

Agrovoc descriptors: vitis vinifera,grapevines,varieties,plant anatomy,genotypes,microsatellites,polymorphism, genetic markers,genetic variation,provenance,identification

Agris category code: F30,F50

Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo kultivarjev vinske trte (*Vitis vinifera* L.)

Nataša ŠTAJNER¹

Prispelo 1. marca 2010; sprejeto 28. maja 2010.

Received 1st of March 2010; accepted 28th fo May 2010.

IZVLEČEK

Identifikacija kultivarjev vinske trte z metodami, ki temeljijo na morfoloških razlikah med rastlinami, je lahko zaradi vpliva ekoloških dejavnikov nepravilna, zato so bile razvite metode, ki omogočajo analizo kultivarjev na nivoju genotipa. V zadnjih dvajsetih letih so se uveljavile različne tehnike za karakterizacijo kultivarjev, od izoencimskih analiz do analiz na nivoju DNA (RFLP, RAPD, AFLP, SCAR in SSR markerji). Med omenjenimi so se najbolj uveljavili mikrosateliti, ki kažejo največjo informacijsko vrednostjo polimorfizma in so večinoma zelo variabilni. Sestavljeni so iz kratkih, tandemsko ponovljivih motivov DNA, ki so prisotni pri večini organizmov. Glavni vzrok polimorfizma med posamezniki so spremembe v številu ponovitev osnovnega motiva mikrosatelita. Za izdelavo začetnih oligonukleotidov mikrosatelitskih lokusov so v začetnih raziskavah uporabili zaporedja obrobnih regij že znanih mikrosatelitov, ki so bila shranjena v podatkovnih bazah DNA. Kasneje pa se je strategija razvijala v smeri nastanka genomskih knjižnic obogatenih z mikrosateliti. Pri vinski trti je bilo razvitih več kot 500 mikrosatelitskih markerjev in njihov izredni potencial in uporabnost pri določanju kultivarjev vinske trte in podlag je bil dokazan v številnih raziskavah. Za genotipizacijo se večinoma uporablja set šestih oz. devetih mikrosatelitskih markerjev (označevalcev), ki so zelo polimorfni in najbolj primerni za ugotavljanje genetske variabilnosti med evropskimi kultivarji vinske trte. Uporaba enotnega seta markerjev ter vključevanje referenčnih kultivarjev v analize genotipizacije omogoča primerjave genotipov med različnimi raziskovalnimi skupinami, in tako lahko rešujemo številne dileme o sinonimih, homonimih ali o izvoru sort vinske trte.

Gljučne besede: mikrosateliti, SSR markerji (označevalci), vinska trta, *Vitis vinifera* L.

ABSTRACT

MICROSATLLITE MARKERS FOR CULTIVAR IDENTIFICATION IN GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.)

Identification of grapevine cultivars using methods based on morphological differences between plants may be incorrect due to the influence of environmental factors. For these reasons, alternative methods for cultivar identification, which better illustrate differences at the genotype level, were developed. The diverse techniques for the molecular characterization (isoenzyme, RFLP, RAPD, AFLP, SCAR and SSR markers) developed in the past twenty years have been also applied to the grapevines. Among them, microsatellites show the best value of polymorphism information and are generally very variable. Microsatellites consist of short, tandem repeated DNA motifs and are ubiquitous in most organisms. The polymorphism among individuals is due to changes in the number of repeat units. In the early studies primers for the PCR amplification of the microsatellite loci were designed on the basis of the microsatellite sequences already existing in the Gene Bank databases. Subsequently a strategy was developed towards the construction of a genomic libraries enriched in microsatellites. A large number of microsatellite markers (more than 500) have been developed in grapevines and their extraordinary potential in determining grapevine cultivars and rootstocks was confirmed by numerous studies. The set of six or nine microsatellite markers, which are highly polymorphic and the most appropriate to determine the genetic variability among the European grapevine cultivars, is mainly used in the genotyping analysis. Using a definite set of markers and the integration of reference cultivars in the genotyping analysis allows comparison of genotypes between different research groups, and thus allows solving many dilemmas of synonyms, homonyms and origin or grape varieties.

Key words: microsatellites, SSR markers, grapevines, *Vitis vinifera* L.

¹ dr. biotehnoških znanosti, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

1 UVOD

Identifikacija kultivarjev vinske trte s tradicionalnimi metodami, kot sta ampelografija in ampelometrija, ki temeljita na morfoloških razlikah med sortami, je otežena zaradi vpliva ekoloških dejavnikov, razvojnega stadija rastline, zdravstvenega stanja in načina pridelave. Zato je bilo v preteklosti smiselno poiskati metode, s pomočjo katerih lahko analiziramo razlike med kultivarji na nivoju genoma. Prednost tovrstne identifikacije je v tem, da je neodvisna od zgoraj naštetih dejavnikov, ki vplivajo na morfologijo rastline. Najprej so bili za ta namen razviti izoencimski markerji, na osnovi katerih so karakterizirali in klasificirali vinsko trto (Stavrakakis in Loukas, 1983; Benin in sod., 1988; Calo in sod., 1989). Naslednji korak pri razvoju molekularnih markerjev so bile analize na nivoju DNA. RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijских fragmentov) je bil prvi razvit markerski sistem, ki je omogočil odkrivanje polimorfizma na nivoju DNA. Tehnika, ki temelji na razrezu DNA z restrikcijскими encimi in zaznavanju specifičnih fragmentov DNA s hibridizacijo z radioaktivno označeno sondo je bila pri analizah vinske trte uspešno uporabljena (Striem in sod., 1990; Bourquin in sod., 1991; 1993), vendar pa je izvajanje metode dolgotrajno in drago. Bolj enostavna in poceni je RAPD tehnika (naključno namnožena polimorfna DNA), ki temelji na namnoževanju neznanih predelov DNA z uporabo začetnega oligonukleotida s poljubnim nukleotidnim zaporedjem v verižni reakciji s polimerazo (PCR) in je bila zelo pogosto uporabljena za določanje genetskih razlik med sortami vinske trte (Tschammer in Zyprian, 1994; Moreno in sod., 1995; Stavrakakis in Biniari, 1998; This in sod., 1997). Največja slabost te metode je zahtevna standardizacija postopka oz. slaba ponovljivost rezultatov. Zato so bili iz RAPD markerjev razviti SCAR markerji (Sequence characterized amplified region), ki predstavljajo pretvorbo RAPD markerja v tip eno-lokusnega (kodominantnega) markerja. Razvoj SCAR markerjev za potrebe identifikacije genotipov vinske trte se ni razširil

(Lahogue in sod., 1998), zaradi sočasnega razvoja in večje uporabnosti mikrosatelitskih markerjev. Mikrosateliti ali enostavne ponovljive sekvence (SSR - simple sequence repeats) pa so se izkazali za najbolj učinkovite markerje za genotipizacijo vinske trte (Thomas and Scott 1993, Cipriani in sod., 1994; Sevc in sod., 1998; 2000; Sanchez-Escribano in sod., 1999). Ti polimorfni elementi jedrnega genoma so sestavljeni iz kratkih, tandemsko ponovljivih motivov DNA, ki so prisotni pri večini organizmov. Številni mikrosateliti so zelo variabilni tako znotraj vrst, kot med vrstami. Do polimorfizma med posamezniki prihaja večinoma zaradi sprememb v številu ponovitev osnovnega motiva (Eisen, 1999). Velika variabilnost mikrosatelitov pa je povezana tudi z dejstvom, da je v genomu evkariontov naključno razporejenih od 10^4 do 10^5 mikrosatelitskih lokusov, kar pomeni veliko število polimorfni mest, ki jih lahko uporabimo za genetske markerje. Prav zaradi visoke mutacijske stopnje predstavljajo mikrosateliti visoko informativne molekulske markerje z največjo informacijsko vrednostjo polimorfizma in kot taki so se uveljavili za identifikacijo kultivarjev vinske trte. Thomas in sod. (1993) so prvi uporabili mikrosatelite za identifikacijo kultivarjev vinske trte in dokazali, da so mikrosatelitske sekvence pogosto zastopane v genomu vinske trte in zelo informativne za identifikacijo *V. vinifera* kultivarjev. Odkrivanje mikrosatelitskega polimorfizma s PCR tehniko namnoževanja je hitro, nezahtevno in učinkovito že pri zelo majhni količini DNA, kar pomeni da v primeru vinske trte namesto rastlinskega tkiva lahko za DNA analizo uporabimo tudi produkte kot sta mošt in vino. Poleg identifikacije kultivarjev so mikrosateliti tudi zelo uporabni za reševanje dilem o sinonimih, homonimih ali o izvoru sort. Zaradi opisanih lastnosti so se mikrosateliti uveljavili kot molekularni markerji za genotipizacijo, v filogenetskih študijah sorodnosti, v populacijski genetiki, za identifikaciji klonov, v selekciji s pomočjo markerjev, idr.

2 MIKROSATELITI

Satelitna DNA je sestavljena iz tandemsko ponavljajočih se zaporedij DNA, ki so v številnih kopijah prisotna v genomu višjih organizmov. Na osnovi dolžine ponovitve so ta zaporedja razdeljena v tri razrede in sicer na satelite (enota ponovitve dolga nekaj tisoč baznih parov), minisatelite (enota ponovitve daljša od 10 bp) in mikrosatelite (enota ponovitve dolga od 2-8 bp) (Armour in sod., 1999).

V zgodovini je termin mikrosatelit označeval samo ponovitve dinukleotidnega motiva CA/ GT (Weber in

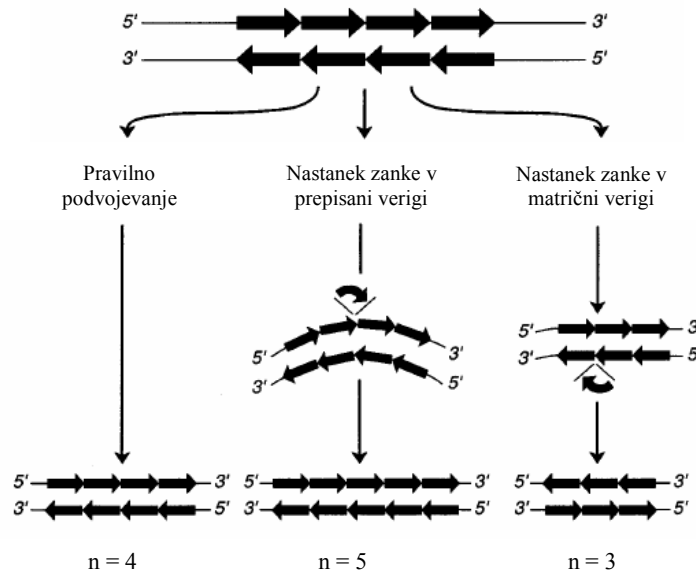
May, 1989), številna druga imena, kot npr. enostavna zaporedja (SSRs- short sequence repeats) in kratke tandemske ponovitve (STRs- short tandem repeats) pa so bila v uporabi za opisovanje ostalih ponovljivih zaporedij (Jeffreys in sod., 1985). Nakamura in sod. (1987) pa so od preostalega ločili še termin VNTRs (- Variable Number of Tandem Repeats), kar pomeni spremenljivo število tandemske ponovitve in označuje variabilnost v dolžini ponovitev med posamezniki na enem lokusu.

Mikrosatelite delimo na popolne (sestavljene samo iz enega motiva osnovne ponovitve, ki se ponavlja brez prekinitve, npr.: ctctctctctctctctctctct), nepopolne (ena ali več ponovitev vsebuje bazo, ki ne odgovarja osnovnemu motivu ponovitve, npr.: ctctctctgctctctct), prekinjene (vsebujejo krajšo insercijo baznih parov, ki se ne ujemajo z osnovnim motivom ponovitve, npr.: ctctctctctgggctctctct) in sestavljene (vključujejo dva ali več mikrosatelitov, ki pa se med seboj razlikujejo po tipu ali motivu ponovitve, npr.: ctctctctctgatgatgatgat).

Mikrosateliti se tvorijo iz regij prikritih zaporednih ponovitev (angl. cryptic simplicity), to so predeli, kjer so različni motivi enostavnih, ponavljajočih se DNA zaporedij prisotni v večji meri (Tautz in sod., 1986). Do variabilnost pri mikrosatelitih v večini primerov pride zaradi zdrs DNA polimeraze in posledično nepravilnega parjenja med replikacijo (SSM- Slipped-Strand Mispairing) (Levinson in Gutman, 1987) ter neučinkovitega DNA replikacijskega popravilnega mehanizma (Strand in sod., 1993). Z *in vitro* raziskavami je bilo dokazano, da je takšen zdrs DNA

polimeraze zelo pogost pojav (Schlötterer in Tautz, 1992), vendar pa se je izkazalo, da je mutacijska stopnja mikrosatelitov v *in vitro* pogojih veliko večja od dejanske mutacije *in vivo* in vzrok temu je *in vivo* delovanje replikacijskega popravilnega mehanizma. Le ta naj bi namreč zmanjšal stopnjo mutacije mikrosatelitov za 100 – 1000 krat (Strand in sod., 1993). Mutacijska stopnja mikrosatelitov na posamezno generacijo se giblje od 10^{-5} do 10^{-2} (Weber in Wong, 1993) in je veliko višja kot stopnja baznih substitucij. Prevladuje mnenje, da mikrosateliti večinoma niso podvrženi selekciji in prav zato proces mutacije igra toliko večjo vlogo pri določanju dolžine in razporeditve mikrosatelitov (Schlötterer, 2000).

Nepravilno parjenje vijačnice med DNA sintezo zaradi zdrs DNA polimeraze se pri mikrosatelitu kaže v pridobitvi ali izgubi ene ali več ponovitev. Ali se bo mikrosatelit daljšal ali krajšal pa je odvisno od tega ali nastane zanka v na novo sintetizirani DNA verigi ali v matrični verigi (Slika 1)



Slika 1: Shematski prikaz mehanizma SSM med podvajanjem, katerega rezultat je podaljšanje ali skrajšanje mikrosatelitne ponovitve. Posamezne enote ponovitev so označene s puščicami; nastajanje zank je posledica ostanka neparne baze, ki prekine dvojno vijačnico DNA. Nastanek zanke v prepisani verigi vodi do večjega števila ponovitev; v matrični verigi pa do manjšega števila ponovitev. Med replikacijo lahko pride do nastanka zank na obeh delih verige in efekt insercije ali delecije je tako nevtraliziran. Število ponovitev se lahko poveča ali zmanjša za več enot, v primeru da nastane več zank na eni verigi (van Belkum in sod., 1998).

Figure 1: Schematic representation of the mechanism of SSM during replication, which results in shortening or lengthening of SSRs. Individual repeat units are identified by arrows; bulging is the presence of non-base-pair base residues interrupting a regular 2-strand DNA helix. Bulging in the nascent strand leads to a larger number of repeat units; bulging in the template strand results in a smaller number of units. During replication, bulges can occur in both strands, and the effect of insertion or deletion can be neutralized by occurrence of the adverse event. The number of repeat units can decrease or increase by multiple repeats once multiple bulging in one strand has occurred (van Belkum in sod., 1998).

Za mikrosatelite je znano, da je mutacijska stopnja med posameznimi lokusi različna (Di Rienzo in sod., 1998) in obstaja kar nekaj potencialnih faktorjev, ki prispevajo k dognani raznolikosti dinamike razvoja mikrosatelitskih sekvenc: število ponovitev, nukleotidno zaporedje motiva ponovitve, dolžina ponovljive enote, obrobna regija, prekinitve v mikrosatelitu, stopnja rekombinacije, stopnja transkripcije, itd. Tako mnogi raziskovalci na osnovi številnih raziskav predvidevajo, da mutacijska stopnja narašča s številom ponovitev (Weber in Wong, 1993; Brinkmann in sod., 1998; Wierdl in sod., 1997, Rajora in sod., 2001), vendar pa obstaja premalo dokazov, da bi lahko to dejstvo upoštevali kot dejanski faktor razvoja mikrosatelitov.

Nestabilnost ponovitev je v večini primerov torej povezana z zdrsom DNA polimeraze med procesom podvojevanja, alternativno pa je variabilnost v številu ponovitev in degeneraciji nukleotidnega zaporedja lahko povezana tudi z DNA rekombinacijo med lokusi, ki so sestavljeni iz homolognih ponovitev.

Nastanek novega mikrosatelita se nanaša na kombinacijo dveh mutacij. Pri prvi mutaciji se mikrosatelit začne razvijati, kar pomeni da nastanejo ponovitve, ki so dovolj dolge, da lahko na njihovi osnovi med replikacijo pride do nepravilnega parjenja zaradi zdrsa DNA polimeraze. Drugo mutacijo pa povzroči nepravilno parjenje zaradi zdrsa DNA polimeraze in tako pride do dolžinskega polimorfizma. Prav tako pa je propad mikrosatelita povezan s kombinacijo dveh mutacij. Prva mutacija prekine popoln mikrosatelit oz. dolgo mikrosatelitsko ponovitev in tako prepreči nepravilno parjenje zdrsnjene vijačnice ter stabilizira ponovitve. Pri drugi mutaciji pa pride do delecije večjega odseka ponovitve. Končen rezultat je neprepoznava homologna sekvenca DNA, ki vsebuje le majhen del motiva osnovne ponovitve in zato lahko takšen proces imenujemo 'smrt' mikrosatelita (Taylor in sod., 1999).

2.1 Ničti aleli

V obrobni regijah mikrosatelitskih lokusov pogosto nastajajo mutacije (Orti in sod., 1997) in posledica tega je lahko nastanek ničtih alelov. Lažna smrt mikrosatelita se lahko pojavi kadarkoli in je posledica nukleotidnih substitucij, insercij in delecij, ki nastanejo v obrobni regijah, zaradi česar začetni oligonukleotidi ne prepoznajo mest prileganja. Rezultat takšnega procesa so ničti aleli (Callan in sod., 1993), ki se lahko ustalijo v populaciji. Posledica lažne smrti mikrosatelita so

številni na videz neuspeli poskusi namnoževanja lokusov med vrstami. Obstoj ničtih alelov lahko dokažemo tako, da naredimo nove začetne oligonukleotide, ki se prilegajo na drugem mestu obrobne regije mikrosatelita, ki ni bil podvržen mutaciji ali pa ga lahko odkrijemo z analizo segregacije križancev. Ni pa vedno nujno, da ničti alel odkrijemo, saj je lahko zamaskiran z alelom homolognega kromosoma. V populaciji je navzočnost teh alelov glavni razlog za veliko odstopanje med dejansko in pričakovano heterozigotnostjo, pri potomcih križancev pa za odstopanje od pričakovanih segregacijskih razmerij (Callan in sod., 1993).

2.2 Homoplazija

Mikrosateliti so običajno na osnovi različne strukture in tudi zgodovine nastanka različno dolgi, vendar pa obstajajo tudi aleli enake dolžine, ki so strukturno in evolucijsko popolnoma različni. In ker običajno variabilnost mikrosatelitov vrednotimo na osnovi elektroforetskih profilov PCR produktov, torej glede na dolžino namnoženega produkta in ne na osnovi nukleotidnega zaporedja, lahko takšen pojav, ki ga imenujemo dolžinska homoplazija privede do napačnega interpretiranja rezultatov. Na genskem nivoju lahko rečemo, da med dvema aleloma obstaja homoplazija, če sta identična po svoji pojavnosti obliki (dolžini), ne pa tudi po izvoru (Estoup in Cornuet, 1999). Glede na to, da je za mikrosatelitske lokuse značilna visoka mutacijska stopnja (Weber in Wong, 1993) in da se pod pritiskom selekcije ohranja le določena dolžina alelov in se tako zmanjšuje število možnih alelnih oblik, je pričakovana stopnja homoplazije pri mikrosatelitih velika (Nauta in Weissing, 1996). Torej so potencialno mikrosatelitski aleli enake dolžine lahko sestavljeni iz homolognih in homoplastičnih alelov. Dolžinsko homoplazijo znotraj vrste predstavljata dva možna vira variabilnosti, ki temeljita na dejstvu, da mikrosateliti niso vedno sestavljeni iz enega samega motiva. Poznamo tudi prekinjene in nepopolne mikrosatelite in prekinitve predstavljajo še en nivo polimorfizma, saj se aleli enake dolžine lahko razlikujejo po številu in/ali lokaciji prekinitev (Viard in sod., 1998). Drug nivo polimorfizma in odkrivanja dolžinske homoplazije mikrosatelitskih alelov pa predstavlja variabilnost v obrobni regijah mikrosatelita, ki je bila bolj pogosto odkrita med vrstami in je zelo redka znotraj vrste (Blanquer-Maumont in Crouau-Roy, 1995).

3 IZOLACIJA MIKROSATELITOV

Mikrosatelite lahko izoliramo iz genoma s pomočjo PCR amplifikacije znanih MS lokusov. Za izdelavo začetnih oligonukleotidov se uporabijo zaporedja obrobnih regij že znanih mikrosatelitov, ki so shranjena v podatkovnih bazah DNA ali iz genomskih knjižnic obogatenih z mikrosateliti. Zadnji pristop se je uveljavil pri številnih vrstah, posebno pri tistih, kjer ni na voljo podatkovnih baz o nukleotidnih zaporedjih. V začetku so mikrosatelite izolirali s pregledom velikega števila klonov genomskih knjižnic, novejša tehnika obogatitve genomske knjižnice pa temeljijo na povečanju deleža DNA fragmentov z mikrosatelitskimi ponovitvami (Jakše in Javornik, 2001). Na osnovi obogatitvenega postopka izolacije mikrosatelitov je mogoče dobiti tudi do 40-krat več uporabnih začetnih oligonukleotidov za namnoževanje mikrosatelitov, kot pa pri tradicionalnih metodah izolacije, ki vključujejo hibridizacijsko preverjanje rekombinantnih klonov (Brondani in sod., 1998). Težava, ki se pojavi pri izolaciji večjega števila

mikrosatelitov na osnovi obogatitvene knjižnice je presežek posameznih mikrosatelitov, kar pomeni, da se določeni kloni v knjižnici pojavijo večkrat in tako zmanjšajo učinkovitost izolacije. Temu problemu se lahko delno izognemo tako, da pri izdelavi knjižnice uporabimo različne restriktivne encime, ki povečajo delež neodvisnih DNA fragmentov (Chen in sod., 1997; Jakše in Javornik 2001). S pomočjo sekvenciranja lahko določimo nukleotidno zaporedje obrobne regije mikrosatelita in izdelamo lokusno specifične začetne oligonukleotide. Na osnovi komplementarnosti med začetnimi oligonukleotidi in mikrosatelitskimi obrobniimi regijami pa lahko v procesu verižne reakcije s pomočjo DNA polimeraze, pri osebkih namnožujemo produkte različnih dolžin. Odkrivanje mikrosatelitskega polimorfizma s PCR tehniko namnoževanja je hitro, nezahtevno in učinkovito že pri zelo majhni količini DNA.

4 VREDNOTENJE MIKROSATELITSKEGA POLIMORFIZMA

Metode za vizualizacijo in vrednotenje PCR produktov so se v zadnjih 20 letih zelo izboljšale. Najprej je bila uveljavljena detekcija namnoženih fragmentov s pomočjo radioaktivno označenih začetnih oligonukleotidov ter barvanje PCR produktov s srebrom ali etidijevim bromidom in ročno vrednotenje dobljenih fragmentov. Kasneje so se v večji meri začeli uporabljati fluorescentno označeni začetni oligonukleotidi, fragmente oz. namnožene alele pa je bilo možno vrednotiti avtomatsko, s pomočjo priloženih programskih aplikacij. PCR vzorce mikrosatelitskih lokusov lahko ločujemo v poliakrilamidnem denaturacijskem gelu na različnih sekvenčnih napravah (npr. ALFII Express sekvenator -Amersham Biosciences, ABI sekvenator - PE Applied Biosystems). Zaradi različnih sistemov elektroforeze pa prihaja do razlik med dolžinami detektiranih alelov in če želimo dobljene rezultate primerjati med različnimi laboratoriji, jih je potrebno standardizirati. Dolžine alelov lahko spremenimo/standardiziramo tako, da v analizo genotipizacije vključimo nekaj referenčnih vzorcev, na osnovi katerih lahko ostalim 'neznanim' vzorcem popravimo dolžine alelov. Znotraj posameznega lokusa so razlike v dolžini alelov vedno enake, zato lahko na osnovi parih vzorcev vključenih v gelsko analizo standardiziramo cel gel oz. vse vzorce (This in sod., 2004). Tako lahko podatke o alelnih dolžinah, ki so bili pridobljeni v različnih laboratorijih, primerjamo in združimo v skupno podatkovno zbirko. Standardizacija

podatkov na osnovi referenčnih vzorcev nam s pomočjo podatkovnih zbirk, ki vključujejo rezultate genotipizacije kultivarjev neke vrste omogoča identifikacijo nepoznanih genotipov. Za natančno določanje dolžine mikrosatelitskih alelov uporabimo dolžinski (eksterni) standard (npr. ALFexpress Sizer, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 500 bp Amersham Biosciences), notranje (interne) standarde, pa pri omenjenem sistemu uporabimo za poravnavo fragmentov enake dolžine, saj med elektroforezo pride do odklona potovanja v različnih delih gela. Če želimo, da so fragmenti na gelu poravnani po vsej širini čim bolj natančno, potem pri elektroforezi posameznega mikrosatelitskega lokusa vedno uporabimo 2 interna standarda (krajšega in daljšega od pričakovane dolžine mikrosatelitskih alelov). Vendar pa tudi pri mikrosatelitskih markerjih obstajajo nekatere omejitve, kot je npr. ta, da pri PCR namnoževanju lahko namesto enega ali dveh pričakovanih fragmentov (alelov) dobimo skupino fragmentov, ki se med seboj razlikujejo le za 2 bp. Dodatni fragmenti, imenovani tudi sekundarni fragmenti (angl. stutter bands), so običajno posledica zdrsa med amplifikacijo s *Taq* polimerazo in zato je določanje dolžin alelov lahko oteženo, še posebej če se dva alela razlikujeta samo za dva bp in je potrebno ločevati homo- in heterozigotno obliko.

5 KARAKTERIZACIJA MIKROSATELITSKIH MARKERJEV

V zadnjih letih je bilo pri vinski trti razvitih več kot 500 mikrosatelitskih markerjev, ki so javno dostopni (Bowers in sod., 1996, 1999, Sefc in sod., 1999, Lefort in sod., 2001, Arroyo-Garciab in sod., 2004, Adam-Blondon in sod., 2004, Di Gaspero in sod., 2005, Merdinoglu in sod., 2005, Goto-Yamamoto in sod., 2006, VMC - Vitis Microsatellite Consortium, 1997-2004). Njihov izredni potencial in uporabnost pri določanju kultivarjev vinske trte in podlag je bil dokazan v številnih raziskavah in narejena je bila identifikacija kultivarjev vinske trte v večini evropskih vinorodnih dežel. V raziskavah genotipizacije vinske trte se večinoma uporablja set šestih (projekt Genres081) oz. devetih (projekt GrapeGen06) mikrosatelitskih markerjev, ki so zelo polimorfni in najbolj primerni za ugotavljanje genetske variabilnosti med evropskimi kultivarji vinske trte (Sefc in sod., 2001).

Mikrosatelitske markerje vrednotimo na osnovi različnih parametrov variabilnosti: dejanska heterozigotnost (H_o) predstavlja delež heterozigotnih posameznikov v analiziranem vzorcu; pričakovana heterozigotnost (H_e) ali genetska raznolikost predstavlja delež populacije, ki bi bila heterozigotna, v primeru, da bi med posamezniki prišlo do naključnega križanja, hkrati pa predstavlja zmožnost markerja za ločevanje med genotipi; informacijska vrednostjo polimorfizma (PIC – Polymorphic Information Content) predstavlja informativnost posameznega markerja oz. stopnjo pri kateri z markerjem nedvoumno določimo genetsko identiteto posameznika in vključuje tako število alelov odkritih na posameznem lokusu, kot tudi frekvence posameznih alelov; verjetnostjo enakosti genotipov (PI – Probability of Identity) pa predstavlja verjetnost, da imata katerakoli dva naključno izbrana posameznika dva enaka alela na proučevanem lokusu in višja vrednost PI kaže na nizko informativnost, kar je ponavadi posledica majhnega števila alelov ali pa visoke frekvence enega izmed alelov.

V preglednici 1 so predstavljeni parametri variabilnosti za 10 SSR lokusov, ki so bili analizirani na osnovi 54 genotipov vinske trte s slovenskega Primorja. V povprečju se je pri analiziranih sortah namnožilo 9,8 alelov na lokus, kar je podobno rezultatom analiz drugih nacionalnih kolekcij vinske trte (Sefc s sod., 2000; Lefort and Roubelakis-Angelakis 2001; Lopes s sod., 1999; Ibáñez s sod., 2003). Pri slovenskih *Vitis vinifera* L. sortah sta bila najbolj informativna lokusa SsrVrZAG79 in VVMD5 s PIC vrednostjo 0,83. Zanimivo je dejstvo, da je dobljeni rezultat za lokus SsrVrZAG79 v nasprotju z rezultatom, dobljenim za portugalske sorte vinske trte (Lopes s sod., 1999), pri katerih je bil ta lokus ocenjen kot najmanj informativen. S tem primerom lahko potrdimo navedbe Sefc in sod. (2000), da je informacijska vrednost posameznega markerja odvisna od niza vzorcev, ki jih analiziramo, kar je povezano z dejstvom, da v različnih regijah, kjer raste vinska trta, prevladujejo različni aleli. Vrednosti dejanske heterozigotnosti so pri analiziranih slovenskih sortah vinske trte na 6 lokusih nižje od vrednosti pričakovane heterozigotnosti. Največja razlika med omenjenima vrednostma je bila odkrita pri lokusu VVMD36, kar je lahko posledica prisotnosti ničtih alelov na tem lokusu. Prisotnost ničtih alelov na omenjenem lokusu je v preteklosti že bila potrjena (Vouillamoz s sod., 2004) in delno je potrjena tudi z našo analizo, saj pri nekaj vzorcih ni bilo PCR amplifikacije, kar bi lahko pomenilo, da gre za prisotnost homozigotnih ničtih genotipov. Na osnovi nizkih vrednosti za verjetnost enakosti genotipov (0,07–0,19) na posameznih proučevanih lokusih lahko rečemo, da so aleli enakomerno razporejeni med analiziranimi vzorci. Pri treh od desetih markerjev (SsrVrZAG79, VVMD5, VVMD32) so bile PI vrednosti manjše od 0,10, kar pomeni, da so ti lokusi zelo informativni. Največja verjetnost enakosti genotipov (PI) pa je bila, kljub velikemu številu namnoženih alelov (10 alelov), ugotovljena pri lokusu VVMD7, kar je posledica neenakomerne razporeditve frekvenc alelov v analiziranem vzorcu.

Preglednica 1: Parametri variabilnosti po posameznih lokusih izraženi z dejansko heterozigotnostjo (Ho), pričakovano heterozigotnostjo (He), informacijsko vrednostjo polimorfizma (PIC), in verjetnostjo enakosti genotipov (PI).

Table 1: The parameters of variability including observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), polymorphic information content (PIC) and probability of identity (PI) calculated for different loci.

Lokus	Št. alelov	Ho	He	PIC	PI
SsrVrZAG79	13	0,815	0,859	0,834	0,072
VVMD5	9	0,755	0,853	0,828	0,075
VVMD32	11	0,868	0,814	0,788	0,098
SsrVrZAG62	9	0,870	0,817	0,783	0,115
VVS2	10	0,808	0,790	0,756	0,125
SsrVrZAG21	8	0,852	0,787	0,754	0,127
VVMD25	9	0,759	0,790	0,751	0,140
VVMD36	11	0,596	0,762	0,728	0,140
SsrVrZAG47	8	0,759	0,786	0,745	0,150
VVMD7	10	0,741	0,745	0,697	0,191
Total	106				^a 8.32x10 ⁻¹¹
Average	9,8	0,782	0,8	0,766	

^a Zmnožek vrednosti vseh lokusov.

6 GENOTIPIZACIJA VINSKE TRTE

Skupen cilj evropskih projektov, ki se nanašajo na vinsko trto je postavitev javno dostopne mikrosatelitske podatkovne zbirke, ki bi obsegala genotipe vinske trte iz vseh vinorodnih evropskih držav. Trenutno pa mednarodna mikrosatelitna zbirka (VIVC - Vitis International Variety Catalogue), ki je bila narejena v okviru evropskega projekta Genres081, omogoča identifikacijo 46-ih evropskih kultivarjev z uporabo 6-ih mikrosatelitskih markerjev. Nekatere vinorodne dežele imajo javno dostopne mikrosatelitske podatkovne zbirke, ki vključujejo genotipe domačih sort vinske trte in tujih kultivarjev, ki jih tudi gojijo na določenem območju. Tako npr. švicarska mikrosatelitska podatkovna zbirka (SVMD - Swiss Vitis Microsatellite Database) vključuje genotipe za 170 sort vinske trte analizirane na šestih mikrosatelitskih lokusih (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 and VrZAG79), ki rastejo na območju Švice. Grška zbirka (Greek Vitis Microsatellite Database) obsega vse možne podatke o trtah, ki rastejo v Grčiji in je kombinacija dveh starejših ampelografskih podatkovnih baz, dopolnjena z mikrosatelitskimi podatki (298 sort in podlag). Italijanska podatkovna zbirka (GMC - Grape Microsatellite Collection) pa omogoča celoten pregled mikrosatelitskih analiz vinske trte narejenih v različnih laboratorijih/državah in tako vključuje tudi podatke o avtorjih ter metodi dela. Hrvaška mikrosatelitska podatkovna zbirka vključuje genotipe 34 kultivarjev z ampelografskimi opisi in v glavnem gre za stare sorte, zgodovinsko povezane s hrvaškim teritorijem (Maletić

in sod., 1999). Obstajajo pa še nekatere mikrosatelitske podatkovne zbirke (kot npr. zbirka Univerze v Kaliforniji, INRA – Francija, idr.), ki niso javno dostopne.

6.1 Genotipizacija slovenskih sort vinske trte

Slovenija ima dolgo vinogradniško tradicijo. Kompleksnost tipov klime in tal, pomemben zgodovinski in geografski prostor, vse to je vodilo k raznolikosti trtnih sort, tipov, sinonimov in homonimov, ki jih je potrebno urediti in evidentirati. Napad trtne uši (*Viteus vitifoliae* Fitch) v začetku 20. stoletja, dve svetovni vojni, propad kmetij v času socializacije kmetijstva, so okrnile trsni izbor. Včasih so vinogradniki gojili predvsem lokalne, manj poznane sorte, ki pa so v času intenzivne obnove vinogradov izginile in nadomestile so jih nove, razširjene sorte, ki jih gojijo tudi drugod po Evropi (Korošec- Koruza, 1992). Po letu 1970 se je začela svetovna akcija zbiranja, ohranjanja in vrednotenja starih kultivarjev in klonov ter organizacija kolekcijskih nasadov, katere osnovni namen je zbiranje genskega materiala vinske trte za nadaljnje žlahtnjenje.

Uporaba mikrosatelitskih markerjev nam omogoča tudi identifikacijo in določanje sorodnosti pri starih sortah vinske trte, ki so ohranjene v kolekcijskih nasadih ali pa jih najdemo samo še v nekaterih vinogradih, kjer jih ponavadi gojijo v manjšem obsegu. Glede na to, da so

opisi teh sort in z njimi povezani razpoložljivi podatki zelo nepopolni oz. okrnjeni, je potrebno nekatere kultivarje tudi identificirati oz. razrešiti njihovo poimenovanje. Večkrat za neko sorto obstaja več sinonimov, kar pomeni, da se posamezne sorte različno imenujejo, čeprav so genotipsko enake, kar lahko dokažemo z analizo mikrosatelitov. V nekaterih primerih pa poznamo tudi skupine oz. pare sort, ki imajo enako ali zelo podobno poimenovanje, v svoji genetski zasnovi pa so različne in take sorte imenujemo homonimi.

V Sloveniji so stari kultivarji ohranjeni v kolekcijskih nasadih na štirih lokacijah, in sicer v Ložah pri Vipavi, v Novi Gorici, na Dobrovem-Goriška Brda in v Ormožu in v nekaterih starih vinogradih. Vendar pa so razpoložljivi podatki za omenjene sorte pogosto nepopolni ali netočni. Težava, ki se pojavlja pri identifikaciji starih sort je tudi njihovo poimenovanje, saj je pestro zgodovinsko dogajanje in s tem povezano večjezično območje, prispevalo k različnemu poimenovanju starih sort, ki jih danes odkrivamo pod različnimi sinonimi. Poleg tega pa so populacije *Vitis vinifera* L. pogosto zelo heterogene oz. so trsi posameznega klona pogosto zelo neizenačeni, kar tudi ovira identifikacijo na morfološkem nivoju. Zato smo v preteklosti z mikrosatelitskimi markerji genotipizirali 33 slovenskih sort, ki rastejo v kolekcijskih nasadih v Vipavski dolini, Novi Gorici in Goriških Brdih (Štajner in sod., 2008) ter 38 starih slovenski sort, ki so bile pridobljene iz različnih vinogradov Vipavske doline in Slovenske Istre (Štajner in sod., v tisku). V analizi podobnosti smo identificirali 11 skupin sinonimov in nekaj homonimov, kot npr. sorte z imenom Rebula (Rebula, Stara Rebula in Rebula-100let), ki na osnovi genetske analize kažejo veliko raznolikost. Poleg tega

smo potrdili nekatere domneve o identičnosti sort, ki so bile narejene na podlagi morfoloških znakov rastlin in tako smo npr. s pomočjo analize mikrosatelitov ugotovili, da je sorta Ferjanščkova sinonim za Merlot, ter da je Grganc sinonim za Rebulo, kar pomeni, da se je starodavno poimenovanje očitno ohranilo na nekaterih področjih v Slovenski Istri. Med skupinami sinonimov, ki smo jih dobili z analizami mikrosatelitov izstopa skupina petih sinonimov (Glera = Prosecco = Briška Glera = Števerjana = Beli teran). Nekateri izmed njih so bili v preteklosti že opisani, medtem ko je npr. Števerjana povsem nov sinonim za omenjene sorte. Velika raznolikost na osnovi mikrosatelitskih lokusov pa je bila odkrita med Glero/Briško Glero in Belo Glero, kar bi lahko razložili z dejstvom, da se je v preteklosti ime Glera uporabljalo za različne bele sorte vinske trte, ki so rasle v submediteranskem delu Slovenije. Pri primerjavi nekaterih slovenskih sort s hrvaškimi, ki so jih genotipizirali Maletić in sod. (1999) smo tudi odkrili tako sinonime kot homonime; tako je bila npr. na osnovi 7 mikrosatelitskih lokusov potrjena identičnost med sortama Muškat Ruža Porečki (hrvaška) in Cipro (slovenska) ter med sortama Ranfol bijeli (hrvaška) in Belina Pleterje (slovenska). Homonim je bil odkrit med hrvaško sorto Plavina (Calo in sod., 2008) in slovensko sorto z enakim imenom, saj je njuna podobnost na osnovi SSR analize le 20%. Prav tako se med seboj zelo razlikujejo slovenska, hrvaška (Calo s sod., 2008) in italijanska (Muganu in sod., 2009) sorta z imenom Pagadebiti. Italijanska beseda pagadebito pomeni 'plačevanje davkov' in to poimenovanje se je včasih uporabljalo za različne zelo produktivne sorte, katerih pridelek so imeli za plačevanje davkov in tako je pričakovati, da se pod tem imenom skriva več različnih sort oz. homonimov.

7 LITERATURA

- Adam-Blondon, A.F., Roux, C., Claux, D., Butterlin G., Merdinoglu, D., This, P. (2004): Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor. Appl. Genet.*, 109:1017-27.
- Armour, J.A.L., Alegre, S.A., Miles, S., Williams, L.J., Badge, R.M. (1999): Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. V: *Microsatellites - evolution and applications*. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 24-33.
- Arroyo-Garcia, R., Martinez-Zapater, J.M. (2004): Development and characterization of new microsatellite markers for grape. *Vitis*, 43:175-178.
- Benin, M., Gasquez, J., Mahfoudi, A., Bessis, R. (1988): Caractérisation biochimique des cépages de *Vitis vinifera* L. par électrophorèse d' isoenzymes foliaires: essai de classification des variétés. *Vitis*, 27: 157-172.
- Blanquer-Maumont, A., Crouau-Roy, B. (1995): Polymorphism, monomorphism, and sequences in conserved microsatellites in primate species. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 492-497.
- Bourquin, J.C., Otten, L., Walter, B. (1991): Identification of grapevine root-stocks by RFLP. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III*, 312: 593-598.
- Bourquin, J.C., Sonko, A., Otten, L., Walter, B. (1993): Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 31-438.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R., Meredith, C.P. (1996): Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L). *Genome*, 39:628-633.

- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Meredith, C.P. (1999): Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50:243-246.
- Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Huhne, J., Rolf, B. (1998): Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *American Journal of Human Genetics*, 62:1408–1415.
- Brondani, R.P.V., Brondani, C., Tarchini, R., Grattapaglia, D. (1998): Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 816-827.
- Callan, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Philips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C., Sutherland, G.R. (1993): Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52: 922-927
- Calò, A., Costacurta, A., Paludetti, G., Calo, G., Aruselkar, S., Parfit D. (1989): The use of isoenzyme markers to characterize grape cultivars. *Rivista Vitic. Enol.*, 42: 15-22.
- Calò, A., Costacurta, A., Maras, V., Meneghetti S., Crespan M. (2008): Molecular Correlation of Zinfandel (Primitivo) with Austrian, Croatian, and Hungarian Cultivars and Kratošija, an Additional Synonym. *Am. J. Enol. Vitic.*, 59:205-209.
- Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., McCouch, S.R. (1997): Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 553–567.
- Cipriani, G., Frazza, G., Peterlunger, E., Testolin R. (1994): Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. *Vitis* 33: 211-215.
- Di Gaspero, G., Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Andreetta, D., Castro, M.J.P., Peterlunger, E., Testolin, R. (2005): Isolation of (AC)_n-microsatellites in *Vitis vinifera* L and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. *Mol. Breeding*, 15:11-20.
- Di Rienzo, A., Donnelly, P., Toomajian, C., Sisk, B., Hill, A., Petzl-Erler, M., Haines, G., Barch, D.H. (1998): Heterogeneity of microsatellite mutations within and between loci and implications for human demographic histories. *Genetics*, 148:1269–1284.
- Eisen, J.A. (1999): Mechanistic basis for microsatellite instability. V: Microsatellites - evolution and applications. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 34-48.
- Estoup, A., Cornuet, J.M., Rousset, F., Guyomard, R. (1999): Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: theoretical aspects. *Molecular Biology and Evolution*, 16:898–908.
- Goto-Yamamoto, N., Mouri, H., Azumi, M., Edwards, K.J. (2006): Development of grape microsatellite markers and microsatellite analysis including oriental cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57:105-108.
- Ibáñez, J., de Andrés M.T., Molino A., Borrego J. (2003): Genetic Study of Key Spanish Grapevine Varieties Using Microsatellite Analysis. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54:1:22-30.
- Jakse, J., Javornik, B. (2001): High Throughput Isolation of Microsatellites in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 217-226.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73.
- Korošec-Koruzza, Z. (1992): Varovanje in vrednotenje sorte raznolikosti vinske trte v Sloveniji. *Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljubl., Kmet.*, 157-162.
- Lahogue, F., This, P., Bouquet A. (1998): Identification of a codominant SCAR marker linked to seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 950-959.
- Lefort, F. Roubelakis-Angelakis K.A. (2001): Genetic comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by nuclear microsatellite profiling. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52:101-108.
- Levinson, G., Gutman G.A. (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 203-221.
- Lopes, M.S., K.M. Sefc, E. Eiras Dias, H. Steinkellner, M. Laimer da Câmara Machado, Câmara Machado A. (1999): The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. *Theor. Appl. Genet.*, 99:733-739.
- Maletić, E., K.M. Sefc, H. Steinkellner, J.K. Kontić, Pejić I. (1999): Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and detection of synonymous cultivars in neighboring regions. *Vitis*, 38: 79-83.
- Merdinoglu, D., Butterlin, G., Bevilacqua, L., Chiquet, V., Adam-Blondon, A.F., Decroocq, S. (2005): Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Mol. Breeding*, 15:349-366.
- Moreno, S., Gogorcena, Y., Ortiz J.M. (1995): The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hort.*, 62: 237-243.
- Muganu, M., Dangl, G., Aradhya, M., Frediani, M., Scossa, A., Stover, E. (2009): Ampelographic and DNA characterization of local grapevine accessions of the Tusciana area (Latium, Italy). *Am. J. Enol. Vitic.*, 60:110–115.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R. (1987): Variable number tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235: 1616-1622.
- Nauta, M.J., Weissing, F.J. (1996): Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics*, 143: 1021-1032.
- Orti, G., Pearse, D.E., Avise, J.C. (1997): Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 10745-10749.
- Rajora, O.P., Rahman, M.H., Dayanandan, S., Mosseler, A. (2001): Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species. *Molecular and General Genetics*, 264: 871-882.
- Sanchez-Escribano, E.M., Martin, J.P., Carreno, J., Cenis J.L. (1999): Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. *Genome*, 42: 87-93.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 211-215.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-71.
- Sefc, K.M., Regner, F., Glössl, J., Steinkellner, H. (1998): Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. *Vitis*, 37: 15-20.
- Sefc, K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J., Steinkellner, H. (1999): Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, 42:367-373.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Ibanez, J., Pejic, I., Wagner, H.W., Glössl, J., Steinkellner, H. (2000): Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 100:498-505.
- Sefc, K.M., Lefort, F., Grando, M.S., Scott, K., Steinkellner, H., Thomas, M. (2001): Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. In: *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*, K.A.Roubelakis-Angelakis editor, Kluwer Publishers, Amsterdam: 407-438.
- Stavrakakis, M., Loukas, M. (1983): The between -and within-grape-cultivars genetic variation. *Sci. Hort.*, 19: 321-334.
- Stavrakakis, M.N., Biniari, K. (1998): Genetic study of grape cultivars belonging to the Muscat family by 30 random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis*, 37: 119-122.
- Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., Petes, T.D. (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365:274-276
- Striem, M.J., Spiegel-Roy, P., Ben-Hayyim, G., Beckmann, J., Gidoni, D. (1990): Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes. *Vitis*, 29: 223-227.
- Štajner, N., Korosec-Koruza Z., Rusjan D., Javornik B. (2008): Microsatellite genotyping of old Slovenian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) of the Primorje (coastal) winegrowing region. *Vitis*, 47:201-204.
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G.A. (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322, 652-656.
- Taylor, J.S., Durkin, J.M.H., Breden, F. (1999): The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution*, 16:567-572.
- This, P., Cuisset, C., Boursiquot, J.M. (1997): Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48: 492-501.
- This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangi G.S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibanez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith X.P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., Maul, E. (2004): Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 109:1148-1158.
- This, P., Lacombe, T., Thomas, M.R. (2006): Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genetics*, 22:511-519.
- Thomas, M.R., Scott, N.S. (1993): Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 86: 985-990.
- Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P., Scott, N.S. (1993): Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 173-180.
- Tschammer, J. Zyprian, E. (1994): Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. *Vitis*, 33: 249-250.
- Van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., Verbrugh, H. (1998): Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 275-293.
- Viard, F., Franck, P., Dubois, M.P., Estoup, A., Jarne, P. (1998): Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution*, 47: 42-51.
- Vouillamoz, F., Maigre, D. Meredith, C.P. (2004): Identity and parentage of two alpine grape cultivars from Switzerland (*Vitis vinifera* L Lafnetscha and Himbertscha), *Vitis*, 43: 81-87.
- Weber, J.L., May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396.
- Weber, J.L., Wong, C. (1993): Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2: 1123-1128.
- Wierdl, M., Dominska, M., Petes, T.D. (1997): Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*, 146:769-779.