroznog gela na kojemu je provjerena amplifikacija CBF1, koja je rezultirala više no jednim umnoženim produktom u 45.83% uzoraka.

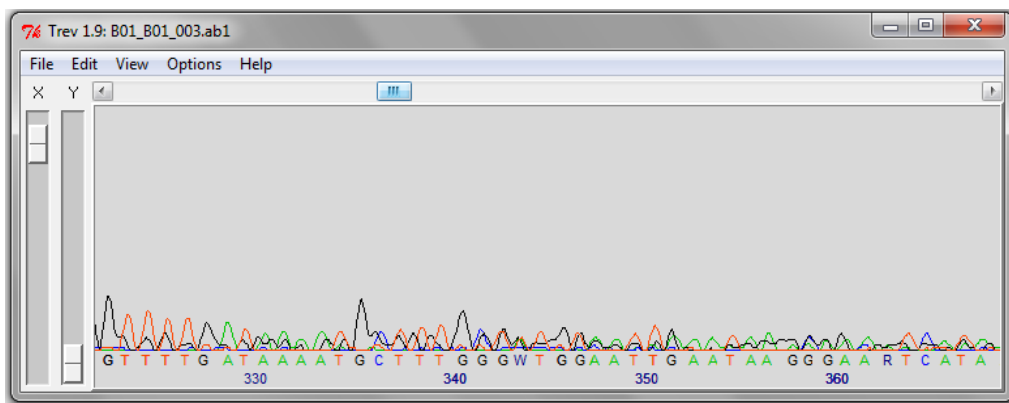
4.2. Obrada sekvenci gena CBF4

4.2.1. Veličina i kvaliteta dobivenih sekvenci

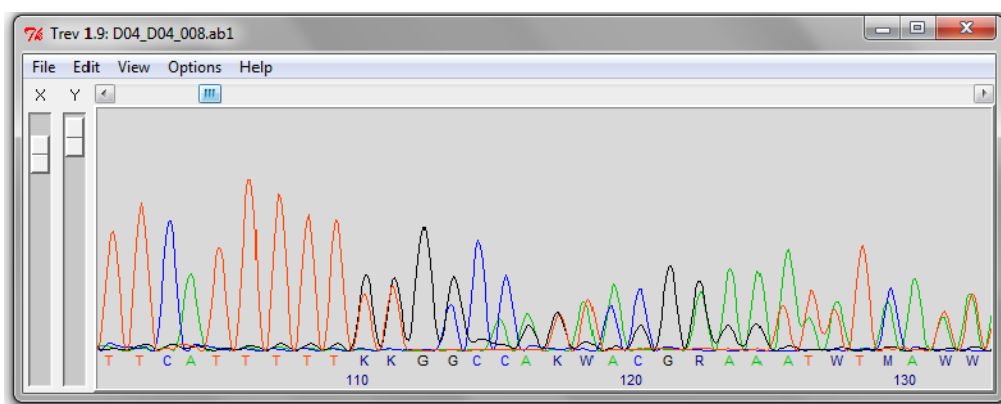
Dobivenih 94 sekvenci uvelike su varirale veličinom: nakon spajanja *forward* i *reverse* segmenta i uređivanja u programu *Staden package* najkraća sekvenca bila je veličine 536 bp (uzorak AHD), a najveća 1275 bp (uzorak RAZ). Čitljivi dijelovi sekvenci uspješno su provjereni i po potrebi ispravljeni (Slika 2.). Očitavanje sekvenci prekinulo bi se u slučaju nedostatne kvalitete (Slika 3.) ili dviju preklapajućih sekvenci (Slika 4.).



Slika 2. Fragment sekvence; svaki nukleotid je označen zasebnom bojom. Heterozigotni SNP vidljivi su na poziciji 258 (M), 259 (C) i 289 (K). Potonji polimorfizam nije detektiran od strane računala; iako su dva šiljka različitih boja na istoj poziciji jasno vidljiva, očitana je baza T.



Slika 3. Nedostatna kvaliteta sekvence onemogućuje očitavanje dalje od okvirno 330. bp-a.



Slika 4. Dvostruka sekvenca započinje na poziciji 110, nakon čega se nastavlja do kraja sekvenciranog fragmenta, što onemogućuje njeno očitavanje.

4.2.2. Detektirani polimorfizam

U sekvenciranim fragmentima 94 uzorka detektiran je ukupni polimorfizam u vidu 24 SNP-a i 4 INDEL-a. SNP-i se razlikuju frekvencijom, najučestaliji je SNP1 s varijacijom prisutnom u 49.5% slučajeva, dok je najmanje učestali SNP4 s 0.5% frekvencije. SNP markeri podrazumijevaju razlike nukleotida na točno određenom mjestu u genomu i najčešće imaju samo dvije varijante, odnosno dva alela (npr. A/G). Frekvencija SNP-a predstavlja učestalost određene alelne varijante u ispitivanom uzorku. Alelna varijanta koja se pojavljuje u većem broju jedinki ispitivanog seta uzoraka se naziva major alel, a drugi rjeđi alel se naziva minor alel. Kod INDEL-a je situacija slična, kao major alel se uzima uobičajeno stanje genoma koje je prisutno kod većine jedinki, a opažena insercija ili delecija je minor alel. Frekvencija pojedinog SNP-a i INDEL-a dobivena je, dakle, omjerom ukupnog broja minor alela i sume svih alela. Što je omjer minor i major alela uži, frekvencija je veća. Po pitanju insercija i delecija, najučestaliji je INDEL4 (47.1%), a najmanje učestali INDEL1 (21.7%). U poravnatim sekvencama, insercije i delecije bile su vidljive u vidu određenog broja nukleotidnih baza koji je bio u suvišku (insercija) ili manjku (delecija) u odnosu na ostale sekvence. Tablice 4. i 4. prikazuju podatke za pojedinačne polimorfizme.

Frekvencija svakog SNP-a i INDEL-a izračunata je unutar pojedinih poduzoraka (Tablica 6.) i vizualno prikazana grafikonom (Slika 5.). Može se zamijetiti da su čak 10 SNP-a i jedan INDEL svojstveni isključivo kultiviranoj lozi, pri kojima se varijacija ne može zamijetiti u poduzorku divlje ($f=0\%$). Suprotno od toga, SNP20 detektiran je jedino kod divlje loze. SNP22 nije zamijećen u skupinama suša_1 niti suša_3, već samo suša_2 i kod divlje loze. Primijećuje se da su polimorfizmi visoke frekvencije unutar skupine suša_1 u divljoj lozi načelno zastupljeni u nižoj frekvenciji. SNP4 detektiran je isključivo u skupini suša_3 u vrlo niskoj frekvenciji (2%). Uspoređujući frekvencije u dvjema skupinama s najvećom razlikom u otpornosti na sušu (suša_1 i suša_3), može se zamijetiti da SNP19 nije prisutan u skupini suša_3, a u skupini suša_1 ima nisku frekvenciju (2.85%). Frekvencije svih polimorfizama unutar dviju skupina variraju u određenoj mjeri, a komparativno najviše u SNP2 (3,6% i 28% redom u suša_1 i suša_3) i INDEL1 (45,4% i 5,8% u suša_1, odnosno suša_3).

Tablica 4. Učestalost pojave polimorfizma [f(SNP)] i udjeli homozigota i heterozigota za 24 identificirana SNP lokusa na sekvenci transkripcijskog faktora CBF4, utvrđeni pri određenoj veličini uzorka (n).

SNP	Varijacija	f	n	Major alel	Minor alel	N homozig_major	N homozig_minor	N heterozig
1	[A/G]	49.5 %	92	G	A	31	30	31
2	[A/G]	19.0 %	92	A	G	67	10	15
3	[A/G]	25.8 %	93	G	A	55	10	28
4	[T/G]	0.5 %	94	G	T	93	0	1
5	[T/C]	9.6 %	94	C	T	82	6	6
6	[A/G]	11.3 %	93	G	A	75	3	15
7	[A/G]	47.3 %	93	A	G	36	31	26
8	[A/G]	25.3 %	93	G	A	62	16	15
9	[A/G]	8.2 %	91	G	A	81	5	5
10	[A/G]	3.3 %	91	G	A	87	2	2
11	[T/G]	22.5 %	91	G	T	66	16	9
12	[A/C]	16.9 %	86	C	A	64	7	15
13	[A/C]	32.4 %	85	A	C	46	16	23
14	[T/C]	22.4 %	85	C	T	60	13	12
15	[T/G]	25.3 %	85	T	G	55	13	17
16	[A/G]	27.1 %	85	A	G	51	12	22
17	[A/T]	41.1 %	84	A	T	38	23	23
18	[A/G]	45.2 %	84	G	A	34	26	24
19	[A/G]	10.4 %	82	G	A	70	5	7
20	[T/C]	9.8 %	51	C	T	46	5	0
21	[T/C]	21.2 %	52	C	T	41	11	0
22	[A/G]	10.2 %	49	A	G	44	5	0
23	[A/C]	19.1 %	47	C	A	38	9	0
24	[A/T]	42.0 %	44	A	T	23	16	5

(f – frekvencija SNP-a; n – broj jedinki; N homozig_major – broj homozigota s major alelom; N homozig_minor – broj homozigota s minor alelom; N_heterozig – broj heterozigota).

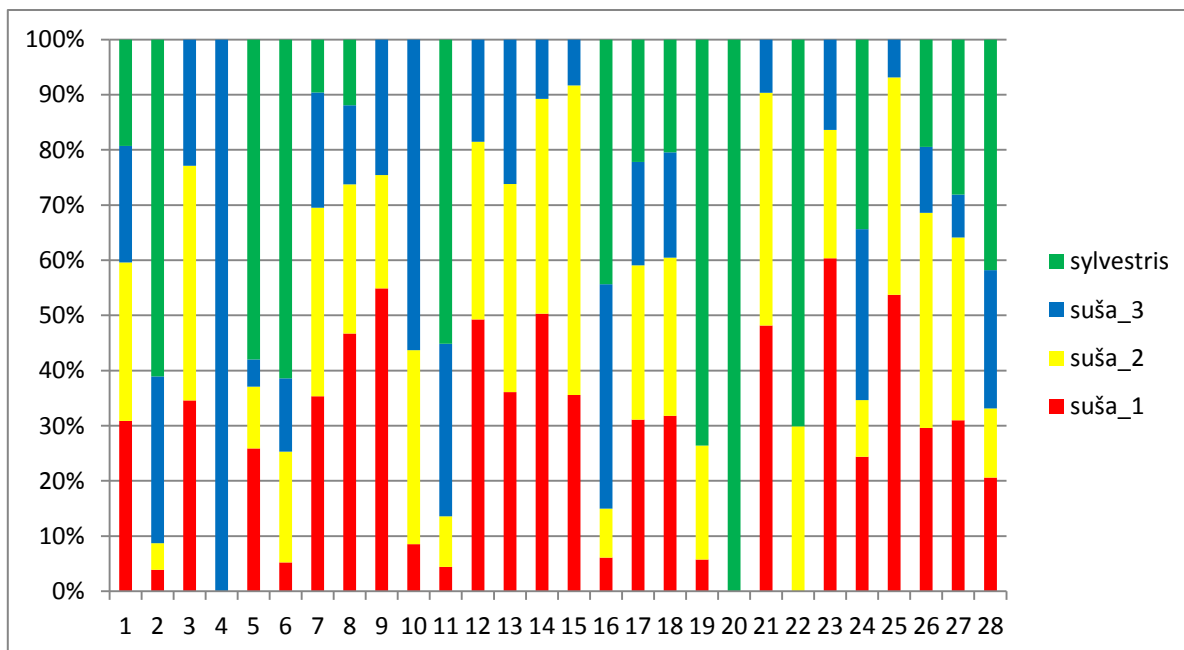
Tablica 5. Učestalost detektiranih frekvencija insercija i delecija (f) i udio genotipova kod različitog broja jedinki (n) na sekvenci transkripcijskog faktora CBF4

INDEL	f	n	Major alel	Minor alel	N homozig_major	N homozig_minor
1	21.7 %	60	insercija	delecija	47	13
2	30.8 %	52	delecija	insercija	36	16
3	31.2 %	48	delecija	insercija	33	15
4	47.1 %	34	delecija	insercija	18	16

(f – frekvencija; n – broj jedinki; N homozig_major – broj homozigota s major alelom; N homozig_minor – broj homozigota s minor alelom).

Tablica 6. Učestalost pojave detektiranog polimorfizma (SNP i INDEL) unutar četiri zasebne podskupine analiziranih uzoraka vinove loze.

Polimorfizam	suša 1	suša 2	suša 3	sylvestris
SNP1	58,5%	54,5%	40%	36,6%
SNP2	3,6%	4,5%	28%	56,6%
SNP3	33,3%	40,9%	22%	0%
SNP4	0%	0%	2%	0%
SNP5	10,4%	4,5%	2%	23,3%
SNP6	7,1%	27,2%	18%	83,3%
SNP7	61,0%	59,0%	36%	16,6%
SNP8	39,2%	22,7%	12%	10%
SNP9	13,4%	5%	6%	0%
SNP10	1,21%	5%	8%	0%
SNP11	4,8%	10%	34%	60%
SNP12	27,7%	18,1%	10,4%	0%
SNP13	43,0%	45%	31,2%	0%
SNP14	38,8%	30%	8,3%	0%
SNP15	44,4%	70%	10,4%	0%
SNP16	6,9%	10%	45,8%	50%
SNP17	50%	45%	30,1%	35,7%
SNP18	55,5%	50%	33,3%	35,7%
SNP19	2,8%	10%	0%	35,7%
SNP20	0%	0%	0%	33,3%
SNP21	38,0%	33,3%	7,6%	0%
SNP22	0%	14,2%	0%	33,3%
SNP23	36,8%	14,2%	10%	0%
SNP24	39,4%	16,6%	50%	55,5%
INDEL1	45,4%	33,3%	5,8%	0%
INDEL2	38,0%	50%	15,3%	25%
INDEL3	40%	42,8%	10%	36,3%
INDEL4	41,1%	25%	50%	83,3%



Slika 5. Grafički prikaz raspodjele frekvencija opaženog polimorfizma u četiri zasebne podskupine analiziranih uzoraka vinove loze naznačene u legendi. Brojevima 1 do 24 označena 24 SNP-a, a 25-28 četiri INDEL-a redoslijedom pojavnosti kao i u Tablici 5.

4.2.3. Lokalizacija i učinak polimorfizma

Analizom u *SNiPlay*-u, BLAST programom je potvrđena amplifikacija i djelomično sekvenciranje ciljne regije gena, transkripcijskog faktora CBF4, lociranog na 16. kromosomu vinove loze (Tablice 3.,5. i 6.). Ustanovljeno je da je od 24 detektiranih SNP-a 11 smješteno unutar introna (nekodirajuće regije gena), 9 unutar egzona (kodirajuće regije), a dva se nalaze izvan gena CBF4 (međugenski prostor). Dvije trećine (66.66%) egzonskih mutacija su sinonimske, što znači da promijenjeni triplet kodira sintezu jednake aminokiseline, a 33.34% je nesinonimsko, s promijenjenom aminokiselinom tijekom translacije. Primjerice, SNP8 G/A na kromosomskoj poziciji 15814417 uzrokuje promjenu aminokiseline glicin u lizin. Pozicije i učinci svih SNP-a prikazani su u Tablici 7. Dva INDEL-a nalaze se unutar egzona, a po jedan unutar introna i međugenskog prostora (Tablica 8.).

Tablica 7. Pozicije detektiranih SNP-ova na 16. kromosomu vinove loze i promjene koje izazivaju. Dvije mutacije nalaze se u međugenskom prostoru, 11 u nekodirajućoj regiji, a preostalih 9 u kodirajućoj regiji dijele se na sinonimske i nesinonimske.

SNP	Kromosom	Pozicija	Dio gena	Kodon	Aminokiselina	Učinak
1	chr16	15814705	egzon	aaG/aaA	Lys/Lys	sinonimska kodirajuća
2	chr16	15814702	egzon	cgG/cgA	Arg/Arg	sinonimska kodirajuća
3	chr16	15814615	egzon	gtG/gtA	Val/Val	sinonimska kodirajuća
4	chr16	15814525	intron	#	#	#
5	chr16	15814476	intron	#	#	#
6	chr16	15814432	intron	#	#	#
7	chr16	15814429	intron	#	#	#
8	chr16	15814417	egzon	Gga/Aga	Gly/Lys	nesinonimska kodirajuća
9	chr16	15814360	intron	#	#	#
10	chr16	15814345	egzon	acG/acA	Thr/Thr	sinonimska kodirajuća
11	chr16	15814258	egzon	ccT/ccG	Pro/Pro	sinonimska kodirajuća
12	chr16	15814000	intron	#	#	#
13	chr16	15813952	intron	#	#	#
14	chr16	15813951	intron	#	#	#
15	chr16	15813921	intron	#	#	#
16	chr16	15813919	intron	#	#	#
17	chr16	15813871	intron	#	#	#
18	chr16	15813857	intron	#	#	#
19	chr16	15813844	intron	#	#	#
20	chr16	15813763	egzon	Ctt/Ttt	Leu/Phe	nesinonimska kodirajuća
21	chr16	15813749	egzon	atC/atT	Ile/Ile	sinonimska kodirajuća
22	chr16	15813721	egzon	Aaa/Gaa	Lys/Glu	nesinonimska kodirajuća
23	chr16	15813707	međugenski prostor	#	#	#
24	chr16	15813688	međugenski prostor	#	#	#

(Lys – lizin; Arg – arginog; Val – valin; Gly – glicin; Thr – treonin; Pro – prolin; Leu – leucin; Phe – fenilalanin; Ile – izoleucin; Glu – glutaminska kiselina)

Tablica 8. Pozicije opaženih INDEL-a

INDEL	Kromosom	Pozicija	Dio gena
1	chr16	15813824	intron
2	chr16	15813758	egzon
3	chr16	15813713	egzon
4	chr16	15813669	međugenski prostor

4.2.4. Parametri diverziteta

Analiza parametara diverziteta sekvenci provedena je za cjelokupni uzorak, kao i za podskupinu kultivirane i divlje loze, koja omogućuje njihovu komparaciju (Tablica 9.). Uspoređene su i dvije skupine sorti *Vitis vinifera* subsp. *sativa* (Tablica 10.) koje se razlikuju u otpornosti na sušu.

Tablica 9. Prikaz parametara diverziteta π , θ Watterson, D Tajima, F_{ST} izračunatih su za cjelokupni uzorak i zasebno za dvije podvrste vinove loze u n broju uzoraka.

Uzorak	n	π	θ Watterson	D Tajima	Fst
<i>Vitis vinifera</i>	94	0.00856	0.00474	2.35512 *	/
Vv subsp. <i>sylvestris</i>	15	0.00484	0.00276	2.49521 **	0.54582
Vv subsp. <i>sativa</i>	79	0.00640	0.00404	1.70318 n.s.	0.40363

(analiza signifikantnosti prema Tajima, (1989.) * signifikantno, **visokosignifikantno, n.s. nesignifikantno)

Tablica 9. Usporedba parametara diverziteta π , θ Watterson, D Tajima, F_{ST} pri dvije skupine sorti kultivirane loze s najvećom i najmanjom otpornošći na sušu.

Vv subsp. <i>sativa</i>	n	π	θ Watterson	D Tajima	Fst
suša_1	43	0.00768	0.00426	2.50339*	0.41448
suša_3	25	0.00676	0.00507	1.11276 n.s.	0.26667

(analiza signifikantnosti prema Tajima, (1989.) * signifikantno, **visokosignifikantno, n.s. nesignifikantno)

Nukleotidni diverzitet (π) koji predstavlja srednji broj različitih nukleotida između sekvenci bio je manji kod divlje loze (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) u odnosu na kultiviranu (*Vitis vinifera* subsp. *sativa*) s vrijednosti 0.00484, odnosno 0.00640. Najveći nukleotidni diverzitet opažen je pri analizi 94 uzoraka u cjelini. Uspoređujući skupine sorti vinove loze suša_1 i suša_3, π vrijednost je veća kod sorti otpornijih na sušu (0.00768 i 0.00676).

Na temelju opaženog polimorfizma i veličine uzorka, Wattersonov θ estimator bio je najmanji kod divlje loze (0.00276), veći kod kultivirane (0.00404) i najveći kod neraščlanjenog uzorka (0.00474), što prati i rastuću π vrijednosti, dok uzorak suša_1 ima manju θ Watterson vrijednost (0.00426) od suša_3 (0.00507).

Tajiminim D testom provjerena je neutralnost mutacija. Dobivene su isključivo pozitivne vrijednosti, 2.35512 – *Vitis vinifera*, 2.49521 – *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* te

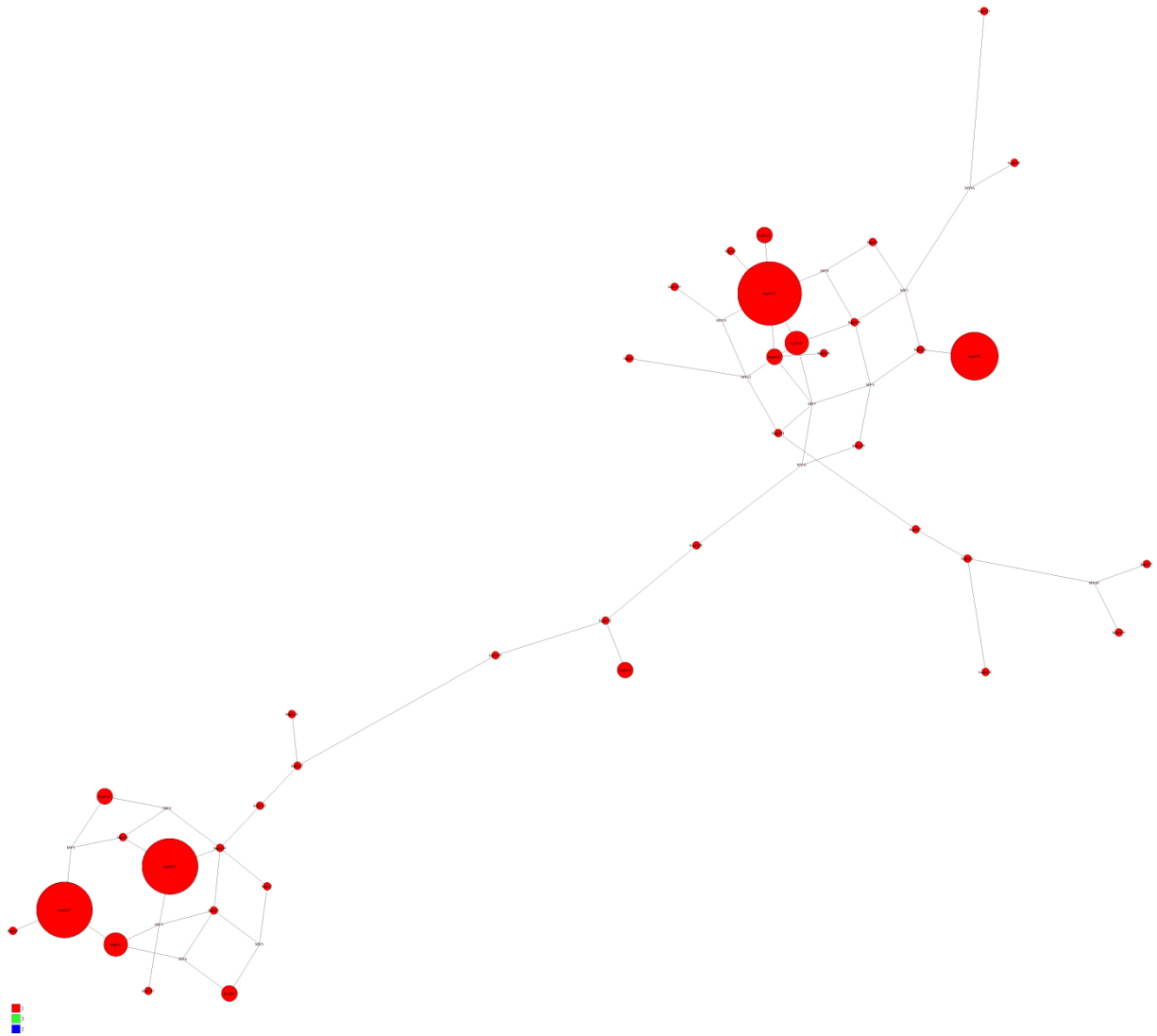
najmanjih 1.70318 za *Vitis vinifera* subsp. *sativa*, unutar koje suša_1 ima više od dvostruko veću vrijednost (2.50339) od suša_3 (1.11276).

Fiksacijski indeks F_{ST} (Hudson) izračunat je usporedbom genetičkog diverziteta unutar i između pojedinih poduzoraka. Manje varira pri komparaciji dviju podvrsta vinove loze (0.54528 - divlja loza i 0.40363 - kultivirana) u odnosu na dvije skupine sorti različite u otpornosti na sušu (0.41448 – suša_1 i 0.26667 – suša_3).

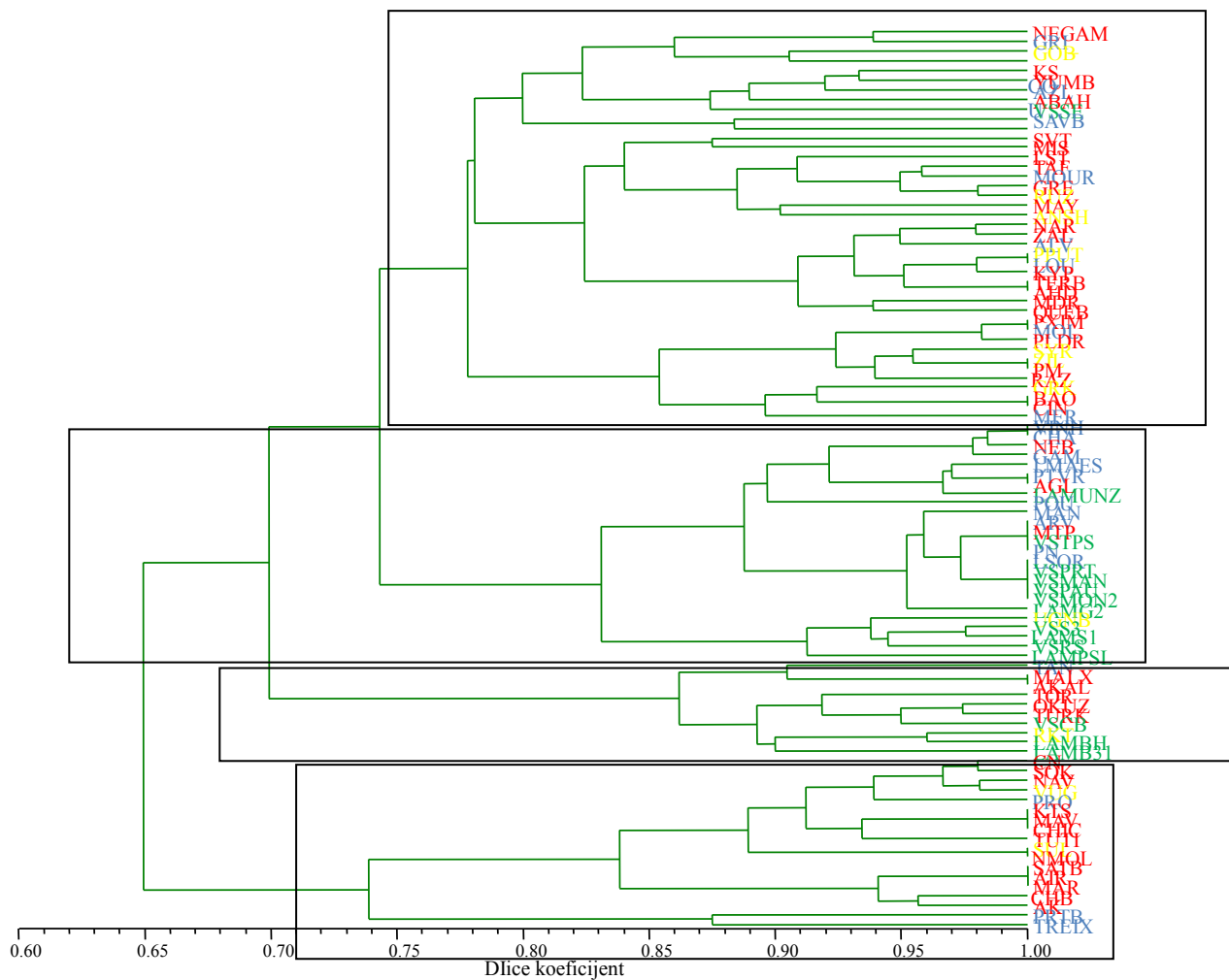
4.2.5. *Median – joining* (MJ) filogenetska mreža i UPGMA filogenetsko stablo

Na temelju DNA sekvenci 39 haplotipova sorata iz grupe suša_1, izrađena je *Median – joining* filogenetska mreža. Analiza mreže (*Network analysis*) prikazana je Slikom 5., pri čemu je veličina kruga u skladu s frekvencijom pojedinog haplotipa, a grane koje ih povezuju ukazuju na mutacijske korake koje ih dijele. Iz mreže se može uočiti da se haplotipovi grupiraju u grupiraju u dvije odvojene skupine.

Filogenetsko stablo konstruirano korištenjem Diceovog koeficijenta i UPGMA algoritma na temelju SNP profila genotipova prikazano je slikom 6. Primjećuje se razdvajanje četiriju skupina koje su vizualno istaknute. Najmanju skupinu sačinjava pet sorti iz skupine suša_1, divergentnog geografskog porijekla. Samo su dvije sorte europske (iz Grčke i Turčke), a ostale su iz Argentine, Irana i Tunisa. Uz njih svrstane su tri divlje loze sa Zapadnog Mediterana – dvije iz Francuske i jedna iz Maroka, kao i jedna na sušu najmanje otporna francuska sorta te gruzijska sorta srednje otpornosti. Druga skupina po veličini objedinjuje 13 sorti s najvećom otpornošću na sušu, dvije sa srednjom i četiri sorte s najmanjom otpornošću. Sorte su različitog geografskog porijekla. U iduću skupinu svrstalo se čak 11 od ukupno 15 analiziranih divljih loza i devet sorata iz skupine suša_3. Ovdje je grupirano pet od ukupnih osam sorata iz Italije, odakle su i jedine dvije sorte s najvećom otpornošću na sušu ove skupine. Najveća skupina sačinjena je od 40 sorata različite reakcije na sušu i jedne divlje loza, predstavnice španjolske populacije. Samo pet sorata ove skupine nije porijeklom iz Europe ili Mediterana, već su iz Kine, Indije, Jemena, Uzbekistana i Perua.



Slika 6. *Median – joining* mreža 39 haplotipa gena CBF4 istraživanih sorti vinove s najvećom otpornošću na sušu (suša_1).



Slika 7. UPGMA filogenetsko stablo dobiveno iz SNP profila analiziranih genotipova. Zelenom bojom označene su jedinice podvrste *sylvestris*, crvenom sorte u skupini suša_1, žutom suša_2, a plavom suša_3

5. Rasprava

Na temelju literaturnih navoda, CBF1 i CBF4 odabrani su kao kandidati geni zbog potencijalne povezanosti u reakciji na stres suše. Provedeno je istraživanja njihovog polimorfizma u setu uzoraka vinove loze koji objedinjuje genotipove divlje i kultivirane loze te sorte vinove loze koje se razlikuju u reakciji otpornosti na sušu.

CBF1 nije bilo moguće sekvencirati zbog nespecifičnosti dizajniranih početnica u velikom postotku uzoraka, koja je ustanovljena provjerom PCR amplifikacije na gelu. Nespecifičnost se nije očitovala BLAST-om na referentnu sekvencu genoma vinove loze, što može ukazivati na različitosti visoko homozigotnog PN40024 u odnosu na pojedine genotipove. U prilog tome govori i razlika u procjeni veličine genoma heterozigotnog Pinot noir klonu i gotovo potpuno homozigotne biljke s 505 Mb naprema 485 Mb (Jaillon i sur., 2007., Velasco i sur., 2007.). Nespecifičnost početnica mogle su dakle uzrokovati primjerice kopije gena ili pseudogeni zastupljeni u određenim genomima analiziranih uzoraka.

Sekvenciranje PCR produkata gena CBF4 Sangerovom metodom provedeno je s djelomičnim uspjehom. Sekvence čitavih gena u cjelokupnom uzorku nisu dobivene ponajprije zbog problema heterozigotnosti, što se na kromatogramu manifestiralo dvjema kontinuiranim superponiranim sekvencama, koje su onemogućavale daljnje očitavanje. Visoka heterozigotnost karakteristika je vinove loze, a procijenjena je na 13% ukupne sekvence (Jaillon i sur., 2007.).

Na temelju rezultata analize sekvenciranih fragmenata, omogućen je uvid u detektirani polimorfizam: prosječno je opažen jedan SNP svakih 53 parova baza, više nego u istraživanju Lijavetzky i sur. (2007.), a manje nego kod Salmaso i sur. (2004.), koji su detektirali jedan SNP svakih 64, odnosno 47 parova baza. U skladu s Lijavetzky i sur. (2007.), frekvencija polimorfizma veća je u nekodirajućoj regiji (jedan SNP svakih 52 parova baza) u odnosu na kodirajuću (jedan SNP svakih 60 parova baza). Insercije i delecije (INDEL) potvrđene su u prosjeku svakih 581 parova baza, znatno više nego kod Lijavetzky i sur. (2007.), koji pronalaze INDEL svakih 1932 bp-a.

Razina polimorfizma u čitavom setu uzoraka je visoka, što je u skladu s prethodno objavljenim rezultatima (Lijavetzky i sur., 2007., Salmaso i sur., 2004.). Vrijednosti

parametara diverziteta π (0.00856) i θ Watterson (0.00474) više su nego u publikaciji Lijavetzky i sur. (2007.), gdje π iznosi 0.0051, a θ 0.0046. Visoka pozitivna Tajimina D vrijednost ukazuje na prisutnost svojevrsne selekcije, odnosno odstupanja od neutralnog modela. D vrijednosti od 2.35512 pri veličini uzorka jednakoj 94 smatra se signifikantnom uz razinu pouzdanosti od 95% (Tajima, 1989.). Može se pretpostaviti da je posrijedi učinak ravnotežne selekcije, kojom se održava genetička varijacija u populaciji. Navedeno je u skladu s visokim stupnjem heterozigotnosti vinove loze, kao i činjenicom da je uzorak sačinjen od jedinki koje potječu iz različitih geografsko – ekoloških uvjeta, za koje su selekcijom (prirodnom ili nametnutom) vjerojatno izdvojeni adaptirani genotipovi.

Usporedba parametara diverziteta provedena je i između dvije podvrste vinove loze, kultivirane *Vitis vinifera* subsp. *sativa* i divlje, *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*, iako se poduzorci razlikuju veličinom, što bi u stanovitoj mjeri moglo utjecati na rezultate komparacije. Kako bi se prevladalo ovo ograničenje, odabrani su genotipovi divlje loze različitog porijekla kako bi se dosljedno nastojala predstaviti raznolikost podvrste. Izračunati π i θ parametri pokazuju da je set uzoraka kultivirane loze polimorfiji od divlje. I u drugim istraživanjima ustanovljen je niži stupanj polimorfizma i heterozigotnosti divlje loze u odnosu na kultiviranu (Aradhaya i sur., 2003., Laucou i sur., 2011.). Navedeno je u skladu s činjenicom da su 10 SNP-a i jedan INDEL detektirani u cjelokupnom uzorku svojstveni isključivo kultiviranoj lozi, a jedan SNP isključivo divljoj lozi. Određene mutacije su se, dakle, razvije uslijed domestikacije i evolucije divlje forme u kultiviranu. Nadalje, fiksacijski indeks F_{ST} veći od 0.25 ukazuje na postojanje vrlo velike genetičke diferencijacije. To je slučaj kod oba poduzorka: kod divlje loze veći udio genetičke varijacije predstavljaju razlike u odnosu na kultiviranu lozu, a manji na razlike unutar samog poduzorka ($F_{ST} = 0.54582$), dok je kod kultivirane loze slučaj obratan ($F_{ST} = 0.40363$). Nadalje, iako je Tajimina D vrijednost u oba slučaja bila visoka i pozitivna, provjerom signifikantnosti ustanovljeno je da se u slučaju divlje loze neutralnost mutacija može odbaciti s 99% sigurnosti, dok je kod kultivirane loze razlika nesignifikantna, odnosno nije ustanovljeno odstupanje od neutralnog modela. Može se pretpostaviti da je tome razlog svojevrsna prirodna selekcija ili, vjerojatnije u kontekstu divlje loze kao ugrožene podvrste, smanjenje populacije.

Podjela sorata vinove loze u tri skupine ovisno o razini otpornosti na sušu omogućila je usporedbu skupina komparativno najotpornijih i najmanje otpornih genotipova. Parametri diverziteta π i θ visokih su vrijednosti, no međusobno se znatno ne razlikuju. Iako mogućnost utjecaja različite veličine uzoraka nije isključena, dobivene visoke vrijednosti u skladu su s

utvrđenim diverzitetom u čitavom uzorku kultivirane loze i visokom polimorfnošću istraživane regije. Dva SNP-a karakteristična su samo jednoj od dviju skupina, unutar kojih se pojavljuju u niskim frekvencijama, dok frekvencije ostalih SNP-a po skupinama variraju. Fiksacijski indeks F_{ST} veći je kod poduzorka suša_1 u odnosu na suša_3, iako je stupanj genetičke diferencijacija u oba poduzorka vrlo velik. Temeljem toga, može se zaključiti da se u populaciji suša_3 opaža veći tok gena, dok se u populaciji suša_1 u većoj mjeri fiksiraju poželjni genotipovi otporni na sušu. Tajiminim D testom neutralnosti mutacija potvrđena je selekcija (uz stupanj signifikantnosti 95%) u uzorku suša_1, dok su statistički mutacije u uzorku suša_3 neutralne. Moguće je dakle da su mutacije unutar transkripcijskog faktora CBF4 svojstvene genotipovima u skupini suša_1 uvjetovale otpornost na vodni stres, koji je bio temelj selekcije dotičnih sorti. Pošto je riječ o sortama koje potječu i uzgajaju se u aridnim i semiaridnim uvjetima, prilagodba na sušu svakako je poželjna.

Filogenetska *Median – joining* mreža dobivena na temelju rekonstruiranih haplotipova skupine uzoraka suša_1 pokazuje da su haplotipovi generalno gledano grupirani u dvije zasebne skupine, što sugerira pojavnost dviju odvojenih mutacija koje su mogle dovesti do povećane otpornosti na sušu. Navedeno je u skladu s visoko signifikantnom Tajiminom D vrijednošću koja ukazuje na tip selekcije uslijed koje se održavaju različite genetičke varijante koje karakteriziraju određene prilagodbe.

Važno je naglasiti je klaster analizom vizualiziranom filogenetskim UPGMA stablom čak 11 od 15 genotipova divlje loze svrstano zajedno, što je u skladu s nižim nukleotidnim diverzitetom i visokim fiksacijskim indeksom poduzorka divlje loze dobivenog usporedbom s kultiviranom lozom. Također, može se zamijetiti stanovita geografska pravilnost klasteriranja.

Iako podaci ukazuju na postojanje selekcije među sortama, resekvenciranjem transkripcijskog faktora CBF4 nije dobivena jasna razlika između genetičkih varijanti otpornih i neotpornih na sušu. To je naime kompleksno svojstvo, kontrolirano velikim brojem gena, dok je analiza kandidata gena primjerenija u slučaju svojstava kontroliranih manjim brojem gena. Primjerice, ispitivanjem nukleotidne varijacije u genu VvDXS povezanom s muškatnom aromom kod muškatnih, aromatičnih i neutralnih sorti dokazana su tri SNP-a svojstvena isključivo za muškatnu aromu, a temeljem te spoznaje željena aroma se u oplemenjivačkim programima može detektirati u ranoj fazi selekciji potpomognutoj markerima (Emanuelli i sur., 2010.). Preciznija podjela fenotipskih varijanti u spomenutom istraživanju (bobice sorata razlikuju se u sadržaju terpena – nosioca muškatne arome, koje je

lako točno kvantificirati), različita je od relativno grube podjele u tri skupine ovisno o otpornosti na sušu. Ograničenje predstavljaju i relativno kratke dobivene sekvence, kao i visok udio podataka koji nedostaju, uzrokovan prekidom čitljivih sekvenci. Potencijalan problem predstavlja i činjenica da je istraživani gen kandidat transkripcijski faktor koji djeluje na veći broj gena. Logičan korak koji bi uslijedio nakon ovog istraživanja je analiza polimorfizma u genima koje ovaj transkripcijski faktor regulira te kompilacija i usporedba dobivenih rezultata.

6. Zaključci

Temljem dobivenih rezultata i analiza, može se zaključiti sljedeće:

- 1.) Sekvencirani fragmenti CBF4 transkripcijskog faktora pokazuju visok stupanj nukleotidne raznolikosti, koja je bila veća kod analiziranih predstavnika kultivirane loze u odnosu na divlju.
- 2.) Polimorfizam CBF4 transkripcijskog faktora ukazuje na diferenciranost svih uspoređivanih poduzoraka.
- 3.) Mutacije u CBF4 genu vinove loze odstupaju od neutralnog modela kod divlje loze i u skupini sorata kultivirane loze s najvećom otpornošću na sušu.
- 4.) Filogenetska mreža haplotipova sugerira pojavu dviju mutacija koje su mogle dovesti do povećane otpornosti u skupini najotpornijih sorata na sušu.
- 5.) Određene mutacije u CBF4 transkripcijskom faktoru mogle su se razviti tijekom domestikacije i evolucije divlje forme u kultiviranu. Preporučuju se daljnja istraživanja polimorfizma gena reguliranih transkripcijskim faktorom CBF4 uslijed abiotskog stresa analizom jedinki različite otpornosti na sušu.

7. Zahvale

Velika hvala:

prof.dr.sc. Ivanu Pejiću za vrijeme i trud uloženi u mentorstvo, potporu pri odlasku na stručnu praksu u inozemstvo i, prije svega, za konstantu podršku i vodstvo

dr.sc. Silviju Šimonu za konstruktivne savjete pri analizi i prikazu podataka

PhD HDR P. Thisu na mentorstvu tijekom studentske prakse, V. Laucou na pomoći pri eksperimentalnom dijelu rada, A. Fournier-Levelu na pomoći pri analizi rezultata, kao i cijelom timu na ljubaznosti, susretljivosti i odgovorima

P. Pujiću na interesu i pomoći u uklanjanju dilema

8. Popis literature

1. Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 796-815.
2. Aradhaya, M.K., Dangl, G.S., Prins, B.H., Boursiquot, J.-M., Walker, M.A., Meredith, C.P., Simon, C.J. (2003). Genetic structure and differentiation in cultivated grape *Vitis vinifera* L. *Genet. Res. Camb.* 81: 179-192.
3. Arrigo, N., Arnold, C. (2007). Naturalised *Vitis* rootstocks in Europe and consequences to native wild grapevine. *PLoS One* [online] 2(6): e521 <<http://www.plosone.org/>>. Pristupljeno 21.04.2013.
4. Arroyo-Garcia R., Ruiz-Garcia L., Bolling L., Ocete R., López, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezoğlu, G., Uzun, H.I., Cabello, F., Ibáñez, J., Aradhaya, M.K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Constantini, L., Gorislavets, S., Grando, M.S., Klein, B.Y., McGovern, P.E., Merdinoglu, D., Pejić, I., Pelsy, F., Primikiri, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K.A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J.M., Lefort, F., Martínez-Zapater, J.M. (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* 15: 3707-3714.
5. Atwell, S., Huang, Y.S., Vilhjálmsson, B.J., Willems, G., Horton, M., Li, Y., Meng, D., Platt, A., Tarone, A.M., Hu, T.T., Jiang, R., Mulyati, Zhang, X., N.W., Amer, M.A., Baxter, I., Brachi, B., Chory, J., Dean, C., Debieu, M., Meaux, J., Ecker, J.R., Faure, Kniskern, J. M., Jones, J.D.G., Michael, T. (2010.). Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465: 627-631.
6. Bacilieri, R., Lacombe, T., Le Cunff, L., Di Vecchi-Staraz, M., Laucou, V., Genna, B., Péros, J.-P., This, P., Boursiquot, J.-M. (2013). Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. *BMC Plant Biology* [online] 13:25 <<http://www.biomedcentral.com>> Pristupljeno 23.04.2013.
7. Bandelt, B.J., Forster, P., Rohl, A. (1999) *Mol Biol Evol.* 16(1): 37-48.
8. Base de données du Réseau Français des Conservatoires de Vignes <http://bioweb.ensam.inra.fr/collections_vigne/>. Pristupljeno: 20.04.2013.
9. Boneh U., Biton I., Zheng C., Schwartz A., Ben-Ari G. (2012). Characterization of potential ABA receptors in *Vitis vinifera*, *Plant Cell Reports* 31: 311-321.
10. Chapman D.M., Roby G., Ebeler S.E., Guinard J.-X., Mathews M.A. (2005). Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different water status, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 329-347.
11. Cramer G.R. (2010). Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 86-93.
12. Cramer G.R., Ergül A., Grimplet J., Tillett R.L., Tattersall E.A.R., Bohlman M.C., Vincent D., Sonderegger J., Evans J., Osborne C., Quilici D., Schlauch K.A., Schooley D.A., Cushman J.C. (2007). Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct Integr Genomics* 7: 111-134.

13. Davies, W.J, Zhang, J., (1991). Root signals and the regulation of growth and development in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 55-76.
14. Dereeper A., Nicolas S., Lecunff L., Bacilieri R., Doligez A., Peros JP., Ruiz M., This P. SNIPlay: a web-based tool for detection, management and analysis of SNPs. Application to grapevine diversity projects (2011). *BMC Bioinformatics* 12(1):134.
15. Dice, L.R. (1945) Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology* 26: 297-302
16. Emanuelli, F., Battilana, J., Constantini, L, Le Cunff, L., boursiquot, J.-M., This, P., grando, M.S. (2010). Candidate gene association study on muscat flavor in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology* [online] 10: 241 <http://www.biomedical.com/>. Pristupljeno 19.04.2013.
17. FAOSTAT 2013, Food and Agriculture Organization of United Nations, <<http://faostat.fao.org/>>. Pristupljeno: 17.04.2013.
18. Flowers, T.J., Yeo, A.R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: where next?. *Australian Journal of Plant Physiology* 22(6): 875-884.
19. Fournier-Level, A., Iacombe, T., Le Cunff, L., Boursiquot, J.-M., This, P. (2010) Evolution of the VvMybA gene family, the major determinant of berry colour in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Heredity* 104: 351-362.
20. Galet (2000). Dictionnaire encyclopédique des cépages. Hachette Livre, Paris
21. Genoscope - Centre National de Séquençage, Blast Server, <http://www.genoscope.cns.fr/cgi-bin/blast_server/projet_ML/blast.pl>. Pristupljeno: 19.04.2013.
22. Genoscope - Centre National de Séquençage, Grape Genome Browser (12X) <<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>>. Pristupljeno: 19.04.2013.
23. Hudson, R.R., Slatkin, M., Maddison, W.P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132 (2): 583–589.
24. International Grape Genome Program. Grape Germplasm Resources. <http://www.vitaceae.org/index.php/Grape_Germplasm_Resources>. Pristupljeno: 21.04.2013.
25. IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change. < <http://www.ipcc.ch/>> Pristupljeno: 16.04.2013.
26. Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguency P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449(7161): 463-467.

27. Laucou, V., Lacombe, T., Dechesne, F., Siret, R., Bruno, J.-P., Dessup, M., Dessup, T., Ortigosa, P., Parra, P., Roux, C., Santoni, S., Varès, D., Péros, J.-P., Boursiquot, J.-M., This, P. (2011). High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics* 122(6):1233-1245.
28. Le Cunff, L., Fournier-Level, A., Laucou, V., Vezulli, S., Lacombe, T., Adam-Blondan, A.-F., Boursiquot, J.-M., This, P. (2008). Construction of nested genetic core collections to optimize the exploration of natural diversity in *Vitis vinifera* L. subsp *sativa*. *BMC Plant Biology* [online] 8: 31 <<http://www.biomedcentral.com>>. Pristupljeno 23.04.2013.
29. Levadoux, L. (1956). Les populations sauvages et cultivés de *Vitis vinifera* L. *Ann. Amélior. Plantes* 6: 59-177.
30. Li W.X., Oono Y., Zhu J., He X.J., Wu J.M., Iida K., Lu X.Y., Cui X., Jin H., Zhu J.K. (2008). The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20: 2238-2251
31. Lijavetzky, D., Cabezas, J., A., Ibáñez, A., Rodríguez, V., Martínez-Zapater, J.M. (2007). High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Genomics* [online] 8: 424 <<http://www.biomedcentral.com>>. Pristupljeno 09.04.2013.
32. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H. Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
33. Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008). *Vinova loza. Školska knjiga*, Zagreb
34. Martínez-Zapater, J.M., Carmona, M.J., Diaz-Riquelme, J., Fernandez, L., Lijavetzky, D. (2010). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 33–46.
35. McGovern, P.E. (2003) *Ancient Wine and Search for the Origins of Viniculture*, 2nd edn. Princeton University Press, New Jersey
36. Mica, E., Piccolo, V., Delledonne, M., Ferrarini, A., Pezzotti, M., Del Fabbro, C., Valle, G., Policriti, A., Morgante, M., Pesole, G., Pè, M.E., Horner, D.S. (2009). High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics* [online] 10:558 <<http://www.biomedcentral.com>>. Pristupljeno: 18.04.2013.
37. Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E. (1992). *Biology of grapevine*, Cambridge University Press, Cambridge
38. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, GenBank Overview (2013.). <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Pristupljeno: 19.04.2013.
39. Negruľj, A.M. (1936). Variabilitat und Vererbung des Geschlechts bie der Rebe. *Gartenbauwiss* 10: 215-231.
40. Nei, M., Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* 76(10): 5269-5273.
41. Primer3 – Primer Designing Tool at SimGene. <<http://simgene.com/index.jsp>>. Pristupljeno 13.04.2012.

42. Rafalski, A. (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant biology* 5(2): 94-100.
43. Rohlf, F.J. (2000) NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. Exter Publications, New York.
44. Roby G., Habretson J.F., Adams D.A., Matthews M.A. (2004). Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins, *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 10: 100-107.
45. Salmaso, M., Faes, G., Stefanini, M., Salakhutdinov, L., Zyprian, E., Toepfer, R., Grando, M.S., Velasco, R. (2004). Genome diversity and gene haplotypes in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), as revealed by single nucleotide polymorphisms. *Mol Breeding* 14(4): 385-395.
46. Seki M., Umezawa T., Urano K., Shinozaki K. (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 296-302
47. Siddiqua M., Nassuth A. (2011). *Vitis* CBF1 and *Vitis* CBF4 differ in their effect on *Arabidopsis* abiotic stress tolerance, development and gene expression. *Plant, Cell and Environment* (34): 1345-1359
48. Staden, H. (2000) The Staden package, 1998 (2000) *Methods Mol Biol* 132: 115–130
49. Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., thomashow., M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 1035-1040.
50. Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
51. This, P., Lacombe, T., Thomas, M.R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet* 22: 511–519.
52. Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Dejardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehling J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjarvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leple JC., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson DR., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouze P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C.J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y., Rokhsar D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313(5793):1596-164.

53. Velasco R., Zharkikh, A., Troglio, M. Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D. Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J. T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N, Stefanini, M., Chen, Y., Segala. C., Davenport, C., Dematte, I., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Angie Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J.A., Sterck, L. Vandepoele, K., M. Grando, S.M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S.K., Paolo Fontana, P., Gutin, A, Van de Peer, Y., Salamini, F., Viola, R. (2007). A High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS One 2 (12): e1326.
54. Wang W., Vincour B., Altman A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14
55. Watterson, G.A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Pop. Bio.* 7: 256-276.
56. Wright, S., I. Vroh Bi, I., Schroeder, S., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S. (2005). The effects of artificial selection on the maize genome. *Science* 308 (5726): 1310-1314.
57. Xiao, H., Siddiqua, M., Braybrook, S., Nassuth, A. (2006). Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, Cell and Environment* 29: 1410–1421.
58. Xiao H., Tattersall E.A.R., Siddiqua M.K., Cramer G.R., Nassuth A. (2008). CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*, *Plant, Cell and Environment* 31: 1-10.
59. Yang Y., Sulpice R., Himmelbach A., Meinhard M., Christmann A., Grill E. (2006) Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 6061-6066.
60. Yu, J., Hu, S., Wang, S., Ka-Shu Wong, G., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Peng Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Lihuang Zhu, L., Longping Yuan, L., Yang, H. (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 5: 79-92.
61. Zhu, M., Zhao, S. (2007). Candidate gene identification approach: progress and challenges. *International Journal of Biological Sciences* 3 (7):420-427.

9. Sažetak

Ana Hranilović : Analiza polimorfizma transkripcijskih faktora vinove loze CBF1 i CBF4 povezanih s reakcijom na abiotski stres suše

Kultivirana vinova loza (*Vitis vinifera* subsp. *sativa*) gospodarski je najznačajnija višegodišnja voćna kultura, domesticirana je iz populacije divlje loze (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*). Temelj vinogradarske proizvodnje predstavljaju sorte kultivirane loze, koje uvelike variraju u različitim gospodarskim i biološkim svojstvima, uključujući otpornost na abiotski stres. Vinova loza relativno dobro podnosi sušu, no nedostatak vode može biti ograničavajući čimbenik njenog uzgoja, naročito u kontekstu predviđenih klimatskih promjena. Kod vinove loze detektirano je više od 2000 gena čiji se broj transkripata mijenja uslijed vodnog stresa. U tu skupinu spadaju i CBF1 i CBF4 transkripcijski faktori, uključeni u ovo istraživanje kao geni kandidati zbog pretpostavljnog utjecaja na razinu otpornosti na sušu. Uz specifične početnice, navedeni geni su umnoženi PCR-om u setu od 96 uzoraka vinove loze, sačinjenom od predstavnika divlje i sorata kultivirane loze. Tri ispitivane skupine sorata kultivirane loze odabrane su na temelju njihove razine otpornosti na sušu. U sekvenciranim fragmentima CBF4 gena detektirano je 24 SNP-a i četiri INDEL-a. Provedena je usporedba parametara diverziteta između dviju podvrsta loze, kao i dviju skupina sorata kultivirane s najvećom razlikom u otpornosti na sušu. Opažen je visok nukleotidni diverzitet ($\pi = 0.00856$; $\theta = 0.00474$), manji kod divlje loze u odnosu na kultiviranu. *Tajima* testom neutralnosti utvrđeno je da mutacije odstupaju od neutralnog modela kod divlje loze i u skupini sorata s najvećom otpornošću na sušu. Rezultati sugeriraju da su se određene mutacije u transkripcijskom faktoru CBF4 pojavile tijekom domestikacije i evolucije iz divlje forme u kultiviranu, a unutar sorata s najvećom otpornošću na sušu potvrđena je svojevrsna selekcija. Preporučuju se daljnja istraživanja polimorfizma gena reguliranih transkripcijskim faktorom CBF4 uslijed abiotskog stresa kod sorata s različitom otpornošću na sušu.

Ključne riječi: *Vitis vinifera*, CBF4, abiotski stres, suša, SNP

10. Summary

Ana Hranilović: Polymorphism analysis of grape transcription factors CBF1 and CBF4 connected with reaction to abiotic drought stress

Cultivated grapevine, *Vitis vinifera* subsp. *sativa*, is a perennial fruit crop of great economic importance, domesticated from population of its wild relative *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. Grape cultivars highly differ in their economic value and biological traits, including abiotic stress tolerance. Despite relatively high drought tolerance, water deficit can limit grape cultivation, especially in context of climate change. In grapevine, altered transcript abundance during drought was reported for more than 2000 genes. Among those are transcription factors CBF1 and CBF4, chosen as candidate genes for the present study. Using gene specific primers, CBF1 and CBF4 were amplified in the sample of 96 genotypes, comprising cultivated and wild grapes. Three groups of *sativa* cultivars were chosen based on their level of drought tolerance. Partial CBF4 sequences of 94 genotypes were obtained, revealing 24 SNPs and four INDELs. Diversity parameters were calculated and compared between two grape subspecies, as well as *sativa* subsamples with highest and lowest drought tolerance. Observed overall nucleotide diversity was high ($\pi = 0.00856$; $\theta = 0.00474$), being lower in *sylvestris* compared to *sativa*. Tajima's neutrality test has revealed that mutations in CBF4 gene did not evolve randomly in samples of wild grape and cultivated grape with highest drought tolerance. Results suggest that certain mutations in transcription factor CBF4 occurred during domestication and evolution from wild to cultivated form, as well as selection among the most drought tolerant cultivars. Further analysis of genes regulated by CBF4 transcription factor during abiotic stress in cultivars that differ in drought tolerance is recommended.

Key words: *Vitis vinifera*, CBF4, abiotic stress, drought, SNP